

Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes

**Utilização de diferentes substratos para a produção de
etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***

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
2009

Ernandes, Fernanda Maria Pagane Guerreschi.

Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis* / Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2009.

145 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Crispin Humberto Garcia-Cruz

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Alimentos - Microbiologia. 3. *Zymomonas mobilis*. 3. Etanol. 4. Levana. 5. Sorbitol. I. Garcia-Cruz, Crispin Humberto. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 663

FERNANDA MARIA PAGANE GUERESCHI ERNANDES

Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*

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.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz – Orientador – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – Campus São José do Rio Preto. Área de Atuação: Bioprocessos. Orientador

Profa. Dra. Eleni Gomes - Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista – Campus São José do Rio Preto. Área de Atuação: Microbiologia Industrial, Ambiental e de Alimentos. Titular

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre - Departamento de Engenharia de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP. Área de atuação: Bioengenharia. Titular

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi - Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista – Campus São José do Rio Preto, Área de Atuação: Bioprocessos. Titular

Prof. Dr. Hamilton Cabral - Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto/SP Área de atuação: Microbiologia aplicada. Titular

São José do Rio Preto, 03 de julho de 2009

Dedico este trabalho ao meu filho *Miguel*, a quem eu amo muito e que por várias vezes, no esforço de produzi-la, privei-o de minha presença.

Ao meu marido *Marsel*, que soube me apoiar e aconselhar nas horas mais difíceis.

Aos meus pais *Maria e Zeferino*, pelo apoio e dedicação.

Amo muito todos vocês.

Fernanda M. P. G. Ernandes

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus*, principalmente pela saúde e pela minha família.

É com carinho especial que agradeço meu orientador *Crispin Humberto Garcia-Cruz* pelo apoio, dedicação, incentivo, ensinamento, bom humor e amizade. As palavras serão sempre poucas para agradecer a confiança e a amizade.

À FAPESP pela concessão da bolsa para a realização deste trabalho e pelo financiamento do projeto.

Aos membros da banca examinadora pela análise rigorosa de cada capítulo, pelas sugestões, esclarecimentos e comentários sempre oportunos e que espero ter sabido aproveitar.

Aos colegas, estagiários, bolsistas e funcionários dos Laboratórios, amigos construídos e descobertos durante o percurso.

Um especial agradecimento às minhas amigas *Daniela Cristina dos Santos Bofo* e *Adriana Navarro da Silva* que me auxiliaram na coleta de dados, sugeriram melhorias, contribuindo muito para que esse trabalho chegasse ao resultado final. Obrigada pelas amizades, eternamente imprescindíveis. Amizades essas, que vão além do que as palavras podem expressar e que não conhecem tempo, nem distância.

Aos meus pais *Maria* e *Zeferino* pela criação, ensinamentos, educação, amor e incentivo a buscar constantemente o conhecimento.

Um eterno agradecimento ao meu esposo *Marsel* que sempre esteve ao meu lado e que muito se esforçou para compreender, com paciência e AMOR, as mais diversas formas do meu humor, nunca deixando de me apoiar e ajudar com seu divino carinho e dedicação. Te AMO MUITO!

E finalmente ao meu filho *Miguel*...

Por existires, eu recomeço muitas vezes, eu amadureço e aprendo a ser uma mãe cada vez melhor. A ti devo muito do que sou, pois a experiência de vivenciar, com seriedade, o papel de mãe, me oportunizou sorrisos, sofrimentos, cansaços, emoções que influenciaram minha personalidade e me levam, hoje, a tentar ser mais e melhor... para conservar o elo de amor que nos deve unir por toda a vida.

A todos agradeço, profundamente, e dedico o resultado do trabalho.

RESUMO

O principal produto da fermentação de açúcares por *Zymomonas mobilis* é o etanol quando glicose e frutose são utilizadas como fontes de carbono. Entretanto, quando sacarose é empregada na fermentação, o rendimento do etanol diminui devido à formação de subprodutos como levana, sorbitol, acetaldeído, ácido acético, pequenas quantidades de alguns álcoois superiores e fenol. A utilização de produtos agroindustriais, como o caldo e melão de cana-de-açúcar, é uma alternativa para reduzir o custo final dos produtos de fermentação devido à disponibilidade de aquisição e composição química desses substratos. Este trabalho teve como objetivo utilizar substratos alternativos e otimizar as condições de fermentação para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Também foi considerado o efeito da variação do substrato e de sais minerais adicionados nos meios de produção (sintético, caldo e melões de cana-de-açúcar). Para a obtenção dos produtos de fermentação, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, seguindo um planejamento fatorial do tipo 2^{7-2} , de acordo com o modelo proposto por Box e Hunter, onde as variáveis independentes estudadas foram: pH inicial do meio de cultivo, temperatura de incubação, concentração do substrato e efeito da adição de KCl, K_2SO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$. Durante a realização das fermentações foi observado que a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 se adaptou nos meios de fermentação contendo altas concentrações de sacarose e suportou a variação do pH e da temperatura de fermentação. O aumento da concentração da fonte de carbono favoreceu a formação dos produtos levana e etanol, entretanto, não houve produção de sorbitol. O meio sintético proporcionou maior rendimento de levana e etanol, enquanto que, os meios alternativos caldo e melões de cana-de-açúcar, favoreceram o crescimento celular. Das variáveis independentes analisadas com o melhor meio (sintético) para biossíntese do biopolímero e etanol, as que afetaram significativamente ($p < 0,05$) foram KCl, K_2SO_4 , $CaCl_2$ e sacarose. O pH inicial do meio de fermentação foi a variável que apresentou maior influência significativa ($p < 0,05$), no desenvolvimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. De acordo com o modelo matemático, os resultados obtidos

com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 demonstraram que o baixo valor de p encontrado para os interceptos levana (Y_1) e etanol (Y_2) indicou que os níveis foram bem escolhidos e que os coeficientes de regressão da equação descreveram acima de 80% o experimento, em ambos os casos. O bom desempenho do modelo adotado também pôde ser confirmado por não haver desvio significativo de regressão ($p>0,05$), tanto para Y_1 quanto para Y_2 .

Palavras-chave: levana, etanol, sorbitol, *Zymomonas mobilis*, metodologia de superfície de resposta, fermentação.

ABSTRACT

The main product from fermentation of sugars by *Zymomonas mobilis* is ethanol when glucose and fructose are used as carbon sources. However, when sucrose is used in the fermentation medium, ethanol yield decreases due to the formation of by-products such as levan, sorbitol, acetaldehyde, acetic acid, small amounts of some superior alcohols and phenol. The use of agro industrial by products, such as sugarcane juice and molasses, is an alternative to reduce the final cost of fermentation products due to the constant availability and to the chemical composition of these by substrates. This study had the aim of using alternative substrates and of optimizing fermentation conditions for the production of ethanol, levan and sorbitol by *Zymomonas mobilis* CCT 4494. The effect of variation of substrate and mineral salts added to the production media (synthetic, sugarcane juice and molasses) was also considered. To obtain the fermentation products, response surface methodology was employed, following a 2^{7-2} factorial planning, according to the model proposed by Box and Hunter, where the independent variables studied were: initial medium pH, incubation temperature, substrate concentration and effect of the addition of KCl, K_2SO_4 , $MgSO_4$, $CaCl_2$. During the fermentations, it was noted that the bacteria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 well adapted in the media containing high concentrations of sucrose and tolerated pH and temperature variations. The increase of carbon source concentration favored the formation of levan and ethanol, however, there was no sorbitol production. The synthetic medium offered higher levan and ethanol yield, whereas alternative media sugarcane juice and molasses, favored cellular growth. Among the independent variables analyzed with the best medium (synthetic) for biosynthesis of the biopolymer and ethanol, the ones that significantly ($p < 0.05$) affected were KCl, K_2SO_4 , $CaCl_2$ and sucrose. Initial fermentation medium pH was the variable that presented the highest significant ($p < 0.05$) influence on the development of *Zymomonas mobilis* CCT 4494. According to the mathematical model, the results obtained with *Zymomonas mobilis* CCT 4494 showed that the low p value found for the intercepts levan (Y_1) and ethanol (Y_2) indicated that the levels were well chosen and

that the regression coefficients of the equation described above 80% the experiment, in both cases. The good performance of the model used could also be confirmed by not having a significant regression deviation ($p>0.05$), for Y_1 as well as for Y_2 .

Keywords: levan, ethanol, sorbitol, *Zymomonas mobilis*, response surface methodology, fermentation.

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIACÕES	xi
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xviii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 OBJETIVO	3
2.1 GERAL	3
2.2 ESPECÍFICOS	3
3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	4
3.1 A BACTÉRIA <i>Zymomonas mobilis</i>	4
3.1.1 Características fisiológicas do microrganismo	4
3.2 PRODUTOS PRODUZIDOS POR <i>Zymomonas mobilis</i>	8
3.2.1 Etanol	8
3.2.1.1 Tecnologia da produção de etanol por <i>Zymomonas mobilis</i>	11
3.2.2 Levana	16
3.2.2.1 Tecnologia da produção de levana por <i>Zymomonas mobilis</i>	19
3.2.3 Sorbitol	23
3.2.3.1 Tecnologia da produção de sorbitol por <i>Zymomonas mobilis</i>	26
3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL, LEVANA E SORBITOL EM PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS DE BAIXO CUSTO COMERCIAL POR <i>Zymomonas mobilis</i>	28
3.3.1 Caldo de cana-de-açúcar	29
3.3.2 Melaços de cana-de-açúcar	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MICRORGANISMO	38
4.2 MEIOS DE CULTURA	38
4.2.1 Meio de Manutenção da Cultura	38
4.2.2 Meios de Fermentação	38
4.2.2.1 Meio Sintético	39
4.2.2.2 Meio com Caldo de Cana-de-Açúcar	39
4.2.2.3 Meios com Melaços de Cana-de-Açúcar	39
4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	40
4.3.1 Preparo do Pré-Inóculo	40
4.3.2 Pré-Fermentação	40
4.3.3 Fermentação	41
4.3.3.1 Padronização do Inóculo	41
4.3.3.1.1 Construção da curva de calibração para determinação da concentração celular a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	41
4.3.3.2 Otimização de alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol, levana e sorbitol por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	43
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	44
4.4.1 Coleta e preparo das amostras	45
4.4.2 Determinação do pH	45
4.4.3 Estimativa da Biomassa	45
4.4.4 Determinação de Etanol	45
4.4.5 Determinação de Levana	46

4.4.6	Determinação de Sorbitol	47
4.4.7	Determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)	48
4.4.8	Determinação da atividade da enzima levanasacarase “in vitro”	48
4.4.9	Produção e determinação de levana a partir do extrato enzimático	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	PRODUÇÃO DE SORBITOL COM O MEIO SINTÉTICO, CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MELAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR	55
5.2	PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM O MEIO SINTÉTICO	56
5.3	PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM O MEIO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	75
5.4	PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM OS MEIOS MELAÇOS DE CANA-DE AÇÚCAR	94
5.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LEVANASACARASE “IN VITRO” NO CALDO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE LEVANA A PARTIR DO EXTRATO ENZIMÁTIVO, NOS MELHORES PARÂMETROS FERMENTATIVOS	112
5.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE VARIÁVEIS PARA PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL POR <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE FERMENTAÇÃO	115
6	CONCLUSÕES	124
	ANEXO	126
7	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	131

LISTA DE ABREVIÇÕES

ADH	piruvato descarboxilase álcool deidrogenase
AR	Açúcares Redutores
AT	Açúcares Totais
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
EDA	2-ceto 3-dioxi 6-fosfogliconato aldolase
EDO	6-fosfogliconato desidrogenase
ENO	enolase
FRK	frutoquinase
GAP	gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
GFOR	glicose-frutose oxirredutase
GL	gliconolactonase
GLF	difusão facilitada
GLK	glicoquinase
GNTK	gliconatoquinase
HTM	melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade
INV B	invertase
LEV U	levansacarase
MSR	metodologia de superfície de resposta
NADP	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato
pc	ponto central
PDC	fosfatase
PDHC	piruvato desidrogenase
PGI	fosfoglicose isomerase
PGK	fosfoglicerato quinase
PGL	6-fosfogliconolactonase
PGM	fosfoglicerato mutase
PYK	piruvato quinase
TKT	transquetolase
TST	teores de sólidos totais
ZWF	glicose-6-fosfato desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

Y_1	levana
Y_2	etanol
Y_3	sorbitol
X_1	pH
X_2	T°C
X_3	KCl
X_4	K ₂ SO ₄
X_5	MgSO ₄
X_6	CaCl ₂
X_7	Sacarose / TST

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Metabolismo dos carboidratos em <i>Zymomonas mobilis</i> . Fonte: Sprenger (1996).	07
Figura 3.2	Catabolismo da glicose. Fonte: Lehniger (2002).	09
Figura 3.3	Estrutura β (2 \rightarrow 6) da ramificação principal da levana.	17
Figura 4.1	Estratégia realizada com diferentes meios de fermentação para a produção de levana (Y_1), etanol (Y_2) e sorbitol (Y_3), por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	43
Figura 4.2	Esquema de tratamento analítico das amostras obtidas após processo fermentativo, por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	44
Figura 4.3	Fluxograma de separação, hidrólise e quantificação de levana por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, após fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.	47
Figura 5.1	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e temperatura de incubação (°C) (Levana (mg/mL) = $0,3388 - 0,0007 * x + 0,0062 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $0,2694 + 0,0081 * x + 0,0062 * y$).	60
Figura 5.2	Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e CaCl_2 (g/L) (Levana (mg/mL) = $-0,4573 + 0,1292 * x + 0,0062 * y$).	62
Figura 5.3	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e KCl (g/L) (Levana (mg/mL) = $-0,3254 + 0,056 * x + 0,0062 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e K_2SO_4 (Levana (mg/mL) = $-0,2778 + 0,0518 * x + 0,0062 * y$).	63
Figura 5.4	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 2, utilizando o meio sintético fermentado, por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	64
Figura 5.5	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 11, utilizando o meio sintético fermentado, por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	65
Figura 5.6	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e temperatura (°C) (Etanol (mg/mL) = $-0,398 + 0,2407 * x + 0,0865 * y$).	67

Figura 5.7	Superfície de resposta para etanol (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose comercial (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $3,592+0,5384*x+0,0865*y$).	68
Figura 5.8	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose comercial (g/L) e KCl (g/L) (Etanol (mg/mL) = $1,3226+0,4783*x+0,0865*y$).	69
Figura 5.9	(a) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e K_2SO_4 (Etanol (mg/mL) = $13,3357-0,5663*x+0,0865*y$); (b) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e $CaCl_2$ (g/L) (Etanol (mg/mL) = $12,1154-0,8821*x+0,0865*y$).	70
Figura 5.10	Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-1,5057+0,4756*x+0,0014*y$).	72
Figura 5.11	Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,9693+0,0126*x+0,0014*y$).	73
Figura 5.12	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e $CaCl_2$ (g/L) (Levana (mg/mL) = $-0,0522+0,0147*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e K_2SO_4 (Levana (mg/mL) = $-0,0044+0,0035*x+0,0018*y$).	80
Figura 5.13	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e KCl (g/L) (Levana (mg/mL) = $0,0686-0,0028*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e $MgSO_4$ (Levana (mg/mL) = $-0,0042+0,0032*x+0,0018*y$).	81
Figura 5.14	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $0,0106+0,0042*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura de incubação (°C) (Levana (mg/mL) = $0,0631-0,0009*x+0,0018*y$).	82
Figura 5.15	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 19, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494	83

Figura 5.16	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 13, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	84
Figura 5.17	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e T (°C) (Etanol (mg/mL) = $2,1-0,0356*x+0,0022*y$).	85
Figura 5.18	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de KCl (g/L) e pH (Etanol (mg/mL)= $-0,2345+0,1641*x+0,0537*y$).	86
Figura 5.19	(a) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $-0,1095+0,1641*x+0,082*y$); (b) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $0,0487+0,1641*x+0,0022*y$).	87
Figura 5.20	(a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-2,9663+1,1409*x-0,0003*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-1,5057+0,4756*x+0,0014*y$).	89
Figura 5.21	(a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $3,5062+0,0124*x-0,0003*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,9693+0,0126*x+0,0014*y$).	90
Figura 5.22	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio sintético fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	92
Figura 5.23	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	93
Figura 5.24	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura de incubação (°C) (Levana (mg/mL) = $-0,8276+0,017*x+0,0084*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e temperatura de incubação (°C) (Levana (mg/mL) = $0,3308+0,017*x+0,0179*y$).	97
Figura 5.25	a) Superfície de resposta para levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de KCl (g/L) e temperatura de incubação (°C)	98

	(Levana (mg/mL) = $0,3308+0,017*x+0,0179*y$); b) Superfície de resposta para levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $0,7564+0,0141*x+0,0179*y$).	
Figura 5.26	Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e CaCl_2 (g/L) (Levana (mg/mL) = $0,0016+0,0272*x+0,0023*y$).	100
Figura 5.27	(a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $-0,402+0,0141*x+0,0084*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (equação: Levana = $0,0039+0,0269*x+0,0023*y$).	101
Figura 5.28	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Etanol (mg/mL) = $0,1403-0,0033*x+0,0002*y$).	102
Figura 5.29	Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Etanol (mg/mL) = $0,0466-0,0011*x+7,2812*y$).	103
Figura 5.30	Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	107
Figura 5.31	(a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e pH do meio de fermentação (Biomassa (mg/mL) = $-1,1243+0,5625*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (Biomassa (mg/mL) = $-1,0598+0,5214*x+0,002*y$).	108
Figura 5.32	(a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Biomassa (mg/mL) = $0,162+0,0696*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (Biomassa (mg/mL) = $0,1027+0,0655*x+0,002*y$).	109
Figura 5.33	Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e KCl (g/L) (Biomassa (mg/mL) = $1,6768+0,0499*x+0,0018*y$).	110

Figura 5.34	(a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e CaCl_2 (g/L) (Biomassa (mg/mL) = $2,043+0,0346*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e MgSO_4 (g/L) (Biomassa (mg/mL) = $2,5945-0,0275*x+0,0018*y$).	111
Figura 1.A	Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.	127
Figura 1.B	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).	128
Figura 1.C	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois e colaboradores (1956).	129
Figura 1.D	Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (umol/mL) pelo método Glicose-Oxidase-Peroxidase.	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Porcentagem de crescimento de linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de pH.	05
Tabela 3.2	Porcentagem de crescimento de linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> em diferentes valores de temperatura de incubação (°C).	05
Tabela 3.3	Estudo comparativo entre a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> e a levedura <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> utilizando meio de cultura com concentração inicial de glicose de 100,0 g/L com relação à produção de etanol.	11
Tabela 3.4	Efeito do pH inicial sobre a produção de etanol por várias linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	14
Tabela 3.5	Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	14
Tabela 3.6	Microrganismos produtores de levana.	18
Tabela 3.7	Diversas aplicações do sorbitol em função de suas propriedades.	25
Tabela 3.8	Composição do caldo de cana-de-açúcar.	30
Tabela 3.9	Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	30
Tabela 3.10	Variabilidade de composição do melaço em Usinas de Açúcar.	35
Tabela 3.11	Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de <i>Zymomonas mobilis</i> .	37
Tabela 4.1	Meio de manutenção do microrganismo <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	38
Tabela 4.2	Meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986).	39
Tabela 4.3	Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção de levana (Y_1), etanol (Y_2) e sorbitol (Y_3), por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494.	44
Tabela 5.1	Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio sintético (bloco 1) acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	51

Tabela 5.2	Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar (bloco 2) acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	52
Tabela 5.3	Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM (bloco 3) acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	53
Tabela 5.4	Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar (bloco 4) acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	54
Tabela 5.5	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	58
Tabela 5.6	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	66
Tabela 5.7	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta biomassa, utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	71
Tabela 5.8	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	78
Tabela 5.9	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos	84

	efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.	
Tabela 5.10	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.	96
Tabela 5.11	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.	99
Tabela 5.12	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.	103
Tabela 5.13	Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.	104
Tabela 1.A	Valores de absorbância de suspensões de <i>Zymomonas mobilis</i> CCT 4494 a 570 nm, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após pré-fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.	127
Tabela 1.B	Valores de absorbância a 540 nm obtidos de amostras contendo diferentes concentrações de frutose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).	128
Tabela 1.C	Valores de absorbância a 490 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Dubois e colaboradores (1956).	129
Tabela 1.D	Valores de absorbância a 500 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (umol/mL) para a	130

	confeção da curva de calibração pelo método Glicose-Oxidase- Peroxidase.	
--	--	--

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A crise do petróleo de 1973 gerou grande interesse na busca de recursos energéticos renováveis, assim como em encontrar fontes de recursos orgânicos capazes de substituir os atuais produtos petroquímicos. Desta forma, por um lado realizaram-se esforços para melhorar a rentabilidade dos processos de obtenção de bioálcool, e por outro se tratou de substituir os processos do tipo químico por outros do tipo biológico.

Devido à queda no preço do petróleo, no início da década de 80, estes estudos perderam impulso durante certo tempo; contudo, a consciência de que os combustíveis fósseis vão se esgotar e que é necessário utilizar tecnologias menos contaminantes, tem feito renascer o interesse nestes processos biológicos.

Na fermentação alcoólica, as leveduras são os microrganismos comumente utilizados em nível industrial. Contudo, nos últimos 15 anos, a bactéria *Zymomonas mobilis* vem despertando muito interesse pelo seu potencial na produção de etanol, produzindo cerca de 1,9 mol de etanol por mol de glicose e com velocidade três a quatro vezes maior que *Saccharomyces cerevisiae*. Apesar das vantagens apresentadas por *Zymomonas mobilis* perante as leveduras (fermentações mais rápidas com maior rendimento em etanol; condições de crescimento mais simples; maior taxa específica de produção de álcool e consumo de substrato; maior tolerância a elevadas temperaturas, concentração de açúcar e etanol) o rendimento fermentativo diminui quando se utiliza sacarose como carboidrato para a fermentação. Isto é devido, segundo alguns autores, à formação de subprodutos como levana e sorbitol.

Nem sempre têm sido consideradas as condições de cultivo e os processos fermentativos para determinar os parâmetros que um determinado microrganismo necessita para uma ótima síntese dos produtos de fermentação. Na literatura, quando disponíveis, os dados publicados demonstram que a temperatura e o pH ideais usados para a fermentação com *Zymomonas mobilis* dependerão do que se deseja maximizar no final do processo.

As influências do pH, da temperatura e a composição do meio de fermentação com *Zymomonas mobilis* são pesquisadas com o objetivo de aumentar a produção de etanol e reduzir a formação de subprodutos, porém são raros os trabalhos existentes que visam melhorar o desempenho da bactéria para a produção destes mesmos subprodutos.

Os substratos utilizados na fermentação alcoólica são caros, o que inviabiliza o custo do produto final. Isto poderia ser melhorado com a utilização de matérias primas regionais e destas o aproveitamento do caldo de cana e de melaços de cana-de-açúcar, como substratos no processo biotecnológico, é uma alternativa atrativa e promissora.

A presente proposta buscou otimizar as condições de fermentação utilizando substratos alternativos para a produção de etanol, levana e sorbitol, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, considerando o efeito da variação de diferentes concentrações de sacarose e de sais minerais, as quais serão adicionadas nos meios de produção, bem como a influência da temperatura de incubação e do pH inicial. Além disso, foi determinada a atividade da enzima levanasacarase “in vitro” no caldo de fermentação para, posteriormente, realizar as fermentações, a partir do caldo enzimático obtido nos melhores parâmetros de fermentação realizados com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e comparar os rendimentos de levana obtidos em ambos os casos.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol, levana e sorbitol pelo microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

2.2 ESPECÍFICOS

- Estudar a produção de etanol, levana e sorbitol pelo microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando meio sintético, caldo de cana e melaços de cana-de-açúcar;
- Aplicar a metodologia de superfície de resposta (MSR) para estudar o efeito das variáveis independentes como pH do meio de cultivo, temperatura de incubação, concentração do substrato e de KCl, K₂SO₄, MgSO₄, CaCl₂ para obtenção dos produtos de fermentação;
- Determinar a atividade da enzima levanasacarase “*in vitro*” no caldo de fermentação obtido nos melhores parâmetros de fermentação com *Zymomonas mobilis* CCT 4494;
- Utilizar o extrato enzimático bruto nos melhores parâmetros de fermentação obtidos para *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e comparar os rendimentos de levana em ambos os casos.

3 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 A BACTÉRIA *Zymomonas mobilis*

3.1.1 Características fisiológicas do microrganismo

A bactéria *Zymomonas mobilis* é Gram-negativa, não esporulante e móvel, anaeróbia facultativa. Morfologicamente, apresenta-se na forma de bastonete curto, medindo de 2,0 a 6,0 μm de comprimento e 1,0 a 1,4 μm de largura. Quando apresenta mobilidade, possui de um a quatro flagelos polares (FALCÃO DE MORAIS, 1983). São encontradas geralmente em pares, embora também apareçam isoladas.

Em meios com altas concentrações de açúcar (melaço com mais de 15° Brix), estas bactérias ocorrem como longos filamentos de extremidades dilatadas. Em meio sólido à base de glicose, as colônias apresentam-se lenticulares de bordas regulares, de coloração branca ou creme e com 1,0 a 2,0 mm de diâmetro após 2 dias de incubação a 30°C (SWINGS; DE LEY, 1977).

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. Cultivadas em meio complexo, podem converter 98% da glicose presente em etanol, CO₂, lactato e outros, seguindo balanço metabólico simples. Apenas 2% da glicose são utilizados para formar biomassa. As Tabelas 3.1 e 3.2 mostram a porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH e temperatura de incubação, respectivamente (SWINGS; DE LEY, 1977).

Tabela 3.1 Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de pH.

pH inicial	% de crescimento de linhagens
3,05	0
3,5	43
3,7	71
3,85	90
4,5	100
5,7	87
8,0	0

Fonte: Swings e De Ley (1977).

Tabela 3.2 Porcentagem de crescimento de linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes valores de temperatura de incubação (°C).

Temperatura de Incubação (°C)	% de crescimento de linhagens
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

Fonte: Swings e De Ley (1977).

Açúcares fermentáveis, como glicose, frutose e, em alguns casos, sacarose, são indispensáveis na composição do meio de cultura de *Zymomonas mobilis*. Esta, fermenta glicose e frutose gerando quantidades praticamente equimolares de etanol e CO₂, formando colônias de coloração branca ou creme.

Na hidrólise da sacarose, ou de misturas de glicose e frutose, os subprodutos da formação de etanol são a levana e o sorbitol. A frutose, formada da hidrólise da sacarose, não é primariamente transportada para o interior das células, mas sim utilizada na formação de levana e frutooligômeros pela ação da enzima levanasacarase (LOOS et al., 1994).

A maioria das cepas requer ácido pantotênico, biotina e, ocasionalmente, alguns outros fatores de crescimento como vitamina B₁₂, riboflavina, tiamina, ácido lipóico e ácido fólico. Além disso, altas quantidades de extrato de levedura aumentam a produção de células, mas não necessariamente a produtividade de etanol, levana ou sorbitol (CROMIE; DOELLE, 1980).

Belaich e Senez (1965) estudaram o efeito de pantotenato no crescimento de *Zymomonas mobilis* e observaram que a limitação desta substância resulta na redução da velocidade específica de crescimento da bactéria. Os autores citam que o pantotenato é uma vitamina essencial à produção de etanol porque a bactéria não a sintetiza, mas necessita desta substância para produzir compostos orgânicos essenciais para o crescimento celular, produzindo, conseqüentemente, etanol.

Possuem rotas catabólicas comparativamente simples e não tem a variedade de alternativas metabólicas encontradas em outros microrganismos. De forma a gerar energia suficiente para o crescimento, *Zymomonas mobilis* deve catabolizar substratos com altas taxas específicas de carbono, resultando em baixos rendimentos de biomassa, pois a maior parte deste substrato é incorporado no catabolismo do produto final, o etanol (TOMA et al., 2003).

O metabolismo de açúcares de *Zymomonas mobilis*, ilustrado na Figura 3.1, aparece como uma “via metabólica” com algumas ramificações. A sacarose é metabolizada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato) que existe na bactéria *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR, que está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. Gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas (GL e GFOR) são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (SPRENGER, 1996).

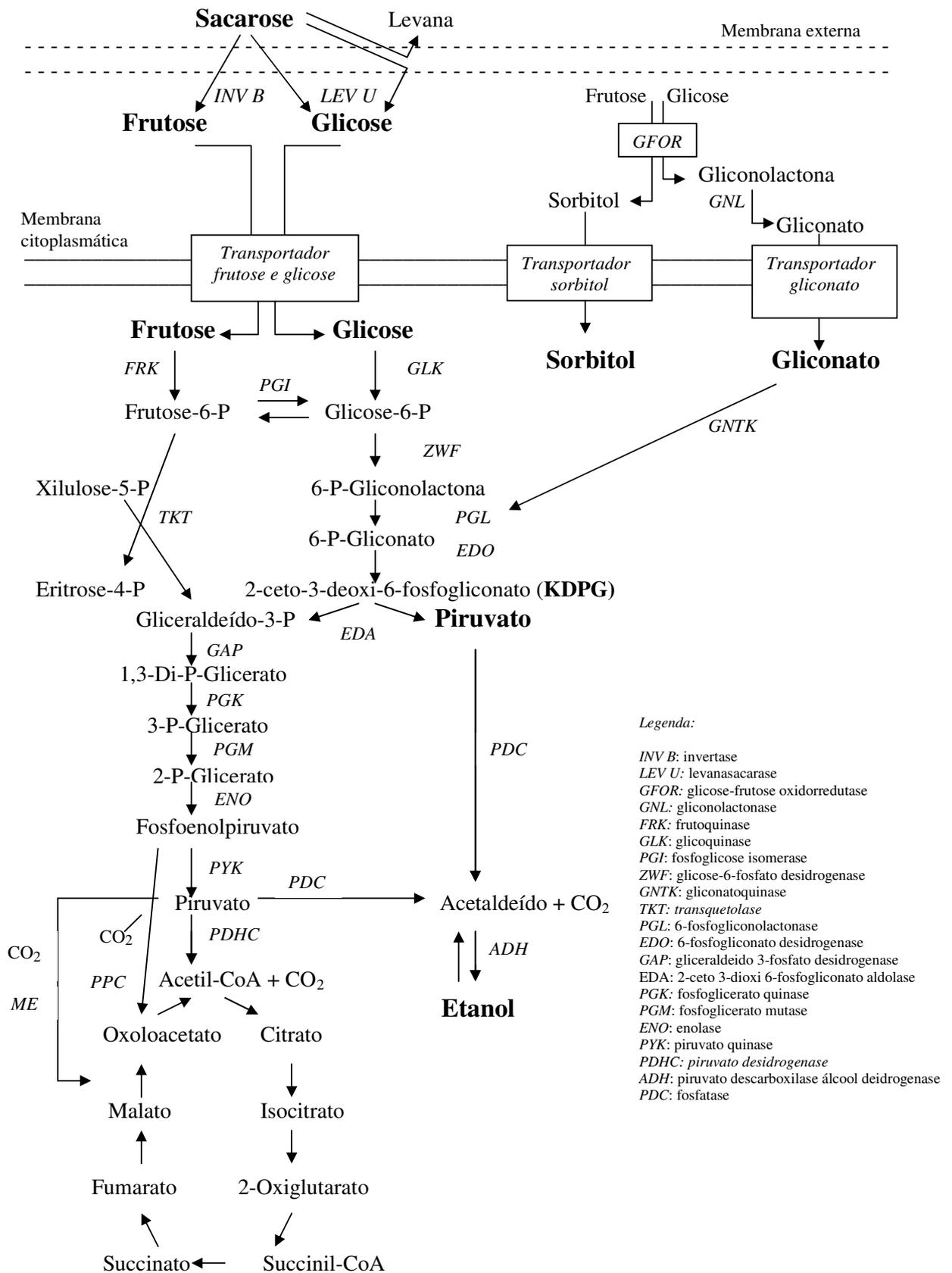


Figura 3.1 Metabolismo dos carboidratos em *Zymomonas mobilis*. Fonte: Sprenger (1996).

Segundo Doelle e colaboradores (1993), *Zymomonas mobilis* é uma bactéria única dentro do mundo microbiano, com crescimento, produção de energia e resposta às condições de cultura extremamente peculiares, causando grande interesse no mundo científico, biotecnológico e industrial. Os autores afirmam que a habilidade da bactéria em acoplar e desacoplar a produção de energia a favor da formação do produto, responder à manipulação física e química do ambiente, bem como sua limitada formação de produtos, a torna um microrganismo ideal para o estudo e desenvolvimento de processos microbianos.

3.2 PRODUTOS PRODUZIDOS POR *Zymomonas mobilis*

3.2.1 Etanol

O Brasil foi o primeiro país a adotar a bioenergia em larga escala com a implantação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), pelo decreto nº 76.593 do Governo Federal, em 14 de novembro de 1975. Este programa trouxe diversos benefícios como o desenvolvimento rural e a criação de um combustível que colabora com a redução da poluição ambiental.

Quanto ao petróleo, devido a grande instabilidade dos preços e fornecimento, em virtude de forte dependência geopolítica, muitos países estão considerando razoável, e necessário, a curto e médio prazo, um constante investimento no estudo de formas, economicamente viáveis, de obtenção de fontes renováveis de energia, com grande destaque para a produção de etanol.

O processo da fermentação alcoólica caracteriza-se como uma via catabólica na qual há a degradação de moléculas de açúcar (glicose ou frutose) no interior da célula de microrganismos (leveduras ou bactérias) até a formação de etanol e CO₂, havendo liberação de energia química e térmica. A glicólise é a via central do catabolismo da glicose, sendo que o piruvato é o produto final desse processo, o qual pode seguir diferentes vias metabólicas: fermentação alcoólica; lática e respiração no ciclo de Krebs e cadeia respiratória (Figura 3.2).

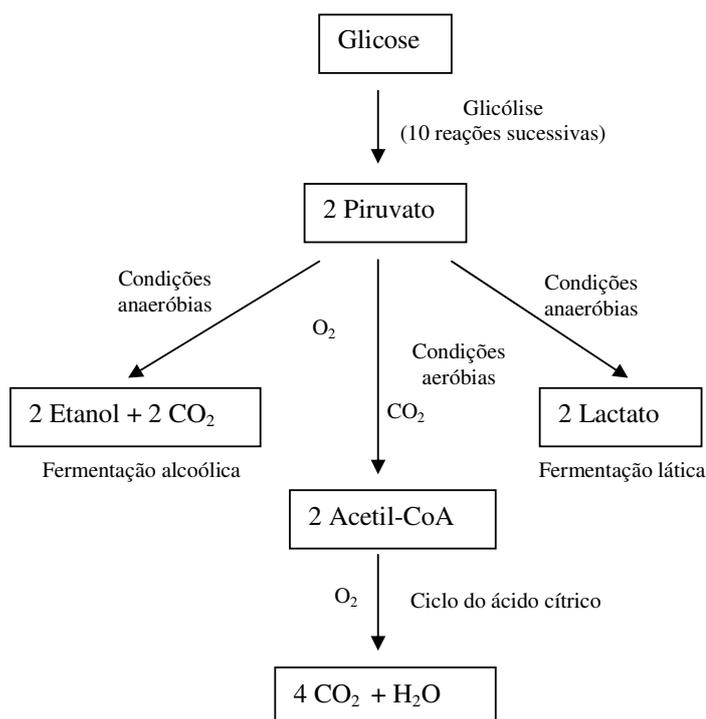


Figura 3.2 Catabolismo da glicose. Fonte: Lehniger (2002).

Na fermentação alcoólica, o piruvato é descarboxilado, formando acetaldeído e, posteriormente, reduzido a etanol. A equação da fermentação alcoólica apresenta-se da seguinte maneira:



Cerca de 500 espécies de leveduras são conhecidas pelo homem e, dentre elas, destacam-se, como produtoras de etanol, espécies do gênero *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Pichia* e outras. A espécie mais importante de levedura alcoólica é a *Saccharomyces cerevisiae*, que possui largo espectro de utilização, sendo empregada na produção de pães, bebidas alcoólicas, etanol e muitos outros produtos.

Embora os agentes de fermentação alcoólica mais utilizados sejam as leveduras, principalmente as do gênero *Saccharomyces*, existem estudos para selecionar outros microrganismos capazes de desdobrar carboidratos na produção de álcool.

As bactérias produtoras de etanol da espécie *Zymomonas mobilis* apresentam atributos tecnológicos que potencializam o seu emprego na fermentação alcoólica em escala industrial pois, possuem habilidades promissoras de transformar açúcares em etanol e gás carbônico em condições comparáveis às aquelas exigidas pelas leveduras. Possuem produtividade em etanol a partir de glicose acima de 97% do valor teórico máximo (SPRENGER, 1996).

Gibbs e DeMoss (1954) demonstraram que essa bactéria utiliza, para o catabolismo anaeróbico desses carboidratos, uma modificação da via de Entner-Duodoroff, podendo produzir mais do 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada e pequena quantidade de lactato, de acordo com a seguinte reação:



As condições simples para seu crescimento, a alta tolerância ao açúcar e a resistência a altas concentrações de etanol tornaria o microrganismo um sério concorrente para as tradicionais leveduras, não fosse a pequena faixa de tipos de substrato, apesar de sua alta capacidade fermentativa.

Em 1984, Rogers e colaboradores fizeram estudos comparativos entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em relação à produção de etanol. Nestes estudos, os autores observaram uma série de vantagens na fermentação com *Zymomonas* em relação à levedura. Esta bactéria apresenta aproximadamente o dobro de velocidade de crescimento, produz etanol numa velocidade seis a sete vezes maior e o fator de conversão de glicose em etanol é 5% maior. Além disso, *Zymomonas mobilis* não requer controle adicional de oxigênio para manter sua viabilidade em altas concentrações de células (ROGERS et al., 1980).

A capacidade de crescer rapidamente na ausência de oxigênio sugere seu uso em processos de fermentação contínuo para a produção comercial de etanol. Maiores detalhes desses

resultados podem ser observados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 Estudo comparativo entre a bactéria *Zymomonas mobilis* e a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* utilizando meio de cultura com concentração inicial de glicose de 100,0 g/L com relação à produção de etanol.

	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>
Tempo de processo (h)	2,51	5,64
μ_p (h^{-1})	5,44	0,82
$Y_{x/s}$	0,028	0,043
$Y_{p/s}$	0,465	0,460

Velocidade específica de produção de etanol (μ_p), fator de conversão de glicose em células ($Y_{x/s}$) e em etanol ($Y_{p/s}$). Fonte: Rogers e colaboradores (1984).

Segundo Lyness e Doelle (1980), a fermentação quase quantitativa de glicose, frutose ou sacarose a etanol e dióxido de carbono é considerada uma característica importante do gênero *Zymomonas*. Quando glicose e frutose são utilizadas como fonte de carbono, é obtido rendimento superior a 95% em relação ao rendimento teórico, pois a fermentação produz quase exclusivamente etanol e CO₂. Quando sacarose, um substrato industrialmente disponível e de baixo custo, é utilizado, o rendimento de etanol representa 75-80% do valor teórico, devido à formação de subprodutos como levana e sorbitol.

3.2.1.1 Tecnologia da produção de etanol por *Zymomonas mobilis*

Em vários países têm sido realizados estudos de fermentação que incluem o uso de bactérias em vez de leveduras para reduzir o tempo de fermentação. No Brasil, toda a produção industrial de álcool é realizada utilizando leveduras, como microrganismo da fermentação, e pouco se conhece de outros microrganismos que produzam álcool em nível industrial. Em virtude da situação de destaque em que se encontra o Brasil, em nível mundial no setor energético, algumas instituições vêm selecionando microrganismos mais eficientes no processo de produção de álcool.

Vários autores consideram ser *Zymomonas mobilis* um excelente produtor de etanol, uma vez que apresenta ciclo de fermentação rápida e com elevada eficiência; tolerância a elevadas

concentrações de glicose, de sacarose e de etanol; suporta pH entre 2,5 e 7,5 e apresenta bom rendimento em etanol. Esta produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0, pois o pH ideal para o crescimento da bactéria varia de acordo com a cepa utilizada (SWINGS; DE LEY, 1977; VIIKARI; GISLER, 1986; CALAZANS et al., 1989).

A temperatura ótima em meios contendo sacarose como fonte de carbono é de 35°C, porém, a 38°C ocorre diminuição de cerca de 26% do crescimento e em temperaturas próximas de 40°C o crescimento é raro, dificultado ou inibindo a produção de etanol (LEE et al., 1989).

Em 1979, Rogers e colaboradores estudaram a cinética de produção de etanol por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 e *Saccharomyces carlsbergensis* (*uvarum*), em altas concentrações de açúcar, e observaram que ambos os microrganismos fermentaram completamente 250,0 g/L de glicose, com concentração final de etanol superior a 100,0 g/L, em 30 a 40 horas de fermentação. Além disso, a concentração de biomassa de *Zymomonas mobilis* foi consideravelmente menor que a massa obtida pela levedura, indicando maior velocidade específica de consumo de açúcar e de produção de etanol para *Zymomonas*.

Lee e colaboradores (1989) verificaram o comportamento de duas diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* (ZM1 e ZM4) com relação à sensibilidade a temperatura de 25 a 40°C e observaram que, em temperaturas mais altas, os rendimentos da biomassa e de etanol decresciam. Porém, as velocidades específicas de crescimento, de consumo de substrato e de formação de produtos não foram afetadas pela temperatura na faixa de pH estudada.

Torres e Baratti (1987) estudou a influência do volume de inóculo, da concentração inicial de glicose e sacarose, do pH inicial e da temperatura, sobre a fermentação etanólica e a produção de levana em processo batelada, por *Zymomonas mobilis* (cepa ZAP). A análise dos resultados demonstrou que o aumento do volume de inóculo em meio de glicose provocou elevação do teor de etanol formado, sem diminuir significativamente o tempo de fermentação, escolhendo-se o inóculo de 10% (v/v) como o mais apropriado. A concentração de glicose superior a 150,0 g/L provocou inibição do crescimento. A temperatura "ótima" para a produção

em meio de glicose situou-se a 35°C e que o aumento da temperatura, a partir de 35°C, ocasionou diminuição da fase "lag". No meio de sacarose suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, a produção de etanol foi inferior àquela apresentada em meio semelhante tendo uréia como fonte de nitrogênio. Em meios de sacarose, além de levana, formou-se algum outro subproduto que justifique os baixos valores de eficiência bioquímica apresentados.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) produziram etanol com cepas de *Zymomonas mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2), obtidos através do tratamento com NTG (N-metil N'nitroso guanidina). A produção máxima de etanol foi de 55,1; 41,0 e 44,2 g/L, respectivamente, em 24 horas de fermentação a 30°C, com concentração de sacarose de 150,0 g/L. Os autores observaram que os mutantes ZML1 e ZML2 possuíam taxas de produção de etanol significativamente menores que a cepa natural. Nas Tabelas 3.4 e 3.5, pode ser observado o efeito da concentração inicial de açúcar e do pH sobre os alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol, por 4 linhagens de *Zymomonas mobilis* (ATCC 10988, ATCC 12526, NRRL B 4286 e IFO 13756).

Os principais resultados em regime descontínuo encontrados na literatura, utilizando glicose como fonte de carbono, demonstram que neste tipo de processo, apesar da inibição causada pela concentração de substrato, altas concentrações de etanol podem ser obtidas. Segundo Rogers e colaboradores (1982), o rendimento em etanol normalmente é maior que 95%, o fator de conversão de glicose em biomassa varia de 0,015 a 0,050, dependendo da concentração inicial de substrato e a produtividade em torno de 5,0 a 7,0 g/L.h.

Tabela 3.4 Efeito do pH inicial sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*.

pH	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
4,0	P	2,7	2,2	4,0	3,5
	Su	74,4	68,1	85,6	75,0
	g/gs	0,18	0,16	0,23	0,23
	E	26,37	21,48	39,06	34,18
5,0	P	2,9	3,2	4,2	4,4
	Su	ND	ND	87,5	81,3
	g/gs	ND	ND	0,24	0,27
	E	28,32	31,25	41,02	42,97
6,0	P	3,9	4,0	4,3	4,7
	Su	80,6	81,2	87,5	88,1
	g/gs	0,24	0,25	0,25	0,27
	E	38,09	39,06	41,99	45,9
7,0	P	6,6	6,3	5,2	6,4
	Su	82,77	79,0	88,1	92,5
	g/gs	0,40	0,40	0,30	0,35
	E	64,45	64,51	50,29	62,5

P - produtividade de álcool % (v/v); Su - substrato utilizado % (v/v); g/gs - gramas de álcool produzido/ g de substrato utilizado; E - porcentagem teórica de rendimento; ND - não determinado. Fonte: Gunasekaran e colaboradores (1986).

Tabela 3.5 Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Açúcar Inicial (% v/v)	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
15	P	6,6	6,3	5,1	6,1
	Su	82,77	79,0	88,0	93,3
	g/gs	0,43	0,44	0,31	0,33
	E	68,75	65,63	53,13	63,54
20	P	5,9	6,1	10,15	8,85
	Su	73,0	75,0	89,0	91,0
	g/gs	0,32	0,33	0,46	0,39
	E	46,09	47,65	79,29	69,14
25	P	5,2	5,5	7,9	7,2
	Su	76,0	78,0	84,8	75,6
	g/gs	0,22	0,23	0,30	0,30
	E	32,05	34,38	49,38	45,0

P - produtividade de álcool % (v/v); Su - substrato utilizado % (v/v); g/gs - gramas de álcool produzido/ g de substrato utilizado; E - porcentagem teórica de rendimento. Fonte: Gunasekaran e colaboradores (1986).

Wisbeck e colaboradores (1997), em trabalhos feitos com diferentes linhagens de *Zymomonas mobilis*, relataram rendimentos em etanol superiores a 90%. Estes autores descreveram, entretanto, que altas concentrações iniciais de glicose, em processo em batelada, levaram a significativa redução da produtividade devido à inibição pelo substrato. Elzinger (1996) mostrou que este problema pode ser contornado pelo uso de fermentação em regime descontínuo alimentado.

Estudos conduzidos usando duas técnicas para o processo contínuo: o reciclo de células (LAWFORD; ROUSSEAU, 2003) e o uso de células imobilizadas (AMIN; ALLAH, 1992) apresentaram excelentes resultados em laboratório, mas o custo é excessivamente elevado para o uso em processos industriais. Lawford e Rosseau (2003) demonstraram que, em cultivo contínuo de *Zymomonas mobilis* linhagem ATCC 39676, à medida que os valores de velocidade de duplicação foram elevados de 0,05 a 0,20 h⁻¹, as concentrações de biomassa e etanol também aumentaram.

Hermans (1992) trabalhou com fermentação em regime contínuo com a linhagem *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 e utilizou diferentes concentrações de glicose (150,0 170,0 e 200,0 g/L). A partir dos resultados, obteve produtividade média de 4,0 g/L.h, com rendimentos em torno de 98% e velocidade específica de produção de etanol de aproximadamente 1,1 h⁻¹.

Costa e colaboradores (2001) estudaram a fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose, e concluíram que a melhor condição para fermentação de sacarose a 10% (p/v) mostrou ser na taxa de diluição de 0,21 h⁻¹. Entretanto, para a fermentação de sacarose a 20% (p/v), mesmo em taxa de diluição baixa, a cultura mostrou um período prolongado de oscilações, indicando dificuldade, senão impossibilidade, em atingir o estado estacionário.

O uso de diversas matérias-primas tem sido pesquisado para a produção de etanol. Millichip e Doelle (1989) utilizaram sorgo moído a seco como substrato para *Zymomonas* produzir álcool em larga escala (586.000 litros) e obtiveram 13% (v/v) de etanol. Além do sorgo,

o milho e outras matérias-primas amiláceas foram testadas por Doelle e colaboradores (1989) para a fermentação em escala industrial (64.000 litros) de *Zymomonas mobilis*.

Segundo Ingram e Buttke (1984), em Biohol, no Canadá, existe em funcionamento uma planta piloto para a produção de etanol utilizando serragem hidrolisada por via ácida e fermentação por *Zymomonas mobilis*. No Japão, Austrália e Nova Zelândia existem várias plantas-piloto operando em sistema contínuo utilizando diferentes linhagens de *Zymomonas* para a produção de etanol. Segundo esses autores, este microrganismo pode ser especialmente útil em países como o Brasil e a Índia, levando em consideração a característica termotolerante de *Zymomonas mobilis*.

3.2.2 Levana

A obtenção de biopolímeros para o consumo humano é uma tarefa mais complexa do que sua utilização em outros produtos, uma vez que estes devem ser considerados absolutamente seguros do ponto de vista alimentar e, portanto, satisfazer aos severos códigos e legislações alimentares em vigor. Uma amostra disso é que, apesar da pesquisa em biopolímeros ter sido iniciada há mais de três décadas, até 1999 apenas três biopolímeros tinham sido aprovados para uso alimentar nos EUA: xantana, gelana e curdlana (SUTHERLAND, 1999).

Além desses polissacarídeos, a levana tem despertado grande interesse devido às suas aplicações em diversas áreas de saúde e de alimentação humana. O termo “levana” refere-se a um polímero de frutose sintetizado através de reações de transfructosilação por muitas espécies de bactérias. Inicialmente foi considerado um subproduto da fermentação alcoólica durante a produção de etanol, pois aumentava a viscosidade de xaropes de cana-de-açúcar, dificultando a obtenção do álcool (CHUN; ROGERS, 1998).

Segundo Swings e De Ley (1977), a levana é produzida por bactérias a partir da sacarose e não da glicose, frutose ou misturas de ambas. Sendo um anidrofructosilfructosídeo solúvel em água, a levana pode também ser chamada de polifrutana ou frutana pelo fato de estar constituída,

basicamente, de moléculas de frutose com uma única glicose no grupo inicial da sacarose. As unidades de D-fructofuranosil são associadas por pontes (2 →6), com ramificação (2 →1) a cada nove unidades, podendo ser de alto ou baixo peso molecular, dependendo da fonte de carbono utilizada na fermentação e sua estrutura pode ser observada na Figura 3.3. Além disso, a levana é facilmente produzida por diferentes linhagens de bactérias conforme especificados na Tabela 3.6 (DAWES et al.,1966; GARCIA-CRUZ, 1997, ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009).

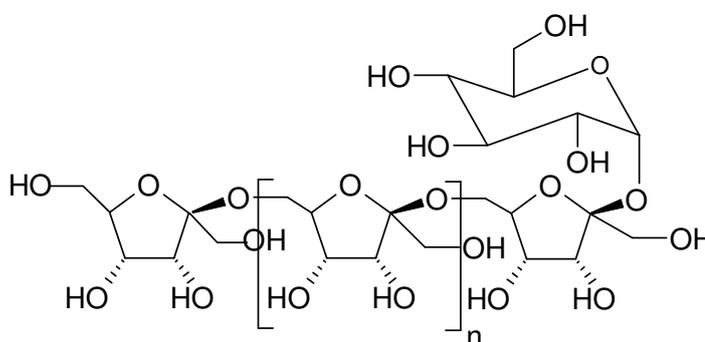


Figura 3.3 Estrutura β (2 → 6) da ramificação principal da levana.

Na indústria de alimentos, a levana tem vários usos potenciais: agente espessante, fixador de cores e sabores e em produtos dietéticos. Estas aplicações valem-se claramente das qualidades funcionais do polissacarídeo pois, devido às suas propriedades reológicas e capacidade de formação de gel, pode ser incorporado às formulações de produtos alimentícios. O interesse pelo estudo do melhor aproveitamento da levana possibilitará que lhe sejam atribuídas novas e importantes aplicações (TANO; BUZATO, 2003).

Segundo Leibovici e colaboradores (1979), é possível o uso de levana em medicina como componente funcional dotado de atividade biológica para o funcionamento adequado do organismo humano. A literatura relata usos práticos de levana para vários propósitos, por exemplo, como complexo biologicamente ativo, substituto de plasma sanguíneo (THACHENKO; SEVRYUGINA, 1989), agente prolongador da ação de fármacos, preparação

de frutose altamente purificada para uso médico, fator de promoção do desenvolvimento de Bifidus, agente hipocolesterolêmico (LIEPA et al., 1993) e como imunomodulador e anticarcinogênico (CALAZANS et al., 1997).

Tabela 3.6 Microrganismos produtores de levana.

Microrganismos produtores de levana	Pesquisadores
<i>Acetobacter suboxydans</i>	Thachenko e Sevryugina (1989)
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Hernandez e colaboradores (1995)
<i>Bacillus mesentericus</i>	Dedonder e Noblesse (1953); Dedonder (1966); Euzenat e colaboradores (1997)
<i>Bacillus polymyxa</i>	Tkachenko e Sevryugina (1989); Han e Clarke (1990)
<i>Bacillus subtilis</i>	Dedonder (1966); Chambert e colaboradores (1974)
<i>Erwinia herbicola</i>	Keith e colaboradores (1991)
<i>Mycobacterium</i> sp.	Cha e colaboradores (2001)
<i>Pseudomonas syringae</i> ; <i>Pseudomonas lindneri</i>	Hettwer e colaboradores (1995); Gibbs e Demoss (1954)
<i>Serratia</i> sp.	Kojima e colaboradores (1993)
<i>Streptococcus salivarius</i>	Lyness e Doelle (1983); Han e Watson (1992)
<i>Zymomonas mobilis</i>	Dawes e colaboradores (1966); Lyness e Doelle (1983); Reiss e Hartmeier (1990); Coté e Ahlgren (1993)

Fonte: Ernandes e Garcia-Cruz (2005). Adaptada.

Hettwer e colaboradores (1995) relataram que *Zymomonas mobilis* possui três enzimas distintas: a sacarase intracelular (SacA), a levanasacarase extracelular (SacB) e a sacarase extracelular (SacC). A função da SacA não é bem conhecida; a SacC é responsável pela hidrólise da sacarose e a SacB, também conhecida como levanasacarase, tem a função de converter a sacarose em frutanas com pontes β (2 \rightarrow 6), pois transfere o radical fructosil da sacarose para o C-6 da frutose no terminal não redutor, formando a cadeia da levana. A levanasacarase pode ser produzida por diversas espécies de bactérias como *Pseudomonas* ssp, *Acetobacter aceti*,

Aerobacter levanicum, *Bacillus natto* e *Bacillus polymyxa* (KOJIMA et al., 1993), sendo *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* as mais estudadas devido à grande capacidade de produção de levana (COTÉ; AHLGREN, 1993).

Hernandez e colaboradores (1995) observaram que a atividade da levanasacarase está envolvida em processos variados, como sobrevivência de bactérias no solo (*Bacillus subtilis*), fitopatogêneses (*Erwinia* e *Pseudomonas* ssp) ou simbiose de plantas interagindo com bactérias (*Bacillus polymyxa*).

Segundo Ammar e colaboradores (2002), a enzima fructosiltransferase ou levanasacarase (2,6-β-D-frutana-6-β-D-fructosiltransferase, E.C. 2.4.1.10) catalisa a seguinte reação:



3.2.2.1 Tecnologia da produção de levana por *Zymomonas mobilis*

A formação de levana e o crescimento celular são afetados não só pela fonte de carbono, como também pela presença de certos compostos químicos, variação do pH no meio de fermentação e da temperatura de incubação. A habilidade de *Zymomonas* em produzir levana varia de cepa para cepa.

Segundo Doelle e colaboradores (1989), a temperatura e o pH ideais para o crescimento são diferentes dos requeridos para a produção de levana, que, por sua vez, varia conforme a cultura utilizada.

Há divergências entre diversos autores com respeito à temperatura e ao pH ideais para a produção de levana pela *Zymomonas mobilis*. Segundo relataram Bekers e colaboradores (1999) e Calazans e colaboradores (1997), a temperatura ótima para a produção de levana é de 25°C; Park e Baratti (1993) observaram que os melhores rendimentos ocorreram a 30°C.

Estudos realizados por Lyness e Doelle (1980, 1983) e Doelle e colaboradores (1989)

concluíram que temperaturas de fermentação elevadas (30 a 42°C) e altos valores iniciais de pH (acima de 5,0) devem inibir a produção da enzima levanasacarase, responsável pela formação de levana em *Zymomonas mobilis*. Em outro estudo, Jerez (1993) demonstrou que os parâmetros cinéticos são afetados tanto pela temperatura quanto pelo controle do pH do meio pois, utilizando a temperatura de 37°C, com e sem controle de pH, a taxa específica de crescimento foi maior e a quantidade de levana produzida foi menor que na temperatura de 30°C.

Calazans e colaboradores (1989) observaram que a concentração de levana produzida foi de 12,7% por *Zymomonas mobilis*, em condições de cultura por batelada contendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio, enquanto que Bekers e colaboradores (1990), utilizando uma linhagem de *Zymomonas mobilis* denominada 113 “S”, observaram que esta pôde produzir aproximadamente 30,0-50,0 g/L de levana em condições de fermentação por batelada ou contínua.

De acordo com Bekers e colaboradores (1990), o pH ótimo para a produção de levana é aproximadamente 5,0, sendo o mesmo controlado, e uma temperatura de 25°C. Doelle e Greenfield (1985) também obtiveram bons rendimentos em levana trabalhando em pH 5,0 e numa temperatura de 27-30°C.

Carlos (1991) realizou ensaios de fermentação em mosto à base de sacarose, conduzidos em processo de batelada, utilizando seis linhagens de *Zymomonas mobilis*: AG11, CP4, P4, Z-1-81, Z-1-87 e Z-1-88, pertencentes à coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE (Universidade Federal de Pernambuco - Recife). Na etapa de seleção da melhor linhagem produtora de levana precipitável, como subproduto da fermentação da sacarose, foi escolhida a Z-1-81 por apresentar maior capacidade de conversão de substrato a levana, formando 3,7 g/L de levana (expressa como frutose).

Silva (1996) fez experimentos para estudar a influência do pH sobre a formação de levana por *Zymomonas mobilis* ZAG-12 em meios à base de sacarose. Para o controle do pH foram utilizadas soluções alcalinas e ácidas e, também, soluções tampão. Cada experimento foi

em diferentes valores iniciais de pH, tanto nos ensaios com controle como sem controle do pH. O acompanhamento das fermentações consistiu na retirada de amostras, em intervalos de tempo determinados, para as dosagens de biomassa celular, açúcares redutores totais, pH, levana precipitável e etanol. A análise dos resultados demonstrou que a linhagem se desenvolve bem numa faixa de pH entre 4,5 e 6,0. O controle do pH ao longo da fermentação mostrou menor quantidade de levana precipitável em comparação com fermentações realizadas sem o controle do pH (pH entre 4,5 e 5,0). O rendimento em levana formada foi maior nas primeiras 24 horas de fermentação. A faixa de pH inicial, entre 5,5 e 6,0, nas fermentações com controle de pH, e naquelas contendo solução tampão, ocasionou maior eficiência bioquímica de produção de etanol e pequena formação de levana precipitável em comparação às fermentações sem controle de pH.

Vinhas (1999) fez um trabalho que teve como objetivo selecionar, dentre duas linhagens de *Zymomonas mobilis*, ZAG-12 e ZAP, a melhor produtora de levana, verificar a produção com e sem agitação, a influência da concentração inicial de sacarose sobre o rendimento final de fermentação, fracionar e determinar o peso molecular de levana e desenvolver o diagrama ternário da mistura levana - água - etanol. As levanas foram produzidas em meio à base de sacarose, suplementado com extrato de levedura e sais minerais. A produção em batelada foi realizada em frascos com e sem agitação, nas concentrações iniciais de sacarose de 200,0 e 250,0 g/L, à temperatura de 25°C, por 72 horas de processo. O fracionamento das levanas foi realizado pelo método de precipitação fracionada, utilizando o etanol como não solvente e a determinação dos pesos moleculares, pelo método de cromatografia de permeação em gel. Os resultados mostraram que a linhagem *Zymomonas mobilis* ZAG-12 foi a melhor produtora quando a concentração de sacarose inicial foi de 200,0 g/L, sem agitação.

Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) estudaram cepas de *Zymomonas mobilis* mutantes (ZML1 e ZML2), obtidas através do tratamento com NTG (N-metil N'nitroso guanidina), as quais produziram concentração máxima de levana de 21,6 e 20,0 g/L,

respectivamente, em 24 horas de fermentação, a 30°C, com 150,0 g/L de sacarose.

Muro e colaboradores (2000) investigaram a produção de levana usando linhagens de *Zymomonas mobilis* em diferentes condições de cultura. Obteve-se elevada produção de levana (41,0 g/L) através da linhagem mutante HL29, em meio de cultura contendo 200,0 g de sacarose L⁻¹ e 0,5 g de (NH₄)₂SO₄ L⁻¹, estocado a 7°C por 29 dias. Esta foi a primeira pesquisa que descreveu a síntese de levana por *Zymomonas mobilis* a 7°C.

Bekers e colaboradores (2000) pesquisaram o efeito de altas concentrações de sal durante a fermentação de sacarose (10,0%) por *Zymomonas mobilis* 113S. Foi verificado que a concentração de 0,6 M de solução NaCl levou a um aumento da síntese de oligossacarídeos. A produção de sorbitol aumentou na presença de 0,16 M de solução de NaCl, porém foi inibida em concentrações maiores do sal.

Wendt (2001) observou que, durante sua pesquisa, uma linhagem de *Zymomonas mobilis* mutante produziu até 30,0 g/L de levana e a concentração de extrato de levedura influenciou na sua síntese. Além disso, o mesmo autor relata que a produção de levana é influenciada não só pela relação carbono/nitrogênio, mas também pela relação nitrogênio orgânico/inorgânico. Garcia-Cruz (1997) estudou o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de levana e verificou que não houve estímulo no padrão de desenvolvimento celular e que o sulfato de amônia, até a concentração de 50 mM, promoveu discreto aumento da produção do polissacarídeo.

Jerez (1993), quando estudou o efeito da variação da concentração de potássio, verificou que a taxa de desenvolvimento e a quantidade de levana formada são proporcionais ao aumento da concentração de potássio até a concentração de 10,0 g/L. Em outro estudo, Vigants e colaboradores (1998) verificaram que o efeito de sais minerais, como KCl e NaCl, não só estimularam a produção de etanol, como também, a de levana.

Várias enzimas da via Entner Doudoroff requerem cofatores como magnésio, cálcio, potássio para a produção de levana. Hoppner e Doelle (1983) reportaram que o cálcio e o

magnésio ativam a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto Bekers e colaboradores (2000) observaram que o potássio ativa a enzima piruvato quinase.

A aeração também é considerada um fator de inibição para produção de levana. Segundo Vinhas (1999), durante a produção do biopolímero por *Zymomonas mobilis* não é vantajoso promover a agitação, pois a mesma conduz a uma aeração que, em última análise, prejudica a produção de células e de levana. Porém, foi observado no trabalho realizado por Han e Clarke (1990) que a produção do polissacarídeo aumentou quando a cultura foi levemente agitada durante a fermentação.

3.2.3 Sorbitol

O sorbitol é uma substância amplamente encontrada em algumas algas marinhas vermelhas e em plantas da família Rosácea que inclui pêras, maçãs, cerejas, ameixas e pêssegos (FREITAS, 1990). Foi isolado pela primeira vez em 1872 por Joseph Boussingault, professor de química analítica e agricultura em Paris, como resultado de sua curiosidade a respeito de uma fruta européia conhecida como “sorb apple”. O pesquisador passou a investigar o motivo do suco desta fruta ser tão doce e, apesar do alto teor de açúcar, gerar pouco álcool. Separou uma amostra de suco fermentado desta fruta, destilou o álcool da amostra e, a partir do xarope residual, cristalizou um composto adocicado, como cristais em forma de agulha, concluindo que não se tratava de um açúcar comum, mas de um açúcar relacionado com o manitol, já conhecido na ocasião. Como estes cristais foram originados da “sorb apple”, Boussingault os batizou de sorbitol.

Devido à sua estrutura química, o sorbitol possui diversas propriedades desempenhando papel importante nas indústrias químicas, farmacêuticas, cosmeceúticas e alimentícias. Dentre suas propriedades, esse álcool é utilizado como agente umectante, estabilizante, amaciante, espessante, emulsificante, tensoativo e iniciador de outros produtos químicos. A Tabela 3.7 descreve as diversas aplicações do sorbitol em função de suas propriedades.

O sorbitol pode ser sintetizado a partir de várias fontes, tais como trigo, arroz, batata, biomassa, madeira, algodão, bagaço, beterraba, frutas e algas específicas, sendo que o milho, os rejeitos de agricultura e a cana-de-açúcar são as principais fontes de glicose pura (dextrose) para a fabricação deste poliálcool e as que apresentam maior potencial de aplicação prática.

O primeiro processo utilizado em escala industrial para a produção de sorbitol foi a redução eletroquímica da glicose em meio aquoso entre os anos de 1937 e 1947. Porém, a partir de 1948, a hidrogenação catalítica da glicose passou a ser considerada como processo básico para a síntese de sorbitol (GORP, 1999).

Em escala industrial, para a produção de sorbitol, é normalmente utilizado o processo químico de hidrogenação catalítica de solução de glicose a 70%, catalisada por níquel (Ni^{+2}), a temperatura de cerca de 150°C e pressão entre 40 e 50 atm. Este processo envolve a geração e o armazenamento do H_2 produzido pela eletrólise da água. O xarope de sorbitol resultante passa por várias colunas de troca-iônica para reduzir a concentração de Ni^{+2} a níveis inferiores a 5 ppm, aceitáveis na indústria de alimentos. Além disso, o produto resultante apresenta contaminantes, como por exemplo o manitol, tornando o rendimento do processo menos atrativo.

Tabela 3.7 Diversas aplicações do sorbitol em função de suas propriedades.

Indústria de Alimentos	<p>Edulcorante Adoçante nutritivo e semi-natural, possui 60% do poder edulcorante da sacarose, porém com o mesmo valor calórico. É classificado como atóxico pelo FDA (United States Food and Drug Administration) com “status” GRAS (Generally Recognized As Safe).</p> <p>Dietético A absorção do sorbitol pelo sistema intestinal é relativamente lenta em comparação à da glicose.</p> <p>Essessante Retarda a granulação e a cristalização de açúcares em doces.</p> <p>Texturizante Melhora a mascarabilidade e a textura dos alimentos.</p> <p>Higroscópico É usado como umectante e amaciante.</p> <p>Estabilizante Aumenta a vida de prateleira (shelf life) de diversos produtos alimentícios</p> <p>Flavorizante Reduz o sabor residual desagradável, evitando a turbidez provocada por complexos metálicos.</p>	<p>Produtos alimentícios dietéticos e substituto do açúcar em alimentos, como: gomas sem açúcar, mentas, chicletes.</p> <p>Sorvetes</p> <p>Coberturas para bolos</p> <p>Bolos, pães</p> <p>Sobremesas congeladas</p> <p>Bebidas e vinhos</p>
Cosméticos	<p>Umectante Retarda a perda de água em aplicações que requerem alto teor de umidade.</p> <p>Emoliente Como gel base, produz uma sensação suave e seca quando espalhado na pele, ao contrário de outros polióis que deixam uma sensação de “cobertura”.</p> <p>Higroscópico Melhora a espalhabilidade e a lubrificidade das emulsões.</p> <p>Plastificante Melhora o desempenho de cremes de barbear.</p> <p>Dentifrício Resistente à fermentação causada por microrganismos da boca.</p> <p>Não irrita os tecidos da boca.</p> <p>Não é cariogênico.</p> <p>Possui calor de dissolução negativo produzindo sensação refrescante quando provado.</p> <p>Possui sabor agradável e adocicado.</p> <p>Age como plastificante amaciando a escovação dos dentes.</p>	<p>Loções, Cremes</p> <p>Géis</p> <p>Emolientes</p> <p>Emulsões</p> <p>Soluções</p>
Industria Farmacêutica	<p>Sintetizador de L-ascórbio É produzido comercialmente através de síntese bioquímica via sorbitol, cujo processo básico envolve passos direcionados para obter oxidações seletivas em posições específicas.</p>	Vitamina C

A utilização de processos fermentativos para a produção de sorbitol tornou-se uma opção viável devido à utilização de condições suaves de reação, diminuindo os custos de produção e os impactos ambientais. Dentre os microrganismos candidatos à produção industrial por processo fermentativo, têm-se destacado *Zymomonas mobilis* (FARIA, 2002).

Quando as células de *Zymomonas mobilis* são colocadas em condições de estresse, como alta concentração de açúcares, a enzima glicose-frutose-oxidoreductase (GFOR) fornece à célula alta concentração de sorbitol (um novo soluto para a célula), para contrapor os efeitos de desidratação provocada pela alta osmolaridade externa (BARROW et al., 1984).

Zachariou e Scopes (1986) descobriram que a enzima glicose-frutose oxidoreductase, ou GFOR, catalisa a reação de transidrogenação na qual a oxidação da glicose a glicono-d-lactona está acoplada à redução da frutose a sorbitol. Num passo subsequente, a instável lactona é convertida em ácido glicônico, tanto espontaneamente quanto pela ação da enzima gliconolactonase (GL), também presente em *Zymomonas mobilis*. A enzima GFOR possui um cofator não dialisável, o NADPH, fortemente ligado-se ao sítio ativo. Numa fermentação convencional, partindo de glicose e frutose, o sorbitol acumularia no meio, enquanto o ácido glicônico formado seria metabolizado via 6-fosfogluconato a 2-ceto-3-deoxi-6-fosfogluconato, um intermediário na rota de Entner-Doudoroff. Como resultado, o gliconato seria convertido a etanol e alguns subprodutos. No entanto, em reações com a permeabilização das células, a rota que levaria à produção de etanol não é funcional. Assim, glicose e frutose podem ser convertidas em ácido glicônico e sorbitol, respectivamente.

3.2.3.1 Tecnologia da produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*

Após a identificação das enzimas responsáveis pela formação de sorbitol por Zachariou e Scopes (1986), vários trabalhos foram realizados visando à aplicação da bactéria *Zymomonas mobilis* na produção deste composto.

Bertasso (1996) estudou alguns parâmetros que interferem na biotransformação de frutose e glicose em sorbitol e ácido glucônico, respectivamente, e constatou-se a manutenção da atividade da enzima glicose-frutose-oxidoreductase (GFOR) por longos períodos com perda de 21% de atividade, após 340 horas do término do processo em batelada, utilizando diferentes concentrações celulares. As eficiências de conversão em sorbitol e ácido glucônico apresentaram valores médios de 95,6 e 96,3%. Os valores de produtividade aumentaram linearmente com aumento da concentração celular. A avaliação de concentrações iniciais de substratos (S_0) entre 100,0 e 750,0 g/L não revelou, nos ensaios realizados com células imobilizadas, o consumo de ácido glucônico formado, sendo encontrados valores máximos na eficiência de conversão de até 97,5% em ácido glucônico e 91,8% em sorbitol para concentração de glicose + frutose de 750,0 g/L. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que para células imobilizadas, a permeabilização é dispensável, mesmo em baixas concentrações de substratos.

Vignoli (2003) verificou as variáveis importantes na produção de sorbitol e as otimizou através de planejamento estatístico variando as condições de cultivo, permeabilizando as células com brometo cetiltrimetilamonio (CTBA) e imobilizando-as em *Luffa cilíndrica*. Os resultados mostraram que a concentração de açúcares, o tempo de cultivo, a permeabilização e a imobilização das células possuíram efeitos significativos na produção de sorbitol. Altas concentrações de açúcares causaram quedas nos níveis de sorbitol, enquanto o aumento do tempo de cultivo e o processo de imobilização aumentaram a produção. A permeabilização das células provocou redução na produção de sorbitol quando foi associada ao processo de imobilização. As condições ótimas de cultivo encontradas por uma matriz de modelagem envolveram a utilização de células imobilizadas, no tempo de fermentação de 36 horas, na faixa de concentração de sacarose de 200,0 a 300,0 g/L.

Estudos conduzidos por Doelle e Greenfield (1985) sugeriram que o pH pode ser um parâmetro muito importante para controlar a relação de conversão para sorbitol. Estes autores determinaram que a relação de sacarose para formação de sorbitol varia significativamente com

as condições de cultivo, por exemplo, pH controlado de 5,0, em concentração inicial de sacarose de 288,0 g/L, favorece a formação de sorbitol; entretanto pH próximo de 6,0 parece favorecer a formação de frutose.

3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL, LEVANA E SORBITOL EM PROCESSOS FERMENTATIVOS UTILIZANDO SUBSTRATOS ALTERNATIVOS DE BAIXO CUSTO COMERCIAL POR *Zymomonas mobilis*

Praticamente qualquer produto natural ou seus derivados de natureza orgânica, como produtos ou subprodutos da agricultura e do processamento de vegetais, podem constituir a base ou substrato para processos fermentativos (JEREZ, 1993).

Dada a importância dos carboidratos no metabolismo de qualquer via celular, não é por acaso que eles são a principal matéria-prima nas fermentações. Devem estar presentes compostos nitrogenados, além de prebióticos (fatores de crescimento), como vitaminas e coenzimas. Também é indispensável à presença de fósforo, sob a forma de fosfatos, o qual costuma ser adicionado aos meios, onde exerce ação tamponante ou inibidora de flutuações de pH (TANO; BUZATO, 2003).

Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas para aumentar o rendimento de etanol, sorbitol e levana, juntamente com o emprego de técnicas mais econômicas de produção, recuperação e purificação, visando diminuir o custo total do processo. Em nível experimental, utilizam-se substratos de baixo custo tais como sacarose, amido, amido hidrolisado, xarope de milho e melaços residuais da indústria açucareira.

3.3.1 Caldo de cana-de-açúcar

Conforme Luiz da Câmara Cascudo (1971), o caldo de cana (garapa) é um refresco cujo consumo há muito se universalizou no país, particularmente nas épocas de verão, fazendo parte também de uma diversidade de prescrições na medicina popular, como, acontece no nordeste, onde se acredita que possua qualidade hemostática e cicatrizante e excelente galactogênio.

O caldo de cana é uma suspensão coloidal cuja cor, que varia de verde-escuro a marrom, resulta da presença de substâncias diversas, como clorofila, antocianinas, xantofilas e carotenos. A sua opacidade é causada por colóides, proteínas, pentosanas e sais inorgânicos como fosfatos, óxidos de cálcio, ferro e magnésio (FIORAVANTI, 2000; KITOKO; OLIVEIRA; SILVA, 2004).

O caldo de cana-de-açúcar comercial é uma matéria-prima consumida “*in natura*” no Brasil e é considerado de baixo custo comercial. Soccol e colaboradores (1990) relataram que a composição química do caldo de cana-de-açúcar apresenta: 74,5 a 82,0% de água; 14,0% de hidratos de carbono; 10,0% de fibras; 0,4% de substâncias nitrogenadas. As substâncias sólidas representam 18,0 a 25,0% do total de sua composição. A composição do caldo de cana-de-açúcar pode ser visualizada na Tabela 3.8.

Gunasekaran e colaboradores (1986) estudaram o efeito de diferentes meios (sintético, caldo e melado de cana-de-açúcar) para a produção de etanol, com diferentes linhagens *Zymomonas mobilis* e os resultados obtidos estão representados na Tabela 3.9, onde pode ser observado que os melhores rendimentos foram obtidos com o caldo de cana-de-açúcar. Das linhagens testadas, apenas a NRRL B 4286 produziu mais etanol quando foi usado o meio sintético. Com *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 o rendimento de etanol foi 82-94%, após 48 horas de fermentação.

Tabela 3.8 Composição do caldo de cana-de-açúcar.

Composição centesimal do caldo de cana-de-açúcar		Elementos (%)		Percentagem dos componentes	
Água	74,50	Sílica (SiO ₂)	0,25	Potássio (K ₂ O)	0,12
		Sódio (Na ₂ O)	0,01	Cálcio (CaO)	0,02
		Magnésio (MgO)	0,01	Ferro (Fe ₂ O ₃)	traços
		Fósforo (P ₂ O ₅)	0,07	Sulfatos (SO ₃)	0,02
		Cloretos (Cl)	traços	Celulose	5,50
Cinzas	0,50	Sacarose	12,50	Ácido aspártico	0,20
		Ácido nítrico	0,01	Amoníaco	traços
Fibra	10,0	Corpos xânticos	traços		
Matérias nitrogenadas ...	0,40				
Nitrogênio total = 0,06%					

Fonte: Soccol e colaboradores (1990).

Tabela 3.9 Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por várias linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Substrato	Parâmetros fermentativos	Linhagens			
		ATCC 10988	ATCC 12526	NRRL B 4286	IFO 13756
Meio sintético	P	5,9	6,1	10,15	8,85
	Açúcar inicial	20,0	20,0	20,0	20,0
	Su	73,0	75,0	89,0	91,0
	g/gs	0,32	0,33	0,46	0,39
	E	46,09	47,65	79,29	69,14
Cana-de-açúcar	P	10,3	10,3	9,2	10,3
	Açúcar inicial	18,0	18,0	18,0	18,0
	Su	95,0	95,0	97,2	97,2
	g/gs	0,48	0,48	0,42	0,47
	E	89,4	89,4	79,86	89,4
Melaço	P	3,05	2,9	3,29	1,97
	Açúcar inicial	10,0	10,0	10,0	10,0
	Su	ND	ND	ND	ND
	g/gs	ND	ND	ND	ND
	E	47,66	45,31	51,41	30,78

P - produtividade de álcool % (v/v); Su - substrato utilizado % (v/v); g/gs - gramas de álcool produzido/ g de substrato utilizado; E - percentagem teórico de rendimento; ND - não determinado. Fonte: Gunasekaran e colaboradores (1986).

Hebling (1995) investigou o efeito da adição de alguns compostos durante a fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4, na expectativa de aumentar a produtividade alcoólica. Os aditivos testados foram: glicerol, Tween 80, soro de queijo, peptona de caseína e sulfatos de amônio e magnésio e os parâmetros cinéticos analisados foram: taxa específica de crescimento, fator de produção de biomassa, fator de produção etanol e eficiência de conversão do substrato a etanol.

Duarte (1995) analisou o efeito da lecitina de soja e do destilado do desodorizado do óleo de soja (DDOS) na fermentação da sacarose e do caldo de cana, por *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* CP4, em cultura de batelada. Com o açúcar redutor total em valor nominal de 15% (p/v) e sem adição de suplemento lipídico, os açúcares não foram eficientemente utilizados e os resultados para *Saccharomyces* e *Zymomonas*, num meio contendo sacarose e caldo de cana foram, em média, respectivamente: eficiência de conversão (YE con.) 12,55 e 20,54%; taxa específica de crescimento máximo (Mmax.) 0,25 e 0,20 h⁻¹. Com adição de lecitina de soja ou DDOS a 0,01% (v/v) em sacarose e caldo de cana-de-açúcar os resultados para *Saccharomyces* ou *Zymomonas* foram, em média, respectivamente: YE con. 13,69 e 26,15%, enquanto que os valores de Mmax. foram: 0,24 e 0,22 h⁻¹ e Y_{x/s}: 0,025 e 0,012.

Cação (1999) fez um estudo utilizando o planejamento fatorial de 2 níveis equidistantes de 3 variáveis 2³ para determinar as melhores condições de cultivo quanto a temperatura (25 e 35°C), agitação (0 e 150 rpm) e concentração de açúcares redutores totais no caldo de cana (100,0 e 200,0 g/L) e 3 repetições no ponto central, onde a temperatura foi de 30°C, agitação de 150 rpm e concentração de açúcar redutor total no caldo de cana, usado como substrato para a produção de sorbitol e etanol. Observou-se que altas concentrações de açúcar no caldo de cana estimularam a produção de sorbitol e etanol. Os cultivos estáticos proporcionaram os melhores valores de produção de sorbitol porém, para etanol os melhores foram em cultivos com agitação de 150 rpm. Em relação à temperatura, verificou que esta não foi uma variável significativa para

a produção de sorbitol e etanol.

Borsari e colaboradores (2003) estudaram a produção de levana em fermentação descontínua alimentada. O microrganismo foi cultivado em meio de cultura contendo sacarose acrescido de caldo de cana-de-açúcar (200,0 g/L), pH 5, 25°C, por 20 horas. As produções de levana e a biomassa foram 14,83 g/L e 1,56 g/L no processo descontínuo e 10,3 g/L e 1,91 g/L no descontínuo alimentado, com consumo de açúcares de 78,21 g/L e 163,55 g/L, respectivamente. Estes resultados demonstraram que, apesar de ter ocorrido maior consumo de açúcares no processo descontínuo alimentado, não houve diferenças estatisticamente significativas na produção de levana nos dois processos estudados.

Tano e Buzato (2003) avaliaram a produção de etanol em caldo de cana fermentado por *Zymomonas mobilis* com alta concentração inicial de açúcar (150,0 g/L), rico em sais minerais, adicionado de 5,0 g/L de extrato de levedura e incubado a 28°C, durante 48 horas a 180 rpm, em pH de 5,4. Neste meio, observou-se a presença de etanol e foi constatado que este reduziu a formação de mais etanol, porém não afetou a produção de levana nem o rendimento, quando relacionado à biomassa (g biomassa/ g açúcar consumido). Estes mesmos pesquisadores observaram que alguns dos componentes presentes no caldo de cana-de-açúcar inibem o crescimento e a fermentação por *Zymomonas mobilis*. Os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, especialmente cloreto de potássio e alguns íons como cálcio e magnésio, apresentam efeito inibidor significativo na fermentação, além da competição de outros microrganismos que progrediram nele.

Borsari (2004) estudou as condições de produção de levana, por *Zymomonas mobilis* CP4, através de delineamentos estatísticos variando a concentração e tipo de substrato, forma de cultivo, suplementação com ácido pantotênico, extrato de levedura, cloreto de sódio e a técnica de permeabilização celular. Inicialmente, foi aplicado um planejamento 2^3 onde as variáveis foram: concentração de caldo de cana de açúcar e sacarose e tipo de fermentação. Um segundo planejamento 2^2 foi usado para confirmar a importância do caldo de cana-de-açúcar. Um último

delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} foi utilizado para selecionar as variáveis: concentração de ácido pantotênico, cloreto de sódio e extrato de levedura e o crescimento celular. Os resultados indicaram que o processo por batelada alimentada não melhorou a produção de levana. O máximo de levana obtido foi de $40,14 \text{ g/L}^{-1}$, em $150,0 \text{ g/L}^{-1}$ de sacarose. A adição de caldo de cana-de-açúcar não foi estatisticamente significativa para formação de levana. O caldo de cana-de-açúcar estimulou a produção de biomassa, sorbitol e etanol. Do delineamento 2^{4-1} , os fatores analisados não foram estatisticamente significativos para a biossíntese de levana, etanol e biomassa, sugerindo nos próximos estudos ampliar as faixas de variação estabelecida.

Ernandes (2006) estudou o efeito de um meio sintético e o caldo de cana-de-açúcar estéril e não estéril como fonte alternativa para a produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Os resultados obtidos neste experimento confirmaram os citados por outros pesquisadores, como Bekers e colaboradores (2001); HuertasDiaz e colaboradores (1991); Park e Baratti (1993) e Borsari e colaboradores (2003), os quais relataram que a utilização de caldo de cana-de-açúcar pode ser um meio satisfatório para a produção de levana, pois os valores de rendimentos obtidos deste biopolímero foram semelhantes ou superiores às concentrações de sacarose adicionadas ao meio sintético. Além disso, Ernandes observou que houve a contaminação do caldo não estéril após as 24 horas de fermentação. Segundo este autor, do ponto de vista microbiológico, o caldo de cana carrega certa quantidade de microrganismos que fazem parte de sua biota epifítica e da terra aderida aos colmos, raízes e folhas. Estima-se que a cana saudável pode conter 10^1 a 10^8 bactérias por grama, sendo as mais frequentes: *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* e *Corynebacterium*. Entre as leveduras, podem-se citar: *Torulopsis*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Torula* e *Pichia*.

3.3.2 Melaços de cana-de-açúcar

Diversos subprodutos e matérias-primas da indústria de alimentos e/ou da agroindústria têm sido empregados para o crescimento de microrganismos devido a alta disponibilidade e baixo custo. Dentre estes, os melaços destacam-se com meio de cultivo nos processos fermentativos, em virtude do alto teor de açúcares, nitrogênio, vitaminas e sais minerais.

No Brasil são produzidos cerca de 17,9 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar por ano durante a fabricação do açúcar. Devido a sua composição rica em açúcares fermentescíveis, seu baixo custo (R\$ 0,15/Kg) e alta disponibilidade no território brasileiro, o melaço de cana-de-açúcar tem sido sugerido como substrato para melhorar e reduzir custos na produção de diversos produtos, como, por exemplo, de ácido lático pelo *Lactobacillus curvatus* (HAULY et al., 2003) e para produção de etanol, levana e sorbitol a partir de *Zymomonas mobilis* (LIMA et al., 1975).

O melaço é um subproduto do processo de extração e refinação de sacarose, quer seja de cana ou beterraba, o qual pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de etanol por fermentação. O melaço de cana-de-açúcar caracteriza-se por apresentar maior conteúdo de vitaminas, ao passo que o melaço de beterraba é mais rico em nitrogênio e minerais. Ambos contém aproximadamente 50,0% de açúcar, sendo a maior parte sacarose.

A composição do melaço depende da variedade de cana-de-açúcar utilizada, portanto, fatores como: idade, limpeza, maturação, sistema de cultivo, adubação, tratos culturais e condições climáticas, além dos processos de fabricação normais utilizados nas diversas usinas, podem influenciar na sua composição química, conforme pode ser observado na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 Variabilidade de composição do melaço em Usinas de Açúcar.

Elemento	Valores observados					
	São Paulo			Alagoas		
	Médio	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo
Água (%)	17,3	8,2	26,8	-	-	-
Sólidos Totais (%)	82,7	73,2	91,8	-	-	-
Brix (%)	80,0	65,0	88,0	78,61	76,77	83,30
Pureza (%)	65,0	56,0	76,0	46,54	40,41	55,67
Sacarose (%)	52,0	47,0	64,0	-	-	-
Glicose (%)	12,0	6,0	20,0	-	-	-
Frutose (%)	9,0	5,0	17,0	-	-	-
Açúcares Redutores (%)	6,0	4,0	12,0	16,20	14,45	18,03
Açúcares Totais (%)	65,6	52,1	72,1	54,73	51,11	61,09
Gomas (ppm)	-	0,0	2000	-	-	-
pH	6,3	5,0	6,8	-	-	-
Cinzas (%)	5	3,5	7,0	-	-	-
P ₂ O ₅	0,05	0,01	0,15	0,07	0,02	0,14
K ₂ O	2,1	1,23	2,68	3,51	2,93	4,52
CaO	0,36	0,14	0,73	1,36	0,93	2,03
MgO	0,12	0,03	0,60	1,03	0,60	1,31
SiO ₂	0,58	0,56	0,62	-	-	-
F ₂ O ₃	0,32	0,28	0,56	-	-	-
SO ₃	1,17	1,0	1,19	-	-	-
Cl	0,18	0,14	0,28	-	-	-
Na ₂ O	0,12	0,11	0,19	-	-	-
Vitaminas A ₁ , B ₁ e B ₂	variável	variável	variável	-	-	-

Fonte: Copersucar (1988).

Doelle e Greenfield (1985) detalharam, ainda mais, estes fatores que influenciam a composição do melaço, aos quais acrescentaram: natureza da matéria prima (cana de açúcar, beterraba, etc); processo de extração do caldo; sistema de clarificação, evaporação e cozimento; sistema de resfriamento; sistema de turbinagem; tipo de açúcar e condições técnico-econômicas da região açucareira.

A composição média do melaço de cana-de-açúcar corresponde a 20% de água; 72% de constituintes orgânicos dos quais 62% correspondem aos açúcares (sacarose, glicose, frutose, ou açúcar invertido e rafinose), 10% de não açúcares (material nitrogenado, ácidos livres e combinados e substâncias gomosas solúveis) e 6% de constituintes inorgânicos (óxidos de silício, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro, fósforo e alumínio, além de resíduos de soda,

carbonatos, sulfatos e cloretos) (SOCCOL et al.,1990).

Além do melão de cana-de-açúcar, existe o melão de alta qualidade (HTM). O HTM é definido como xarope clarificado, parcialmente invertido para evitar a cristalização e evaporado a 85° Brix. A composição do melão de alta qualidade difere notavelmente da composição do melão tradicional. Possui alto conteúdo de açúcares o que o torna muito interessante para a produção de álcool. O conteúdo de P₂O₅, K₂O, MgO, CaO e nitrogênio é mínimo, comparado com a do melão de cana e de beterraba (CROMIE, DOELLE, 1980).

Gunasekaran e colaboradores (1986) estudaram o efeito da adição de melão de cana-de-açúcar em meios de cultivo para a produção de etanol, com diferentes linhagens *Zymomonas mobilis*. As linhagens ATCC 10988 (3,05% v/v) e NRRL B 4286 (3,29% v/v) mostraram máxima produtividade enquanto que, a IFO 13756, mínima produtividade (1,97% v/v). A partir desses resultados, a performance de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 foi mais bem estudada em diferentes concentrações de açúcares presentes no melão de cana-de-açúcar. A Tabela 3.11 mostra que a máxima produção de etanol (3,35% v/v) foi com 15% de concentração inicial de açúcar e, abaixo dessa concentração, a produção de etanol diminuiu significativamente. Em geral, os autores concluíram que a habilidade das linhagens de *Zymomonas mobilis* produzirem etanol a partir de melões foi menor quando comparada com os outros substratos (meio sintético e cana-de-açúcar). Esta observação é semelhante com os resultados obtidos por Van Vuuran e Meyer (1982), que relatam que isso poderia estar relacionado à presença de altas concentrações de íons Mg⁺² e K⁺ nos melões (SKOTNICK et al., 1983).

Tabela 3.11 Efeito da concentração inicial de açúcar sobre a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* ATCC 10988.

Açúcar inicial	Produção de etanol	Rendimento teórico
(% v/v)	(% v/v)	(%)
3	1,25	65,1
5	2,0	62,5
7	2,5	55,8
10	3,05	47,66
15	3,35	34,9

Fonte: Gunasekaran e colaboradores (1986).

Jerez (1993) conduziu um estudo sobre métodos e condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CP4 e seu efeito sobre os parâmetros cinéticos de fermentação. Avaliou o efeito da temperatura, controle de pH e concentração de íons Ca^{+2} , K^{+1} , Cl^{-1} e Mg^{+2} num meio de fermentação contendo sacarose. No melaço de cana-de-açúcar, foram estudados os efeitos da clarificação e suplementação com nutrientes. Determinaram-se os parâmetros cinéticos de fermentação do melaço em processo descontínuo, descontínuo alimentado e contínuo em escala de laboratório, descontínuo e descontínuo alimentado em escala piloto. Os tratamentos de clarificação do melaço removeram Ca^{+2} e K^{+1} mas não aumentaram o rendimento da fermentação. Foi observado que Ca^{+2} , K^{+1} e Cl^{-1} são inibidores do crescimento e fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4, mas Mg^{+2} não apresentou efeito inibitório nas condições estudadas. Portanto, é necessária a suplementação de alguns nutrientes no melaço para aumentar os rendimentos da produção de levana.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado neste trabalho foi a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, adquirida da Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio de Manutenção da Cultura

A linhagem bacteriana foi cultivada e mantida em meio de manutenção contendo: caldo de cana clarificado; água destilada; CaCO₃; extrato de levedura e agar nutriente. Para clarificação do caldo de cana-de-açúcar, foram adicionadas claras de ovo ao caldo e este foi submetido ao “vapor fluente”, por 15 minutos, e em seguida filtrado com algodão e papel filtro. Após a inoculação, as células foram incubadas por 24 horas a 30°C e, então, estocadas a 4°C. Para melhor conservação da cultura, repiques foram feitos, em média, a cada três meses. A Tabela 4.1 ilustra a composição do meio de manutenção de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Tabela 4.1 Meio de manutenção do microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Composto	Concentração
Caldo de cana clarificado	100,0 mL
Água destilada	30,0 mL
CaCO ₃	0,4 g
Extrato de levedura	0,4 g
Agar nutriente	1,5 g

4.2.2 Meios de Fermentação

Para a produção de etanol, levana e sorbitol, foram utilizados os meios de fermentação especificados a seguir:

4.2.2.1 Meio Sintético

O meio sintético utilizado nas fermentações foi semelhante ao definido por Rodriguez e Callieri (1986), conforme mostrado na Tabela 4.2, com algumas modificações, sendo composto de: extrato de levedura; KH_2PO_4 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e acrescido de sacarose e outros sais minerais (KCl , K_2SO_4 , MgSO_4 e CaCl_2). A solução de sacarose foi esterilizada separadamente a 121°C , por 20 minutos, e misturada assepticamente no momento do preparo do meio de produção contendo os demais constituintes que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados.

Tabela 4.2 Meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986).

Composto	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	5,0
KH_2PO_4	1,0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0

4.2.2.2 Meio com Caldo de Cana-de-Açúcar

O caldo de cana-de-açúcar foi clarificado e, em seguida, utilizando um refratômetro modelo Carl Zeiss, este foi ajustado em diferentes Teores de Sólidos Totais (TST): 50,0; 150,0 e 250,0 g/L, com água destilada estéril. Os frascos de Erlenmeyer, contendo o caldo de cana-de-açúcar clarificado com a concentração de sólidos totais adequada, foram esterilizados separadamente a 121°C , por 20 minutos, dos demais constituintes do meio de fermentação que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados.

4.2.2.3 Meios com Melaços de Cana-de-Açúcar

O melaço de cana-de-açúcar e o melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade (HTM) foram diluídos com água destilada estéril para 30° Brix, utilizando um refratômetro modelo Carl Zeiss e, posteriormente, clarificados. Em seguida, foram ajustados em diferentes Teores de

Sólidos Totais (TST): 50,0; 150,0 e 250,0 g/L, com água destilada estéril. Os frascos de Erlenmeyer, contendo os melaços de cana-de-açúcar clarificados, com a concentração de sólidos totais adequada, foram esterilizados separadamente a 121°C, por 20 minutos, dos demais constituintes que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados.

4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 Preparo do Pré-Inóculo

A partir da cultura de *Zymomonas mobilis* armazenada em geladeira, em meio de manutenção, fez-se o pré-inóculo para a reativação das células. A cepa foi repicada por esgotamento em tubos de ensaio inclinados contendo o meio de manutenção conforme descrito no item 4.2.1 e estes foram incubados em estufa a 30°C, por 24 horas.

4.3.2 Pré-Fermentação

Após a incubação, como descrito em 4.3.1, foi feita a suspensão da cultura de células bacterianas pela adição de 5,0 mL de água destilada estéril e, em seguida, esta foi transferida para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 30,0 mL do meio sintético, proposto por Rodriguez e Callieri (1986), adicionado de 20,0 mL de uma solução de sacarose (Sigma-EUA) na concentração de 2,0% e o pH do meio ajustado para 7,0 com NaOH. O pré-inóculo foi mantido a 30°C, por 24 horas, a 200 rpm (rotações por minuto), em “Shaker Marconi”, modelo MA 830.

4.3.3 Fermentação

4.3.3.1 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 com *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

A suspensão celular obtida na pré-fermentação (item 4.3.2) foi diluída com água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão com absorvância da ordem de 0,300 a 570 nm.

A partir da curva de calibração da concentração celular de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (item 4.3.3.1.1), que relaciona a absorvância com concentração celular, foi possível calcular o inóculo inicial de células transferido nos frascos de Erlenmeyer contendo o meio de fermentação.

Para todos os experimentos realizados, foi padronizado o inóculo inicial de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em 0,28 mg de peso seco/50,0 mL, correspondente à absorvância da suspensão de 0,300 a 570 nm.

O espectrofotômetro utilizado para determinações fotométricas foi o modelo Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”.

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

Para a construção da curva de calibração da concentração celular, foi utilizada suspensão de *Zymomonas mobilis* CCT obtida após o processo de pré-fermentação.

A construção da reta de calibração foi executada da seguinte forma:

- Um volume de 50,0 mL de cultura de células de *Zymomonas mobilis*, obtido nas condições de pré-fermentação, foi centrifugado a 6941g a 4°C, durante 15 minutos, e lavado duas vezes com água destilada;

- A massa celular úmida foi, então, ressuspensa em 50,0 mL de água destilada (suspensão original) e posteriormente foram preparadas diferentes diluições;
- Um volume de 5,0 mL da suspensão celular original e de cada diluição de suspensão de células foram colocados em cadinhos de porcelana, previamente secos em estufa a 90°C, e pesados em balança analítica;
- Os cadinhos, contendo a suspensão celular original e as diferentes diluições, foram levados em estufa a 102-105°C, por 24 horas;
- Os cadinhos foram transferidos para um dessecador, contendo cristais de sílica, e mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos para resfriamento;
- Os cadinhos foram pesados em balança analítica, transferidos novamente para o dessecador e, após 30 minutos, novamente pesados; a fim de confirmar a constância das medições, a operação foi repetida cerca de 2 horas depois;
- Uma vez conhecidos o volume e a massa de células, esta última obtida pela subtração do peso dos cadinhos vazios e do peso dos cadinhos com células, foi determinada a concentração celular da suspensão celular original e a das amostras que foram diluídas;
- Paralelamente, foram feitas leituras de absorvância a 570 nm com a amostra da suspensão celular original e com das diluídas em espectrofotômetro modelo Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”.
- Com base nas absorvâncias das amostras diluídas e da suspensão original, foi construída a reta de calibração, relacionando a absorvância com a concentração celular (Tabela 1.A e Figura 1.A, em anexo).

4.3.3.2 Otimização de alguns parâmetros de fermentação para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis* CCT 4494

Para o planejamento experimental utilizou-se o software *Statistica* 6.0 (StatSoft), a partir de um delineamento do tipo 2^{7-2} (BOX; HINTER, 1978), sendo necessários 32 experimentos, com 3 repetições no ponto central (pc), para cada meio fermentativo.

As variáveis independentes estudadas foram: X_1 = pH inicial do meio de cultivo; X_2 = temperatura em °C; X_3 = KCl g/L; X_4 = K_2SO_4 g/L; X_5 = $MgSO_4$ g/L; X_6 = $CaCl_2$ g/L e X_7 = sacarose ou Teor de Sólidos Totais (TST) em g/L.

As respostas analisadas foram: produção de levana (Y_1), etanol (Y_2) e sorbitol (Y_3) em mg/mL. Os blocos 1, 2, 3 e 4 corresponderam aos meios: sintético; caldo de cana-de-açúcar; melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade (HTM) e melaço de cana-de-açúcar, respectivamente. A Figura 4.1 apresenta a estratégia realizada com os diferentes meios de fermentação testados para a produção de etanol, levana e sorbitol pelo microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e, na Tabela 4.3, estão as variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção dos produtos de fermentação, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

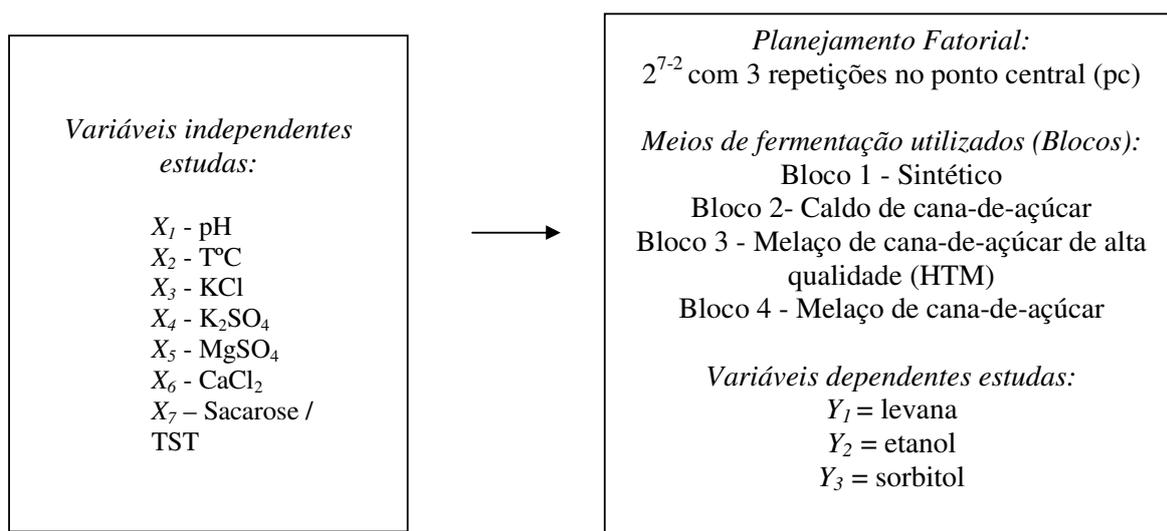


Figura 4.1 Estratégia realizada com diferentes meios de fermentação para a produção de levana (Y_1), etanol (Y_2) e sorbitol (Y_3), por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Tabela 4.3 Variáveis independentes, codificadas, estudadas para a produção de levana (Y_1), etanol (Y_2) e sorbitol (Y_3), por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X_1 - pH	4	6	8
X_2 - T°C	20	30	40
X_3 - KCl (g/L)	5,0	11,5	18,0
X_4 - K ₂ SO ₄ (g/L)	5,0	11,5	18,0
X_5 - MgSO ₄ (g/L)	5,0	12,5	20,0
X_6 - CaCl ₂ (g/L)	1	6	11
X_7 - Sacarose / TST (g/L)	50	150	250

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Após os processos fermentativos, acompanhou-se, através de retiradas de amostras, a determinação: do pH, da concentração celular, dos produtos da fermentação (etanol, levana e sorbitol), de Açúcares Totais (AT) e Açúcares Redutores (AR) e da atividade da enzima levanasacarase.

O esquema de tratamento analítico das amostras está representado na Figura 4.2.

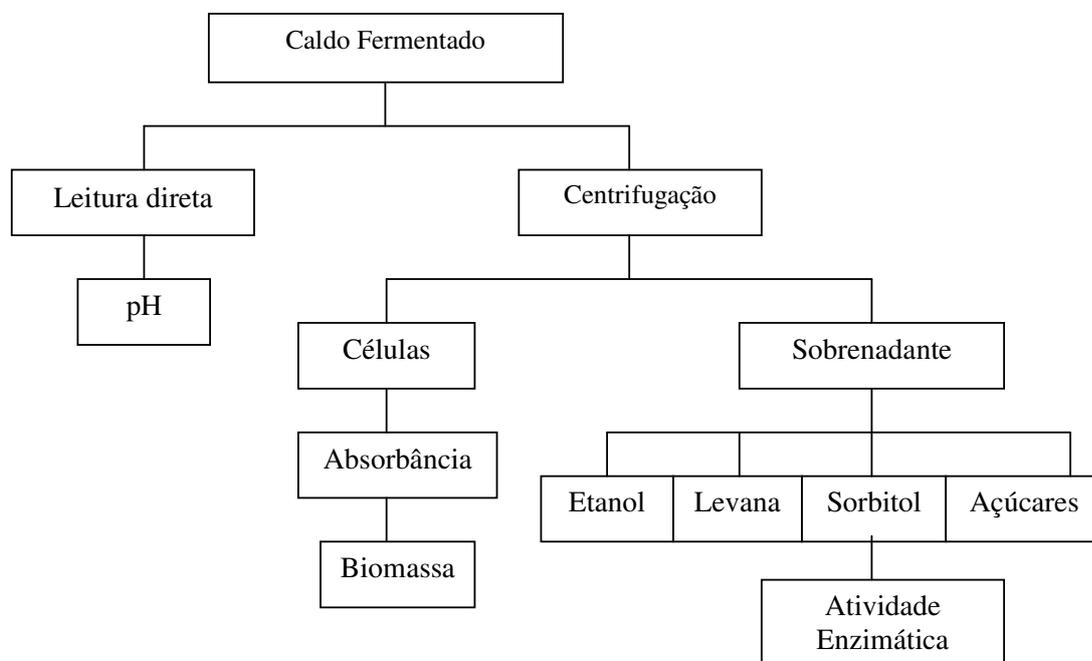


Figura 4.2 Esquema de tratamento analítico das amostras obtidas após processo fermentativo, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

4.4.1 Coleta e preparo das amostras

As amostras de cada ensaio foram colhidas a aproximadamente 20°C. Primeiramente, foi determinado o valor de pH final do caldo de fermentação e, em seguida, 10,0 mL do caldo foram centrifugados a 6941g, 4°C, durante 15 minutos, para a medição da concentração celular em espectrofotômetro. O restante do caldo obtido da fermentação foi centrifugado nas mesmas condições e o sobrenadante foi separado e congelado para as análises posteriores (determinação dos produtos da fermentação, de açúcares totais, açúcares redutores e da atividade da enzima levanasacarase).

4.4.2 Determinação do pH

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

4.4.3 Estimativa da Biomassa

Após a centrifugação do caldo fermentado, a concentração celular foi determinada pela medição da absorbância de suspensões diluídas em água destilada, a 570 nm, para sua conversão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume), através de reta de calibração da concentração celular de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, conforme descrita no item 4.3.3.1.1. As medições foram executadas em espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam”.

4.4.4 Determinação de Etanol

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa, após separação das células por centrifugação, utilizando Cromatógrafo - HP-5890 Série II - detector FID (Flame Ionization Detector).

As condições de operação foram as seguintes:

- Cromatógrafo - HP-5890 Série II - detector FID (Flame Ionization Detector);
- Coluna – HP-FFAP (25m x 0.2mm x 0.3um);
- Temperatura do forno = 70°C (mantendo esta temperatura por toda corrida - isotérmica);
- Tempo da corrida = 3,2 minutos;
- Temperatura do injetor = 250°C;
- Temperatura do detector = 250°C;
- Injeção = 40 µl de vapor da amostra;
- As amostras foram deixadas em “dry block” em uma temperatura de 40°C (até atingir o equilíbrio).

Foi feita a solução padrão de 50 µl de etanol. O tempo de retenção de etanol foi de 2,825 minutos e a área foi de 0,2 mV/min.

4.4.5 Determinação de Levana

A determinação da levana foi realizada adotando-se a técnica de Viikari (1984), com algumas modificações. Retirou-se, volumetricamente, uma quantidade do sobrenadante obtido após a centrifugação e adicionou-se etanol anidro, previamente resfriado. Homogeneizou-se a solução e deixou-se em repouso, por 24 horas na temperatura de 4°C. A solução foi centrifugada a 3123 g e 4°C, durante 20 minutos, e a operação de precipitação pelo etanol foi repetida novamente para aumentar o grau de pureza do material isolado. A levana precipitada foi hidrolisada em frutose, com HCl 0,5%, à temperatura de ebulição da água, por 60 minutos. Neutralizou-se o material hidrolisado com NaOH 2 M. A pureza da levana foi estimada indiretamente como frutose (em g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944). A Figura 4.3 esquematiza o procedimento de separação, hidrólise e quantificação da levana. Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda de 540 nm tendo como base amostras de frutose com concentrações conhecidas e, posteriormente, construiu-se uma curva de

calibração utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (Tabela 4.5 e a Figura 4.5, em anexo).

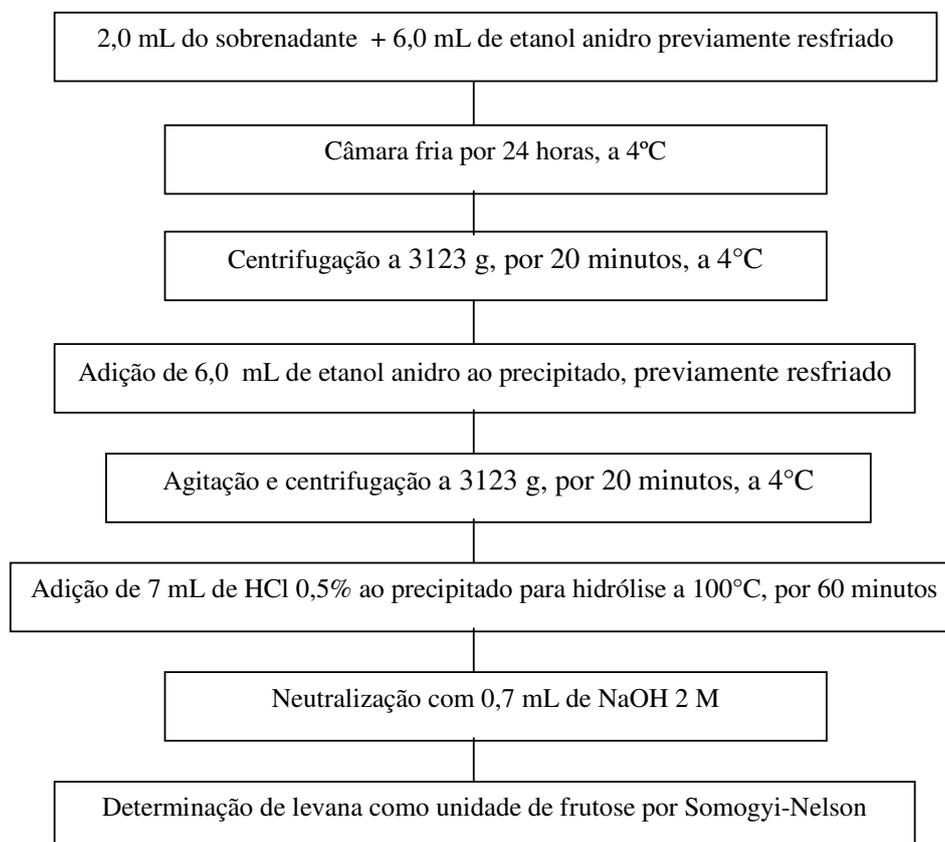


Figura 4.3 Fluxograma de separação, hidrólise e quantificação de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, após fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.

4.4.6 Determinação de Sorbitol

O teor de sorbitol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

As condições de operação foram as seguintes:

- Cromatógrafo HPLC – PU-980/JASCO;
- Coluna Aminex HPX - 87C, com 300x78 mm;
- Temperatura do forno = 80°C;
- Fluxo = 0,6 mL/min;
- Solvente = Água MiliQ;

- Detector de índice de refração SHODEX RI-72;
- Tempo da corrida = 30 minutos;
- Injeção = 300 ul da amostra.

4.4.7 Determinação de Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Totais (AT)

Os Açúcares Redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944) e os Açúcares Totais (AT) pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois e colaboradores (1956).

Foram realizadas leituras de absorvância no comprimento de onda desejado para cada método utilizado, tendo como base amostras de açúcares com concentrações conhecidas e, posteriormente, construiu-se uma curva de calibração utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (Tabela 1.B e a Figura 1.B, em anexo) e Dubois e colaboradores (Tabela 1.C e Figura 1.C, em anexo).

4.4.8 Determinação da atividade da enzima levanasacarase “in vitro”

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizada uma amostra do sobrenadante obtido após o processo de fermentação com a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, como extrato enzimático bruto, correspondente às melhores condições de experimento para a síntese de levana

A determinação da atividade aparente da enzima levanasacarase foi realizada adotando-se a técnica de Wendt (2001), com algumas modificações. Uma mistura reacional composta por 100 µL do extrato enzimático bruto e 900 µL de sacarose 10,0 % em tampão acetato de sódio 0,05 M e pH 4,0, reagiu a 30°C por 2 horas. Foi feito um branco de reação (100 µL de extrato enzimático e 900 µL de tampão acetato de sódio pH 5,0). A reação enzimática foi interrompida por fervura em água durante 10 minutos para desnaturação da enzima. A concentração de glicose foi determinada através do método da glicose oxidase/peroxidase (Kit Bio Diagnóstica – Glicose

Enz Color). As leituras de absorvância foram feitas no espectrofotômetro Cintra 5 UV-VIS “DoubleBeam” a 500nm e correlacionadas a uma curva padrão de glicose feita previamente (Tabela 1.D e Figura 1.D, em anexo).

Uma unidade de atividade da enzima levanasacarase (atividade de transfrutossilacão) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μ mol de glicose/minuto/mL (YANASE et al., 1992).

4.4.9 Produção e determinação de levana a partir do extrato enzimático

Para a produção de levana, realizou-se uma mistura reacional composta por 3,0 mL do extrato enzimático bruto (item 4.4.8), correspondente às melhores condições de experimento para a produção de levana no meio de cultivo com a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 e incubada, por 24 horas, em “Shaker rotatório”. Após o processo fermentativo, a levana foi estimada indiretamente, como frutose (em g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (item 4.4.5).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi aplicada a metodologia de superfície de resposta, utilizando planejamento fatorial 2^{7-2} , de Box e Hunter (1978), totalizando 140 experimentos. A fermentação submersa se processou a 200 rpm, por 24 horas, com controle de temperatura. As variáveis independentes foram: X_1 = pH do meio de cultivo, X_2 = temperatura em °C, X_3 = KCl g/L, X_4 = K_2SO_4 g/L, X_5 = $MgSO_4$ g/L, X_6 = $CaCl_2$ g/L e X_7 = sacarose ou Teor de Sólidos Totais (TST) g/L. Este método de planejamento experimental tem sido utilizado por diversos autores (CAÇÃO, 1999; BORSARI, 2004; NETO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004; BORSARI et al., 2006).

A avaliação dos efeitos das variáveis e a otimização das respostas foram obtidas mediante utilização de modelagem empírica e da estimação de parâmetros, empregando o programa *Statistica 6.0*, que descreve como as variáveis experimentais e suas interações influenciam na resposta.

A matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} , contemplando as 32 combinações e com 3 repetições no ponto central (pc), indicadas pelas corridas 33, 34 e 35, e os resultados dos experimentos visando a produção de levana (Y_1) e etanol (Y_2), pela bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494, a partir do meio sintético (bloco 1), caldo de cana-de-açúcar (bloco 2), melão de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM (bloco 3) e melão de cana-de-açúcar (bloco 4) estão apresentados nas Tabelas 5.1, 5.2, 5.3 e 5.4, respectivamente.

Tabela 5.1 Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio sintético (bloco 1) acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Corridas	Variáveis independentes							Respostas						
	g/L							mg/mL						
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	pH final	Biomassa	Y_1	Y_2	AR	AT	Sc
01	1	1	1	-1	-1	1	-1	4,43	7,32	0,38	10,54	9,0	13,90	36,10
02	1	1	1	-1	-1	-1	1	4,25	0,68	0,14	76,6	2,12	82,02	167,98
03	-1	1	-1	1	-1	1	-1	3,90	0,54	0,96	11,43	2,80	25,64	24,36
04	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	3,96	0,35	0,40	22,96	2,05	4,08	45,92
05	1	1	-1	1	1	1	1	3,85	0,71	3,14	30,57	5,15	148,16	101,84
06	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	3,90	0,24	0,55	50,26	2,09	98,43	151,57
07	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4,12	0,51	0,26	10,12	2,07	28,99	21,01
08	-1	-1	-1	1	1	1	1	3,88	0,53	2,23	12,1	4,06	218,36	31,64
09	1	-1	-1	-1	1	1	-1	5,66	0,72	0,58	12,42	2,6	23,86	26,14
10	1	1	1	1	1	1	-1	4,96	0,60	0,83	4,27	4,04	40,03	9,97
11	-1	-1	1	1	1	1	-1	3,90	0,58	2,16	1,91	5,97	41,03	8,97
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	4,59	4,48	0,19	10,03	2,83	12,22	33,78
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	5,23	0,84	0,69	12,97	2,94	22,53	27,47
14	-1	1	-1	-1	1	1	-1	3,64	0,66	0,98	11,42	5,66	27,16	22,84
15	1	1	1	1	1	-1	1	4,58	2,21	2,05	40,04	6,29	120,84	129,16
16	-1	1	1	1	-1	1	1	4,06	0,49	4,50	30,5	2,92	146,0	104,14
17	1	-1	-1	1	-1	1	-1	5,32	0,84	0,78	2,48	7,21	41,42	8,58
18	1	-1	-1	1	-1	-1	1	6,16	4,71	1,12	20,26	7,46	177,5	72,50
19	1	-1	1	1	-1	1	1	5,42	1,83	4,33	21,13	5,68	179,62	79,38
20	1	-1	-1	-1	1	-1	1	6,57	3,83	0,55	25,57	6,03	165,85	84,15
21	1	1	-1	-1	-1	1	1	4,48	4,24	0,49	26,22	2,15	163,03	86,97
22	-1	1	1	-1	1	-1	-1	3,90	0,50	0,35	22,94	2,34	5,15	44,85
23	-1	1	-1	1	-1	-1	1	3,88	0,45	0,59	15,37	1,95	203,96	46,04
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,56	0,54	0,11	20,15	2,66	9,05	40,95
25	-1	-1	1	1	1	-1	1	4,17	0,42	0,94	20,1	2,24	188,34	61,66
26	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	4,16	0,51	0,43	16,09	2,39	200,79	49,21
27	-1	1	-1	-1	1	-1	1	4,05	0,47	0,62	25,34	2,07	172,89	77,11
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	4,47	0,65	0,12	11,17	8,56	26,89	23,11
29	1	-1	1	-1	1	1	1	5,56	3,37	3,89	26,27	7,52	152,45	97,55
30	-1	1	1	-1	1	1	1	4,49	2,82	3,40	25,27	2,15	159,19	90,81
31	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	4,24	0,48	0,37	10,13	4,89	28,89	21,11
32	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6,78	3,50	0,09	10,01	4,29	23,39	26,61
33*	0	0	0	0	0	0	0	3,50	1,28	1,71	15,51	4,33	94,50	55,50
34*	0	0	0	0	0	0	0	3,90	1,25	1,78	15,13	4,33	96,77	53,23
35*	0	0	0	0	0	0	0	3,98	1,25	1,78	15,54	4,33	95,54	54,46

*Pontos Centrais.

X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura, °C); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (sacarose), em g/L.

Y_1 (levana); Y_2 (etanol); AR (Açúcares Redutores); AT (Açúcares Totais); Sc (Substrato consumido), em mg/mL.

Tempo de fermentação: 24 horas.

Tabela 5.2 Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar (bloco 2) acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Corridas	Variáveis independentes							Respostas						
	g/L							pH final	Biomassa	Y_1	Y_2	mg/mL		
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7					AR	AT	Sc
01	1	1	1	-1	-1	1	-1	4,5	4,75	0,10	0,11	6,15	40,29	19,21
02	1	1	1	-1	-1	-1	1	4,53	5,09	0,24	0,16	6,63	229,24	20,76
03	-1	1	-1	1	-1	1	-1	4,77	4,48	0,06	0,86	6,84	31,16	18,84
04	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	4,61	0,58	0,04	3,38	5,26	39,24	10,76
05	1	1	-1	1	1	1	1	4,74	4,98	1,05	3,76	10,04	215,65	34,35
06	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	4,76	0,9	0,16	0,13	2,33	244,05	5,95
07	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4,45	0,48	0,09	0,54	2,32	44,4	5,60
08	-1	-1	-1	1	1	1	1	3,93	0,98	0,52	0,32	2,60	246,36	3,64
09	1	-1	-1	-1	1	1	-1	5,91	4,95	0,23	0,07	6,32	29,99	20,01
10	1	1	1	1	1	1	-1	4,80	6,24	0,12	3,07	10,77	15,71	34,29
11	-1	-1	1	1	1	1	-1	4,5	0,56	0,10	2,90	4,85	40,64	9,36
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	4,64	6,62	0,47	0,10	8,02	22,95	27,05
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	6,17	3,99	0,05	0,06	5,35	33,93	16,07
14	-1	1	-1	-1	1	1	-1	4,25	0,97	0,05	0,51	2,78	42,35	7,65
15	1	1	1	1	1	-1	1	4,68	4,55	0,16	2,05	7,90	225,49	24,51
16	-1	1	1	1	-1	1	1	4,47	0,73	0,47	0,16	2,19	243,20	5,80
17	1	-1	-1	1	-1	1	-1	5,04	3,7	0,30	0,53	5,53	34,37	15,63
18	1	-1	-1	1	-1	-1	1	5,96	5,96	0,22	0,37	7,63	225,57	24,43
19	1	-1	1	1	-1	1	1	5,16	1,96	0,95	8,89	12,15	214,54	35,46
20	1	-1	-1	-1	1	-1	1	6,38	8,6	0,33	0,62	10,52	214,65	35,35
21	1	1	-1	-1	-1	1	1	5,02	8,0	0,20	0,64	9,94	217,16	32,84
22	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4,12	0,81	0,04	1,06	3,17	45,97	4,03
23	-1	1	-1	1	-1	-1	1	4,29	1,42	0,32	0,60	3,32	243,40	6,60
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,06	0,62	0,05	2,01	3,93	43,30	6,70
25	-1	-1	1	1	1	-1	1	4,32	0,51	0,73	0,53	2,34	241,15	8,85
26	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	4,41	1,81	0,59	0,91	4,02	241,26	8,74
27	-1	1	-1	-1	1	-1	1	4,23	0,94	0,69	0,81	3,05	237,8	12,20
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	5,31	7,19	0,07	0,07	8,56	21,10	28,90
29	1	-1	1	-1	1	1	1	6,16	8,28	0,48	3,80	13,38	205,0	45,0
30	-1	1	1	-1	1	1	1	4,30	2,40	0,62	0,95	4,65	238,83	11,17
31	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	4,60	2,96	0,23	0,22	4,48	37,71	12,29
32	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6,51	9,31	0,06	2,09	12,27	6,43	43,57
33*	0	0	0	0	0	0	0	4,72	7,70	0,27	0,93	9,93	218,0	32,0
34*	0	0	0	0	0	0	0	4,69	5,77	0,24	1,46	8,53	222,3	27,70
35*	0	0	0	0	0	0	0	4,65	5,18	0,26	3,17	9,65	219,51	30,49

*Pontos Centrais.

X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura, °C); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST), em g/L.

Y_1 (levana); Y_2 (etanol); AR (Açúcares Redutores); AT (Açúcares Totais); Sc (Substrato consumido), em mg/mL.

Tempo de fermentação: 24 horas.

Tabela 5.3 Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM (bloco 3) acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Corridas	Variáveis independentes							Respostas						
	g/L							pH final	Biomassa	Y_1	Y_2	mg/mL		
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7					AR	AT	Sc
01	1	1	1	-1	-1	1	-1	4,90	7,97	0,08	0,003	9,35	18,04	31,96
02	1	1	1	-1	-1	-1	1	5,22	7,31	1,37	0,063	9,98	216,49	33,51
03	-1	1	-1	1	-1	1	-1	5,04	0,75	0,10	0,361	2,15	47,58	2,42
04	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	4,98	0,49	0,12	0,002	1,91	48,74	1,22
05	1	1	-1	1	1	1	1	5,13	5,30	2,75	0,021	9,35	220,53	29,47
06	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	5,37	1,33	1,83	0,072	4,46	239,12	10,88
07	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4,90	0,87	0,18	0,021	2,35	47,86	2,14
08	-1	-1	-1	1	1	1	1	5,32	1,88	1,01	0,318	4,19	239,13	10,87
09	1	-1	-1	-1	1	1	-1	6,34	2,01	0,18	0,067	3,49	41,71	8,29
10	1	1	1	1	1	1	-1	4,78	4,56	0,23	0,003	6,09	31,53	18,47
11	-1	-1	1	1	1	1	-1	4,95	0,87	0,17	0,014	2,34	47,89	2,11
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	4,89	2,49	0,20	0,001	3,99	39,84	10,16
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	6,68	4,50	0,20	0,085	6,0	31,72	18,28
14	-1	1	-1	-1	1	1	-1	4,83	1,02	0,16	0,010	2,48	45,75	4,25
15	1	1	1	1	1	-1	1	5,17	5,21	1,86	0,015	8,37	223,57	26,43
16	-1	1	1	1	-1	1	1	5,18	3,40	2,23	0,022	6,93	229,88	20,12
17	1	-1	-1	1	-1	1	-1	6,38	3,96	0,23	0,061	5,49	33,87	16,13
18	1	-1	-1	1	-1	-1	1	5,86	1,93	0,73	0,100	3,96	241,45	8,55
19	1	-1	1	1	-1	1	1	5,94	2,29	2,12	0,345	5,71	234,13	15,87
20	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5,90	1,73	1,39	0,520	4,42	238,39	11,61
21	1	1	-1	-1	-1	1	1	5,37	3,26	2,83	0,008	7,39	228,06	21,94
22	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4,97	0,81	0,08	0,099	2,19	48,01	1,99
23	-1	1	-1	1	-1	-1	1	5,34	2,26	1,96	0,018	5,52	234,92	15,08
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	4,99	1,37	0,16	0,103	2,83	44,26	5,74
25	-1	-1	1	1	1	-1	1	5,41	1,0	1,99	0,013	4,29	240,03	9,97
26	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	5,25	3,0	0,97	0,014	5,27	237,02	12,98
27	-1	1	-1	-1	1	-1	1	5,33	1,84	2,16	0,012	5,30	236,15	13,85
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	5,01	4,29	0,17	0,016	5,76	36,65	13,35
29	1	-1	1	-1	1	1	1	6,01	1,39	1,94	0,009	4,63	238,61	11,39
30	-1	1	1	-1	1	1	1	5,32	2,57	2,28	0,054	6,15	232,83	17,17
31	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	5,04	1,31	0,07	0,003	2,68	44,69	5,31
32	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6,37	2,57	0,09	0,063	3,88	39,57	10,43
33*	0	0	0	0	0	0	0	5,46	0,9	0,48	0,018	2,68	147,2	2,80
34*	0	0	0	0	0	0	0	5,39	0,78	0,42	0,012	2,50	147,58	2,42
35*	0	0	0	0	0	0	0	5,5	1,17	0,44	0,015	2,91	144,87	5,13

*Pontos Centrais.

X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura, °C); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST), em g/L.

Y_1 (levana); Y_2 (etanol); AR (Açúcares Redutores); AT (Açúcares Totais); Sc (Substrato consumido), em mg/mL.

Tempo de fermentação: 24 horas.

Tabela 5.4 Matriz do delineamento fracionado 2^{7-2} contemplando as 32 combinações, com 3 repetições no ponto central (pc), realizadas entre os níveis (-1) e (+1), para as respostas Y_1 e Y_2 , utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar (bloco 4) acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Corridas	Variáveis independentes							Respostas						
	g/L							pH final	Biomassa	Y_1	Y_2	mg/mL		
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7					AR	AT	Sc
01	1	1	1	-1	-1	1	-1	4,87	7,62	0,18	nd	9,10	19,34	30,66
02	1	1	1	-1	-1	-1	1	5,37	7,02	0,60	0,021	8,92	221,29	28,71
03	-1	1	-1	1	-1	1	-1	5,19	0,32	0,30	0,120	1,83	48,70	1,30
04	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	4,77	0,23	0,22	nd	1,84	48,92	1,08
05	1	1	-1	1	1	1	1	5,38	4,98	0,75	0,007	7,03	229,85	20,15
06	-1	-1	1	-1	-1	-1	1	5,00	1,03	0,78	0,024	3,11	245,08	4,92
07	-1	1	1	1	-1	-1	-1	4,65	0,89	0,26	0,007	2,45	47,69	2,31
08	-1	-1	-1	1	1	1	1	5,04	2,09	0,73	0,106	4,12	240,80	9,20
09	1	-1	-1	-1	1	1	-1	5,95	2,21	0,25	0,023	3,76	41,16	8,99
10	1	1	1	1	1	1	-1	5,15	4,07	0,40	nd	5,77	33,32	16,68
11	-1	-1	1	1	1	1	-1	4,67	0,99	0,27	0,004	2,56	47,48	2,52
12	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	4,92	1,99	0,10	nd	3,39	41,94	8,06
13	1	-1	1	-1	1	-1	-1	6,28	4,63	0,37	0,030	6,30	31,09	08,91
14	-1	1	-1	-1	1	1	-1	5,25	1,00	0,41	0,003	2,71	45,09	4,91
15	1	1	1	1	1	-1	1	5,46	5,21	0,50	0,006	7,01	228,66	21,34
16	-1	1	1	1	-1	1	1	5,24	3,14	0,70	0,007	5,14	236,74	13,26
17	1	-1	-1	1	-1	1	-1	6,46	3,55	0,44	0,020	5,29	35,36	16,64
18	1	-1	-1	1	-1	-1	1	5,56	1,36	0,38	0,033	3,04	244,26	5,75
19	1	-1	1	1	-1	1	1	5,51	1,99	1,01	0,115	4,30	329,01	10,99
20	1	-1	-1	-1	1	-1	1	5,48	1,50	0,63	0,173	3,33	243,20	6,80
21	1	1	-1	-1	-1	1	1	5,51	3,27	1,96	0,003	6,53	230,85	19,15
22	-1	1	1	-1	1	-1	-1	4,29	0,75	0,15	0,033	2,20	48,20	1,8
23	-1	1	-1	1	-1	-1	1	5,23	2,18	0,55	0,006	3,71	240,73	9,27
24	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	5,11	1,10	0,31	0,035	2,71	45,25	4,75
25	-1	-1	1	1	1	-1	1	5,00	1,15	0,28	0,004	2,73	245,12	4,88
26	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	5,06	3,01	0,54	0,004	4,85	237,42	12,58
27	-1	1	-1	-1	1	-1	1	5,13	1,75	0,34	0,004	3,39	242,66	7,34
28	1	1	-1	1	1	-1	-1	5,06	4,06	0,42	0,005	5,78	33,34	16,66
29	1	-1	1	-1	1	1	1	4,87	1,21	0,94	0,003	3,45	244,10	5,90
30	-1	1	1	-1	1	1	1	5,21	2,50	1,20	0,018	2,86	236,40	13,60
31	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	4,85	1,36	0,29	nd	3,90	44,27	5,73
32	1	-1	1	1	-1	-1	-1	6,64	2,19	0,12	0,021	4,32	41,12	8,88
33*	0	0	0	0	0	0	0	5,35	0,50	0,48	0,006	2,28	147,52	2,48
34*	0	0	0	0	0	0	0	5,61	0,56	0,55	0,004	2,41	147,21	2,79
35*	0	0	0	0	0	0	0	5,41	1,54	0,51	0,004	3,35	143,33	6,67

*Pontos Centrais.

X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura, °C); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST), em g/L.

Y_1 (levana); Y_2 (etanol); AR (Açúcares Redutores); AT (Açúcares Totais); Sc (Substrato consumido), em mg/mL.

nd (não determinado).

Tempo de fermentação: 24 horas.

5.1 PRODUÇÃO DE SORBITOL COM O MEIO SINTÉTICO, CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR E MELAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

De acordo com as condições de fermentação testadas com os diferentes meios de produção, a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, observou-se que não houve a quantificação de sorbitol nas amostras do caldo fermentado após as análises realizadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). Este fato pode ser justificado pela síntese de levana e etanol durante o processo de fermentação, pois a presença destes compostos, segundo a literatura, influencia no metabolismo de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e, conseqüentemente, na produção de sorbitol. Zachariou e Scopes (1986); Barrow e colaboradores (1984) e Bertasso (1996) relataram que, dependendo das condições oferecidas à fermentação, tais como a temperatura de incubação, aeração, presença de íons e outros componentes e o pH do meio, a rota metabólica de *Zymomonas mobilis* pode ser modificada e, com isso, influenciará o microrganismo a produzir outros produtos como acetaldeído, acetoína, ácido acético, glicerol, lactato, manitol, levana e rendimentos altos em etanol.

Segundo Barrow e colaboradores (1984), quando as células de *Zymomonas mobilis* estão submetidas em condições de estresse, como alta concentração de açúcares, a enzima GFOR fornece à célula alta concentração de sorbitol (um novo soluto para a célula), para contrapor os efeitos de desidratação provocada pela alta osmolaridade externa. Possivelmente, as variáveis independentes estudadas (temperatura de incubação, pH inicial, sais minerais e fonte de carbono presente no meio de fermentação) nos processos fermentativos realizados nesta pesquisa, não foram as adequadas para que as células de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 se submetessem a uma condição de estresse ocasionando, conseqüentemente, a inativação da atividade da enzima GFOR e ativação de outras enzimas (sacarase extracelular, levanasacarase) responsáveis pela produção de produtos como etanol e levana, conforme relatado anteriormente (SPRENGER, 1996; ZACHARIOU; SCOPES, 1986; BARROW et al., 1984; BERTASSO, 1996).

O efeito de diferentes condições de cultivo para a produção de sorbitol, principalmente as relacionadas a altas concentrações de açúcares sobre a atividade metabólica de *Zymomonas mobilis*, foi estudado por diversos pesquisadores. Bertasso (1996) estudou alguns parâmetros que interferem na biotransformação de frutose em sorbitol e constatou a manutenção da atividade da enzima glicose-frutose-oxidoreductase (GFOR) por longos períodos, com perda de 21% de atividade, após 340 horas do término do processo em batelada. A avaliação de concentrações iniciais de substratos (S_0) entre 100,0 e 750,0 g/L mostrou valores máximos na eficiência de conversão de até 91,8% em sorbitol, para uma concentração de glicose e frutose de 750,0 g/L. Vignoli (2003) verificou as variáveis importantes na produção de sorbitol através de planejamento estatístico e observou que as condições ótimas de cultivo encontradas por envolveram a utilização de células imobilizadas, no tempo de fermentação de 36 horas, na faixa de concentração de sacarose de 200,0 a 300,0 g/L. Estudos conduzidos por Doelle e Greenfield (1985) sugeriram que o pH pode ser um parâmetro muito importante para controlar a relação de conversão para sorbitol. Estes autores determinaram que a relação de sacarose para formação de sorbitol varia significativamente com as condições de cultivo, por exemplo, pH controlado de 5,0 e concentração inicial de sacarose de 288,0 g/L favorece a formação de sorbitol; entretanto pH próximo de 6,0 parece favorecer a formação de frutose.

5.2 PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM O MEIO SINTÉTICO

Foi analisado o bloco 1, original do planejamento experimental 2^{7-2} , correspondente ao meio sintético adicionado de sacarose e sais minerais, em diferentes valores de pH e temperatura de incubação durante 24 horas de fermentação, a 200 rpm, a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Pelo modelo estatístico proposto foi possível calcular: as estimativas dos efeitos; o grau de significância; as correlações entre as variáveis (p) e os coeficientes da regressão, conforme demonstrados nas Tabelas 5.5 e 5.6, para levana (Y_1) e etanol (Y_2), respectivamente.

Os modelos matemáticos obtidos para a obtenção das respostas levana (Y_1) e etanol (Y_2), com o bloco 1 (meio sintético), estão representados pelas equações parciais resumidas 5.1 e 5.2.

$$Y_1 = X_3 \cdot 0,727 + X_4 \cdot 0,675 + X_6 \cdot 1,293 + X_7 \cdot 1,232 + X_6 X_7 \cdot 0,688 + 1,243 \quad (5.1)$$

$$Y_2 = X_2 \cdot 4,524 + X_3 \cdot 5,928 - X_4 \cdot 7,001 - X_6 \cdot 8,487 + X_7 \cdot 16,96 + X_1 X_2 \cdot 4,688 + X_1 X_7 \cdot 6,465 + X_2 X_7 \cdot 4,663 - X_3 X_4 \cdot 4,479 - X_3 X_5 \cdot 5,584 - X_3 X_6 \cdot 5,017 + X_3 X_7 \cdot 8,324 + X_4 X_6 \cdot 4,011 - X_5 X_7 \cdot 3,875 + 19,361 \quad (5.2)$$

De acordo com o modelo matemático, os resultados obtidos com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a partir do bloco 1, demonstraram que o baixo valor de p encontrado para os interceptos (Y_1 e Y_2) indicou que os níveis foram bem escolhidas e que os coeficientes de regressão da equação descreveram o experimento acima de 90% de confiança ($r_{Y_1}^2 = 0,9969$ e $r_{Y_2}^2 = 0,9743$), para ambos os casos.

O bom desempenho do modelo adotado também pôde ser confirmado por não haver desvio significativo de regressão ($p > 0,05$), tanto para Y_1 e Y_2 .

A maior produção de levana (4,5 mg/mL) foi obtida nas condições de cultivo da corrida 16: 200 rpm, por 24 horas; pH 4; temperatura 40°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e sacarose 250,0 g/L (Tabela 5.1). A massa do biopolímero formada correspondeu a 1,8% do substrato inicial presente no meio sintético.

Sutherland (1999) aborda que existem vários fatores que podem influenciar na síntese do produto desejado e, dependendo das condições de fermentação empregadas no processo (pH, temperatura, fonte de carbono, tempo de incubação, etc.), o rendimento do biopolímero poderá reduzir ou aumentar. De acordo com o relato, foi observado que a massa de levana obtida neste experimento foi próxima à obtida por Viikari (1984), o qual relatou que 2,0% da sacarose (ATi) foram convertidos em levana, e por Rogers e colaboradores (1982) os quais observaram que

10,0% da sacarose, aproximadamente, foram convertidos para levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. Ainda, Carlos (1991) realizou ensaios de fermentação conduzidos em processo de batelada utilizando seis linhagens de *Zymomonas mobilis* (AG11, CP4, P4, Z-1-81, Z-1-87 e Z-1-88) e verificou que a melhor linhagem produtora de levana precipitável foi a Z-1-81, por apresentar maior capacidade de conversão de substrato a levana, formando 3,7 g/L de levana (expressa como frutose).

Conforme relatado por Belaich e Senez (1965), vários constituintes são utilizados não somente como fontes de energia para o desenvolvimento de *Zymomonas mobilis*, mas também como blocos construtivos para biossíntese de levana. Os resultados apresentados na Tabela 5.5 mostram que, para a produção de levana (Y_l), as variáveis independentes: KCl, K₂SO₄, CaCl₂ e sacarose e a interação CaCl₂ e sacarose foram significativas ($p < 0,05$) e, influenciaram de maneira positiva (*Coefficiente* > 0), tornando-se os principais fatores para a obtenção de melhores rendimentos do produto desejado na fermentação por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

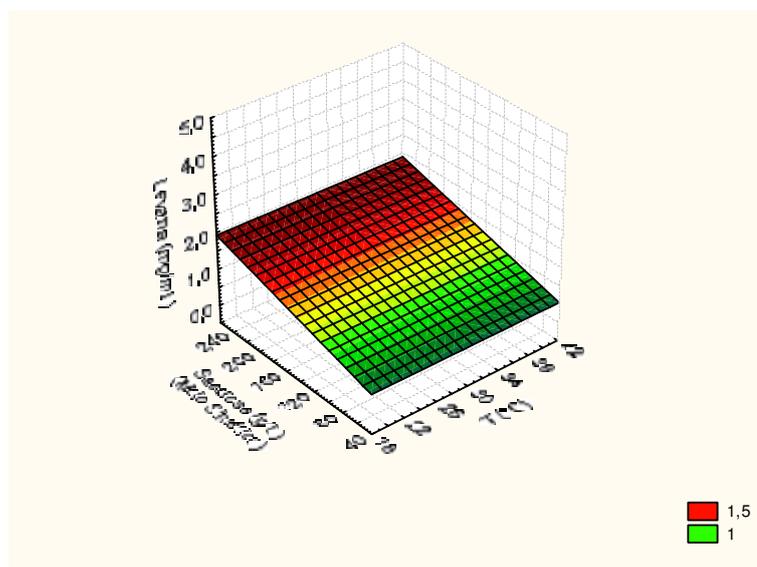
Tabela 5.5 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_l), utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Variáveis	Y_l		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	1,243	0,000	1,243
X_1	0,031	0,916	0,015
X_2	-0,012	0,966	-0,006
X_3^*	0,727	0,018	0,364
X_4^*	0,675	0,027	0,337
X_5^*	0,477	0,11	0,239
X_6^*	1,292	0,000	0,646
X_7^*	1,232	0,000	0,616
$X_6X_7^*$	0,688	0,036	0,344

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K₂SO₄); X_5 (MgSO₄); X_6 (CaCl₂); X_7 (sacarose) e Y_l (levana).

Com o auxílio da metodologia de superfície de resposta pode observar-se, na Figura 5.1, que a síntese de levana foi proporcional ao aumento da concentração da fonte de carbono sacarose. Nas menores concentrações de sacarose comercial (80,0 a 180,0 g/L) a produção do biopolímero permaneceu constante, sendo de aproximadamente 1,0 mg/mL, e nas maiores (180,0 a 250,0 g/L), acréscimo de 50% na massa de levana, havendo produção de 2,0 mg/mL de levana com a máxima concentração do substrato testado. Algumas pesquisas também concluíram que altas concentrações de sacarose inicial influenciam na formação do biopolímero durante o processo fermentativo com linhagens de *Zymomonas mobilis*, considerando as condições de fermentação empregadas em cada uma. Viikari e Gisler (1986) variaram a concentração inicial de sacarose (50,0; 100,0 e 150,0 g/L) e obtiveram máxima formação de levana com 150,0 g/L de substrato para a cepa *Zymomonas mobilis* estudada. Vinhas (1999) comparou diversas linhagens de *Zymomonas mobilis* utilizando sacarose em altas concentrações, à temperatura de 25°C por 72 horas. Os resultados mostraram que a melhor bactéria produtora foi a linhagem de *Zymomonas mobilis* ZAG-12, e que as melhores condições de fermentação foram com a concentração de sacarose inicial de 200,0 g/L.

(a)



(b)

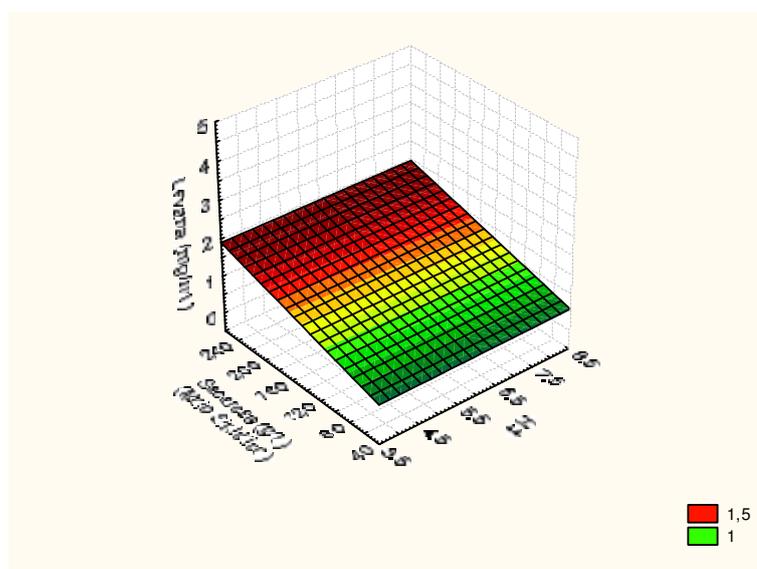


Figura 5.1 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e temperatura de incubação (°C) ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,3388 - 0,0007 * x + 0,0062 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH do meio de fermentação ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,2694 + 0,0081 * x + 0,0062 * y$).

Apesar de constar na literatura que o pH e a temperatura sejam fatores que influenciam no rendimento de polissacarídeos, estas variáveis estudadas não foram consideradas como parâmetros relevantes na produção do biopolímero levana. Este fato também foi observado por Silva (1996), ao estudar a influência do pH na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ZAG-12, na faixa de 4,5 a 6,0, em meio contendo 250,0 g/L de sacarose a 25°C. Este autor observou que não houve resultados satisfatórios sobre a produção deste biopolímero quando ajustado o pH inicial do meio de fermentação. Na Figura 5.1, observou-se que independente da faixa de temperatura de incubação e do pH inicial do meio de fermentação, as concentrações de levana produzida ficaram em torno de 1,0 a 1,5 mg/mL.

Várias pesquisas também foram realizadas com o objetivo de observar a influência de diferentes constituintes, além da fonte de carbono, presentes no meio de fermentação sobre o crescimento de *Zymomonas mobilis* e o mecanismo de ação de diferentes enzimas responsáveis pela produção de levana, devido ao fato de várias enzimas da via Entner Doudoroff requererem cofatores como magnésio, cálcio, potássio para a produção do biopolímero (HOPNER; DOELLE, 1983). Bekers e colaboradores (2000) pesquisaram o efeito de altas concentrações de sal durante a fermentação de sacarose (10,0%) por *Zymomonas mobilis* 113S, e verificaram que a concentração de 0,6M da solução de NaCl levou ao aumento da síntese de oligossacarídeos. Vigants e colaboradores (1996), utilizando diferentes concentrações de NaCl e KCl, demonstraram que esses sais proporcionaram aumento significativo na produtividade específica de levana. Posteriormente, estes mesmos pesquisadores, avaliaram o aumento da adição de sais na atividade de levanasacarase de *Zymomonas mobilis* e relataram que 0,4 M de NaCl aumentou a produtividade em 1,2 vezes, sugerindo ativação direta da levanasacarase por cloreto de sódio *in vitro*. A influência de íons também foi observada por Jerez (1993), quando estudou o efeito da variação da concentração de potássio e verificou que a taxa de desenvolvimento e a quantidade de levana formada foram proporcionais ao aumento da concentração de potássio.

Resultados semelhantes foram encontrados nesta pesquisa pois, além de sacarose comercial presente no meio de fermentação, a síntese de levana foi proporcional ao aumento da concentração de CaCl_2 (1,0 a 11,0 g/L), KCl (5,0 a 18,0 g/L) e K_2SO_4 (5,0 a 18,0 g/L).

Nas Figuras 5.2 e 5.3 pode-se visualizar que as maiores concentrações do biopolímero encontraram-se nas maiores concentrações dos sais testados, que influenciaram significativamente na formação do biopolímero.

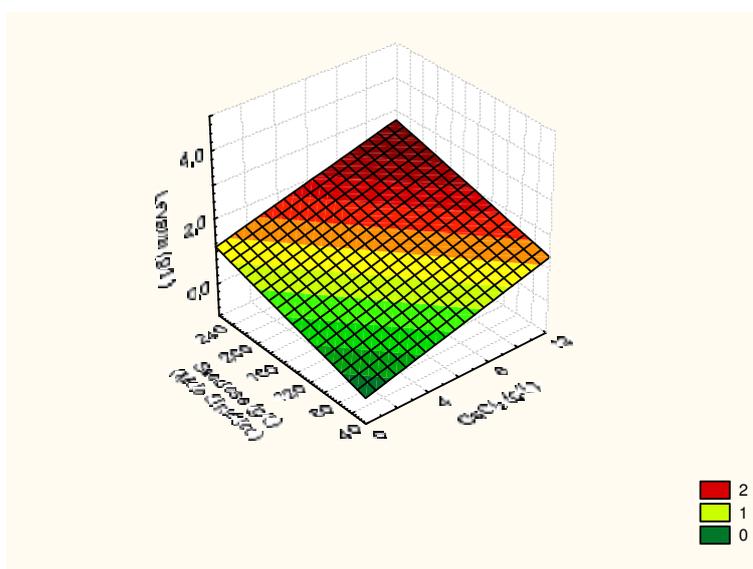


Figura 5.2 Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e CaCl_2 (g/L) (Levana (mg/mL) = $-0,4573+0,1292*x+0,0062*y$).

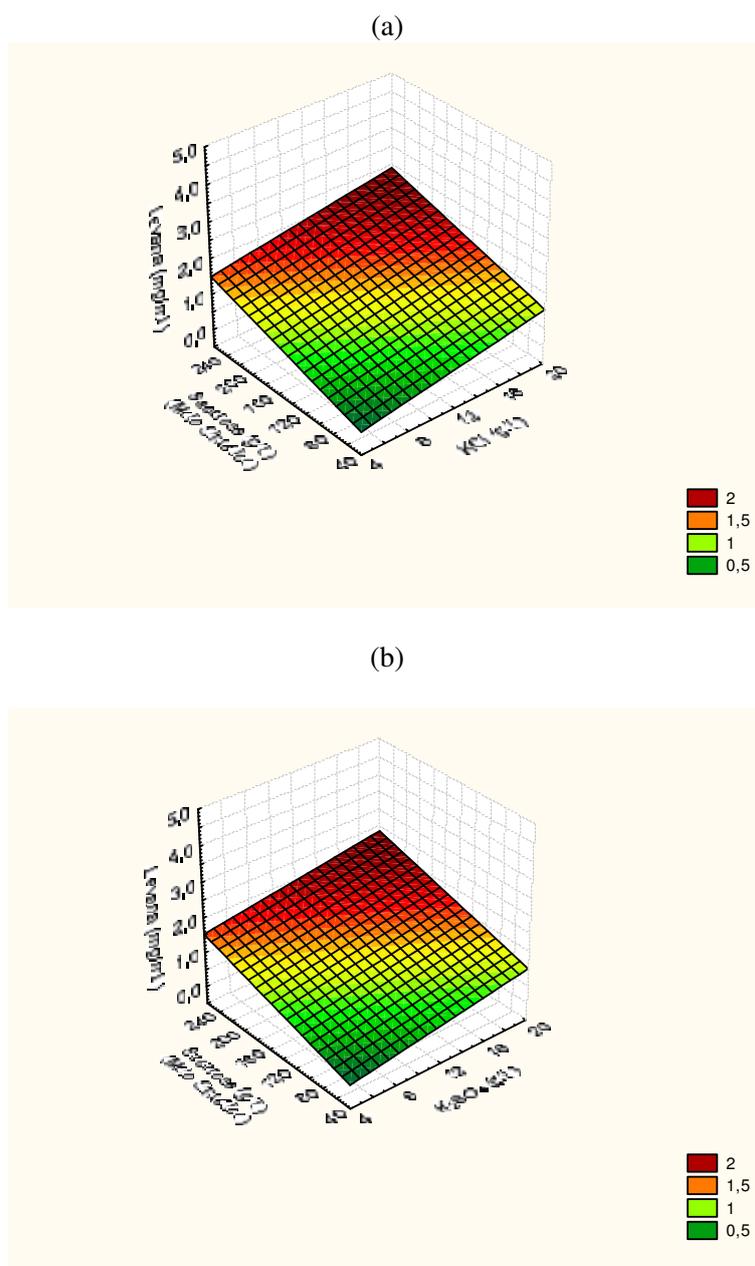


Figura 5.3 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e KCl (g/L) ($\text{Levana (mg/mL)} = -0,3254 + 0,056 * x + 0,0062 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e K_2SO_4 ($\text{Levana (mg/mL)} = -0,2778 + 0,0518 * x + 0,0062 * y$).

Os resultados da análise da produção de etanol por meio da análise de variância (ANOVA) mostraram que a maior produção de etanol (76,6 mg/mL) foi obtida nas condições de cultivo de: 200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 40°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 5,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 1,0 g/L e sacarose 250,0 g/L (Tabela 5.1), correspondente ao experimento 2. Esta concentração é superior às relatadas por outros autores como, por exemplo, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999), os quais produziram etanol com cepas de *Zymomonas mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2), obtidos através do tratamento com NTG (N-metil N'nitroso guanidina), e atingiram a produção máxima de etanol de 55,1; 41,0 e 44,2 g/L, respectivamente, em 24 horas de fermentação, a 30°C, com concentração de sacarose de 150,0 g/L, e ainda observaram que os mutantes ZML1 e ZML2 possuíam taxas de produção de etanol significativamente menores que a cepa natural.

As Figuras 5.4 e 5.5 mostram os cromatogramas correspondentes à produção de etanol, referentes ao maior (76,6 mg/mL) e ao menor valor (1,91 mg/mL), por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, após 24 horas de fermentação, com o bloco 1 (meio sintético).

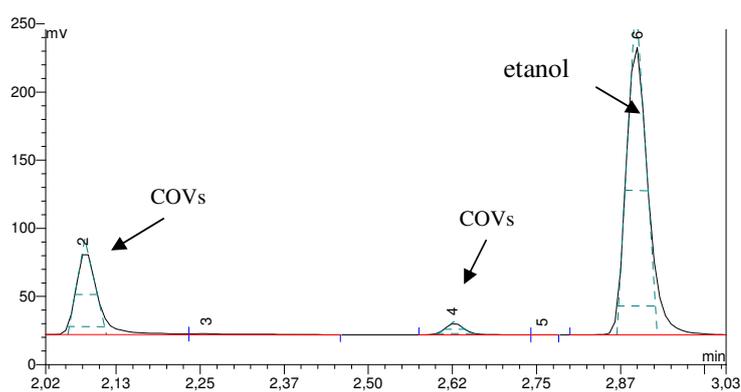


Figura 5.4 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 2, utilizando o meio sintético fermentado, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

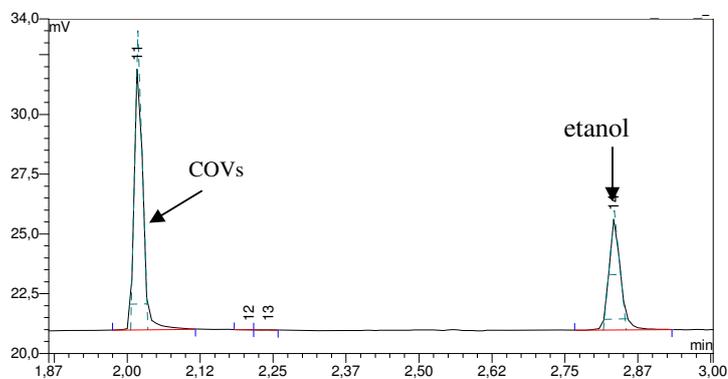


Figura 5.5 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 11, utilizando o meio sintético fermentado, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

De acordo com o planejamento experimental para etanol observou-se, na análise de variância (ANOVA) realizada com o auxílio do software *Statistica 6.0* que, além da fonte de carbono sacarose, outros constituintes influenciaram na fermentação alcoólica, com *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

As variáveis independentes significativas ($p < 0,05$) foram: temperatura; KCl e sacarose, com influência positiva (*Coefficiente* > 0) e K_2SO_4 e $CaCl_2$, com influência negativa (*Coefficiente* < 0) sobre a resposta, conforme mostra a Tabela 5.6.

Tabela 5.6 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Variáveis	Y_2		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	19,63	0,000	19,631
X_1	1,820	0,254	0,910
X_2^*	4,524	0,014	2,262
X_3^*	5,928	0,003	2,964
X_4^*	-7,007	0,001	-3,503
X_5	-1,980	0,217	-0,990
X_6^*	-8,487	0,000	-4,244
X_7^*	16,96	0,000	8,480
$X_1 X_2^*$	4,688	0,012	2,344
$X_1 X_7^*$	6,465	0,002	2,232
$X_2 X_7^*$	4,663	0,012	2,331
$X_3 X_4^*$	-4,479	0,015	-2,239
$X_3 X_5^*$	-5,584	0,005	-2,792
$X_3 X_6^*$	-5,017	0,008	-2,508
$X_3 X_7^*$	8,324	0,000	4,162
$X_4 X_6^*$	4,011	0,025	2,005
$X_5 X_7^*$	-3,875	0,029	-0,758

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (sacarose) e Y_2 (etanol).

As diferentes faixas de concentração de sacarose e da temperatura de incubação testadas no processo fermentativo foram significativas para a produção de etanol. A produção de etanol foi proporcional ao aumento das variáveis citadas, podendo ser observada, na Figura 5.6, que a faixa de temperatura entre 30,0 e 40,0°C e 250,0 g/L de substrato, foram as melhores condições de fermentação para *Zymomonas*, favorecendo a síntese do produto em concentrações entre 30,0 e 35,0 mg/mL.

Os resultados deste trabalho mostraram-se compatíveis com os citados por Borrego e colaboradores (1987), que estudaram o efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos de fermentação por *Zymomonas* e encontraram, na faixa de temperatura de 25,0 a 35,0°C, que a produtividade de etanol permaneceu constante, em aproximadamente 49,0 g/L.h, e que estes valores reduziram em temperatura menores que 25,0°C. Lyness e Doelle (1980) também

observaram variação na produção de etanol na faixa de 30,0 a 42,5 g/L, em função da variação da temperatura em meio utilizando sacarose (200,0 g/L), sendo que para faixa de temperatura entre 30,0 e 35,0°C encontraram concentração de etanol de 69,5 g/L para *Zymomonas mobilis* Z7 e de 66,1 g/L para *Zymomonas mobilis* Z10.

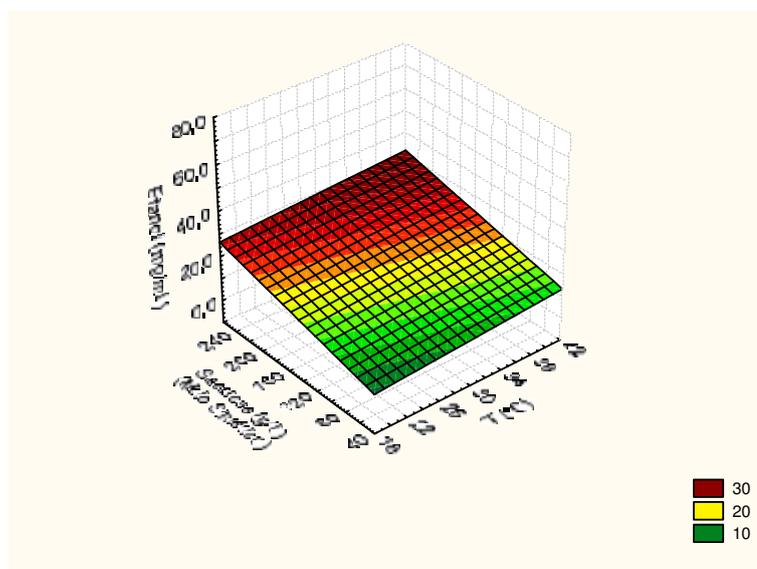


Figura 5.6 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e temperatura (°C) (Etanol (mg/mL) = $-0,398+0,2407*x+0,0865*y$).

A Figura 5.7 mostra concentração de etanol obtido no meio contendo diferentes concentrações de sacarose em relação ao pH inicial testado. Observou-se que a síntese do produto (10,0 – 30,0 g/L) foi proporcional ao aumento da concentração do substrato (50,0 - 250,0 g/L) e que a variação do pH inicial (4,0 – 8,0) não apresentou significância sobre a resposta.

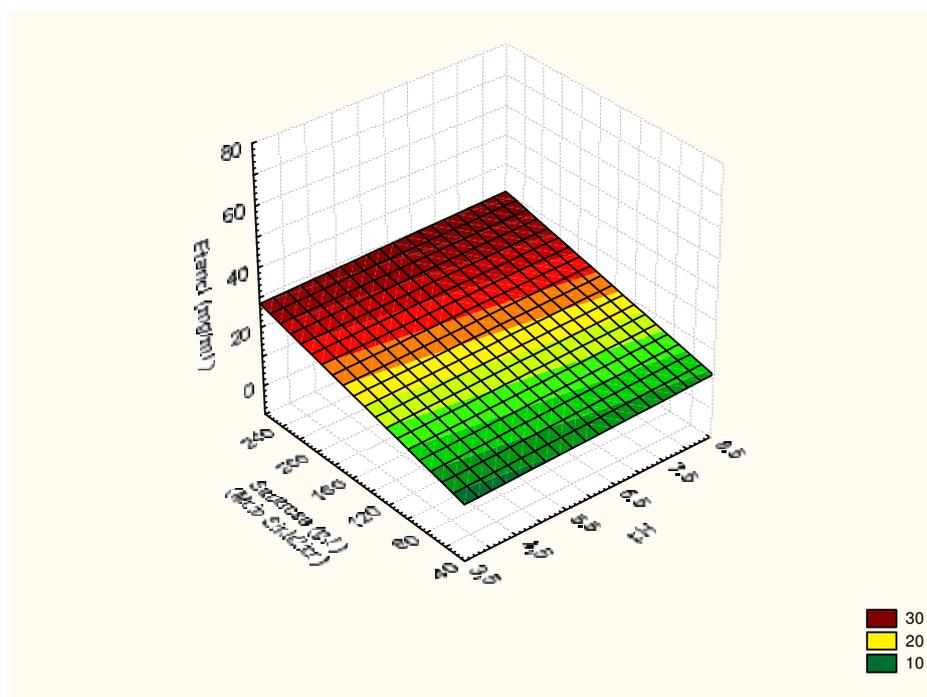


Figura 5.7 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $3,592+0,5384*x+0,0865*y$).

Apesar da concentração de etanol (76,6 mg/mL) obtida no experimento 2 ser superior a valores citados na literatura, observou-se pela análise de superfície de resposta, que as maiores concentrações do produto estavam no intervalo de 30,0 a 35,0 mg/mL, considerando todas as variáveis para sua otimização. Esta redução está relacionada a vários fatores que interferem no metabolismo fermentativo da bactéria (CROMIE; DOELLE, 1981).

Estudos ressaltam a importância do controle de alguns parâmetros de fermentação na formação dos subprodutos para aumentar o rendimento alcoólico (DIEZ et al., 1991). De modo geral, na literatura consta que a produção de etanol é favorecida em valores de pH entre 4,5 e 7,0 e que o controle do pH inicial é importante para que se possa maximizar a produção de etanol e reduzir a formação de outros subprodutos, como levana e sorbitol (KANNAN et al., 1997). Nesta pesquisa, as concentrações baixas de etanol obtidas nos meios de cultura foram inferiores aos encontrados na literatura. Possivelmente, esse fato ocorreu pela falta do controle do pH inicial durante todo processo fermentativo, possibilitando desvio no metabolismo celular e

ocasionado, conseqüentemente, condições propícias à formação do biopolímero (TANO; BUZATO, 2002). Relação similar foi descrita por Diez e colaboradores (1991), os quais relataram em sua pesquisa que o controle do pH é fator muito importante na hidrólise da sacarose e, portanto, na formação de etanol, concluindo ainda, que os rendimentos fermentativos foram superiores na fermentação com controle de pH.

As variáveis CaCl_2 , KCl e K_2SO_4 foram significativas tanto para obtenção de levana quanto para etanol no meio contendo sacarose comercial. A síntese de etanol foi proporcional ao aumento de KCl , entretanto, verificou-se que CaCl_2 e K_2SO_4 , em concentrações superiores a 5,5 g/L e 11,5 g/L, respectivamente, foram inibidores da fermentação alcoólica. As Figuras 5.8 e 5.9 mostram a superfície de resposta para etanol ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) em relação ao efeito destas variáveis.

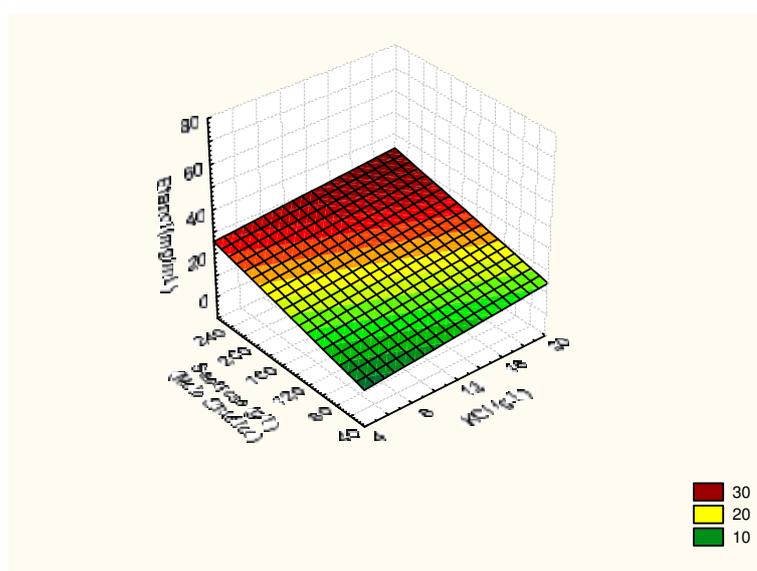
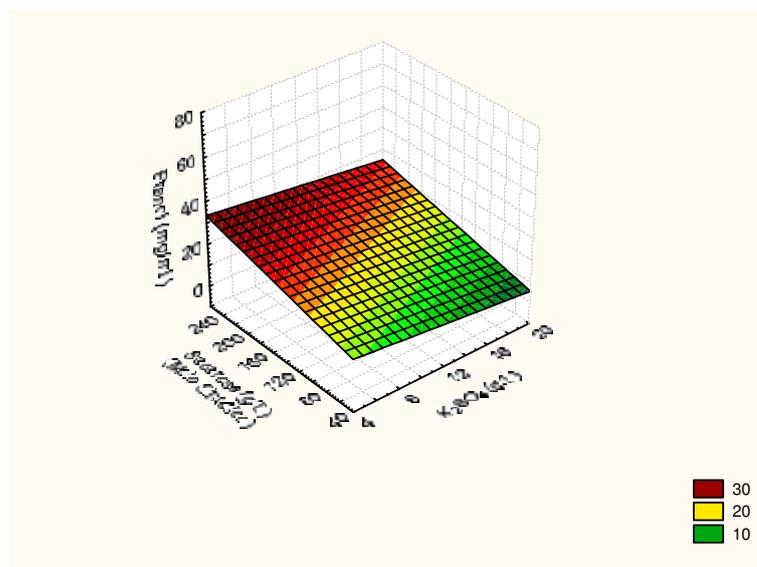


Figura 5.8 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor dos valores ótimos da concentração de sacarose comercial (g/L) e KCl (g/L) (Etanol (mg/mL) = $1,3226+0,4783*x+0,0865*y$).

(a)



(b)

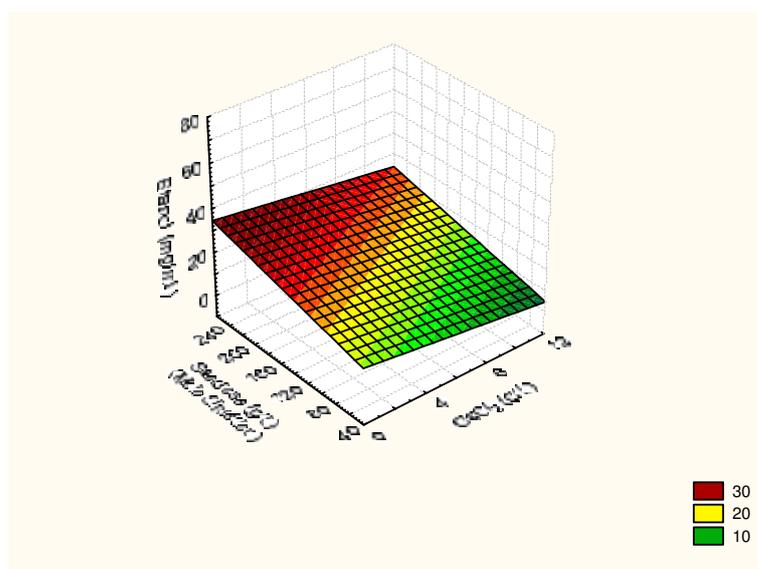


Figura 5.9 (a) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e K_2SO_4 (Etanol (mg/mL) = $13,3357 - 0,5663 * x + 0,0865 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e $CaCl_2$ (g/L) (Etanol (mg/mL) = $12,1154 - 0,8821 * x + 0,0865 * y$).

Congregado e colaboradores (1985) consideram que o desenvolvimento total do microrganismo depende da natureza dos fatores limitantes, e que o pH é um dos fatores mais comuns juntamente com a exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos. Este fato pode ser observado em nosso experimento, pois, o pH inicial do meio de fermentação foi a única variável independente que influenciou significativamente ($p < 0,05$) o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (Tabela 5.7). A metodologia de superfície de resposta mostrou nitidamente a influência positiva do pH inicial em relação a concentração de biomassa, resultando em concentrações entre 2,0 e 3,5 mg/mL, com pH 7,5 e 8,5, e menor que 2,0 g/L, para pH inicial menor que 7,0 (Figura 5.10).

Tabela 5.7 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta biomassa, utilizando o meio sintético acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Variáveis	Biomassa		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	1,554	0,000	1,554
X_1 *	1,902	0,000	0,951
X_2	0,252	0,507	0,126
X_3	0,135	0,720	0,067
X_4	-0,798	0,056	-0,399
X_5	-0,756	0,068	-0,378
X_6	0,116	0,757	0,058
X_7	0,275	0,471	0,137
$X_1 X_5$ *	-1,077	0,016	-0,538
$X_3 X_6$ *	0,957	0,027	0,478
$X_4 X_6$ *	-0,951	0,028	-0,475
$X_5 X_7$ *	0,907	0,034	0,453

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (sacarose) .

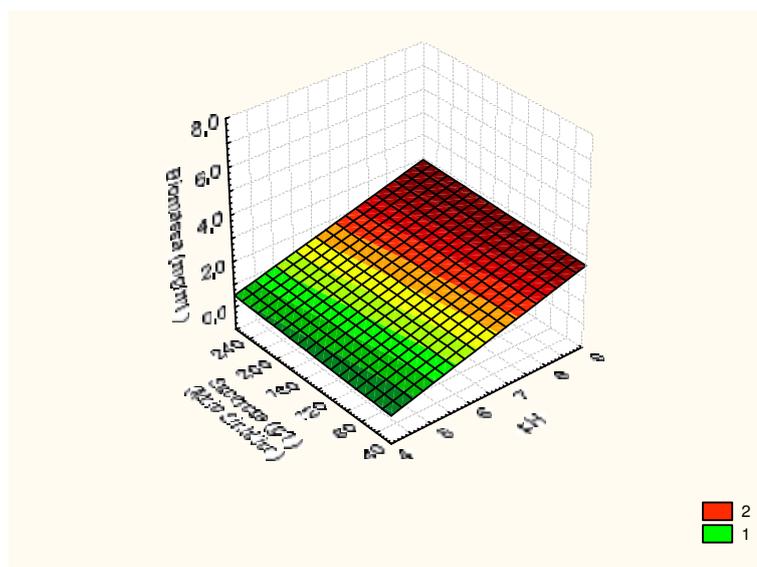


Figura 5.10 Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-1,5057+0,4756*x+0,0014*y$).

Analisando a superfície de resposta para biomassa ao redor da concentração ótima do substrato e da temperatura, estes não foram fatores consideráveis no desenvolvimento das células de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, pois entre 20,0 e 40,0 °C com concentração de sacarose entre 100 e 250,0 g/L, houve pouco acréscimo da biomassa (1,5 para 1,8 mg/mL de biomassa), conforme mostrado na Figura 5.11. Este fato poderia estar relacionado a uma possível inibição causada por eventual falta de nutriente necessário para o crescimento da bactéria, apesar dos diferentes sais acrescentados ao meio de fermentação (ELZINGER, 1996).

A inclusão de extrato de levedura no meio de cultivo poderia fornecer as vitaminas necessárias ao crescimento de *Zymomonas mobilis* (FEIN et al., 1983), como também favorecer a síntese de levana. Ernandes (2006) obteve concentração celular de 2,0 g/L com a ausência de extrato de levedura no meio de produção, mas esta foi proporcional ao aumento do extrato no meio obtendo concentração de 12,6 g/L de biomassa com 10,0 g/L de extrato. O mesmo autor relatou que para a síntese de levana há necessidade de adição do extrato de levedura ao meio de

cultura, porém em quantidades adequadas, evitando assim a influência negativa deste na produção de levana.

É importante salientar que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou alta tolerância às elevadas concentrações de substrato testado, devido à sua elevada capacidade de regulação osmótica e ao eficiente sistema de transporte de glicose (STRUCH et al., 1991). A glicose é transportada em alta velocidade através da membrana plasmática, sendo sua condução facilitada pelo sistema de difusão. Assim, a concentração intracelular rapidamente alcança nível limite em relação às concentrações externas de glicose (BELAICH et al., 1968). A pressão osmótica extracelular pode ser rapidamente balanceada pela concentração intracelular de açúcares.

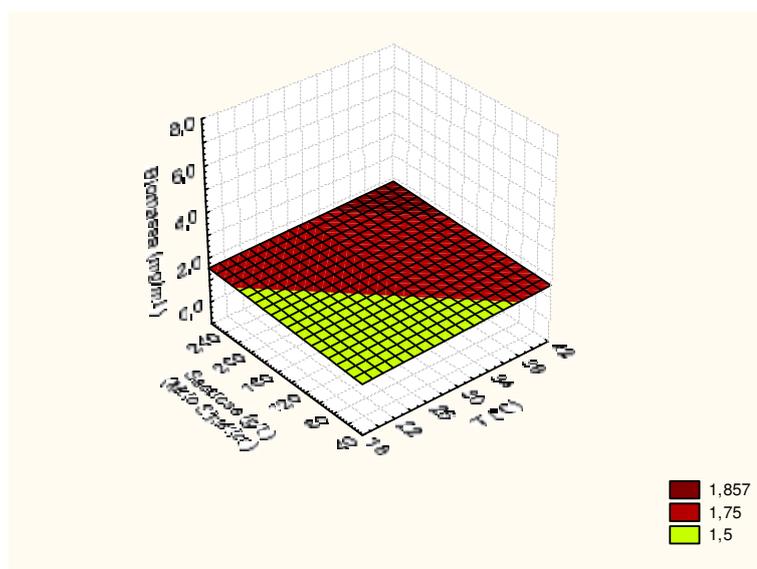


Figura 5.11 Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,9693+0,0126*x+0,0014*y$).

Vários trabalhos descrevem que a taxa de desenvolvimento celular de *Zymomonas mobilis* pode ser influenciada de acordo com as concentrações usadas de íons potássio, magnésio, cálcio, sódio e cloro. A presença dos sais minerais, quando interagiram com outra variável do meio de fermentação contendo sacarose comercial, também influenciaram

significativamente no crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 (Tabela 5.7). A interação entre as variáveis $X_3 X_6$ (KCL e $CaCl_2$) e $X_5 X_7$ ($MgSO_4$ e sacarose) ocasionaram efeito positivo sobre a produção de biomassa, no entanto, quando associadas $X_1 X_5$ (pH e $MgSO_4$) e $X_4 X_6$ (K_2SO_4 e $CaCl_2$), estas causaram efeito inibidor para *Zymomonas*. A influência do efeito destas variáveis também foi relatada por outros pesquisadores, como por exemplo Ernandes (2006), que observou em sua pesquisa que a alta concentração de potássio proporcionou maior taxa de desenvolvimento de duas linhagens de *Zymomonas mobilis* (CCT 4494 e CP4) e de *Bacillus subtilis*. Jerez (1993) estudou o efeito da variação da concentração de potássio e verificou que a taxa de desenvolvimento e a quantidade de levana formadas são proporcionais ao aumento da concentração de potássio até a concentração de 10,0 g/L. Além disso, várias enzimas da via Entner Doudoroff requerem cofatores como magnésio, cálcio, potássio para a produção de levana. Hoppner e Doelle (1983) reportaram que o cálcio e o magnésio ativam a enzima piruvato descaboxilase em *Zymomonas*, enquanto Bekers e colaboradores (2000) observaram que potássio ativa a enzima piruvato quinase.

Analisando os valores de pH finais do caldo de fermentação obtido após o processo fermentativo com o meio sintético, observou-se que o pH final determinado no caldo de fermentação obtido com o meio sintético (bloco 1) variou na faixa de 3,6 a 6,8 (Tabela 5.1). Valores semelhantes foram observados por Doelle e colaboradores (1989), que relataram que o pH final depois de 3 dias, à temperatura de 30°C em meio padrão, ficou entre 4,8 a 5,2, e que esta redução representa a formação de ácidos e a tolerância do microrganismo a valores de pH baixos (WENDT, 2001).

As maiores concentrações de biomassa encontraram-se nos valores de pH finais entre 4,5 a 6,0, e o crescimento celular de *Zymomonas mobilis* decresceu nos valores finais abaixo de 4,5. Os resultados obtidos estão de acordo com Doelle e colaboradores (1989), que relataram que o pH, dentro de certos limites (6,5 a 8,0), tem pouca influência na taxa de desenvolvimento, mas

pode influenciar o número total de bactérias, no entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte.

Para o biopolímero levana, suas maiores concentrações ocorreram nos valores de pH finais entre 4,0 a 5,0. Resultados contraditórios foram observados por Park e Baratti (1993), que relataram que pH variando entre 4,0 a 5,0 na fermentação ocasiona bom desenvolvimento celular e diminuição na produção de levana. Além destes, estudos realizados por Lyness e Doelle (1980, 1983) e Doelle e colaboradores (1989) concluíram que altos valores de pH (acima de 5,0) devem inibir a produção da enzima levanasacarase, responsável pela formação de levana por *Zymomonas mobilis*. Crittenden e Doelle (1994) estudaram a atividades levanasacarase da *Zymomonas mobilis* UQM 2716 e concluíram que para a formação de levana o valor de pH 5,5 foi melhor. Posteriormente, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) obtiveram maior produção de levana em pH inicial de 5,0 do que em pH 6,0 e 7,0.

5.3 PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM O MEIO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O grande interesse pela bactéria *Zymomonas mobilis*, como produtora de levana e etanol, tem levado muitos pesquisadores a realizar estudos sobre fermentação utilizando diferentes substratos, condições de fermentação e processos, a fim de aumentar a sua produtividade.

A informação disponível em relação a trabalhos realizados utilizando matérias-primas naturais é muito limitada. A utilização de substratos alternativos regionais e de baixo custo torna-se muito interessante por sua facilidade de aquisição e custo relativamente baixo.

A influência das variáveis foi estudada nas respostas levana (Y_1) e etanol (Y_2) usando o delineamento estatístico 2^{7-2} e as estimativas dos efeitos relativos, o grau de significância, a correlação entre as variáveis (p) e os coeficientes de regressão estão apresentadas nas Tabelas 5.8

e 5.9, respectivamente, a partir do bloco 2, correspondentes à fermentação de meio caldo de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 após 24 horas de fermentação.

Conforme o ocorrido no meio sintético (bloco 1), o baixo valor de p encontrado para os interceptos (Y_1 e Y_2) indicou que os níveis foram bem escolhidos e que os coeficientes de regressão da equação descreveram acima de 85% o experimento ($r_{Y_1}^2 = 0,9966$ e $r_{Y_2}^2 = 0,8775$), para ambos os casos, com o meio fermentativo caldo de cana-de-açúcar (bloco 2). Além disso, o bom desempenho do modelo adotado pode ser confirmado por não haver desvio significativo regressão ($p > 0,05$), tanto para Y_1 e Y_2 .

Os modelos matemáticos obtidos para a produção de levana (Y_1) e etanol (Y_2), com o bloco 2, estão representados pelas equações parciais resumidas 5.3 e 5.4.

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & X_6 \cdot 0,149 + X_7 \cdot 0,354 + X_1 X_4 \cdot 0,061 + X_1 X_6 \cdot 0,079 - X_1 X_7 \cdot 0,073 - X_2 X_3 \cdot \\
 & 0,097 - X_2 X_6 \cdot 0,074 + X_4 X_6 \cdot 0,087 + X_4 X_7 \cdot 0,094 + X_5 X_7 \cdot 0,132 + X_6 X_7 \cdot 0,106 \\
 & - X_1 X_3 X_5 \cdot 0,079 + X_1 X_4 X_6 \cdot 0,163 + X_1 X_4 X_7 \cdot 0,083 + X_1 X_5 X_6 \cdot 0,105 + 0,303
 \end{aligned}
 \tag{5.3}$$

$$Y_2 = X_4 \cdot 1,122 + X_1 X_3 \cdot 1,061 + X_1 X_6 \cdot 1,01 + X_1 X_7 \cdot 1,331 + 1,367
 \tag{5.4}$$

Os resultados indicaram que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 dispõe de mecanismos bioquímicos reguladores da produção de levana, como substância de reserva temporária, quando há alta disponibilidade de frutose no caldo de fermentação. Para isso, ele pode utilizar-se da atividade levansase para formação do biopolímero (ANANTHLAKSHMY; GUNASEKARAN 1999). A máxima produção de levana foi de 1,05 mg/mL nas melhores condições fermentativas estudadas com as variáveis independentes para a síntese de levana (pH 8; temperatura 40°C; KCl 5,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 20,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e TST 250,0 g/L), correspondente a corrida 5 (Tabela 5.2).

Concentrações similares de produção de levana nas fermentações do caldo de cana foram encontrados por Tano e Buzato (2002), os quais relataram valores de 1,66; 2,54 e de 3,85 g/L, em pH inicial de 5,4; 5,9 e 6,3, respectivamente. Os autores verificaram que, comparativamente, as produções de levana em pH 5,9 e 6,3 representaram, respectivamente, aumento em 53 e 130% com relação ao pH inicial 5,4 (referência = 100%). Outros autores, empregando diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* verificaram que a produção de levana foi bastante diversificada. Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999) alcançaram valores de 12,6 g/L com 150,0 g de sacarose/L, em 16 horas, a partir de *Zymomonas mobilis* B-4286. Por outro lado, Yoshida e colaboradores (1990) utilizaram a mesma concentração de sacarose e obtiveram produções de levana de 35,0 g/L, com *Zymomonas mobilis* IN-17-10 e de 3,1 g/L, com *Zymomonas mobilis* IFO 13757, em 3 dias, valendo ressaltar que nestes trabalhos, o substrato acrescentado ao meio de fermentação foi a sacarose e não o caldo de cana *in natura*.

Os valores do exopolissacarídeo obtidos com o meio caldo de cana-de-açúcar foram inferiores aos obtidos com o sintético. Esse fato também foi observado por outros pesquisadores que estudaram diferentes meios de fermentação para a síntese de levana. Borsari (2004) estudou as condições de produção de levana por *Zymomonas mobilis* CP4, através de delineamentos estatísticos, variando a concentração e tipo de substrato, forma de cultivo, suplementação com ácido pantotênico, extrato de levedura, cloreto de sódio e a técnica de permeabilização celular. Inicialmente, foi aplicado um planejamento 2^3 onde as variáveis foram: concentração de caldo de cana-de-açúcar e sacarose e tipo de fermentação. Um segundo planejamento 2^2 foi usado para confirmar a importância do caldo de cana, e um último delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} foi utilizado para selecionar as variáveis: concentração de ácido pantotênico, cloreto de sódio e extrato de levedura. Os resultados indicaram que o processo por batelada alimentada não melhorou a produção de levana, pois a máxima concentração de levana obtida foi de 40,14 g/L⁻¹ em 150,0 g/L⁻¹ de sacarose e a adição de caldo de cana-de-açúcar não foi estatisticamente significativa para formação de levana, sendo que este meio estimulou a produção de biomassa,

sorbitol e etanol.

Observou-se pela análise de variância (ANOVA), realizada com o auxílio do software *Statistica 6.0*, que apenas as variáveis independentes CaCl_2 e TST foram significativas ($p < 0,05$) e influenciaram de maneira positiva ($\text{Coeficiente} > 0$) na produção de levana com o caldo de cana-de-açúcar, sendo estas variáveis consideradas importantes na síntese do biopolímero quando o meio contendo sacarose comercial foi testado. Relacionando as interações entre as variáveis, várias afetaram significativamente ($p < 0,05$) a formação do biopolímero (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

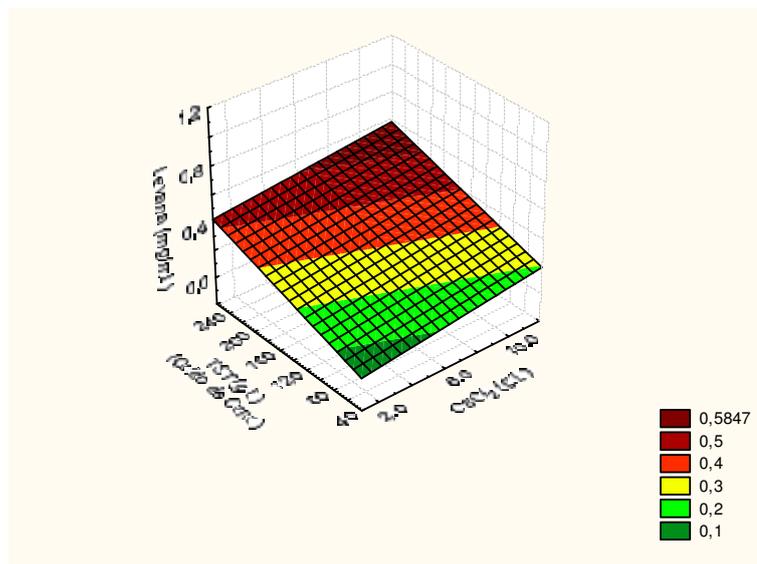
Variáveis	Y_1		
	Efeitos	p	Coeficientes
Intercepto*	0,303	0,000	0,303
X_1	0,016	0,433	0,008
X_2	-0,013	0,965	-0,010
X_3	-0,036	0,134	-0,018
X_4	0,045	0,084	0,022
X_5	0,047	0,077	0,023
X_6 *	0,149	0,003	0,074
X_7 *	0,354	0,000	0,177
$X_1 X_4$ *	0,061	0,041	0,030
$X_1 X_6$ *	0,079	0,021	0,039
$X_1 X_7$ *	-0,073	0,025	-0,037
$X_2 X_3$ *	-0,097	0,012	-0,048
$X_2 X_6$ *	-0,074	0,024	-0,037
$X_4 X_6$ *	0,087	0,016	0,043
$X_4 X_7$ *	0,094	0,013	0,047
$X_5 X_7$ *	0,132	0,005	0,066
$X_6 X_7$ *	0,106	0,009	0,053
$X_1 X_3 X_5$ *	-0,079	0,021	-0,039
$X_1 X_4 X_6$ *	0,163	0,003	0,081
$X_1 X_4 X_7$ *	0,083	0,018	0,041
$X_1 X_5 X_6$ *	0,105	0,009	0,052

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 (MgSO_4); X_6 (CaCl_2); X_7 (TST) e Y_1 (levana).

Considerando a metodologia de superfície de resposta observou-se que a máxima produção de levana (0,58 mg/mL) ocorreu nas maiores concentrações de CaCl_2 (7,0-11,0 g/L) e de substrato (220,0 - 250,0 g/L), resultado semelhante ao ocorrido no experimento com meio contendo sacarose comercial. As demais variáveis não tiveram influência significativa na produção do biopolímero (Figuras 5.12 e 5.13).

A metodologia de superfície de resposta mostrou que o pH inicial e a temperatura não foram variáveis significativas na formação do biopolímero. Observou-se que as máximas concentrações de levana, localizadas na região de TST (220,0 - 250,0 g/L) priorizando a produção do biopolímero, não foram influenciados pela faixa de temperatura de incubação testada (20,0 e 40°C) e nem pelos valores de pH iniciais (4,0 e 8,0) (Figura 5.14). Estas condições de fermentação foram compatíveis aos resultados obtidos com o meio contendo sacarose comercial. Entretanto, discordam com os obtidos por Tano e Buzato (2002) ao concluírem que, na fermentação do caldo de cana em alta concentração de açúcar inicial (150,0 g/L) com *Zymomonas mobilis* ATCC 31821, a produção de levana foi superior quando o pH inicial foi de 6,1 em relação aos pH iniciais de 5,4 e 5,9. Ainda, Sérvulo e França (1986), em estudo realizado variando-se a concentração de açúcar no caldo de cana de 10,0 até 100,0 g/L, encontraram que o teor alcoólico foi similar na faixa de temperatura de 25 a 35°C e que o pH ótimo de fermentação foi entre 5,0 e 6,0.

(a)



(b)

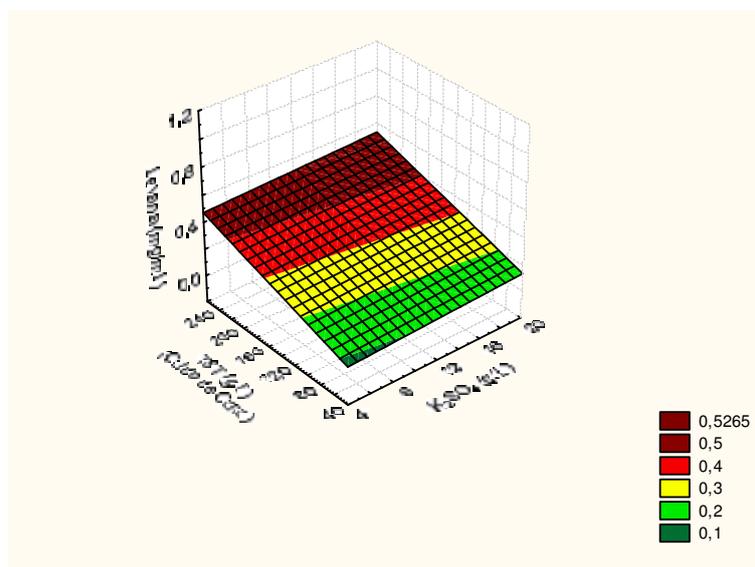
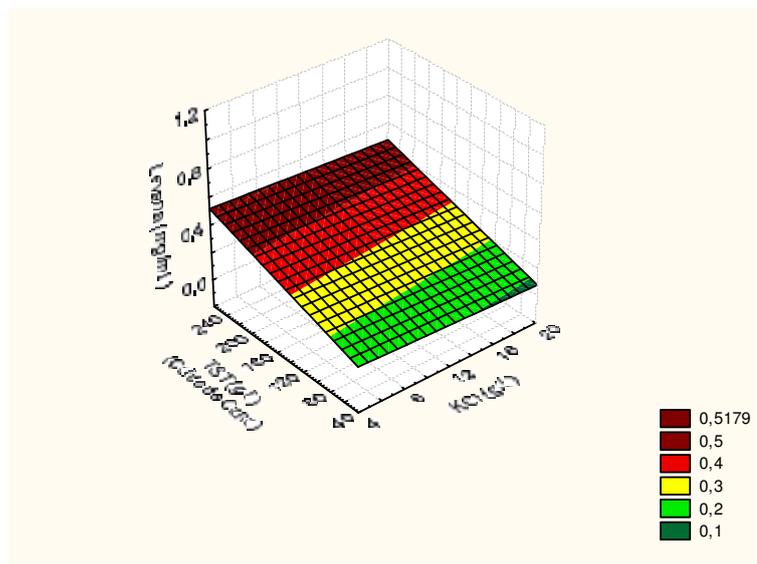


Figura 5.12 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e CaCl₂ (g/L) (Levana (mg/mL) = $-0,0522+0,0147*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e K₂SO₄ (Levana (mg/mL) = $-0,0044+0,0035*x+0,0018*y$).

(a)



(b)

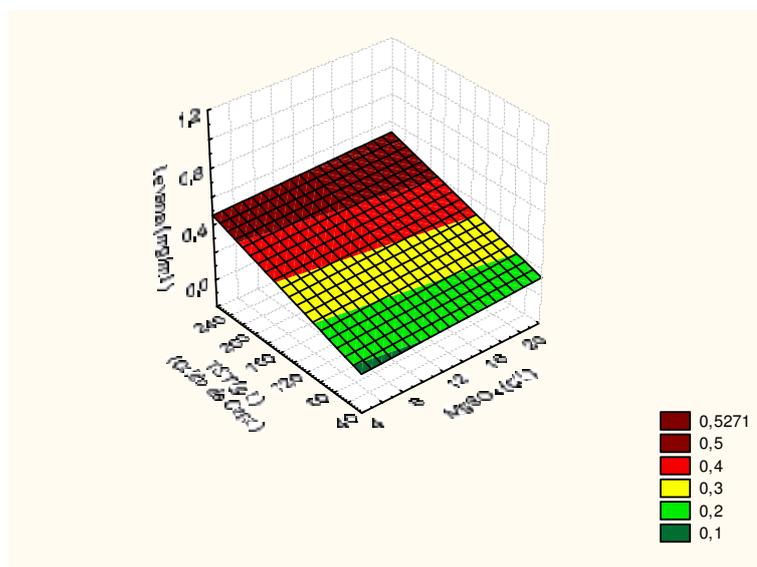


Figura 5.13 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e KCl (g/L) (Levana (mg/mL) = $0,0686 - 0,0028 * x + 0,0018 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e $MgSO_4$ (Levana (mg/mL) = $-0,0042 + 0,0032 * x + 0,0018 * y$).

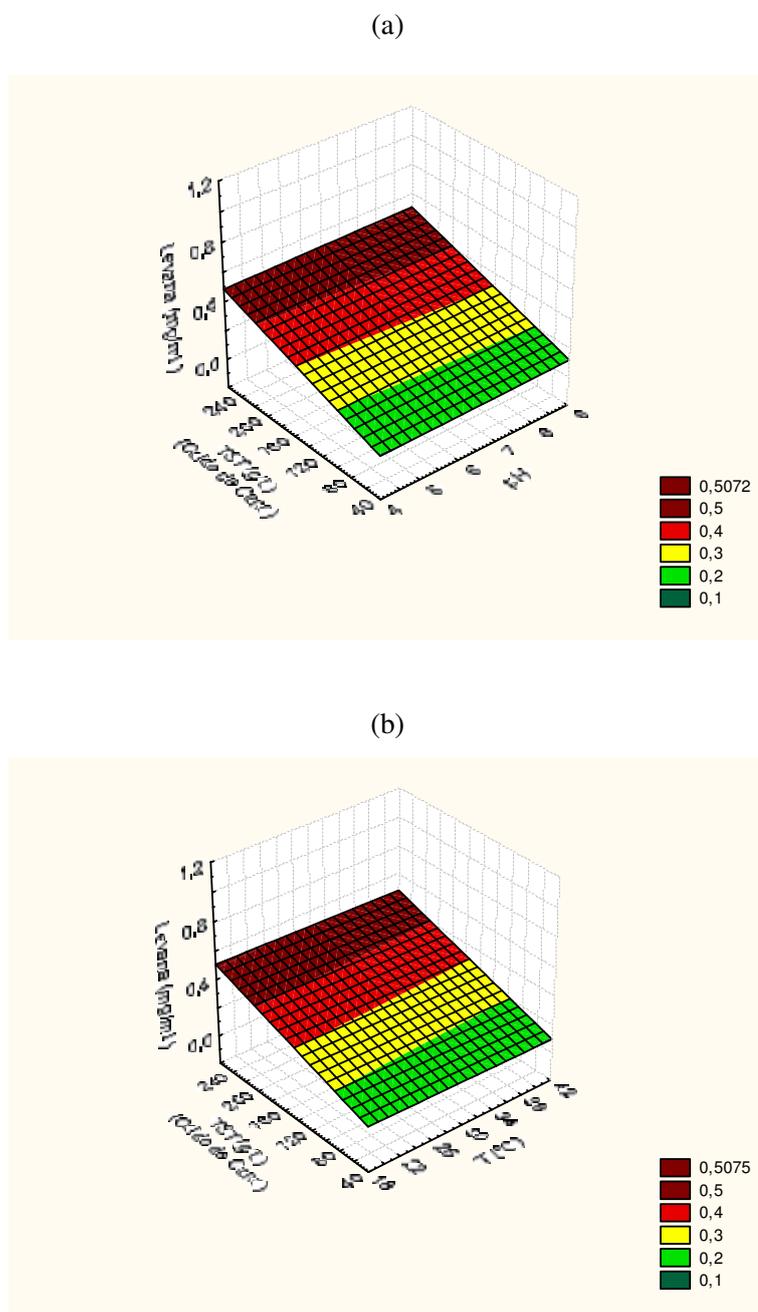


Figura 5.14 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $0,0106+0,0042*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura de incubação (°C) (Levana (mg/mL) = $0,0631-0,0009*x+0,0018*y$).

As diferentes condições de fermentação empregadas em cada experimento ocasionaram variação na concentração de etanol (0,05 e 8,89 mg/mL), sendo que a maior concentração foi obtida nas condições de cultivo testadas no experimento 19 (200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 20°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e TST 250,0 g/L) (Tabela 5.2). Este valor é inferior aos relatados por outros autores como Rogers e colaboradores (1982), os quais obtiveram produções de etanol superiores a 25,0 mg/mL com a mesma concentração do substrato utilizado em nossa pesquisa.

As Figuras 5.15 e 5.16 mostram dois cromatogramas, correspondentes a maior (8,89 mg/mL, corrida 19) e menor (0,058 mg/mL, corrida 13) produção de etanol.

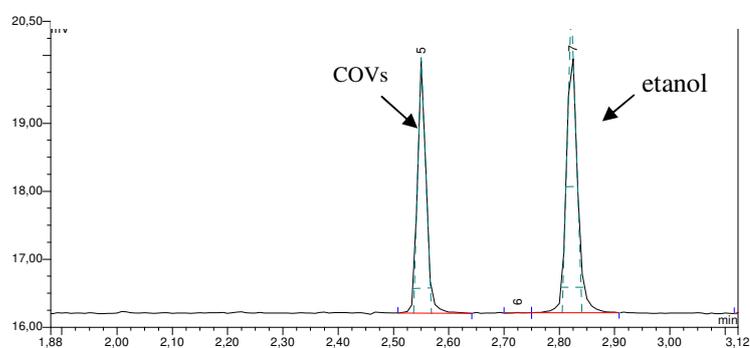


Figura 5.15 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 19, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

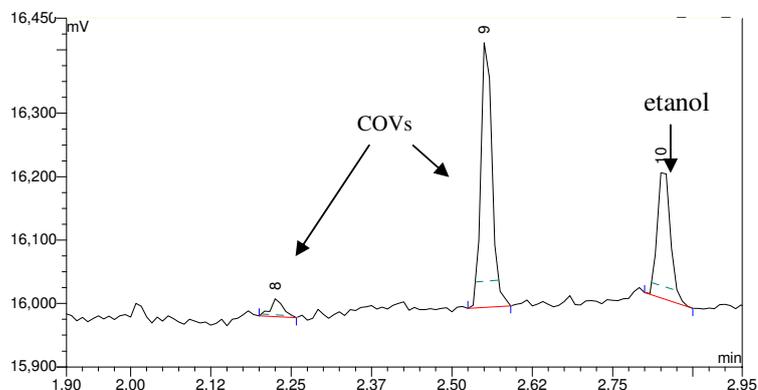


Figura 5.16 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol obtidos na corrida 13, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Para produção de etanol (Y_2), apenas a variável independente X_4 (K_2SO_4) e as interações $X_1 X_3$ (pH e KCl); $X_1 X_6$ (pH e $CaCl_2$) e $X_1 X_7$ (pH e TST) foram significativas ($p < 0,05$) e influenciaram de maneira positiva (*Coefficiente* > 0) na obtenção da resposta (Tabela 5.9).

Tabela 5.9 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperaturas.

Variáveis	Y_2		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	1,368	0,000	1,368
X_1	0,657	0,153	0,329
X_2	-0,711	0,125	-0,356
X_3	0,698	0,132	0,349
X_4 *	1,122	0,026	0,561
X_5	0,350	0,427	0,175
X_6	0,820	0,083	0,410
X_7	0,445	0,318	0,223
$X_1 X_3$ *	1,061	0,033	0,531
$X_1 X_6$ *	1,100	0,028	0,550
$X_1 X_7$ *	1,331	0,012	0,665

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST) e Y_1 (levana).

Cação (1999) realizou um estudo utilizando o planejamento fatorial de 2 níveis equidistantes e de 3 variáveis, para determinar as melhores condições de cultivo quanto a temperatura (25 e 35°C), agitação (0 e 150 rpm) e concentração de sólidos totais no caldo de cana (100,0 e 200,0 g/L); e 3 repetições no ponto central onde a temperatura foi de 30°C, agitação de 150 rpm e concentração de açúcar total no caldo de cana de 250,0 g/L, para produção de etanol e sorbitol. Este autor observou que altas concentrações de açúcares no caldo de cana estimularam a produção de etanol e sorbitol. Os cultivos estáticos proporcionaram a melhor produção de sorbitol e etanol, porém, em cultivos com agitação e a temperatura testada não foram variáveis significativas para a produção de etanol e sorbitol. Em nossa pesquisa observou-se comportamento similar ao apresentado por Cação (1999) relativa à temperatura, visto que esta se mostrou uma variável significativa para produção de etanol. É importante salientar que, apesar da variável temperatura não ser significativa, houve redução na síntese de etanol de 2,0 para 1,0 mg/mL, a partir de temperaturas superiores a 36°C (Figura 5.17).

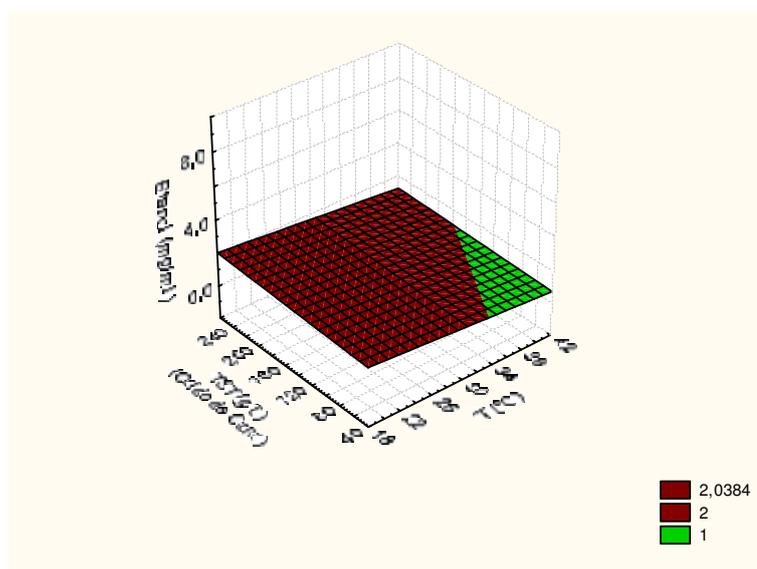


Figura 5.17 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e T (°C) (Etanol (mg/mL) = $2,1 - 0,0356 * x + 0,0022 * y$).

Tano e Buzato (2003) avaliaram a produção de etanol em caldo de cana com alta concentração inicial de açúcar (150,0 g/L) fermentado por *Zymomonas mobilis*, rico em sais minerais, adicionado de 5,0 g de extrato de levedura e incubado a 28°C, durante 48 horas, a 180 rpm, e pH de 5,4. Estes pesquisadores concluíram que os níveis relativamente elevados de alguns sais inorgânicos, especialmente cloreto de potássio e alguns íons como cálcio e magnésio, apresentaram efeito inibidor significativo na fermentação, além da competição de outros microrganismos que progrediram nele. Os resultados obtidos por estes pesquisadores contrapõem-se aos encontrados em nossa pesquisa pois, embora os valores de pH iniciais não tenham sido expressivos para a produção de etanol, quando associados às variáveis concentração de KCl, CaCl₂ e TST, estas influenciaram positivamente o rendimento de etanol. De acordo com o estudo da metodologia de superfície de resposta, a produção de álcool foi de aproximadamente 2,17 mg/mL com as maiores concentrações de KCL (18,0 e 20,0 mg/mL); CaCl₂ (10,0 e 11,0 g/L), TST (230,0 e 250,0 g/L) e de pH iniciais (7,0 a 8,0) (Figuras 5.18 e 5.19).

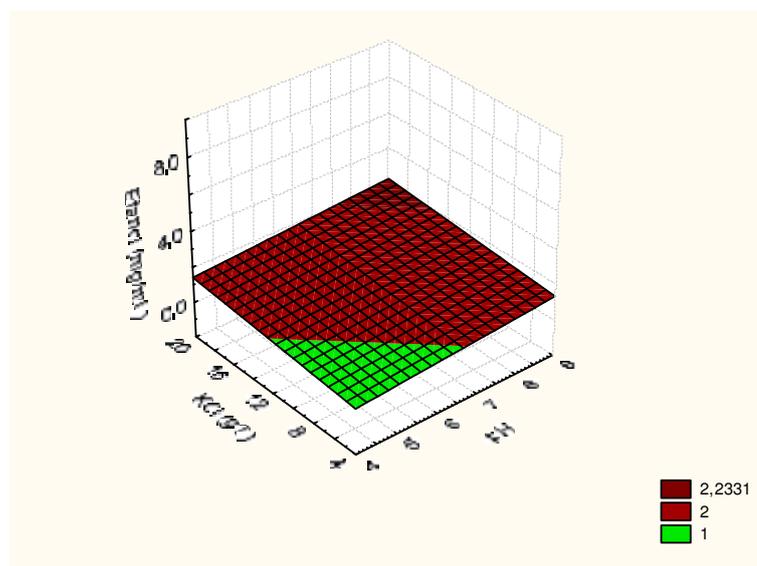
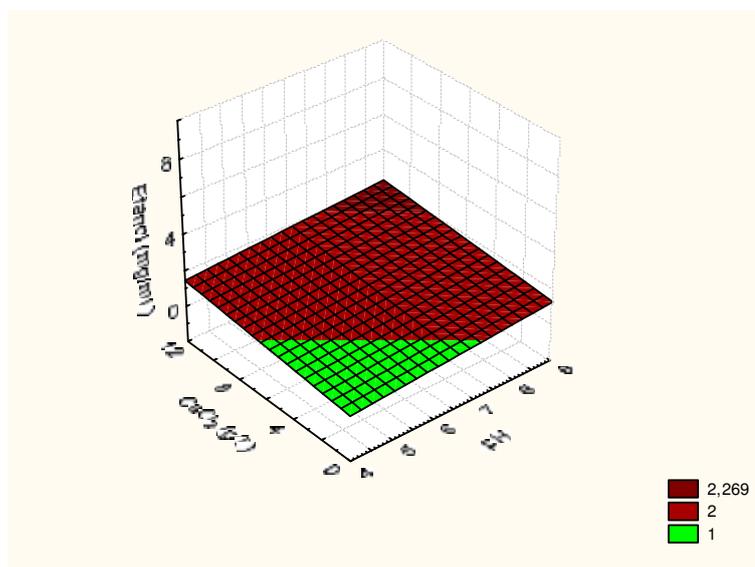


Figura 5.18 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de KCl (g/L) e pH (Etanol (mg/mL)= - 0,2345+0,1641*x+0,0537*y).

(a)



(b)

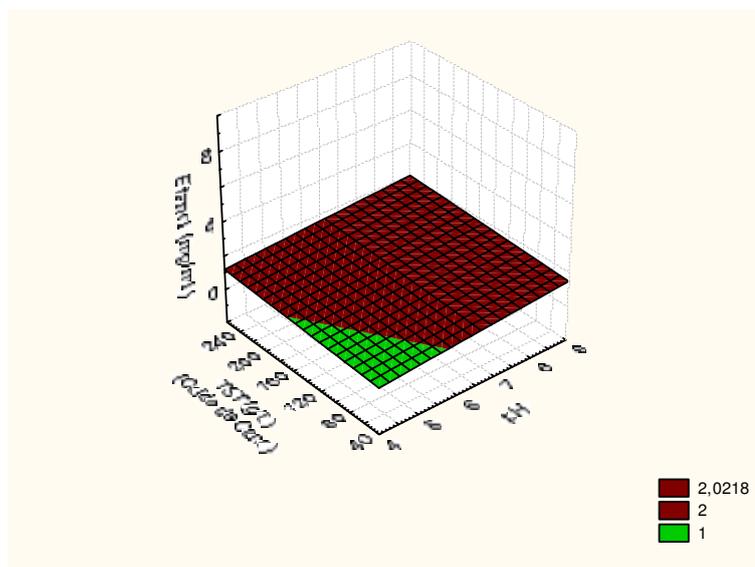


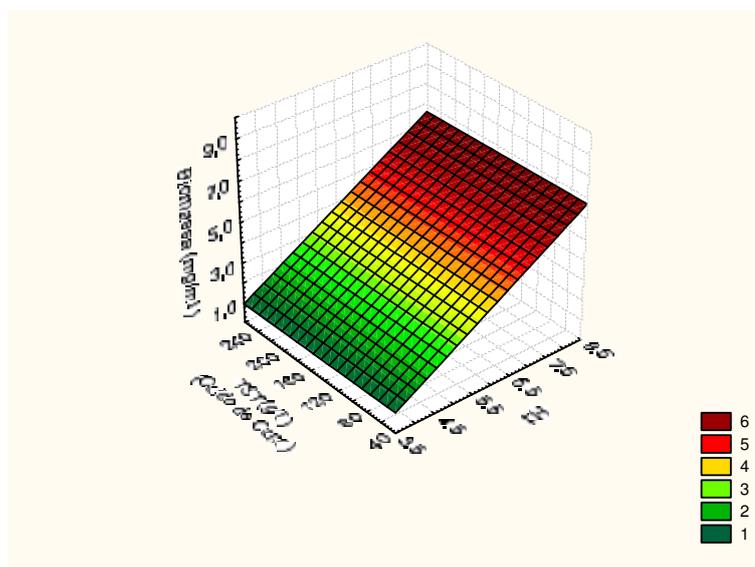
Figura 5.19 (a) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $-0,1095+0,1641*x+0,082*y$); (b) Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH (Etanol (mg/mL) = $0,0487+0,1641*x+0,0022*y$).

O efeito das variáveis pH, temperatura e concentração de substrato utilizadas para o desenvolvimento de *Zymomonas mobilis*, foi semelhante nos meios sintético e caldo de cana. Apenas a variável pH teve influência significativa, sendo considerado como melhor faixa os valores entre 7,0 e 8,0, para ambos os meios testados. As Figuras 5.20 e 5.21 mostram as superfícies de resposta para biomassa ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar e de sacarose comercial em relação ao pH inicial e temperatura de incubação, respectivamente.

Houve redução significativa na síntese de levana e etanol com o substrato alternativo (caldo de cana) em relação ao meio contendo sacarose comercial. As concentrações máximas de levana (1,5 mg/mL) e etanol (8,89 mg/mL) no meio alternativo corresponderam a 33,3% e 11,6%, respectivamente, dos máximos valores obtidos com o meio sintético (4,5 mg/mL e 76,6 mg/mL, respectivamente). Comparando-se as superfícies de resposta, entretanto, é nítido que o caldo de cana proporcionou maior produção de biomassa (Figuras 5.20 e 5.21).

Resultados semelhantes em relação à concentração da biomassa utilizando sacarose comercial e caldo de cana também foram observados por diversos pesquisadores como Han e Watson (1992), Falcão de Moraes e colaboradores (1993) e Bekers e colaboradores (2001). Oliveira (2004) relatou em sua pesquisa que, embora o caldo de cana-de-açúcar produza em torno de 28,72% a menos de levana em comparação à sacarose comercial, a produção de biomassa no caldo é 2,76 vezes maior que com sacarose comercial, o que poderia justificar a produção acoplada de levana e biomassa utilizando *Zymomonas mobilis*. O mesmo autor justifica que isto, possivelmente, esteja relacionado com a presença de outros compostos no caldo de cana-de-açúcar e que poderiam ter inibido a formação do biopolímero e de etanol.

(a)



(b)

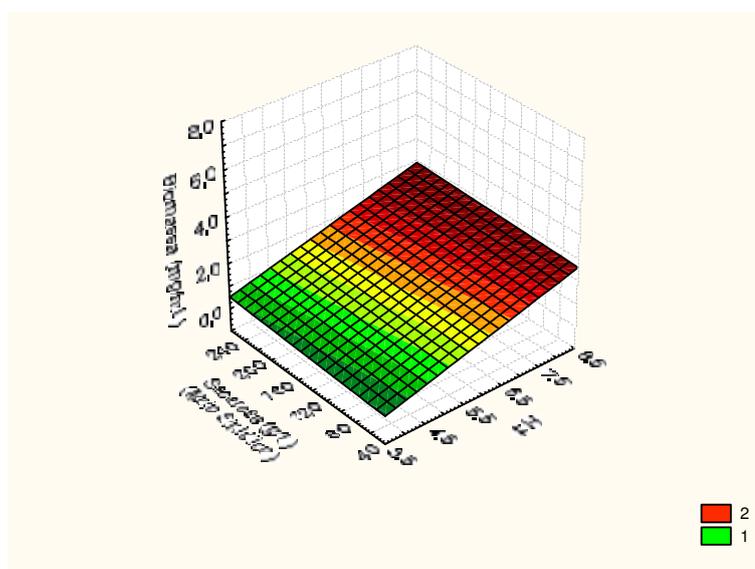
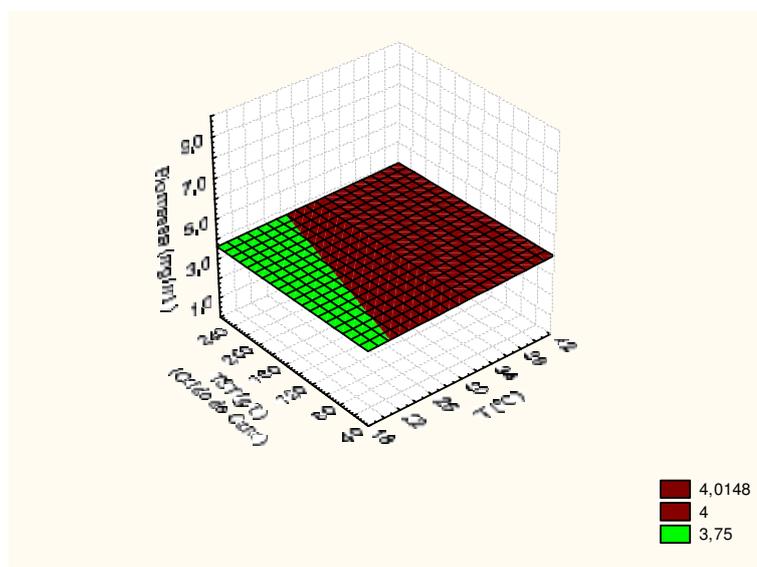


Figura 5.20 (a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-2,9663+1,1409*x-0,0003*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e pH (Biomassa (mg/mL) = $-1,5057+0,4756*x+0,0014*y$).

(a)



(b)

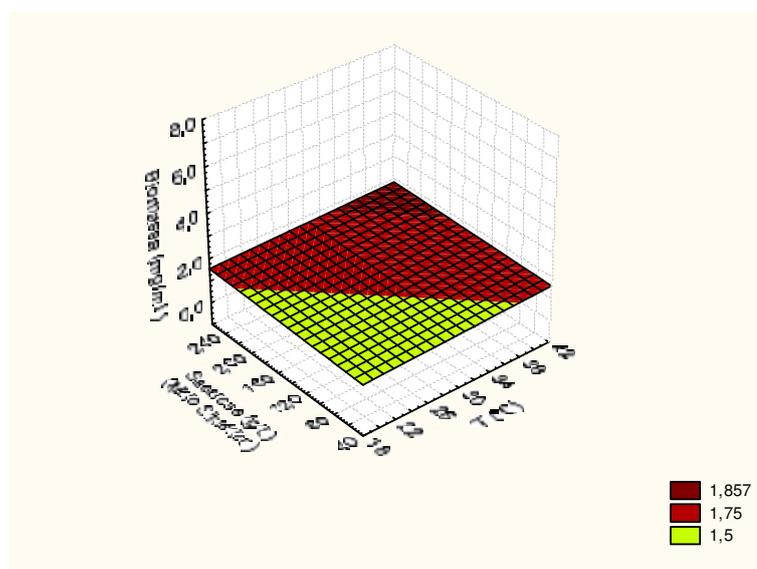


Figura 5.21 (a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do caldo de cana-de-açúcar (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $3,5062+0,0124*x-0,0003*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de sacarose comercial (g/L) e T (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,9693+0,0126*x+0,0014*y$).

A presença de compostos orgânicos voláteis (COVs) no meio de fermentação, tais como ácido acético, fórmico ou propiônico, furfural, fenol, indol, nitratos, clorofenolatos, ácidos alifáticos, aromáticos e etc., podem ser responsáveis pela inibição da produção do biopolímero e do etanol (FEIN et al., 1983). De acordo com a literatura, *Zymomonas mobilis* forma quantidades insignificantes de produtos secundários como acetaldeído, acetoína, ácido acético, glicerol, lactato, levana, manitol e sorbitol, e rendimentos altos em etanol. No entanto, dependendo do tipo de fermentação, os rendimentos em etanol podem ser reduzidos quando há quantidades significativas de COVs liberados na fermentação (VIAKARI; GISLER, 1986).

A presença destes compostos poderia justificar a redução da produção etanol, uma vez que existe a possibilidade do desvio do metabolismo microbiano e, também, do efeito inibitório provocado por estes componentes (COVs) sobre a fermentação alcoólica. Estas afirmações podem ser observadas nos cromatogramas obtidos para determinação de etanol, onde podemos observar que, além da presença deste, há também outros compostos e que, dependendo das condições fermentativas, estes se apresentaram em maior ou menor concentração em relação ao etanol. As Figuras 5.22 e 5.23 mostram os diferentes compostos (COVs e etanol) presentes no caldo de fermentação, tanto com o meio sintético (bloco 1) quanto com o caldo de cana-de-açúcar do (bloco 2).

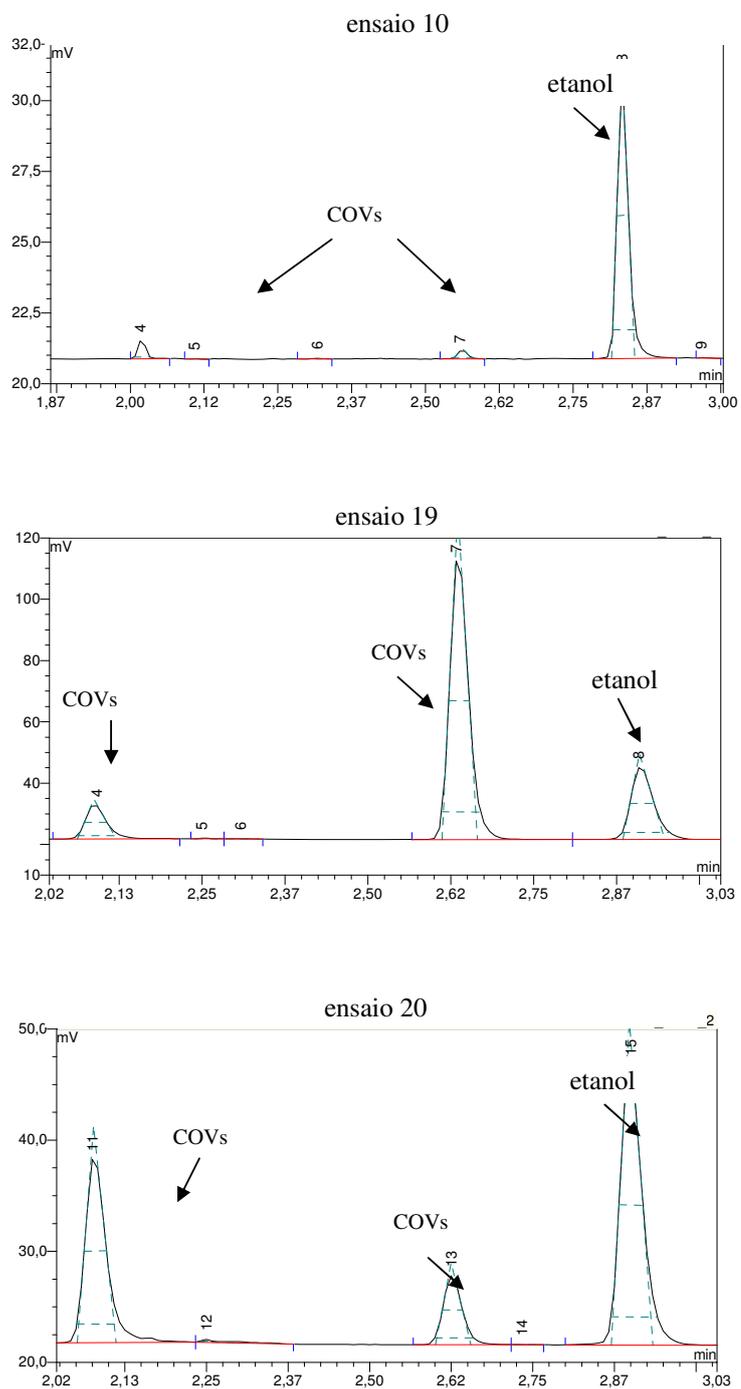


Figura 5.22 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio sintético fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

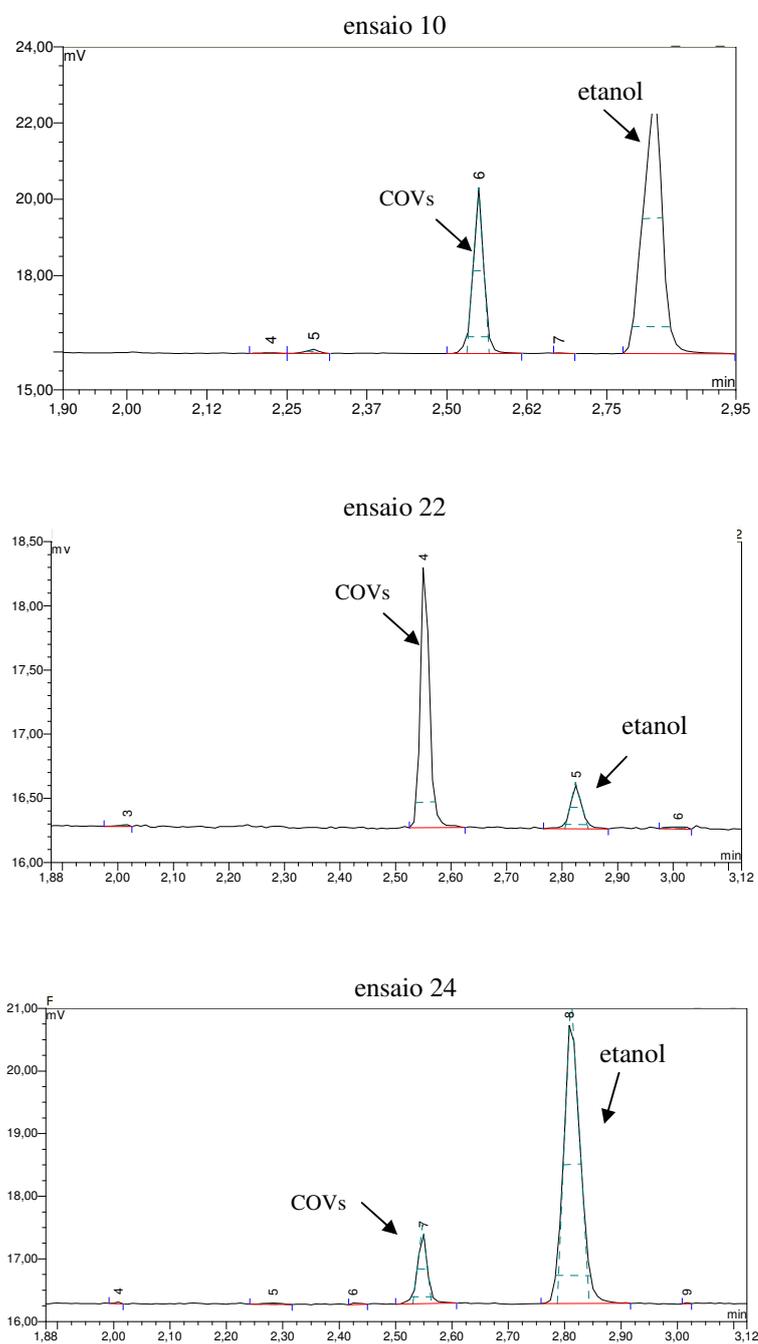


Figura 5.23 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio caldo de cana-de-açúcar fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

5.4 PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL COM OS MEIOS MELAÇOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

Foram analisados os blocos 3 e 4, originais do planejamento experimental 2^{7-2} , correspondente aos meios HTM e melaço de cana-de-açúcar, respectivamente, adicionados de sais minerais em diferentes valores de pH e temperatura de incubação, durante 24 horas de fermentação a 200 rpm.

Os modelos matemáticos obtidos para a obtenção das respostas levana (Y_1) e etanol (Y_2), a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, com o bloco 3 (meio HTM), estão representados pelas equações parciais resumidas 5.5 e 5.6 e, com o bloco 4 (melaço), pelas equações 5.7 e 5.8, respectivamente.

$$Y_1 = + X_2 .0,352 + X_7 . 01,700 + X_1 X_6 . 0,377 - X_2 X_3 . 0,365 + X_2 X_7 . 0,355 + 0,954 \quad (5.5)$$

$$Y_2 = - X_1 X_2 . 0,074 - X_2 X_7 . 0,081 + X_4 X_6 . 0,105 + X_1 X_3 X_4 . 0,086 + 0,073 \quad (5.6)$$

$$Y_1 = + X_6 .0,272 + X_7 . 0,463 + 0,512 \quad (5.7)$$

$$Y_2 = - X_1 X_2 . 0,024 - X_2 X_7 . 0,026 + X_4 X_6 . 0,035 + X_1 X_3 X_4 . 0,029 + 0,024 \quad (5.8)$$

Pelo modelo estatístico proposto foi possível calcular: as estimativas dos efeitos; o grau de significância; as correlações entre as variáveis (p) e os coeficientes da regressão, conforme demonstrados nas Tabelas 5.10 e 5.11, para levana (Y_1) e nas Tabelas 5.12 e 5.13, para etanol (Y_2), com os meios HTM e melaço de cana-de-açúcar, respectivamente.

Conforme o ocorrido com os meios sintético e caldo de cana-de-açúcar, observou-se que o baixo valor de p encontrado para os interceptos (Y_1 e Y_2) indicou que os níveis foram bem escolhidos e que o bom desempenho do modelo adotado também pode ser confirmado por não

haver desvio significativo da regressão ($p > 0,05$), tanto para Y_1 quanto para Y_2 , em ambos os melações testados.

A partir do meio melação de cana-de-açúcar, os coeficientes de regressão da equação descreveram o experimento acima de 80% ($r^2_{Y_1} = 0,8236$) para levana e de 90% ($r^2_{Y_2} = 0,9741$), para etanol. Com o meio HTM, os valores foram acima de 95% ($r^2_{Y_1} = 0,9687$ e $r^2_{Y_2} = 0,9777$), para ambos os produtos.

No planejamento experimental realizado com os melações pôde observar-se na análise de variância (ANOVA), realizada com o auxílio do software *Statistica 6.0*, que as condições de cultivo (200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 40°C; KCl 5,0 g/L; K₂SO₄ 5,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e sacarose 250,0 g/L) testadas no experimento 21 foram consideradas como os melhores parâmetros para a produção de levana. Nestas, a concentração do exopolissacarídeo obtido com o melação HTM, foi de 2,83 mg/mL e de 1,96 mg/mL com o melação (Tabelas 5.3 e 5.4). Tais concentrações são próximas das obtidas por Oliveira e colaboradores (2004), que estudaram a fonte de carbono melação de cana-de-açúcar e observaram que ocorreu produção de levana de 2,53 g/L⁻¹.

Os resultados da análise da produção de levana por meio da análise de variância (ANOVA) mostraram que no meio HTM (bloco 3), além de TST presente, a temperatura de incubação também foi significativa ($p < 0,05$) e, das interações entre as variáveis, $X_1 X_6$ (pH e CaCl₂); $X_2 X_3$ (temperatura e KCl) e $X_2 X_6$ (temperatura e CaCl₂) foram as que afetaram significativamente a formação do biopolímero (Tabela 5.10).

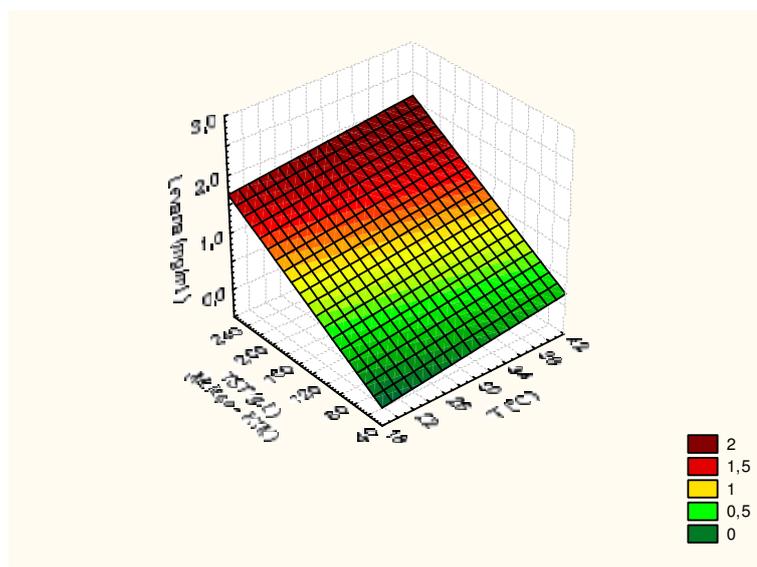
Tabela 5.10 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.

Variáveis	Y_1		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	0,954	0,000	0,953
X_1	0,069	0,561	0,034
X_2^*	0,352	0,013	0,176
X_3	0,087	0,462	0,043
X_4	0,015	0,898	0,007
X_5	0,109	0,364	0,054
X_6	0,191	0,127	0,095
X_7^*	1,700	0,000	0,850
$X_1 X_6^*$	0,377	0,009	0,188
$X_2 X_3^*$	-0,365	0,011	-0,182
$X_2 X_7^*$	0,355	0,012	0,177

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST) e Y_1 (levana).

Com o auxílio da metodologia de superfície de resposta foi possível observar que as maiores concentrações de levana (1,2-2,0 mg/mL) encontradas no meio HTM ocorreram nas concentrações acima de 180,0 g/L de TST, temperatura entre 30,0 e 40,0°C, concentração de KCl entre 16,0 e 18,0 g/L e de $CaCl_2$, entre 9,0-11,0 g/L (Figuras 5.24 e 5.25).

(a)



(b)

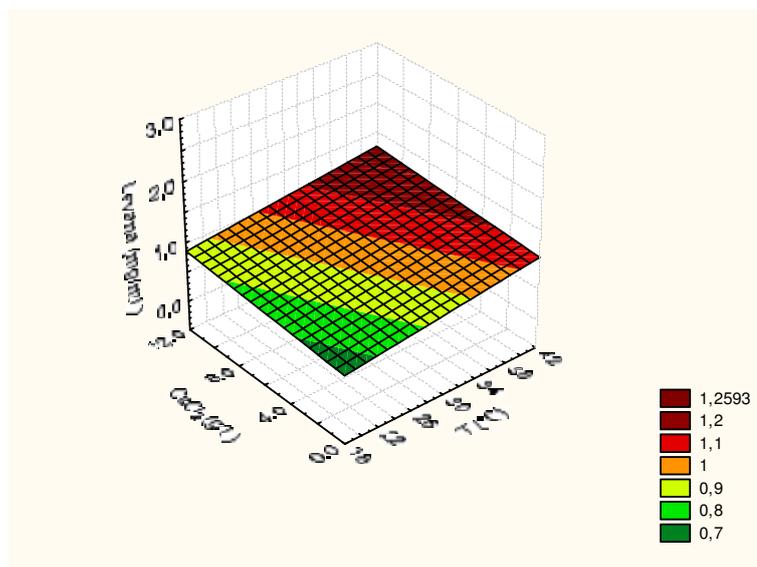
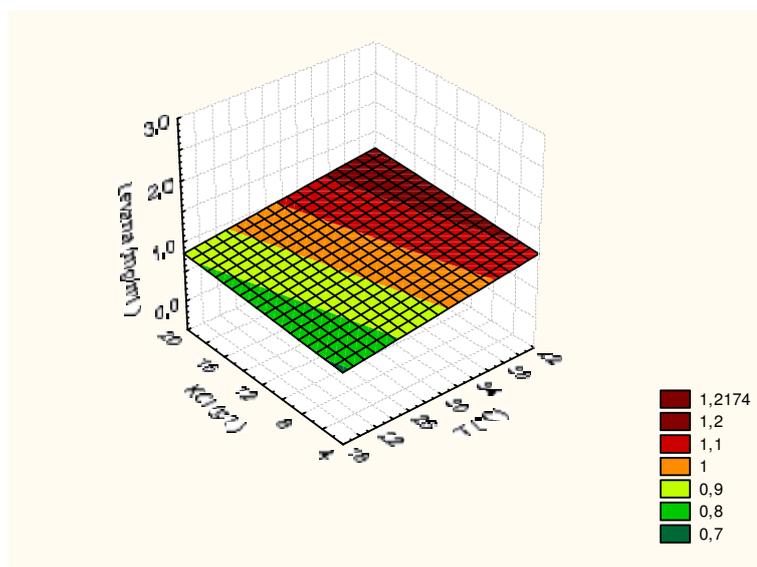


Figura 5.24 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura de incubação (°C) ($\text{Levana (mg/mL)} = -0,8276 + 0,017 * x + 0,0084 * y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e temperatura de incubação (°C) ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,3308 + 0,017 * x + 0,0179 * y$).

(a)



(b)

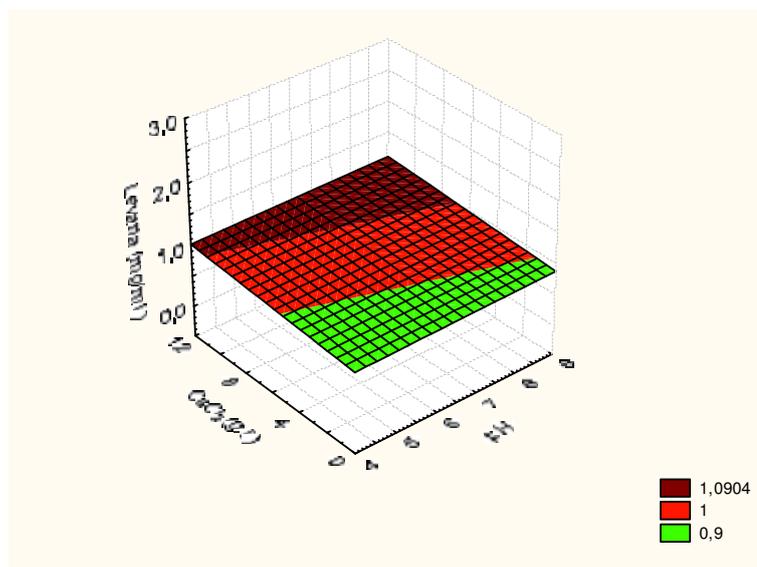


Figura 5.25 a) Superfície de resposta para levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de KCl (g/L) e temperatura de incubação (°C) ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,3308 + 0,017 * x + 0,0179 * y$); b) Superfície de resposta para levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de CaCl_2 (g/L) e pH do meio de fermentação ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,7564 + 0,0141 * x + 0,0179 * y$).

Analisando o efeito das variáveis independentes e o grau de significância nos processos fermentativos com o meio melaço (bloco 4), observou-se que apenas as variáveis independentes CaCl_2 e TST foram significativas ($p < 0,05$) e influenciaram positivamente (*Coefficiente* > 0) a produção de levana (Y_1), resultado similar ao do caldo de cana-de-açúcar (bloco 2) (Tabela 5.11). Na Figura 5.26 observou-se que a síntese do biopolímero foi proporcional ao aumento da concentração de CaCl_2 e TST.

Tabela 5.11 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos p e os coeficientes de regressão para a resposta levana (Y_1), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.

Variáveis	Y_1		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	0,512	0,000	0,512
X_1	0,107	0,326	0,053
X_2	0,079	0,466	0,039
X_3	-0,017	0,874	-0,008
X_4	-0,107	0,326	-0,053
X_5	-0,041	0,699	-0,020
X_6 *	0,272	0,027	0,136
X_7 *	0,463	0,001	0,231

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 (MgSO_4); X_6 (CaCl_2); X_7 (TST) e Y_1 (levana).

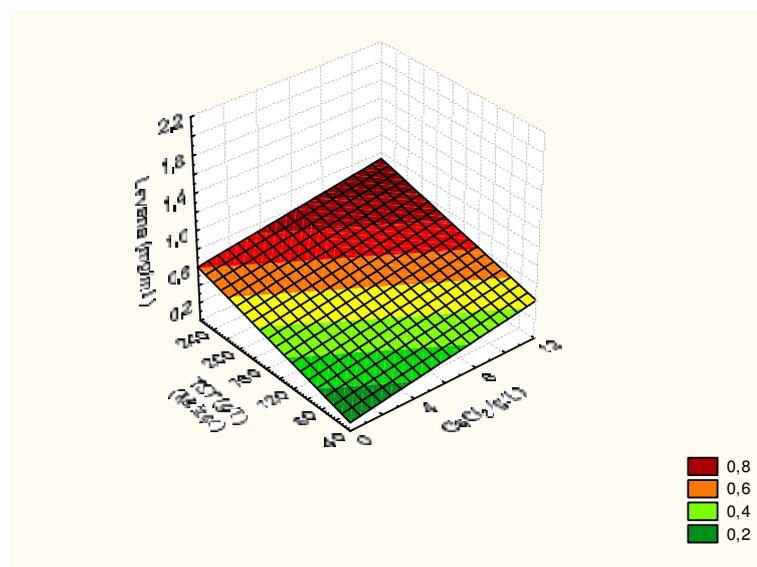
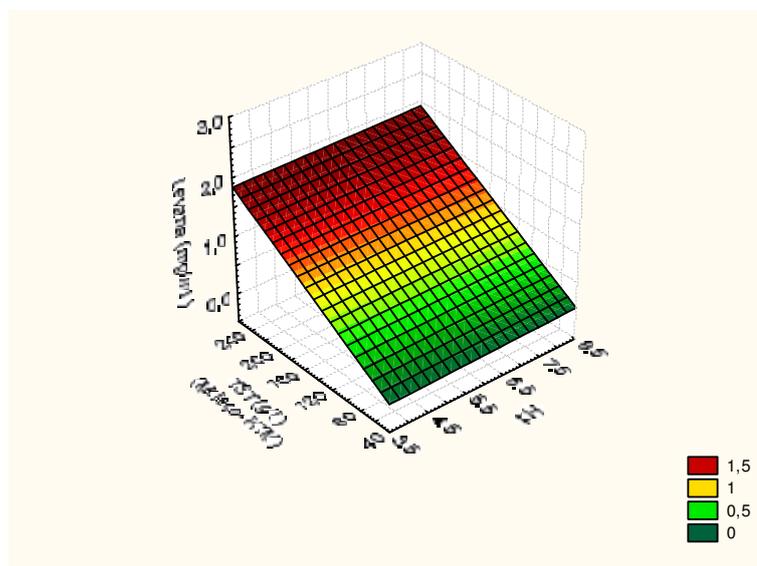


Figura 5.26 Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar (g/L) e CaCl₂ (g/L) ($\text{Levana (mg/mL)} = 0,0016 + 0,0272 * x + 0,0023 * y$).

É importante destacar que TST presente nos melões foi uma variável que se destacou significativamente das demais. A metodologia de superfície de resposta mostrou que foram obtidos baixos valores de levana (0,1 a 0,5 mg/mL) em concentrações inferiores a 180,0 g/L do substrato. Na Figura 5.27 verificou-se que a síntese máxima do biopolímero foi de 1,5 mg/mL, com 250,0 g/L de TST presente no melão HTM, comportamento similar ocorrido com o melão de cana-de-açúcar e com o meio contendo sacarose comercial. Além disso, a faixa de pH inicial estudada em todos os meios de fermentação não influenciou significativamente a produção do biopolímero e, embora a temperatura de incubação também seja um parâmetro importante para o controle fermentativo esta foi considerada uma variável relevante para síntese de levana apenas quando o meio HTM foi testado. Os resultados do exopolissacarídeo obtido com os meios de fermentação testados (sintético, caldo e melões de cana-de-açúcar) mostraram-se similares aos encontrados na literatura. Baixas temperaturas (30°C) conduzem a uma maior indução da levanasacarase responsável pela produção de levana, a qual exibe sua melhor atividade hidrolítica entre 35 e 40°C (LYNESS; DOELLE, 1983) e que *Zymomonas* pode crescer em

contrações relativamente elevadas de açúcar (ROGERS et al., 1980; DOELLE; GREENFIELD, 1985).

(a)



(b)

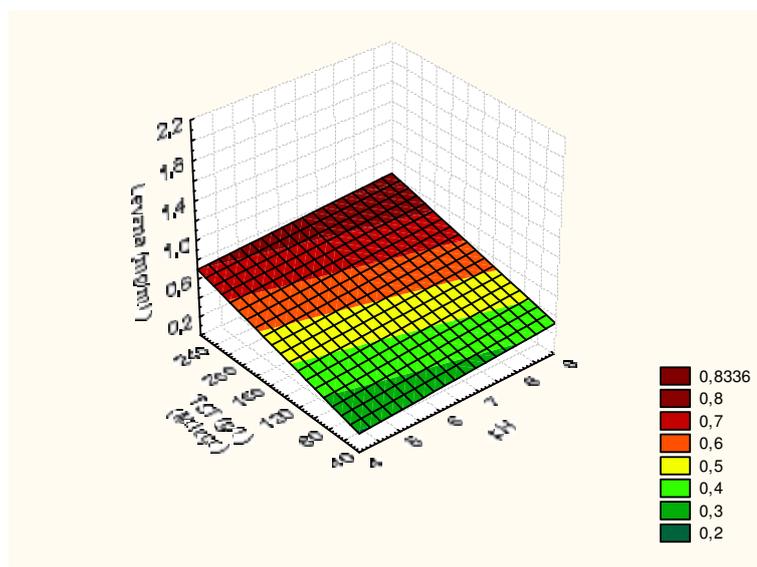


Figura 5.27 (a) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e pH do meio de fermentação (Levana (mg/mL) = $-0,402+0,0141*x+0,0084*y$); (b) Superfície de resposta para produção de levana (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (equação: Levana = $0,0039+0,0269*x+0,0023*y$).

Analisando os melaços de cana-de-açúcar para produção de etanol (Y_2), não houve variável independente significativa e, das interações, apenas $X_1 X_2$ (pH e temperatura); $X_2 X_7$ (temperatura e TST); $X_4 X_6$ (K_2SO_4 e $CaCl_2$) e $X_1 X_3 X_4$ (pH, KCL e K_2SO_4) foram significativas ($p < 0,05$) e influenciaram positiva (*Coeficiente* > 0) ou negativamente (*Coeficiente* < 0), dependendo das condições fermentativas testadas (Tabelas 5.12 e 5.13). Entretanto, a metodologia de superfície de resposta mostrou que concentrações acima de 150,0 g/L de TST e valores de temperaturas de incubação entre 20,0 e 36,0 °C foram as melhores condições para síntese de etanol (Figuras 5.28 e 5.29). Elzinger (1996) também observou que a temperatura de 34°C é a mais apropriada para o crescimento de *Zymomonas mobilis* CP4 e produção de álcool em meio com melaço.

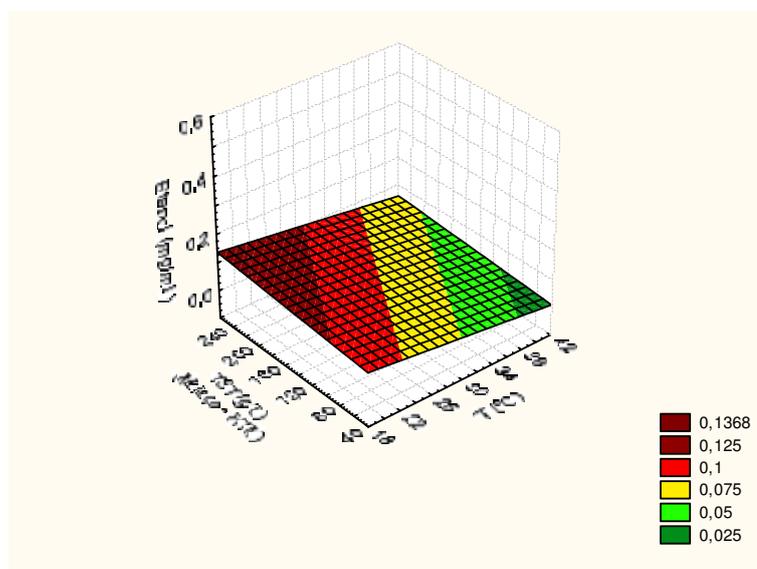


Figura 5.28 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura (°C) (Etanol (mg/mL) = $0,1403 - 0,0033 * x + 0,0002 * y$).

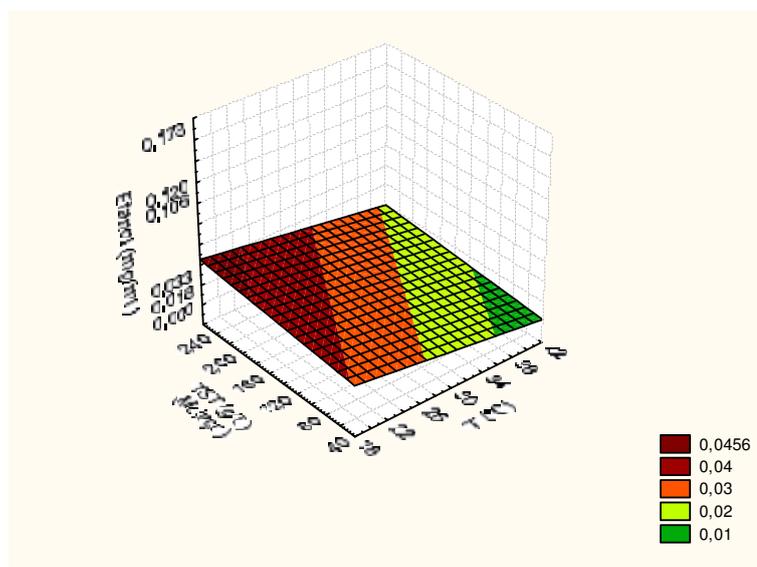


Figura 5.29 Superfície de resposta para produção de etanol (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura (C°) (Etanol (mg/mL) = 0,0466-0,0011*x+7,2812*y).

Tabela 5.12 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade – HTM acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.

Variáveis	Y_2		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	0,073	0,006	0,073
X_1	0,015	0,530	0,007
X_2	-0,066	0,054	-0,033
X_3	-0,047	0,118	-0,023
X_4	0,017	0,490	0,008
X_5	0,000	1,000	0,000
X_6	0,069	0,770	0,003
X_7	0,043	0,138	0,021
$X_1 X_2$ *	-0,074	0,041	-0,037
$X_2 X_7$ *	-0,081	0,033	-0,040
$X_4 X_6$ *	0,105	0,016	0,053
$X_1 X_3 X_4$ *	0,086	0,028	0,043

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST) e Y_2 (etanol).

Tabela 5.13 Tabela ANOVA resumida referente à estimativa parcial dos efeitos, p e os coeficientes de regressão para a resposta etanol (Y_2), utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar acrescido de sais minerais, fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, em diferentes valores de pH, concentração de sacarose e temperatura.

Variáveis	Y_2		
	Efeitos	p	Coefficientes
Intercepto*	0,024	0,007	0,024
X_1	0,005	0,538	0,003
X_2	-0,022	0,065	-0,011
X_3	-0,015	0,138	-0,008
X_4	0,005	0,532	0,003
X_5	0,0002	0,980	0,000
X_6	0,002	0,825	0,000
X_7	0,015	0,155	0,007
$X_1 X_2$ *	-0,024	0,049	-0,012
$X_2 X_7$ *	-0,026	0,042	-0,013
$X_4 X_6$ *	0,035	0,020	0,017
$X_1 X_3 X_4$ *	0,029	0,034	0,014

*Variáveis que influenciaram no processo fermentativo ($p < 0,05$). X_1 (pH inicial); X_2 (Temperatura); X_3 (KCl); X_4 (K_2SO_4); X_5 ($MgSO_4$); X_6 ($CaCl_2$); X_7 (TST) e Y_2 (etanol).

A maior produção de etanol nos melaços de cana-de-açúcar foi obtida nas condições de cultivo correspondente ao experimento 20 (200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 20°C; KCl 5,0 g/L; K_2SO_4 5,0 g/L; $MgSO_4$ 20,0 g/L; $CaCl_2$ 1,0 g/L e TST 250,0 g/L) (Tabelas 5.3 e 5.4). A síntese de etanol foi maior no meio HTM em relação ao melaço de cana-de-açúcar. O HTM é definido como um xarope clarificado, parcialmente invertido para evitar a cristalização e evaporado a 85°Brix. A composição do melaço de alta qualidade difere notavelmente da composição do melaço tradicional. Possui alto conteúdo de açúcares, o que é interessante para a produção de álcool e baixo conteúdo de cinzas pelo que é uma ótima matéria-prima para fabricação de rum (MURPHY, 1984). O conteúdo de P_2O_5 , K_2O , MgO , CaO e nitrogênio é mínima comparada com o melaço de cana e de beterraba. Quanto ao conteúdo de fatores de crescimento, a quantidade de inositol é baixíssima, muito abaixo da quantidade requerida pelas leveduras para bom rendimento em etanol (OLBRICH, 19874).

Verificou-se, entretanto, que nestes meios houve redução significativa na formação de etanol (0,520 mg/mL com HTM e de 0,173 mg/mL, com melaço de cana-de-açúcar) quando

comparada aos meios com sacarose comercial (76,6 mg/mL) e caldo de cana-de-açúcar (8,89 mg/mL), considerando as melhores condições de fermentação para cada um. Resultado similar foi encontrado por Gunasekaran e colaboradores (1986), os quais estudaram a performance de *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 em diferentes concentrações de açúcares presentes no melão de cana-de-açúcar e observaram que a máxima produção de etanol (3,35% v/v) foi com 15% de concentração inicial de açúcar e que, abaixo dessa concentração, a produção de etanol diminuiu significativamente. Em geral, os autores concluíram que a habilidade das linhagens de *Zymomonas mobilis* produzirem etanol a partir de melões foi menor quando comparada com os outros substratos (meio sintético e caldo de cana-de-açúcar).

Pouca informação existe na literatura em relação a produção de etanol por *Zymomonas mobilis* utilizando melão. Van Vuuren e Meyer (1982) utilizaram diferentes cepas de *Zymomonas mobilis* e as comparou com *S. cerevisiae*, quanto a produção de etanol utilizando melão de cana-de-açúcar em sistema descontínuo de fermentação. Segundo esses autores, a habilidade de *Zymomonas* produzir etanol de melão varia de cepa para cepa. Em baixa concentração de açúcar (5% p/v), *Zymomonas* compara-se favoravelmente com *S. cerevisiae*, ao passo que em altas concentrações de açúcar (maior a 5% p/v) *S. cerevisiae* produziu consideravelmente mais etanol que *Zymomonas*. A baixa eficiência obtida por *Zymomonas*, de acordo como os autores, provavelmente ocorreu pela presença de certos compostos no melão que são inibidores do crescimento e da produção de etanol.

É importante destacar que a literatura tem mencionado que o melão é uma matéria-prima difícil de fermentar, devido principalmente a infecções primárias ou secundárias nos mostos, composição química anormal como presença de ácidos graxos voláteis, quantidades excessivas de caramelo e rafinose, dentre outras. Por outro lado, além de sacarose e de açúcar invertido, o melão contém carboidratos não fermentescíveis. Estima-se que estes compostos são formados pela reação entre compostos reativos ácidos e alcalinos durante a clarificação e tratamentos

subseqüentes da fabricação de açúcar, mas não se encontram originalmente no caldo de cana-de-açúcar (GUNASEKARAN et al., 1986).

A presença dos compostos citados justificaria um dos vários motivos causadores do efeito inibidor do melaço sobre a fermentação alcoólica a partir de *Zymomonas mobilis* realizada nesta pesquisa (SKOTNICKI et al., 1983; DOMINGUEZ, 2003). Segundo Oura (1983), o melaço deve ser tratado antes de ser utilizado em fermentação para precipitar alguns compostos inorgânicos e materiais em suspensão e posteriormente deve ser suplementado com suficiente quantidade de sais minerais e vitaminas. Além disso, as diferentes concentrações dos sais minerais, escolhidas como variáveis independentes para a fermentação com *Zymomonas mobilis* CCT 4494 nos melaços de cana-de-açúcar, em conjunto com os compostos químicos provenientes do próprio meio, poderiam interferir na síntese de etanol, podendo estes ter causado efeito inibidor no processo fermentativo.

Apesar das variáveis independentes estudadas nesta pesquisa de doutorado não serem significativas na produção de etanol, observou-se que altas concentrações de KCl presentes nos meios melaços de cana-de-açúcar provocaram efeito inibidor da fermentação. Esta observação é semelhante aos resultados obtidos por Skotnicki e colaboradores (1983), os quais atribuíram o baixo rendimento de etanol aos níveis relativamente altos de potássio e magnésio. Van Vuuran e Meyer (1982) relataram que o efeito inibidor do melaço poderia estar relacionado à presença de altas concentrações de íons Mg^{+2} e K^{+} . Jerez (1993) conduziu um estudo sobre métodos e condições de fermentação de melaço de cana-de-açúcar e observou que Ca^{+2} , K^{+1} e Cl^{-1} são inibidores do crescimento e fermentação por *Zymomonas mobilis* CP4.

A Figura 5.30 mostra o cromatograma correspondente a produção de etanol e a presença de compostos orgânicos, referente a corrida 20, por *Zymomonas mobilis* CCT 4494, após 24 horas de fermentação, com o bloco 3 (melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade - HTM).

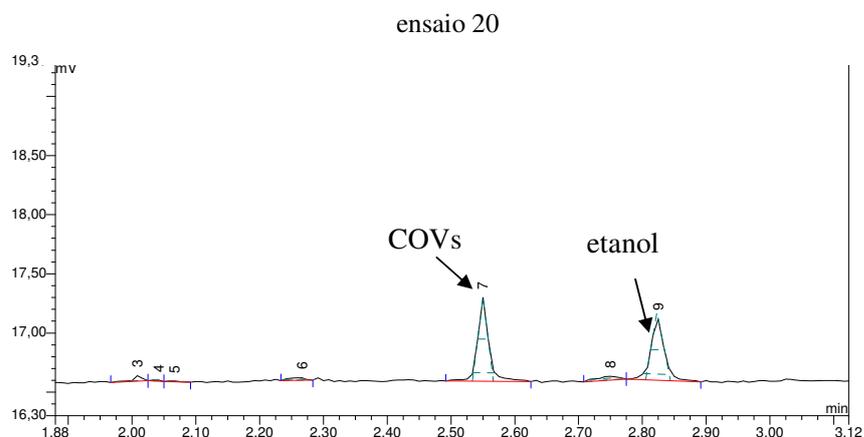
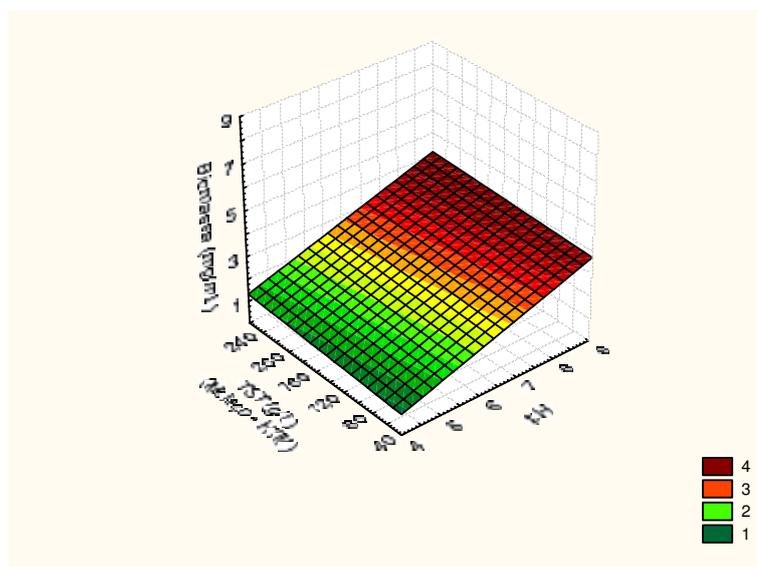


Figura 5.30 Cromatograma de Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) e etanol, utilizando o meio melaço de cana-de-açúcar de alta qualidade fermentado por *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

O comportamento do crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 mostrou-se de maneira diferente dentre os meios de fermentação testados. Comparando-se as melhores condições fermentativas testadas em cada meio, o maior crescimento das células foi de 9,31 mg/mL no caldo de cana-de-açúcar. Com os melaços, o maior valor foi de 7,97 mg/mL com o meio HTM, sendo este semelhante ao encontrado no meio contendo sacarose comercial que foi de 7,32 mg/mL.

É importante ressaltar que os valores de pHs iniciais dos meios melaços de cana-de-açúcar assim como a temperatura de incubação testada durante o processo fermentativo influenciaram significativamente ($p < 0,05$) no crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. A análise de superfície de resposta mostrou que a biomassa foi proporcional ao aumento das variáveis, sendo a faixa de pH inicial entre 7,0 a 8,0 e temperatura acima de 36°C consideradas como as melhores condições para o crescimento da bactéria, havendo produção de até 4,0 g/L de biomassa (Figuras 5.31 e 5.32).

(a)



(b)

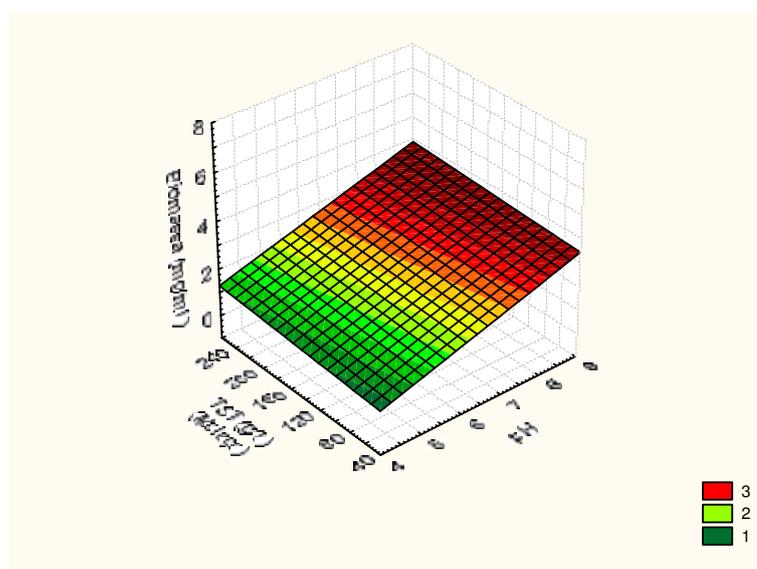
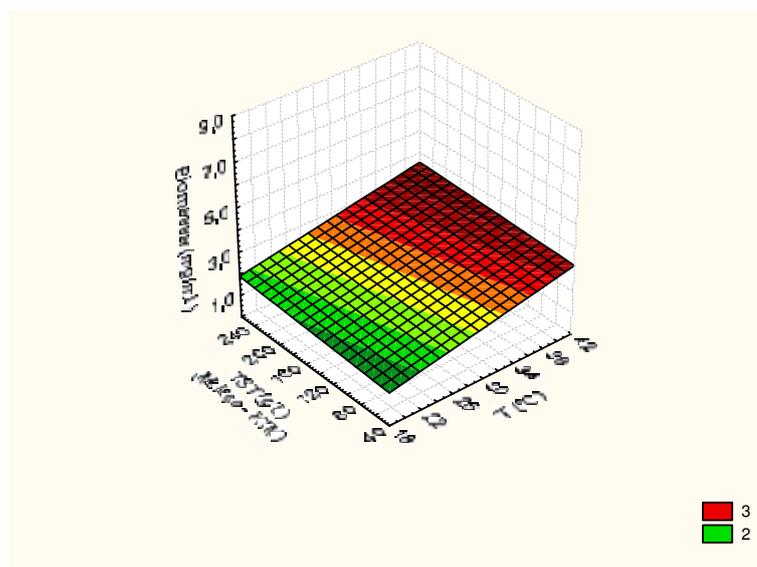


Figura 5.31 (a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e pH do meio de fermentação (Biomassa (mg/mL) = $-1,1243+0,5625*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar (g/L) e pH do meio de fermentação (Biomassa (mg/mL) = $-1,0598+0,5214*x+0,002*y$).

(a)



(b)

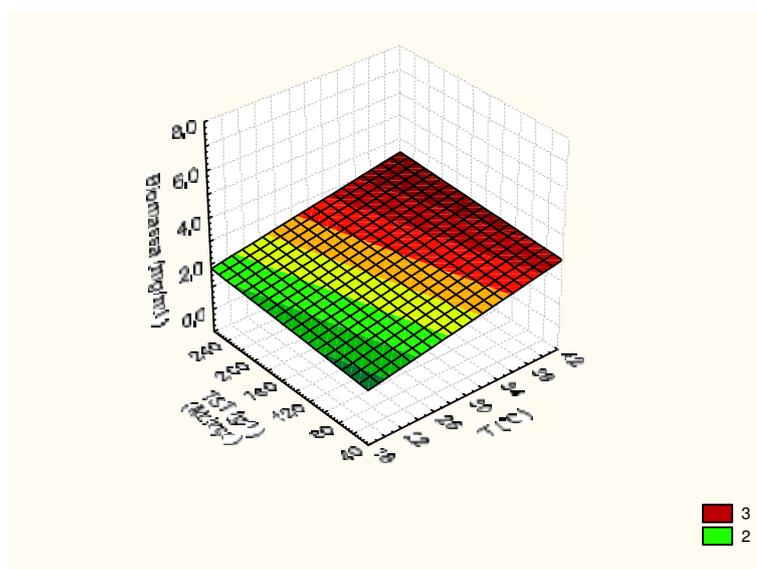


Figura 5.32 (a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e temperatura (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,162+0,0696*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar (g/L) e temperatura (°C) (Biomassa (mg/mL) = $0,1027+0,0655*x+0,002*y$).

Em virtude da sua composição, o melaço é utilizado fundamentalmente como fonte de carbono e energia, sendo necessário suplementá-lo com nitrogênio e alguns sais minerais, especialmente fósforo e magnésio. Há divergências, entretanto, sobre esse assunto, como por exemplo, Rogers e colaboradores (1982) que relataram inibição significativa do crescimento de *Zymomonas mobilis* ZM4 em razão, provavelmente, das altas concentrações de potássio, magnésio e cloreto no melaço. O relato citado por estes pesquisadores poderia justificar o que ocorreu com a pesquisa realizada neste projeto de doutorado, pois verificou-se que dentre as variáveis testadas, os sais minerais KCl, CaCl₂ influenciaram positivamente e MgSO₄, negativamente o crescimento celular, conforme as Figura 5.33 e 5.34.

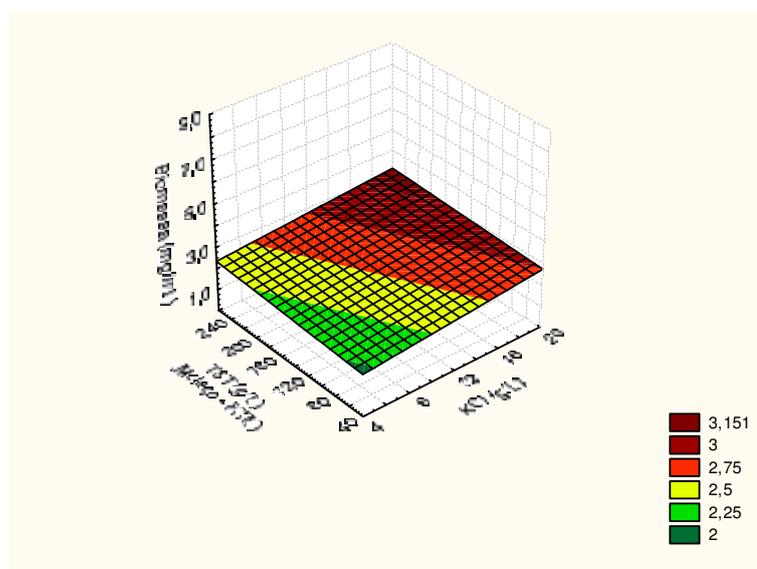


Figura 5.33 Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melaço de cana-de-açúcar - HTM (g/L) e KCl (g/L) (Biomassa (mg/mL) = Biomassa (mg/mL) = $1,6768+0,0499*x+0,0018*y$).

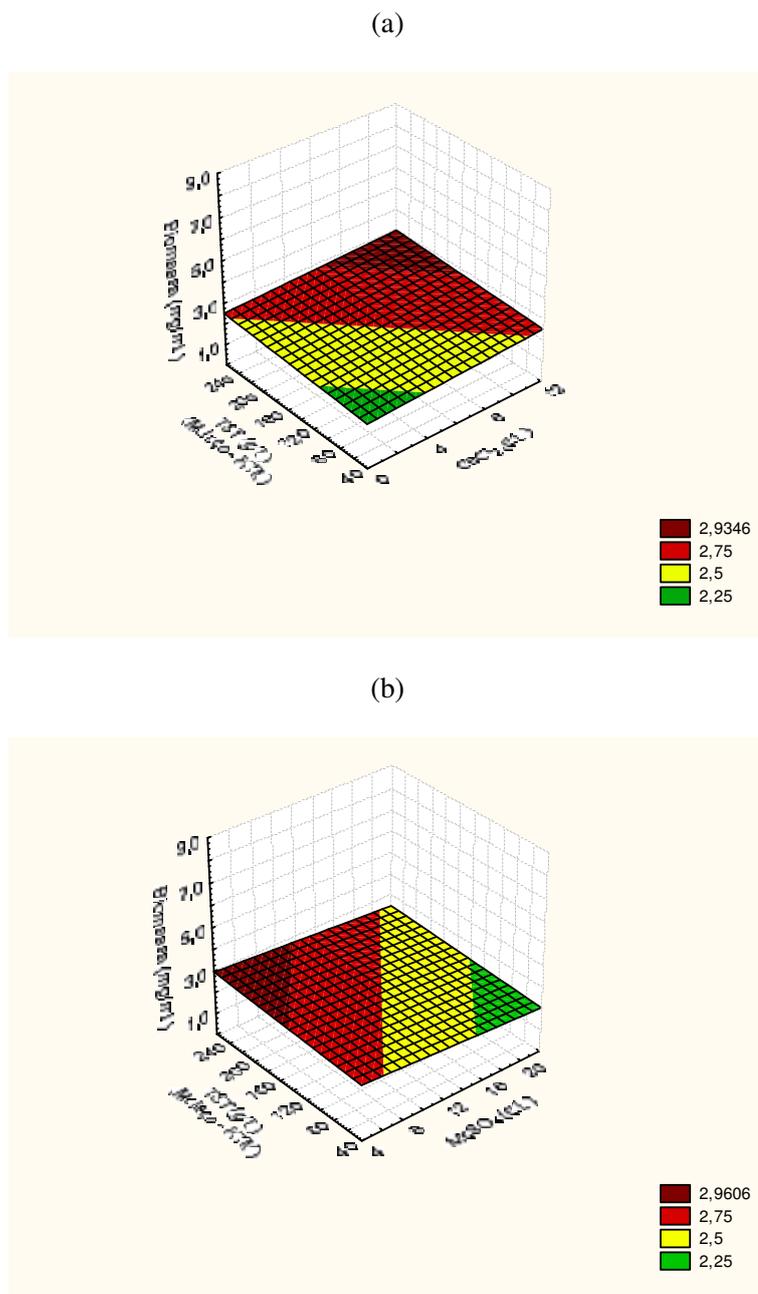


Figura 5.34 (a) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar (g/L) e CaCl_2 (g/L) (Biomassa (mg/mL) = $2,043+0,0346*x+0,0018*y$); (b) Superfície de resposta para produção de biomassa (mg/mL) ao redor da concentração ótima de TST do melão de cana-de-açúcar (g/L) e MgSO_4 (g/L) (Biomassa (mg/mL) = $2,5945-0,0275*x+0,0018*y$).

A utilização de caldo e de melaços de cana-de-açúcar como meios de cultura tem a vantagem de serem matérias-primas de baixo custo e disponíveis em grandes quantidades no Brasil. Na formação de bioprodutos, contudo, uma condição “ambiental” a ser analisada é o aumento da pressão osmótica e, portanto, o uso de meios de cultivos alternativos com grandes quantidades de sais podem afetar a síntese de etanol e subprodutos. Essas matérias-primas apresentam grande variedade na sua composição química sendo, portanto, difícil determinar qual ou quais componentes provocam inibição da fermentação.

Mediante a utilização de modelagem empírica e da estimação de parâmetros, empregando o programa *Statistica 6.0*, que descreveu como as variáveis experimentais e suas interações influenciaram nas respostas (etanol, sorbitol e levana), observou-se que ainda são necessários estudos mais detalhados da composição dos meios e dos parâmetros físicos e químicos que viabilizem o uso de substratos alternativos complexos em biotecnologia, como o caldo e o melaço de cana-de-açúcar, evitando a suplementação desnecessária com vitaminas e sais minerais.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA LEVANASACARASE “IN VITRO” NO CALDO DE FERMENTAÇÃO E PRODUÇÃO DE LEVANA A PARTIR DO EXTRATO ENZIMÁTICO, NOS MELHORES PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Após a realização das fermentações com todos os meios de cultura utilizando *Zymomonas mobilis* CCT 4494, observou-se que o experimento 16 (200 rpm, por 24 horas pH 4,0; temperatura 40°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L), contendo 250,0 g/L de sacarose comercial, referente ao bloco 1, foi considerado como o melhor parâmetro fermentativo para síntese de levana, pois proporcionou a máxima concentração do exopolissacarídeo (4,50 mg/mL).

Foi utilizada uma amostra do sobrenadante, obtida a partir deste experimento (corrida 16) com *Zymomonas mobilis* CCT 4494, como extrato enzimático bruto, para determinação da atividade enzimática e, posteriormente, para a produção do exopolissacarídeo nas mesmas condições de fermentação.

Verificou-se que a atividade da enzima levanasacarase foi de 0,699 umol açúcares redutores/mL, valor semelhante ao encontrado em outras pesquisas (PREZIOSI et al.,1990; WENDT, 2001; BOFO, 2009).

Nesta pesquisa, embora o pH não tenha sido considerado uma variável estatisticamente significativa na formação de levana com o meio contendo sacarose comercial (bloco 1), a partir de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, acredita-se que a atividade da enzima levanasacarase poderia estar relacionada ao pH inicial do meio de fermentação e ser explicado pelo fato do pH 4,0 estar próximo do valor de pH ótimo para atuação da enzima, conforme relatos de alguns pesquisadores. Wendt (2001) verificou que a maior atividade da enzima foi de 0,65 umol/mL e se deu em pH de pré-incubação de 4,0, em 1 hora de reação, e a menor atividade (0,35 umol/mL) foi em pH 8,0, em 2 horas de reação. Bofo (2009) observou variação da atividade de hidrólise de sacarose na faixa de pH entre 3,5 e 7,0 e picos de atividade enzimática em valores de pH 4,0, 5,0 e 6,5, entretanto, afirmou em seu relato que o máximo valor de atividade enzimática foi conseguido em pH 4,0, sendo este, portanto, considerado o pH ótimo para a atividade de sacarase do extrato enzimático bruto. O pH ótimo da enzima de cepas de *Zymomonas mobilis* NRRL B-806, conforme Park e colaboradores (1983), está entre 4,7 e 5,6 e Preziosi e colaboradores (1989) encontraram para a cepa ZM4 (ATCC 31821) o melhor pH igual a 5,5, apresentando atividade de 0,83 umol/mL.

Para a produção de levana, preparou-se uma mistura reacional composta por 3,0 mL do extrato enzimático bruto e 2,0 mL do meio de fermentação contendo os sais minerais e a fonte de carbono (KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e sacarose 250,0 g/L), em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 4,0 e incubada em “Shaker rotatório”, a temperatura de

40°C, por 24 horas, de acordo com as condições testadas no experimento 16 com o meio sintético (bloco 1).

Após o processo fermentativo, somente 2,92% da sacarose inicial (25,0%) foi utilizada para a produção do biopolímero levana (7,30 mg/mL), sendo que o restante do substrato pode ter sido convertido em outros compostos e servido de substrato para o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

A produção de levana pelo extrato enzimático obtido neste experimento foi semelhante ao valor encontrado por Bofo (2009), testando a mesma linhagem bacteriana, porém em condições fermentativas diferentes. Em seu projeto, para a formação de levana a partir da levanasacarase presente no extrato enzimático bruto, foi aplicada a metodologia de superfície de resposta 3^{4-0} , onde as variáveis independentes estudadas foram: pH do meio reacional (3,0; 4,0 e 5,0), tempo (24; 48 e 72 horas), temperatura de reação (20,0; 30,0 e 40,0°C) e concentração de sacarose (10,0; 25,0 e 40,0%) presente no meio. A maior produção de levana foi de 7,92 mg/mL, obtida em meio reacional com 400,0 g/L de sacarose, temperatura e tempo de reação de 20°C e 24 horas, respectivamente, em tampão acetato de sódio 50mM e pH 4,0, o que correspondeu a 1,8% do substrato inicial utilizado. As concentrações de levana obtidas nesta pesquisa e na de Bofo (2009), entretanto, são inferiores ao relatados por Ammar e colaboradores (2002), que alcançaram valores de 200,0 mg/mL utilizando a enzima levanasacarase termoestável de *Bacillus* sp TH4-2 em solução de sacarose 36%, temperatura de reação de 50°C, após de 24 horas de reação e por Dawes e colaboradores (1966), que determinaram a atividade de levanasacarase, utilizando os extratos brutos produzidos por *Zymomonas mobilis*, e observaram que aproximadamente 10% da sacarose foi convertida em levana e o restante foi hidrolisado, com a formação de glicose e frutose.

É importante ressaltar que, apesar da quantidade de sacarose hidrolisada convertida em levana ser baixa, ocorreu aumento da concentração de 62,0% do biopolímero com o extrato

enzimático bruto em relação ao microrganismo *Zymomonas mobilis* CCT 4494, durante sua fermentação em meio contendo sacarose comercial (bloco 1).

A partir do resultado obtido para levana, utilizando o extrato enzimático bruto, é válido o estudo da purificação da enzima levanasacarase com o objetivo de aumentar o rendimento do biopolímero, conforme relatado por outros pesquisadores. Lyness e Doelle (1983) purificaram a enzima levanasacarase de *Zymomonas mobilis* pelo tratamento do sobrenadante, com sulfato de protamina e posterior cromatografia de troca iônica DEAE-trisacril, obtendo-se purificação parcial de 330 vezes e rendimento de 11%.

5.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE VARIÁVEIS PARA PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL POR *Zymomonas mobilis* CCT 4494, UTILIZANDO DIFERENTES MEIOS DE FERMENTAÇÃO

A eficiência da conversão de açúcar em etanol e levana por *Zymomonas mobilis* depende de vários fatores tais como: substrato, condições ambientais, tipo de microrganismo, entre outros. Nesta pesquisa foram estudados e avaliados os efeitos de diferentes variáveis (pH, temperatura de incubação, substrato e sais minerais presentes nos meios de fermentação) e a otimização das respostas (etanol e levana), pela linhagem de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

Mediante a utilização de modelagem empírica e da estimação de parâmetros, empregando o programa *Statistica 6.0*, está relatado como as variáveis experimentais e suas interações influenciaram nas respostas (levana e etanol).

Efeito da temperatura de incubação

Segundo Doelle e colaboradores (1989), a temperatura utilizada para o crescimento é diferente da requerida para a produção de levana e etanol. Baseando-se nesta afirmação, notou-se que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 teve a taxa de desenvolvimento celular e a formação dos

produtos de modo diferente em relação à variação da temperatura de incubação testada para cada meio fermentativo.

Considerando o experimento em que houve maior produção de levana, etanol e biomassa, em cada meio de fermentação, observou-se que no caldo de cana-de-açúcar a maior concentração do biopolímero foi a 40,0°C, e para síntese de etanol e crescimento de *Zymomonas mobilis*, contudo, a temperatura de 20,0°C revelou-se como a melhor. O efeito das condições fermentativas empregadas nos melaços foi semelhante ao encontrado no meio contendo sacarose comercial, pois a temperatura de incubação de 40,0°C testada nestes meios foi a ideal tanto para formação de levana quanto para biomassa, contrapondo-se apenas para etanol. No meio sintético, a maior concentração de etanol foi a 40,0°C, enquanto que a temperatura de 20,0°C nos melaços promoveu maior síntese deste produto.

As temperaturas acima de 30,0°C foram consideradas ideais para a fermentação alcoólica no meio com sacarose, pois a concentração máxima de etanol obtida esteve entre 30,0 e 35,0 g/L. Nos demais meios de fermentação, as temperaturas entre 20,0 a 30,0°C foram as melhores para síntese etanólica, podendo observar que no melhor experimento com cada meio, a concentração máxima de etanol ocorreu à temperatura de 20°C.

Zymomonas mobilis CCT 4494 mostrou ser uma bactéria termotolerante, pois a linhagem se adaptou às variações de temperatura testadas. Embora a variável tenha sido considerada significativa apenas nos melaços de cana-de-açúcar, verificou-se que a massa celular da bactéria aumentou proporcionalmente ao aumento da temperatura de incubação em todos os meios de fermentação, obtendo-se valores de biomassa de aproximadamente 1,3 g/L, a 25,0°C e de 4,0 g/L, na faixa de 30,0°C a 40,0°C após o processo fermentativo.

Emprega-se a bactéria *Zymomonas mobilis*, geralmente para produção de etanol a partir da sacarose, frutose e glicose (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993). Na fermentação em alta concentração inicial de sacarose, porém, a taxa de hidrólise deste dissacarídeo é maior do que o consumo dos seus monossacarídeos (PARKER et al., 1997; TANO et al., 2000).

Conseqüentemente, os monossacarídeos acumulam-se no caldo de fermentação e favorecem a formação de subprodutos, como levana, o que reduz o rendimento em etanol (KANNAN et al., 1997; PARKER et al., 1997). Baseando-se nesses experimentos, é importante salientar que os valores de temperatura testados nesta pesquisa promoveram a hidrólise do substrato presente nos meios fermentativos, proporcionando condições para que *Zymomonas* utilizasse os monossacarídeos para seu crescimento e polimerização da frutose para formação de levana.

De acordo com o planejamento experimental para otimização da produção de levana, observou-se que a maior concentração obtida em cada meio de fermentação foi à temperatura de 40,0°C. Nestas condições fermentativas, o meio contendo sacarose comercial foi considerado o melhor devido a obtenção da concentração máxima do biopolímero (4,5 mg/mL), seguido pelo HTM (2,83 mg/mL), melação de cana-de-açúcar (1,96 mg/mL) e caldo de cana-de-açúcar (1,05 mg/mL).

Comparando o efeito da temperatura aos meios de fermentação, a variação influenciou significativamente na síntese de levana quando o meio HTM foi testado, apresentando concentrações mais altas (1,5 a 2,0 g/L) do biopolímero acima de 30,0°C, conforme o ocorrido para a biomassa. A síntese de levana em temperaturas abaixo de 25,0°C foi bem inferior à obtida a 30,0°C (0,5 g/L). Estes resultados contrapõem-se aos de Bekers e colaboradores (1999) e Calazans e colaboradores (1997), os quais relataram que a temperatura ótima para a produção de levana é de 25,0°C; e assemelham-se, porém, aos de Park e Baratti (1993), que observaram melhores rendimentos ocorridos a 30,0°C.

Efeito do pH do meio de fermentação

Congregado e colaboradores (1985) consideram que o desenvolvimento total do microrganismo depende da natureza dos fatores limitantes, e que o pH é um dos fatores mais comuns juntamente com a exaustão dos nutrientes e do acúmulo de produtos tóxicos. Valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5), no entanto, podem levar o microrganismo

rapidamente à morte (MANRESA et al., 1987). Baseando-se neste relato, observou-se que de todas as variáveis estudadas, o pH inicial do meio de fermentação foi o fator que apresentou maior influência no desenvolvimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494. Seu efeito foi semelhante em relação a todos os meios de fermentação, sendo os valores entre 7,0 e 8,0 considerados como a melhor faixa de pH inicial para o crescimento da bactéria.

De acordo com o planejamento experimental, observou-se que a melhor condição fermentativa testada para o crescimento celular correspondeu ao valor de pH inicial 8,0. Sob este parâmetro, a bactéria desenvolveu-se melhor no meio caldo de cana (9,31 mg/mL), seguido no HTM (7,32 mg/mL), melão de cana-de-açúcar (7,62 mg/mL) e sintético (7,32 mg/mL).

Não houve resultados satisfatórios sobre a produção do biopolímero e de etanol em relação à variação do pH inicial de todos os meios de fermentação. Baseando-se na metodologia de superfície de resposta, as concentrações dos produtos em pH abaixo de 5,5 foram ligeiramente inferiores às obtidas nos valores de pH iniciais acima de 6,5. Importa destacar que o controle do pH inicial é essencial para que se possa maximizar a produção de etanol e reduzir a formação de outros subprodutos como levana e sorbitol (KANNAN et al., 1997). Nesta pesquisa, as concentrações baixas de etanol obtido nos meios de cultura, principalmente nos alternativos, foram inferiores às encontradas na literatura. Tal fato, possivelmente, ocorreu pela falta de controle do pH inicial durante todo processo fermentativo, possibilitando desvio no metabolismo celular e, conseqüentemente, ocasionando condições propícias à formação do biopolímero (TANO; BUZATO, 2002).

A determinação dos valores de pH final dos meios de fermentação mostrou que, independentemente do valor inicial (4,0, 6,0 ou 8,0), houve queda do mesmo após 24 horas de fermentação na faixa de 4,5 a 6,0. Isto também foi demonstrado por Bekers e colaboradores (2000), os quais também observaram que durante a fermentação em meio de sacarose, *Zymomonas mobilis* 113 "S" não produziu apenas etanol e levana, mas também ácido glicônico, ácido láctico e ácido acético, responsáveis pelo abaixamento do pH do meio.

As maiores concentrações de biomassa encontraram-se nos valores de pH finais entre 5,5 a 6,0 e o crescimento celular de *Zymomonas mobilis* decresceu nos valores finais abaixo de 4,5. Os resultados obtidos estão de acordo com Doelle e colaboradores (1989), pois relataram que o pH dentro de certos limites (6,5 a 8,0) tem pouca influência na taxa de desenvolvimento, mas pode influenciar o número total de bactérias, no entanto, valores de pH extremamente baixos (menores que 4,5) podem levar o microrganismo rapidamente à morte.

Efeito do substrato no meio de fermentação

É importante destacar que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou alta tolerância às elevadas concentrações de substrato (15 e 25%). Isto é devido à sua elevada capacidade de regulação osmótica e ao eficiente sistema de transporte de glicose (STRUCH et al., 1991), embora a matriz do delineamento fracionado contemplando as combinações realizadas para a obtenção das respostas (levana e etanol), utilizando os diferentes meios de fermentação, tenha mostrado que as maiores concentrações de biomassa ocorreram nos experimentos contendo 5% de substrato.

De acordo com as melhores condições fermentativas proporcionadas à bactéria, as concentrações do biopolímero produzido com o meio de fermentação contendo sacarose comercial foram superiores (valor máximo de 4,5 mg/mL, experimento 16) às obtidos com os meios alternativos. Comparando o efeito dos meios alternativos sobre as concentrações de levana, estas foram superiores (valor máximo de 2,83 mg/mL, experimento 21) nos melaços de cana-de-açúcar em relação aos obtidos no caldo de cana (valor máximo de 1,05 mg/mL, experimento 5). Os resultados discordam dos obtidos por Oliveira e colaboradores (2004), os quais, estudando as fontes de carbono caldo e melaço de cana-de-açúcar, observaram que no meio melaço ocorreu queda na produção de levana ($2,53 \text{ g/L}^{-1}$) quando comparado ao meio caldo de cana ($14,45 \text{ g/L}^{-1}$).

A síntese de levana foi proporcional ao aumento da concentração da fonte de carbono presente nos meios fermentativos. Baseando-se na metodologia de superfície de resposta, nas concentrações abaixo de 180,0 g/L de substrato, a produção do biopolímero variou entre 0,1 a 1,0 mg/mL, dependendo do meio testado e, acima desta concentração, ocorreu acréscimo de até 50% na concentração de levana, havendo produção de 2,0 mg/mL com a máxima concentração de sacarose (250,0 g/L). Vinhas (1999) comparou diversas linhagens de *Zymomonas mobilis* utilizando diferentes concentrações de sacarose, à temperatura de 25°C, por 72 horas de processo e os resultados mostraram que as melhores condições de fermentação foram com a concentração do substrato inicial de 200,0 g/L, com a linhagem *Zymomonas mobilis* ZAG-12.

As diferentes faixas de concentração de sacarose testada no processo fermentativo com o meio contendo sacarose comercial ou então quando associada a outras variáveis nos meios alternativos, foram significativas para a produção de etanol. A fermentação alcoólica foi proporcional ao aumento da variável, favorecendo a síntese do produto em concentrações de substrato acima de 180,0 g/L, conforme o ocorrido para produção do biopolímero. Resultados semelhantes foram obtidos por Lyness e Doelle (1980), que observaram variação na produção de etanol na faixa de 30,0 a 42,5 g/L, em meio utilizando sacarose (200,0 g/L) para *Zymomonas mobilis* Z7.

Zymomonas mobilis precisa de um açúcar fermentável no meio de cultura para o crescimento, podendo ser glicose ou frutose ou ainda, para algumas linhagens, sacarose (DADDS; MARTIN, 1973), entretanto, quando sacarose é utilizada para a fermentação, ocorre redução significativa da síntese de etanol devido à formação de subprodutos como levana (RIBBONS et al., 1962) e sorbitol (BARROW et al., 1984). Além disso, é também capaz de produzir outros metabólitos em altas concentrações sob condições de cultura adequadas como, por exemplo, acetaldeído e ácido acético (BELAICH; SENEZ, 1965), gluconato e fructooligossacarídeos e pequenas quantidades de alguns álcoois superiores e fenol (BEKERS et

al., 1999). De acordo com estes pesquisadores, as baixas concentrações de etanol obtido nos meios de cultura podem ser justificadas pelo tipo de substrato utilizado nesta pesquisa.

Apesar da alta disponibilidade de açúcar (Si – substrato inicial) presente nos meios de fermentação, observou-se baixo consumo de açúcar (Sc – substrato consumido) e elevada quantidade de AT (açúcares totais), principalmente nos meios alternativos, que é dada pela diferença Si – Sc, no final das fermentações (TANO; BUZATO, 2002) (Tabelas 5.1 a 5.4). Estes consumos insatisfatórios de açúcar podem ser resultantes da osmolaridade do meio e, também, da presença de inibidores no caldo e melaços de cana (JOACHIMSTHAL, 1998; PARK; BARATTI, 1993; TANO et al., 2000).

Os baixos valores de AR (açúcares redutores) obtidos através das análises realizadas com as amostras confirmam, segundo Viikari e Gisler (1986), baixa velocidade de hidrólise da sacarose, a qual parece estar associada com a formação de levana, pois *Zymomonas mobilis* utilizou o substrato inicial para seu crescimento e para favorecer, possivelmente, a atividade da enzima levanasacarase extracelular (SacB), que converte a sacarose em frutanas com pontes β (2 → 6), formando a cadeia de levana (KANNAN et al., 1993).

A produção de levana foi pequena quando comparada a de açúcares redutores. Isto ocorreu porque a bactéria *Zymomonas mobilis* hidrolisa a sacarose e utiliza os açúcares redutores para seu crescimento, para a produção de levana e também para a formação de outros produtos tais como frutooligômeros e etanol (SANGILYANDI et al., 1999). Essa distribuição da fonte de carbono para o crescimento celular e formação de frutanas também foi observado por Dawes e Ribbons (1966), os quais acompanharam a formação de levana durante o crescimento da bactéria *Zymomonas mobilis* N.C.I.B. 8938.

Efeito dos diferentes sais minerais presentes no meio de fermentação

A formação de levana e etanol e o crescimento celular são afetados, não só pela fonte de carbono, como também pela presença de certos compostos químicos no meio de fermentação.

Analisando a presença de diversos sais minerais presentes no meio de fermentação, constatou-se que a cultura de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 adaptou-se aos meios e que, dependendo da concentração utilizada destas variáveis, seus constituintes puderam sustentar tanto o crescimento quanto a síntese dos produtos.

Analisando o efeito das variáveis, o delineamento estatístico mostrou que o crescimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi afetado principalmente nos meios melaços de cana-de-açúcar. Nestes, a biomassa foi proporcional ao aumento da concentração de KCl e CaCl₂, enquanto que as maiores concentrações de MgSO₄ apresentaram efeito inibidor para o crescimento celular.

A presença de magnésio é muito importante na fermentação por *Zymomonas*, desde que íons magnésio são requeridos como cofatores de várias enzimas da via Entner Doudoroff, incluindo glucoquinase, glicose 6-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase e enolase (MILLAR et al., 1982, SOLS et al., 1971). Segundo Dawes e Large (1970), o íon magnésio tem um papel importante na prevenção da degradação do RNA prolongando a sobrevivência das *Zymomonas*.

Os sais minerais CaCl₂, KCl e K₂SO₄ testados como variáveis no meio contendo sacarose comercial foram significativos para obtenção de levana. As maiores concentrações do biopolímero encontraram-se nas maiores concentrações dos sais testados, influenciando significativamente a formação do biopolímero.

Para síntese de etanol, apenas KCl influenciou positivamente quando avaliado independentemente ou associado a alguma variável nos meios de fermentação. A presença de CaCl₂ e K₂SO₄ no meio sintético, em concentrações superiores a 5,5 g/L e 11,5 g/L, respectivamente, foram inibidores da fermentação alcoólica. Segundo Hoppner e Doelle (1983), vários co-fatores que podem ser necessários na fermentação por *Zymomonas* incluem cálcio e potássio. Segundos os autores, o cálcio ativa a enzima piruvato descarboxilase em *Zymomonas*, enquanto que Sols e colaboradores (1971) reportaram que o potássio ativa a enzima piruvato

quinase. A adição destes co-fatores, contudo, não reduzem a inibição da fermentação pelo etanol, segundo Osman e Ingram (1985).

Resultados similares foram relatados por Jerez (1993), que estudou alguns parâmetros cinéticos da fermentação de sacarose (100,0 g/L) por *Zymomonas mobilis* CP4 em função de diferentes sais adicionados, e verificou que naqueles meios que continham potássio, cálcio e cloreto, formou-se maior quantidade de levana (3,91, 4,025 e 3,15 g/L, respectivamente). O mesmo autor, entretanto, verificou que KCl, em concentrações superiores a 0,5, é inibidor da produção etanol e do crescimento de *Zymomonas*.

A variação da concentração de $MgSO_4$, quando acrescentado nos meios de fermentação, não ocasionou efeito significativo sobre as respostas (etanol e levana). Estes resultados estão de acordo com os relatados por Diez e Mancilha (1990), os quais mostraram que, utilizando caldo de beterraba açucareira, a presença ou ausência $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ não afetou os rendimentos fermentativos nem apresentou efeito inibidor da *Zymomonas mobilis* CP4. Entretanto, são contraditórios aos reportados por Skotnicki e colaboradores (1981), que indicaram que o Mg^+ pode ter efeito inibidor da fermentação por *Zymomonas*, e aos resultados obtidos por Cromie e Doelle (1981), os quais observaram incremento na taxa específica de consumo de substrato (q_s) e de produção de etanol (q_p) com o aumento da concentração de magnésio até a concentração de 3,0 g/L. A concentração de etanol também foi aumentada com o aumento da concentração de magnésio até 3,0, diminuindo levemente quando a concentração aumentou para 4,5 g/L.

Os resultados gerais do estudo sobre o efeito dos diferentes sais minerais presentes no meio de fermentação de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 mostraram que, nas condições de fermentação utilizadas, a suplementação de $CaCl_2$, KCl e K_2SO_4 , em concentrações adequadas, são importantes para aumentar a síntese dos produtos e que o $MgSO_4$ não tem efeito na fermentação sobre as respostas.

6. CONCLUSÕES

1. Dos meios de fermentação testados com *Zymomonas mobilis* CCT 4494, verificou-se que o bloco 1 (meio sintético) proporcionou maiores rendimentos do exopolissacarídeo levana e de etanol, enquanto que, os demais blocos (caldo de cana-de-açúcar e melaços de cana-de-açúcar de alta qualidade) favoreceram o crescimento celular;

2. As melhores condições para a obtenção da máxima concentração de levana (4,5 mg/mL) foi a composição da corrida 16 (200 rpm, por 24 horas; pH 4; temperatura 40°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 11,0 g/L e sacarose 250,0 g/L), com o bloco 1, quando se utilizou o meio sintético.

3. As melhores condições para a obtenção da máxima concentração de etanol (76,6 mg/mL) foi a composição da corrida 2 (200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 40°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 5,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 1,0 g/L e sacarose 250,0 g/L), com o bloco 1, quando se utilizou o meio sintético.

4. As melhores condições para a obtenção da máxima concentração de biomassa (9,31 mg/mL) foi a composição da corrida 32 (200 rpm, por 24 horas; pH 8; temperatura 20°C; KCl 18,0 g/L; K₂SO₄ 18,0 g/L; MgSO₄ 5,0 g/L; CaCl₂ 1,0 g/L e sacarose 50,0 g/L), com o bloco 2, quando se utilizou o meio caldo de cana-de-açúcar,

5. As variáveis analisadas que afetaram significativamente ($p < 0,05$) a biossíntese de levana e etanol foram: KCl, K₂SO₄, CaCl₂ e sacarose.

6. A variável que apresentou maior influência significativa ($p < 0,05$) no desenvolvimento de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 foi o pH inicial do meio de fermentação.

7. A bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 apresentou alta tolerância às elevadas concentrações de substrato (15 e 25%).

8. A síntese de levana e etanol foram proporcionais ao aumento da concentração da fonte de carbono presente nos meios fermentativos, favorecendo a produção destes em concentrações de substrato acima de 180,0 g/L.

9. Os parâmetros fermentativos estudados não foram os adequados para que *Zymomonas mobilis* CCT 4494 fosse submetida a condição de estresse, ocasionando, conseqüentemente, a inativação da atividade da enzima GFOR que é responsável pela síntese de sorbitol.

10. O extrato enzimático bruto proporcionou aumento de 62,0% na produção do biopolímero em relação ao obtido com *Zymomonas mobilis* CCT 4494, durante fermentação em meio contendo sacarose comercial (bloco 1).

11. Os resultados obtidos com o modelo matemático indicaram que os níveis foram bem escolhidos e que, os coeficientes de regressão da equação descreveram acima de 80% do experimento.

12. A aplicação do modelo fatorial proposto por Box e Hunter na produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis*, permitiu fazer a previsão das condições de cultivo.

ANEXO

Tabela 1.A Valores de absorvância de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a 570 nm, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após pré-fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.

Diluição	Peso Celular Seco (PCS) (mg/mL)	ABS (570 nm)
1:5	0,665	0,682
1:7,5	0,443	0,39
1:10	0,333	0,291
1:15	0,266	0,246
1:17	0,222	0,197
1:20	0,19	0,174
1:22	0,166	0,148
1:25	0,148	0,134
1:27	0,133	0,115

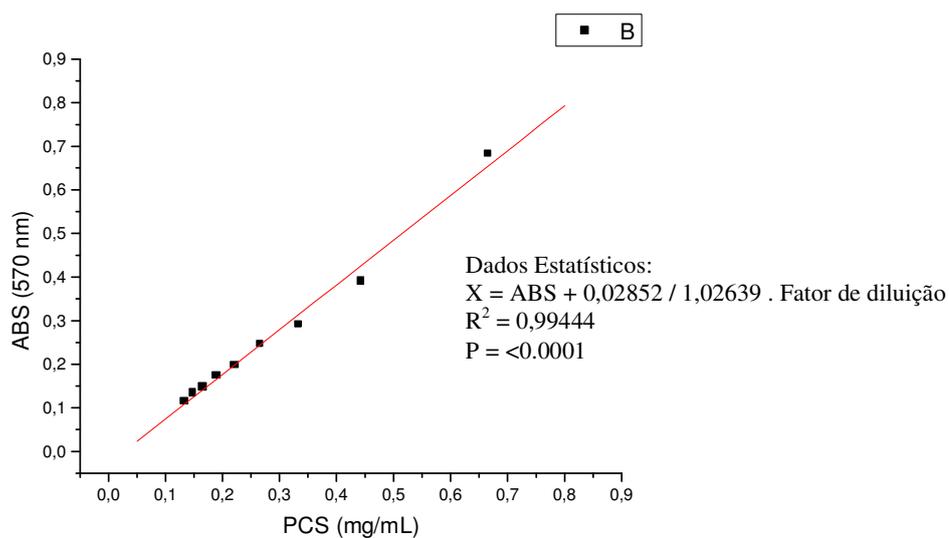


Figura 1.A Curva de calibração da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, utilizando meio sintético acrescido de 20,0 g/L de sacarose inicial após fermentação a 30° e 200 rpm, por 24 horas.

Tabela 1.B Valores de absorvância a 540 nm obtidas de amostras contendo diferentes concentrações de frutose (g/L) para a confecção da curva de calibração pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Concentração de Frutose (mg/mL)	ABS (540 nm)
0,02	0,085
0,04	0,183
0,08	0,468
0,1	0,545
0,12	0,682
0,16	0,917

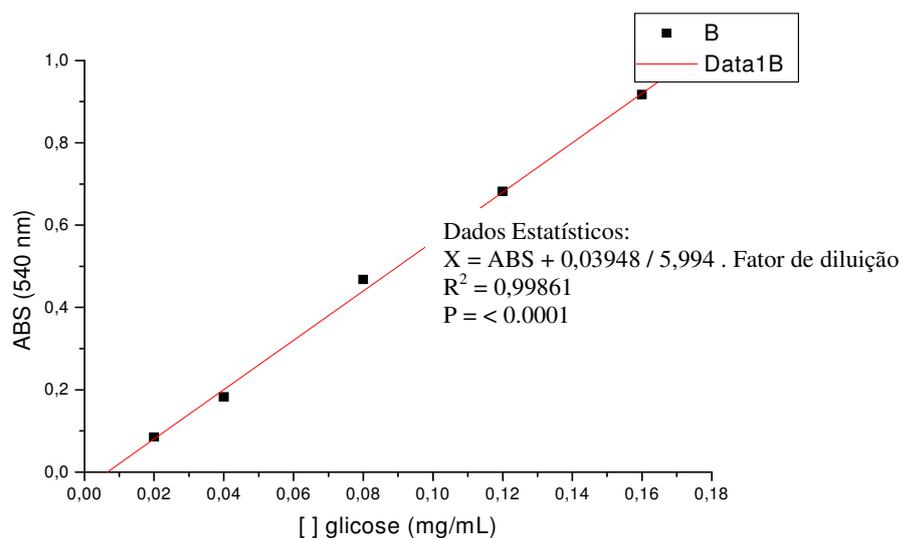


Figura 1.B Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de frutose (g/L) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Tabela 1.C 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 e colaboradores (1956).

Concentração de Glicose (mg/mL)	ABS (490 nm)
0,2	0,132
0,4	0,268
0,6	0,421
0,8	0,570
0,9	0,650
1,0	0,762

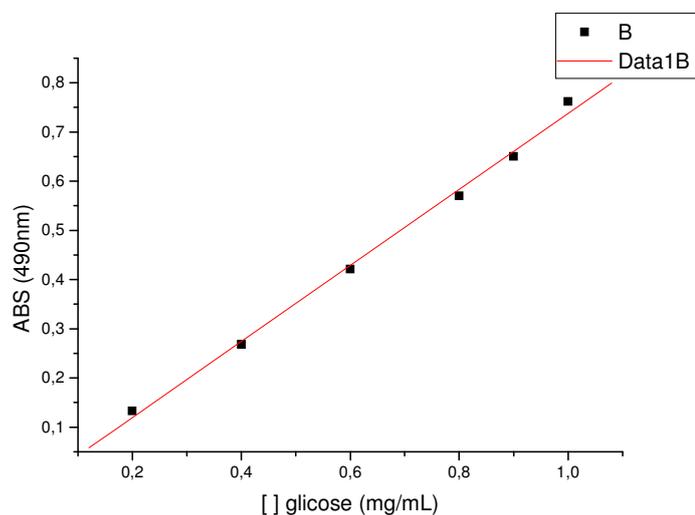


Figura 1.C Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g/L) pelo método Dubois e colaboradores (1956).

Tabela 1.D Valores de absorbância a 500 nm de amostras contendo diferentes concentrações de glicose (umol/mL) para a confecção da curva de calibração pelo método Glicose- Oxidase- Peroxidase.

Concentração de Glicose (umol/mL)	ABS (500nm)
0,000	0,049
0,022	0,108
0,045	0,207
0,068	0,306
0,090	0,410
0,113	0,493
0,135	0,567
0,158	0,719
0,180	0,794
0,203	0,911
0,225	0,987

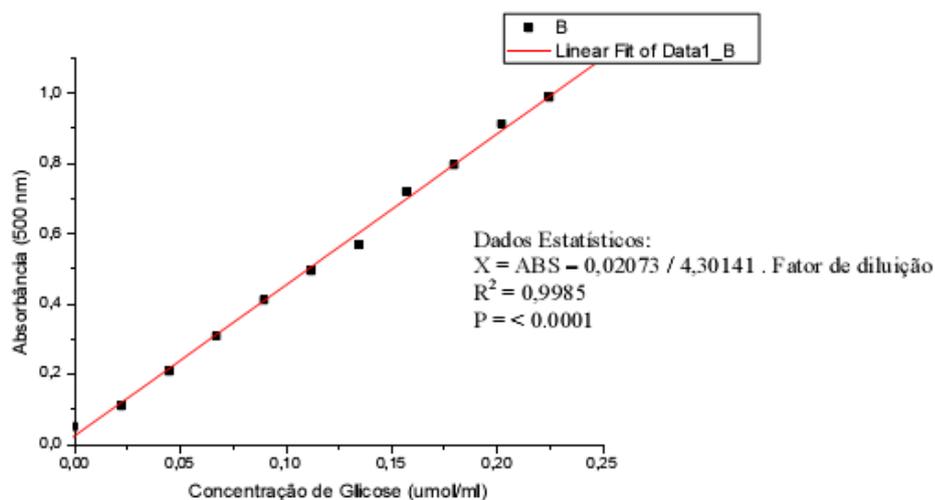


Figura 1.D Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (umol/mL) pelo método Glicose-Oxidase-Peroxidase.

7 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AMIN, G.; KHALAF ALLAH, A.M. By-products formed during direct conversion of sugar beets to ethanol by *Zymomonas mobilis* in conventional submerged and solid-state fermentation. **Biotechnology Letters**, Kew, England ,v.14, p.1187-1192, 1992.
- AMMAR, Y. B.; MATSUBA, T.; ITO, K.; LIZUKA, M; LIMPASENI, T.; PONGSAWASDI, P.; MINAMIURA, N. Characterization of a thermostable levansucrase from *Bacillus* sp. TH4-2 capable of producing high molecular weight levan at high temperature. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 99, p. 111-119, 2002.
- ANANTHALAKSHMY, V. K.; GUNASEKARAN, P. Isolation and characterization of mutants from levan-producing *Zymomonas mobilis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 87, p. 214-217, 1999.
- BARROW, K. D.; COLLINS, J. G.; LEIGH, D. A. A.; ROGERS, P. L.; WARR, R. G. Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 20, p. 22, 1984.
- BEKERS, M.; LINDE, R.; DANILLEVICH, A.; KAMINSKA, E.; UPITE, D.; VIGANTS A.; SCHERBAKA, R. Sugar beet diffusion and syrup as media for ethanol and levan production by *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, Stuttgart, v. 13, p. 107-119, 1999.
- BEKERS, M.; LAUKEVICS, J.; KARSAKECICH, A.; VENTINA, E.; KAMINSKA, UPITE, D.; VINA, I.; LINDE, R.; SCHERBAKA, R. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 979-986, 2001.
- BEKERS, M.; SHVINKA, J.; PANKOVA, L.; LAIVENIEKS, M.; MEZBARDE, I. Simultaneous sucrose bioconversion into ethanol and levan by *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 24, p. 265-274, 1990.

- BEKERS, M.; VIGANTS, A.; LAUKEVICS, J.; TOMA, M.; RAPOPORTS, A.; ZIKMANIS, P.
The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose.
International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 55, p. 147-150, 2000.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C. Influence of aeration and of pentothenate on growth of
Zymomonas mobilis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 89, p. 1195-1200, 1965.
- BELAICH, J. P.; SENEZ, J. C.; MURGIER, M. Microcalcimetric study of glucose permeation in
microbial cells. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 95, p. 1750-1757, 1968.
- BELGHITH, H.; SONG, K.; KIM, C.; RHEE, S. Optimal conditions for levan formation by an
over expressed recombinant levansucrase. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 18, p.
467-472, 1996.
- BERTASSO, M. Produção de sorbitol e ácido do glucônico por células imobilizadas integras de
Zymomonas mobilis ATCC 29191. 1996. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e
Tecnologia de Alimentos)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.
- BOFO, D. C. S. Produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura
contendo sacarose e caracterização do sistema enzimático responsável pela hidrólise de
sacarose e de formação de levana. 2009. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e
Ciências de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade
Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.
- BORREGO, F.; OBON, J. M.; CANOVAS, M.; MANJON, A.; IBORRA, J. L. pH influence on
ethanol production and retained biomass in a passively immobilized *Zymomonas mobilis*
system. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 11, p. 437-442, 1987.
- BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B. Produção de levana por
Zymomonas mobilis em fermentação descontínua alimentada. In: CONGRESSO
BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 22., 2003, Florianópolis-SC. **Anais**. Manaus: Pólo
Editora Ltda, 2003.

- BORSARI, R. R. J. Avaliação das diferentes condições de cultivo para a produção de levana por CP4. 2004. 104 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- BORSARI, R. R. J.; CELLIOGI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciênc. Tecnol. Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 604-609, 2006.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G. Statistics for experimenters. An introduction to design, data analysis and model building. **John Wiley & Sons, Inc.** 653 p. ISBN 0-471-09315-7, 1978.
- CAÇÃO, S. M. B. Fermentação de caldo de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 para produção de etanol e sorbitol. 1999. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.
- CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; MORAIS, J. O. F. D.; SOUZA, M. D. F. V. Q.; MARCAL, M. D. C. R.; LEIX, S.; LOPES, C. E. The levan and ethanol production by *Zymomonas mobilis* strain ZAP in sucrose media. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 32, p. 631, 1989.
- CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E.; LIMA, R. M. O. C.; DEFRANCA, F. P. Antitumor activity of levans produced by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 19, p. 19-21, 1997.
- CÂMARA CASCUDO, L. Da sociologia do açúcar: pesquisa e dedução. Rio de Janeiro: Instituto do Açúcar e do Alcool, 1971.
- CARLOS, T. F. Produção de levana pela bactéria *Zymomonas mobilis* em mosto a base de sacarose. 1991. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Estadual de Pernambuco, Recife, 1991.

- CHA, J.; PARK, N. H.; YANG, S. J.; LEE, T. H. Molecular and enzymatic characterization of a levan frutotransferase from *Mycobacterium* sp AL-210. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 49-61, 2001.
- CHAMBERT R.; TREBONI, G.; DEDONDER, R. Kinetic studies of levansucrase of *Bacillus subtilis*. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v.41, p.285-300, 1974.
- CHUN, U. H.; ROGERS, P. L. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 29, p. 19-24, 1998.
- CONGREGADO, F.; ESTAÑOL, I.; ESPUNY, M. J.; FUSTÉ, M. C.; MANRESA, M. A.; MARQUEZ, A. M.; GUINÉA, J.; SIMON-PUJOL, M. D. Preliminary studies on the production and composition of the extracellular polysaccharide synthesized by *Pseudomonas* sp EPS-5029. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 7, p. 883-888, 1985.
- COPERSUCAR. Fundamentos dos processos de fabricação de açúcar e álcool, **Caderno Copersucar**, Piracicaba, v. 20, 1988.
- COSTA, F.H.N., BUZATO, J.B., CELLIGOI, M.A.P.C., TANO, M.S. Fermentação contínua por *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 em concentrações elevadas de sacarose. **Semina: Ciências Exatas e Naturais**, Londrina, v. 3, p. 201-207, 2001.
- COTÉ, G. L.; AHLGREN, J. A. Metabolism in microorganisms: part I: levan and levansucrase. In: Susuki, N.; Chatterton, N. J. **Science and Technology of Fructans**, Boca Raton: CRS Press, 1993, p. 142-168.
- CRITTENDEN, R. G.; DOELLE, H. W. Identification and characterisation of the extracellular sucrase of *Zymomonas mobilis* UQM 2716 (ATCC 39676). **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 41, p. 302-308, 1994.
- CROMIE, S.; DOELLE, H. W. Relationship between maintenance energy requirements, mineral salts and efficiency of glucose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 2, p. 357-362, 1980.

- DADDS, M. J.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas*: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 79, p. 386-391, 1973.
- DAWES, E.; RIBBONS, D. W.; REES, D. A. Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. **Biochemical Journal**, Cambridge, v. 98, p. 804-812, 1966.
- DEDONDER, R. Levansucrase from *Bacillus subtilis*. **Methods in Enzymology**, Orlando, v. 8, p. 500-505, 1966.
- DIEZ, M. C.; MANCILHA, I. M. Utilização de beterraba açucareira para obtenção de etanol via fermentação por *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces uvarum* IZ 1904. **Arquivos Biologia Tecnologia**, v. 33, p. 915-924, 1990.
- DIEZ, M.C; YOKOYA, F.; CARVALHO, P. R. Produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia Tecnologia**, v. 34, p. 375-380, 1991.
- DOELLE, H.W; GREENFIELD. The productions of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 22, p. 405-410, 1985.
- DOELLE, M.; MILLICHIP, R.; DOELLE, H. W. Production of ethanol from corn using inoculum cascading of *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 15, p. 137-140, 1989.
- DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Science an industrial application. **Critical Reviews in Biotechnology**, London, v. 13, p. 57-98, 1993.
- DUARTE, J. C. Fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis* CP4 ou por *Saccharomyces cerevisiae* nos meios de sacarose e de caldo de cana-de-açúcar com ou sem suplementação lipidica. 1995. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Ohio, v. 28, p. 350-356, 1956.
- ERNANDES, F. M. P. G. Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios de cultura sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar). 2006.

- 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana Bacteriana: Aspectos Tecnológicos, Características e Produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, p. 15-19, 2005.
- ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 31, p. 35-41, 2009.
- ELZINGER, G. S. Influência da concentração de glicose e etanol sobre a atividade de glicose-frutose oxidoreductase em *Zymomonas mobilis* ATCC 29191. 1996. 101 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.
- EUZENAT, O.; GUIBERT, A.; COMBES, D. Production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Bacillus subtilis* C4. **Process Biochemistry**, London, v. 32, p. 237-243, 1997.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, p. 6-10, 1983.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu possível emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v. 21, p. 169-182, 1983.
- FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 31, p. 75-91, 1993.
- FARIA, L. H. G. B. Caracterização taxonômica e produção de polissacarídeos utilizando bactérias isoladas de amostras de solo. 2002. 162 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2002.

- FEIN, J. E.; CHARLEY, R. C.; HOPKINS, K. A.; LAVERS, B.; LAWFORD, H. G. Development of a simple defined medium for continuous ethanol production by *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 5, p. 1-6, 1983.
- FIORAVANTI, C. Os arquitetos da nova cana. Pesquisa FAPESP: São Paulo, p. 29-35, 2000.
- FREITAS, V. A. Produção de sorbitol: análise técnico-econômica dos processos eletroquímico e catalítico: proposta de um projeto básico. 1990. 153 f. Dissertação (Mestrado)-Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.
- GARCIA-CRUZ, C. H. Produção de polissacarídeos bacterianos. 1997. 63 f. Dissertação (Título de Livre Docente)-Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 1997.
- GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C¹⁴, labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. **Journal of Biology Chemistry**, Bethesda, v. 207, p. 689-694, 1954.
- GORP, K. V. Catalytic hydrogenations of fine chemicals: Sorbitol production. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 52, p. 349-361, 1999.
- GUNASEKARAN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. **Journal Bioscience**, India, v. 10, p. 181-186, 1986.
- HAN, Y. W.; CLARKE, M. A. Production and characterization of microbial levan. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 38, p. 393-396, 1990.
- HAN, Y. M.; WATSON, M. A. Production of microbial levan from sucrose, sugarcane juice and beet molasses. **Journal of Industrial Microbiology**, USA, v. 9, p. 257-260, 1992.
- HAULY, M. C. O.; OLIVEIRA, A. R.; OLIVEIRA, A. S. Produção de ácido láctico por *Lactobacillus curvatus* em melaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências agrárias**, Londrina, v. 24, p. 133-142, 2003.

- HEBLING, R. M. U. Efeito de aditivos sobre a fermentação alcoólica por *Zymomonas mobilis*. 1995. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada)-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1995.
- HERMANS, M. Untersuchungen zum einfluß von ethanol auf den stoffwechsel von *Zymomonas mobilis*. Julich: Institut fur Biotechnologie. Forschungszentrum Julich GmbH, p. 1-117, 1992.
- HERNANDEZ, L.; ARRIETA, J.; MENENDEZ, C.; VAZQUEZ, R.; COEGO, A.; SUAREZ, V.; SELMAN, G.; PETIT-GLATRON, M. F.; CHAMBERT, R. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. **Biochemical Journal**, Amsterdam, v. 309, p. 113-118, 1995.
- HETTWER, U.; GROSS, M.; RUDOLPH K. Purification and characterization of an extracellular levansucrase from *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 177, p. 2834-2839, 1995.
- HOPNER, T. C.; DOELLE, H. W. Purification and kinetics characteristics of pyruvate decarboxile and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 17, p. 152-157, 1983.
- HUERTASDIAZ, H.; CACHO, C. L.; BERNARD L. Fermentation of sugarcane juice and blackstrap molasses by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico**, Venezuela, v. 75, p. 43-50, 1991.
- INGRAM, L.O; BUTTKE. Effects of alcohols on microorganismos. **Advance Microbiology and Physiology**, Bethesda, v.25, p.256-300, 1984.
- JEREZ, M. C. D. Estudo comparativo de diferentes métodos e condições de fermentação de melão de cana-de-açúcar por *Zymomonas mobilis*. 1993.108 f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1993.
- JOACHIMSTHAL, E. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 137-142, 1998.

- KANNAN, T. R.; SANGILYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra and extracellular sucrases of *Zymomonas mobilis* on the ethanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 19, p. 661-664, 1997.
- KANNAN, T. R.; MUKUNDAN, G. A.; GUNASEKARAN, P. Fermentation characteristics of levansucrase mutants of *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, p. 265-270, 1993.
- KEITH, J.; WILEY, B.; BALL, D.; ARCIDIACONO, S.; ZORFASS, D.; MAYER, J.; KAPLAN, D. Continuous culture system for production of biopolymer levan using *Erwinia Herbicola*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 38, p. 557-560, 1991.
- KITOKO, P. M.; OLIVEIRA, A. C.; SILVA, M. L. Avaliação microbiológica do caldo de cana comercializado em Vitória, Espírito Santo, Brasil. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 18, p. 73-77, 2004.
- KOJIMA, I.; SAITO, T.; LIZUKA, M.; MINAMIURA, M.; ONO, S. Characterization of levan produced by *Serratia* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, p. 9-12, 1993.
- LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Cellulosic fuel ethanol: alterantive fermentation process designs with wild-type and recombinant *Zymomonas mobilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 106, p. 457-470, 2003.
- LEE, S., WROBLE, M.H., ROSS, J.T. L-asparaginase from *Erwinia carotovora*: an improved recovery and purification process using affinity chromatography. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, USA, v. 22, p. 223-245, 1989.
- LEHNIGER, A.L. *Princípios de Bioquímica*. São Paulo: Edgard Bluncher, 2002.
- LEIBOVICI, J.; BORITA, A.; SANDBANK, U.; WOLMAN, M. Role of macrophages and polymorphs in the levan-induced inhibition of Lewis lung carcinoma in C57BL mice. **British Journal of Cancer**, London, v. 40, p. 597-606, 1979.

- LIEPA, V.; ZAKENFELDS, G.; VOLPE, E.; KORONOVA, Z.; LAPSA, R.; LAIVENIEKS, M.; BEKERIS, M.; POSPISHIL, I. Levan prolongs the life-span of tumor-bearing or irradiates mice, and enhances the antitumor activity of leukocytes. **Proceedings of the Latvian Academy of Sciences**, Baltimore, v. 5, p. 59-64, 1993.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotechnologia: tecnologia das fermentações*. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. v.1.
- LOOS, H., KRÄMER, R., SAHM, H., SPRENGER, G. A., 1994. Sorbitol promotes growth of *Zymomonas mobilis* in environments with high concentrations of sugar: Evidence for a physiological function of glucose-fructose oxidoreductase in osmoprotection. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 7688-7693, 1994.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 2, p. 549-554, 1980.
- LYNESS, E. W.; DOELLE, H. W. Levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 5, p. 345-350, 1983.
- MANRESA, A.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Characterization and production of a new extracellular polymer from *Pseudomonas* sp GPS-910. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 26, p. 347-351, 1987.
- MILLAR, D. G.; GRIFFITHS-SMITH, K.; ALGAR, E.; SCOPES, R. K. Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 601-606, 1982.
- MILLICHIP, R.; DOELLE, H. M. Large-scale production from milo (Sorghum) using *Zymomonas mobilis*. **Process Biochemistry**, London, v. 8, p.141-145, 1989.
- MURO, A. C; RODRIGUEZ, E.; ABATE, C. M.; SIÑERIZ, F. Levan production using mutant strains of *Zymomonas mobilis* in different culture conditions. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 22, p. 1639-1642, 2000.

- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, Washington, v.153, p.375-380, 1944.
- NETO, D. C.; BUZATO, J. B.; CELLOGOI, M. A. C.; OLIVEIRA, M. R. Otimização da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* na fermentação do melão de cana-de-açúcar. **Semina**, Londrina, v. 26, p. 17-22, 2005.
- OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Estudo experimental de produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* em altas concentrações de sacarose. **Semina**, Londrina, v. 25, p. 134-140, 2004.
- OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Journal of Biochemistry and Engineering**, v. 37, p. 177-183, 2007.
- PARK, K. Y.; MORTATTI, M. P. L. SATO, H. H. Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. **Biotechnology Letters**, v. 5, p. 515-518, 1983.
- PARK, S. C.; BARATTI, J. Effects of potassium chloride on ethanol production by an osmotolerant mutant of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 38, p. 542-549, 1993.
- PARKER, C.; PEEKHAUS, N.; ZHANG, X.; CONWAY, T. Kinetics of sugar transport and phosphorylations influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. **Applied Environ. Microbiology**, v. 63, p. 3519-3525, 1997.
- PREZIOSI, L.; MICHEL, G. P. F.; BARATTI, L. Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 153, p. 181-186, 1990.
- REISS, M.; HARTMEIER, W. Levan production with a flocculent strain of *Zymomonas mobilis*. **Food Biotechnology**, Stuttgart, v. 4, p. 69-75, 1990.

- RIOBBONS, D. E. ; DAWES, E. A.; REES, D. A. Levan formation by *Zymomonas mobilis*.
Journal **Biochemical**, v. 82, p. 45, 1962.
- RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D. A. S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a
flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, Kew,
England, v. 8, p. 745-748, 1986.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos:
uma estratégia seqüencial de planejamentos. 1 Ed. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005,
326 p.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas*
mobilis at high sugar concentration. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 1, p. 165-170, 1979.
- ROGERS, P. L.; PHIL, LEE, K. J.; TRIBE, D.E. High productivity ethanol fermentations with
Zymomonas mobilis. **Process Biochemistry**, London, v. 15, p. 7-11, 1980.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. J.; SKOTNICH, M. L.; TRIBE, D. E. Ethanol production by
Zymomonas mobilis. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 23, p. 37-84,
1982.
- ROGERS, P. L.; SKOTNICH, M. L.; LEE, K. J.; LEE, J. H. Recent developments in the
Zymomonas process for ethanol production. **Biotechnology**, VHC, v. 1, p. 273-288, 1984.
- SANGILYANDI, G.; RAJ, K. C.; GUNASEKARAN, P. Elevated temperature and chemical
modification selectively abolishes levan forming activity of levansucrase of *Zymomonas*
mobilis. **Biotechnology Letters**, London, v. 21, p. 179-182, 1999.
- SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. Fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar por
Zymomonas mobilis. **Revista Microbiologia**, v. 17, p. 376-384, 1986.
- SILVA, M. C. P. Influência do pH sobre a produção de levana pela *Zymomonas mobilis* ZAG-12
em meio à base de sacarose. 1996. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-
Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1996.

- SKOTNICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. **Applied Env. Microbiology**, v. 41, p. 889-893, 1981.
- SKOTNICKI, M. L.; WARR, R. G.; GOODMAN, A. E.; LEE, K. J.; ROGERS, P. L. High productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. **Biochemistry Society Symposia**, v. 48, p. 53-86, 1983.
- SOCCOL, C. R.; SCHWAB, A.; KATAOKA, C. E. Avaliação microbiológica do caldo de cana na cidade de Curitiba. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento**, Curitiba, v. 8, p. 116-125, 1990.
- SOLS, A.; GONCEDO, C.; DE LA FUENTE, G. Energy yielding metabolism in yeast. In: Rose, A. H.; HARRISON, J. S. ed. *The Yeast*, Academic Press, Inc., 1971, p. 271-307.
- SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 195, p. 19, 1952.
- SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 145, p. 301-307, 1996
- STRUCH, T.; NEUSS, B.; BRINGER-MEYER, S.; SAHM, H. Osmotic adjustment of *Zymomonas mobilis* to concentrated glucose solutions. **Applied Microbiology Biotechnonology**, Berlin, v. 34, p. 518-523, 1991.
- SUTHERLAND, I. W. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 38, p. 319-328, 1999.
- SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological Reviews**, Baltimore, v. 41, p. 1-46, 1977.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 242-244, 2003.

- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. CELLIGOI, M. A. P. C. Sugar cane juice fermentation by *Zymomonas mobilis* CP4 subjected to inhibition by ethanol and high initial concentration of substrate. **Brazilian Archives Biology Technology**, v. 43, p. 425-430, 2000.
- TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Influência do pH inicial do caldo de cana-de-açúcar na produção de levana por *Zymomonas mobilis* ATCC 31821. **Semina**, v. 23, p. 93-98, 2002.
- THACHENKO, A. A.; SEVRYUGINA, T. V. Biosynthesis of levan by *Bacillus polymyxa*. **Translated from Microbiology**, Leningrad, v. 58, p. 457-461, 1989.
- TOMA, M.M., KALNENIEKS, U., BERZINS, A., VIGANTS, A., RIKMANIS, M., VIESTURS, U. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1347-1350, 2003.
- TORRES, E. F.; BARATTI, J. The effect of pH, temperature and sucrose concentration on high productivity continuous ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, Berlin, v. 27, p. 27-121, 1987.
- VAN VUUREN, M. J. J.; MEYER, L. Production of ethanol from sugar cane molasses. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 4, p. 253-256, 1982.
- VIGANTS, A.; ZIKMANIS, P.; BEKERS, M. Sucrose medium osmolality as a regulator of anabolic and catabolic parameters in *Zymomonas* culture. **Acta Biotechnology**, Berlin, v. 16, p. 321-327, 1996.
- VIGANTS, A.; KRUCHE, R.; BEKERS, M.; ZIKMANIS, P. Response of *Zymomonas mobilis* levansucrase activity to sodium chloride addition. **Biotechnology Letters**, Kew, England, v. 20, p. 1017-1019, 1998.
- VIGANTS, A.; HICKE, H. G.; MARX, S. P. A simple and efficient method for the purification of membrane-bound levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Current Microbiology**, New York, v. 42, n. 6, p. 415-418, 2001.

- VIGNOLI, J. A. Efeito da osmolalidade do meio, permeabilização e imobilização de *Zymomonas mobilis* na produção de sorbitol. 2003. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2003.
- VIIKARI, L. Formation of levan and sorbitol from sucrose by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 19, p. 252-255, 1984.
- VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 23, p. 240-244, 1986.
- VINHAS, G. M. Estudo da produção e do fracionamento de levanas produzidas por *Zymomonas mobilis*. 1999. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de produtos bioativos)-Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1999.
- WENDT, R. Estudos da produção de levana através de *Zymomonas mobilis*. 2001. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.
- WISBECK, E.; SILVEIRA, M. M.; NINOW, J.; JONAS, R. Evaluation of the flocculent strain *Zymomonas mobilis* Z1-81 for the production of sorbitol and gluconic acid. **Journal Basic of Microbiology**, v.6, p. 445-449, 1997.
- YANASE, H.; IWATA, M.; NAKAHIGASHI, R.; KITA, K.; KATO, N.; TONOMURA, K. Purification, crystallization and properties of extracellular levansucrase from *Zymomonas mobilis*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 56, n. 8, p. 1335-1337, 1992.
- YOSHIDA, Y.; SUZUKI, R.; YAGI, Y. Production of levan by *Zymomonas mobilis* sp. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 70, p. 269-271, 1990.
- ZACHARIOU, M; SCOPES, P.K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzymes isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.167, p.863-869, 1986.