



Marina Rodrigues Moro

Produção de etanol e levana por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato

São José do Rio Preto – SP
2012

Marina Rodrigues Moro

Produção de etanol e levana por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos: Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências 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 García-Cruz

São José do Rio Preto - SP
2012

Marina Rodrigues Moro

Produção de etanol e levana por células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos: Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências 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 García-Cruz
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof.^a Dr.^a Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto
UNESP – Assis

São José do Rio Preto – SP
01/Março/2012

Dedico este trabalho à “vovó Cidinha”,
com carinho e muitas saudades.

Marina Rodrigues Moro

Agradecimentos

A Deus, inteligência suprema e causa primária de todas as coisas;

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin Humberto García Cruz, pela oportunidade, pela paciência, pela palavra amiga e pelos ensinamentos valiosos;

Aos meus pais Estelita e Geraldo, e à minha querida irmã Fernanda, pela educação, pelo apoio e amor incondicional, e por acreditarem nos meus sonhos, no meu potencial; e ao meu filhote Flock, pela “cãopanhia”;

Ao meu namorado Thiago de Barros Ferrari, pelo amor e pela torcida;

Ao meu tio André, pela parceria e pelos momentos de descontração;

À Marina de Farias Silva Lorenzetti, pela dedicação à parte experimental;

Às minhas amigas Fernanda, Débora e Patrícia, pelas risadas e pelo apoio;

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo pelo auxílio nas análises de etanol;

À Juliana Ferreira e Ana Karla, pelas novas contribuições e pelo auxílio com a análise estatística;

A CAPES pela concessão da bolsa durante a realização deste trabalho;

À Prof.^a Dr.^a Fernanda M. P. G. Ernandes e ao Prof. Dr. Pedro de Oliva Neto, membros da banca examinadora pelas sugestões e correções que contribuíram para a finalização do trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, de perto ou de longe, estiveram envolvidos neste trabalho.

*“Dê valor ao seu trabalho,
fazendo com todo amor e carinho,
e estará desta maneira dando valor a si mesmo.”*

Carlos Torres Pastorino

RESUMO

O uso do etanol como um combustível tem estimulado a pesquisa sobre vários aspectos do processo de fermentação. A bactéria *Zymomonas mobilis* possui habilidades de transformar açúcares em etanol e gás carbônico. Além disso, produz levana, polissacarídeo cuja hidrólise resulta em frutose que tem poder adoçante superior à sacarose, e pode ser utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica. A imobilização celular tem sido cada vez mais empregada em processos fermentativos para aumentar a eficiência da fermentação e reduzir os custos associados com as trocas constantes de inóculo. O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas por ser de fácil utilização e apresentar uma metodologia simples e barata. O objetivo deste trabalho foi produzir etanol e levana por meio da imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em alginato, utilizando as concentrações de 5% a 30% de sacarose, pH iniciais 4,0, 5,7 e 7,0 a 30 °C e 40 °C, sem agitação. Para isto, células de *Zymomonas mobilis* em concentração pré-estabelecida foram adicionadas em solução de alginato de sódio 2%, e esta mistura foi gotejada em solução de cloreto de cálcio 3%, obtendo-se esferas de alginato de cálcio com 3,0 mm de diâmetro, mantidas por 30 minutos sob agitação e, adicionadas ao meio sintético de fermentação contendo as concentrações de sacarose a serem testadas e com pH inicial ajustado para cada experimento. Foram retiradas amostras a cada 24 horas durante o processo fermentativo para a determinação de crescimento celular no suporte; biomassa desprendida para o meio de fermentação; melhor tempo de incubação para a produção de etanol e levana, e pH final. As condições para produção de etanol e levana foram diferentes. A maior síntese de etanol (130,1 g/L), ocorreu na temperatura de 30 °C, pH inicial 5,7, na concentração de 30% de sacarose e 72 horas de fermentação. A maior produção de levana (74,2 g/L), ocorreu na temperatura de 40 °C, pH inicial 7,0, em 24 horas, na concentração de 30% de sacarose. As concentrações de sacarose acima de 15% favoreceram em geral a produção de etanol, de levana e o crescimento celular no suporte.

Ethanol and levan production by Zymomonas mobilis cells immobilized in alginate.

ABSTRACT

The using of ethanol as a fuel has stimulated research on various aspects of the fermentation process. Bacteria of the species Zymomonas mobilis are capable of turning sugars into ethanol and carbon dioxide. It also produces levan polysaccharide which hydrolysis results in fructose, having sweetness higher than sucrose, and can be used in food and pharmaceutical industries. The cell immobilization has been increasingly used in fermentation processes to improve the fermentation efficiency and reduce costs associated with the constant changes in inoculums size. The alginate is one of the most used supports for immobilization of microbial cells to be easy to use and present a methodology to use simple and inexpensive. The aim of this study was to produce ethanol and levan by immobilizing cells of Zymomonas mobilis CCT 4494 in alginate, using 5% to 30% sucrose concentrations, initial pH 4.0, 5.7, and 7.0, at 30°C and 40°C, without agitation. For this, Zymomonas mobilis cells in pre-established concentration were added to a solution of sodium alginate 2%, then this mixture was dripped into a solution of calcium chloride 3%, achieving levels of pellets of calcium alginate with 3.0 mm in diameter, kept under stirring for 30 minutes and it was added to the synthetic medium fermentation of sucrose concentrations to be tested with a initial pH value adjusted for each experiment. Samples were taken every 24 hours during the fermentation process to determine the following parameters: the cell growth on the pellets; released biomass for the fermentation medium; best incubation time for the production of ethanol and levan and final pH. The conditions for levan and ethanol production were different. The highest ethanol production (130.1 g/L), occurred at 30°C, initial pH 5.7 at a 30% sucrose concentration and 72 hours of fermentation. The highest levan production (74.2 g/L) occurred at 40 °C, initial pH 7.0, 24 hours, at a 30% sucrose concentration. Sucrose concentrations above 15% in general are better to ethanol, levan and cell growth production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura química da goma levana com unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 6) e ramificações β (2 $\rightarrow$ 1)	22
Figura 2	Metabolismo de carboidratos pela <i>Zymomonas mobilis</i> e a via Entner-Doudoroff	23
Figura 3	Classificação dos suportes para imobilização de enzimas e células	26
Figura 4	Estrutura da molécula de alginato de sódio	28
Figura 5	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C	36
Figura 6	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C	37
Figura 7	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C	38
Figura 8	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C	40
Figura 9	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C	41
Figura 10	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C	42
Figura 11	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C	44
Figura 12	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C	45
Figura 13	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C	46
Figura 14	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C	50
Figura 15	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C	51
Figura 16	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C	52
Figura 17	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C	54
Figura 18	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C	55

Figura 19	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C	55
Figura 20	Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C	57
Figura 21	Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C	58
Figura 22	Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C	58
Figura 23	Principais efeitos na produção de etanol	61
Figura 24	Principais efeitos na produção de levana	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C	35
Tabela 2	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C	39
Tabela 3	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C	43
Tabela 4	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7 e na temperatura de incubação de 30 °C	47
Tabela 5	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0 e na temperatura de incubação de 30 °C	47
Tabela 6	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0 e na temperatura de incubação de 30 °C	48
Tabela 7	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C	49
Tabela 8	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C	53
Tabela 9	Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C	56
Tabela 10	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7 e na temperatura de incubação de 40 °C	59
Tabela 11	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0 e na temperatura de incubação de 40 °C	59
Tabela 12	Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0 e na temperatura de incubação de 40 °C	60
Tabela 13	Análise de variância do efeito do pH, da temperatura, da concentração de sacarose e do tempo, na produção de etanol por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	62
Tabela 14	Análise de variância do efeito do pH, da temperatura, da concentração de sacarose e do tempo, na produção de levana por células imobilizadas de <i>Zymomonas mobilis</i>	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 BACTÉRIA ZYMOMONAS MOBILIS	17
3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL	18
3.3 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS	19
3.4 BIOPOLÍMERO LEVANA	21
3.5 IMOBILIZAÇÃO CELULAR	24
3.6 TÉCNICAS E SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR	25
3.6.1 Aprisionamento dentro de uma matriz porosa	26
3.6.2 Adsorção a uma superfície	27
3.6.3 Auto-agregação ou floculação	27
3.6.4 Contenção em barreiras	27
3.7 ALGINATO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 MICRO-ORGANISMO	30
4.2 MEIOS DE CULTURA	30
4.2.1 Meio de Manutenção da Cultura	30
4.2.2 Meio de Pré-Fermentação	30
4.2.3 Meio de Fermentação	30
4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	30
4.3.1 Preparo do pré - inóculo	30
4.3.2 Pré - fermentação	30
4.4 FERMENTAÇÃO	31
4.4.1 Padronização do inóculo	31
4.5 IMOBILIZAÇÃO CELULAR	31
4.5.1 Aprisionamento das células em gel de alginato	31
4.6 PARÂMETROS FERMENTATIVOS ANALISADOS	31
4.6.1 Concentração de sacarose	31
4.6.2 Temperatura de incubação	32
4.6.3 Período de fermentação	32
4.6.4 pH inicial e pH final	32
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	32
4.7.1 Determinação da concentração de células aderidas ao suporte e da biomassa desprendida para o meio de fermentação	32
4.7.2 Produção de etanol pelo sistema imobilizado	33
4.7.3 Produção de levana pelo sistema imobilizado	33
4.7.4 Produtividade de etanol	34
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 EXPERIMENTO I: TEMPERATURA DE 30 °C E PH INICIAL 5,7	35
5.1.1 Variação do pH final a 30 °C, com pH inicial 5,7	35
5.1.2 Crescimento celular dentro das esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 5,7	35

5.1.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 5,7	36
5.1.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 5,7	37
5.2 EXPERIMENTO II: TEMPERATURA DE 30 °C, E PH INICIAL 4,0	39
5.2.1 Variação do pH a 30 °C, com pH inicial 4,0	39
5.2.2 Crescimento celular dentro das esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 4,0	39
5.2.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 4,0	40
5.2.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 4,0	41
5.3 EXPERIMENTO III: TEMPERATURA DE 30°C, E PH INICIAL 7,0	43
5.3.1 Variação do pH a 30 °C, com pH inicial 7,0	43
5.3.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 7,0	43
5.3.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 7,0	44
5.3.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 7,0	45
5.4 ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE DE ETANOL A 30 °C	46
5.5 EXPERIMENTO IV: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 5,7.	49
5.5.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 5,7.	49
5.5.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 5,7.	49
5.5.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 5,7.	50
5.5.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 5,7.	51
5.6 EXPERIMENTO V: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 4,0.	53
5.6.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 4,0.	53
5.6.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 4,0.	53
5.6.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 4,0.	54
5.6.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 4,0.	55
5.7 EXPERIMENTO VI: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 7,0	56
5.7.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 7,0	56
5.7.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 7,0	56
5.7.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 7,0	57
5.7.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 7,0	58
5.8 ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE DE ETANOL A 40 °C	58
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES	73

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os exopolissacarídeos, chamados de biopolímeros ou gomas hidrossolúveis são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos e possuem algumas vantagens em relação às gomas sintéticas ou aquelas produzidas por vegetais que os tornam interessantes para os mais variados tipos de indústrias.

Na indústria alimentícia podem ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes. Dos polissacarídeos de origem microbiana, a goma xantana produzida pela linhagem de *Xanthomonas campestris* e a goma gelana produzida pela bactéria *Pseudomonas elodea* são os mais utilizados. Entretanto, outros biopolímeros são de interesse e estão sendo estudados devido as suas propriedades características, destes destacam-se o alginato produzido por *Azotobacter vinelandii* e a levana produzida pela bactéria *Zymomonas mobilis*.

A levana é um exopolissacarídeo formado por monômeros de frutose e sintetizado por alguns micro-organismos por meio da reação de transfrutossilacção durante a fermentação de culturas crescidas em meios ricos em sacarose. Esta molécula é empregada na indústria de alimentos como fixador de sabores e cores, como espessante e estabilizante de vários alimentos. Em medicina também é proposto o uso de levana como “soro sintético” ou substituto de plasma sanguíneo, agente prolongador da ação de fármacos, preparação de frutose altamente purificada e, ainda agente hipocolesterolêmico.

Além da goma levana, a bactéria *Zymomonas mobilis* pode produzir também etanol, sorbitol e outros subprodutos em menores ou maiores quantidades, dependendo das condições de fermentação, principalmente temperatura e pH, se destacando na fermentação alcoólica.

A indústria sucro-alcooleira no Brasil é de grande importância para a economia. O etanol é utilizado como combustível alternativo para automóveis, sendo menos poluente que a gasolina e derivado de uma fonte de energia renovável. A produção comercial de álcool no Brasil é feita mediante processo de batelada alimentada ou fermentação contínua. O etanol é produzido após a fermentação do açúcar de cana por *Saccharomyces cerevisiae*.

A técnica de imobilização celular oferece certas vantagens sobre a utilização de células livres durante a fermentação, protege células e enzimas das tensões ambientais como temperatura, sais, pH e solventes sendo também muito vantajosa, pois promove o aumento da produtividade durante a fermentação, aumenta a estabilidade celular, reduz o custo do processo e possibilita a reutilização das células por vários ciclos de fermentação.

As principais técnicas empregadas são: aprisionamento dentro de uma matriz porosa, adsorção a uma superfície, auto-agregação ou floculação e a contenção em barreiras. Portanto, a escolha de uma matriz adequada para a imobilização de células é de grande importância para a obtenção do produto desejado.

O alginato destaca-se como um dos suportes mais utilizados por ser barato e de manuseio simples e sua gelificação ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio sem alterações drásticas na temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos micro-organismos imobilizados.

Pelo acima exposto, a produção de etanol e levana utilizando células livres apresentam limitações que resultam em baixo rendimento de produção. Por outro lado a imobilização celular em materiais poliméricos é uma alternativa que pode solucionar ou minimizar este problema oferecendo vantagens em relação à utilização de células livres. Diante disso, este estudo teve como objetivo produzir etanol e levana por meio da imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em alginato, para isto foi determinado o efeito de diferentes concentrações de sacarose, pH inicial, tempo de fermentação e temperatura na produção destas importantes biomoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

*Produzir etanol e levana por meio da imobilização de células de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em alginato.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

*Estudar o desempenho do alginato como suporte de imobilização de *Zymomonas mobilis* na produção de etanol e levana.

*Avaliar a influência de diferentes variáveis na fermentação utilizando células de *Zymomonas mobilis* imobilizadas para produção de etanol e levana:

- Diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25 e 30%).
- Diferentes valores de pH inicial (4,0; 5,7 e 7,0).
- Diferentes temperaturas de incubação (30 e 40 °C).
- Diferentes tempos de fermentação (24, 48, 72 e 96 horas).

*Selecionar as melhores condições de fermentação para a produção de etanol e levana a partir de células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* CCT 4494.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BACTÉRIA *ZYMOMONAS MOBILIS*

Em 1911, Barker e Hillier foram os primeiros a estudar a bactéria que era responsável pela deterioração do sabor e do flavour de bebidas fermentadas. Por não terem atribuído a esta bactéria um binômio latino, a descrição destes autores não foi reconhecida, tendo sido mais tarde, em 1924, creditada a Lindner a descoberta dessa bactéria, por ocasião do seu isolamento no México, a partir da seiva fermentada de *Agave atrovirens* que constitui uma bebida regional muito popular chamada “pulque” (ERNANDES, 2006).

É uma bactéria Gram-negativa, pertence à classe *Proteobacteria* e é um membro da família *Sphingomonadaceae*, mesofílica, não esporulante e móvel (com um a quatro flagelos), anaeróbia facultativa e algumas linhagens são obrigatoriamente anaeróbias. É um bastonete de 2,0 a 6,0 µm de comprimento e 1,0 a 4,0 µm de largura (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009 b).

As condições ideais para seu crescimento são temperaturas de 30 a 36 °C e intervalos de pH entre 5,0 e 7,0, além de catabolizar D-glicose, D-frutose e sacarose como únicas fontes de carbono e energia, resultando em baixos rendimentos de biomassa, uma vez que, a maior parte deste substrato é incorporada no catabolismo do produto final (SPRENGER, 1996; TOMA et al., 2003).

Características essenciais do envelope da célula devem ser consideradas incluindo características físico-químicas, bem como uma composição molecular exata. A hidrofobicidade da superfície da célula de bactérias tem sido reconhecida como uma característica física macroscópica mensurável que responde a uma gama de fatores ambientais e, por sua vez, parece ser envolvidos na interação célula a célula, na adesão de bactérias a superfícies sólidas, a resistência das células a tratamentos por solventes orgânicos ou antibióticos, que são essenciais em uma grande variedade de tecnologias (ZIKMANIS et al., 2007).

No caso da *Z. mobilis*, a hidrofobicidade pode estar relacionada com o possível aumento de células em resposta a concentração elevada de glicose no meio de cultivo (ZIKMANIS et al., 2007).

Além disso, a capacidade de fermentação natural de *Z. mobilis* pode ser melhorado por várias abordagens fisiológicas, genéticas e de engenharia, com

especial referência para a ampliação do substrato e produto por uma introdução e expressão de genes apropriados (ZIKMANIS et al., 2007).

As bactérias alcoólicas da espécie *Z. mobilis* possuem habilidades de transformar açúcares em etanol e gás carbônico, em condições comparáveis àquelas exigidas pelas leveduras podendo produzir 1,9 mol de etanol por mol de glicose fermentada (ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2010). Além disso, produz levana, polissacarídeo cuja hidrólise resulta em frutose que tem poder adoçante superior à sacarose (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

Cepas de *Zymomonas* geneticamente modificadas que fermentam pentoses, além de hexoses, são estudadas para uso em degradações de biomassa lignocelulósica. *Z. mobilis* é considerado como um micro-organismo seguro, o que facilita ainda mais seu emprego em larga escala de empreendimentos biotecnológicos (KOUVELIS et al., 2009).

3.2 PRODUÇÃO DE ETANOL

O álcool é um biocombustível que contribui para a redução do efeito estufa, que ganhou destaque na economia brasileira e apresenta posição estratégica no mercado mundial (SANTANA et al., 2009).

De acordo com as projeções do agronegócio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2011), a produção de cana de açúcar destinada à produção de açúcar, álcool, e outros fins como forrageiras e cachaças chegou a 750,11 milhões de toneladas no período 2010/2011, e pode chegar a 934,59 milhões de toneladas em 2020/2021.

O etanol, produzido no Brasil, a partir da cana-de-açúcar, também conta com projeções positivas para os próximos anos, devidas principalmente, ao crescimento do consumo interno. A produção projetada para 2019 é de 58,8 bilhões de litros, mais que o dobro da registrada em 2008 (BRASIL, 2011).

O interesse em etanol como um combustível em potencial estimula a pesquisa sobre vários aspectos do processo de fermentação. Diferentes técnicas para aumentar a produtividade tais como a cultura de células contínua, reciclagem celular, e destilação a vácuo já foram estudadas, mas uma importante consideração é a melhoria do micro-organismo fermentador para alcançar o máximo de produtividade (SKOTNICKI et al., 1981).

A origem da palavra fermentação vem da palavra latina "fervere", que significa ferver. Foi usado por Pasteur para citar ações microbiológicas em substratos de açúcar liberando grande quantidade de gás, dando a impressão de ebulição. Os agentes responsáveis por essa transformação foram chamados de "fermentos". A fermentação alcoólica consiste na transformação dos hidratos de carbono em etanol e gás carbônico através do metabolismo anaeróbio, no entanto, outras substâncias como o glicerol e ácido acético são produzidas em quantidades menores (ALENCAR et al., 2009).

Enquanto países como os Estados Unidos da América usam milho para a produção de álcool, a produção industrial de álcool no Brasil é realizada utilizando leveduras para fermentação da sacarose da cana-de-açúcar. Em virtude da situação de destaque em que se encontra o Brasil, em nível mundial no setor energético, algumas instituições vêm selecionando micro-organismos mais eficientes no processo de produção de álcool (ERNANDES, 2009; SANTANA et al., 2009).

O micro-organismo para ser usado em processo de fermentação de etanol deve ter características específicas bem definidas, como a habilidade para fermentar carboidratos, alta velocidade de fermentação, osmotolerância, tolerância ao etanol, tolerância ao meio ácido, alta viabilidade celular para reciclagens repetidas, resistência a altas temperaturas e estabilidade genética (ALENCAR et al., 2009).

Vários autores consideram a bactéria *Z. mobilis* um excelente produtor de etanol, uma vez que apresenta ciclo de fermentação rápida e com elevada eficiência; tolerância a elevadas concentrações de glicose, sacarose e etanol. Esta produção de etanol é favorecida numa faixa de pH entre 4,5 e 7,0, e o pH ideal para o crescimento da bactéria varia de acordo com a cepa utilizada (ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2010).

3.3 PRODUÇÃO DE BIOPOLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores (os monômeros). Materiais poliméricos apresentam usualmente baixa densidade, baixa condutividade elétrica e térmica. Podem ser naturais (celulose) ou artificiais (polietileno). Aqueles produzidos por micro-organismos são chamados biopolímeros, e a biossíntese e o acúmulo de polissacarídeos

geralmente ocorrem após a fase de crescimento do micro-organismo (DONOT et al., 2011).

Os polissacarídeos microbianos podem apresentar-se como constituintes da parede celular (lipopolissacarídeos ou LPS), associados covalentemente à superfície celular (polissacarídeos capsulares ou CPS), ou secretados para o meio extracelular (exopolissacarídeos ou EPS). Muitos EPS têm amplo espectro de aplicações na indústria alimentícia, podendo ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes, além de apresentar vantagens se comparados aos obtidos de algas (SOUZA; GARCIA-CRUZ, 2004; CANILHA et al., 2006).

Os EPS são divididos em dois grupos: homopolissacarídeos e heteropolissacarídeos. Homopolissacarídeos são feitos de um único tipo de monossacarídeo, como dextrana (glicose) ou levana (frutose). Heteropolissacarídeos são compostos de vários tipos de monossacarídeos como xantana ou gelana e têm estruturas complexas (DONOT et al., 2011).

A biossíntese de EPS pode ser dividida em três etapas principais: (i) assimilação de um substrato de carbono; (ii) síntese intracelular dos polissacarídeos; e (iii) exsudação do EPS para fora da célula. Os EPS ainda protegem a célula contra o estresse biótico, como a concorrência, e estresses abióticos que podem incluir a intensidade de temperatura, luz ou pH (DONOT et al., 2011).

Estas moléculas de origem microbiana apresentam algumas vantagens para sua obtenção em relação às gomas obtidas de fontes convencionais como: independente das condições climáticas, maior rapidez na obtenção do produto acabado, excelente solubilidade e estabilidade em meio ácido, estabilizadores de emulsões e necessidade de menor espaço físico das instalações fabris o que aumenta sua aplicação em produtos alimentícios (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

Alguns micro-organismos são identificados como ótimos produtores de biopolímeros: *Agrobacterium sp.*, produzindo 76 g.L⁻¹; *Alcaligenes faecalis*, produção de 72 g.L⁻¹; *Xanthomonas campestris*, produzindo 53 g.L⁻¹; *Bacillus sp.*, produzindo 86,3 g.L⁻¹; *Z. mobilis*, produzindo 50 g.L⁻¹ e *Aureobasidium pullulans*, produzindo 52,5 g.L⁻¹. Esses seis micro-organismos produzem

quatro EPS diferentes: Levana, produzida por *Z. mobilis* e *Bacillus* sp.; pululana, produzida por *A. pullulans*; curdulana, produzida por *Agrobacterium* sp. e *A. faecalis*, e xantana, produzida por *X. campestris*. As vias biossintéticas dos quatro EPS, e os fatores que influenciam esses caminhos, são representativas dos mecanismos de produção de EPS microbianos (DONOT et al., 2011).

Entre os biopolímeros, a goma xantana produzida pela linhagem de *Xanthomonas campestris* e a goma gelana produzida pela bactéria *Pseudomonas elodea*, são os mais utilizados em diferentes tipos de indústrias. Estas gomas foram liberadas pela “Food and Drug Administration” (FDA) desde 1969 e 1982, respectivamente, para serem utilizadas em alimentos (GARCIA-CRUZ, 2001).

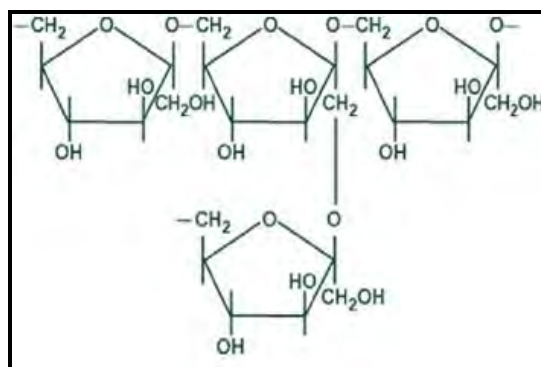
Em geral, esses compostos podem ser utilizados como fármacos, corantes, polissacarídeos e ácidos orgânicos, e são produzidos sob um rígido controle dos parâmetros de fermentação como temperatura, pH, velocidade de agitação, tempo de fermentação e composição do meio de cultura (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

A utilização de substratos de baixo custo tem sido investigada em pesquisas sobre produção de metabólitos microbianos. Melaço e xarope de cana de açúcar, suco de beterraba, extratos de trigo e da fermentação do soro de leite para a produção de exopolissacarídeo incluindo levana foram descritos (BORSARI et al., 2006).

3.4 BIOPOLÍMERO LEVANA

O termo “levana” refere-se a um exopolissacarídeo obtido pela reação de transfrutoseilação durante a fermentação de culturas crescidas em meios ricos em sacarose e é constituído basicamente de 60.000 unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 6) e ramificações β (2 $\rightarrow$ 1), com massa molecular de aproximadamente 10^7 Daltons, e sua estrutura química pode ser observada na figura 1 (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009a).

Figura 1 – Estrutura química da goma levana com unidades de frutose ligadas em β (2 $\rightarrow$ 6) e ramificações β (2 $\rightarrow$ 1).



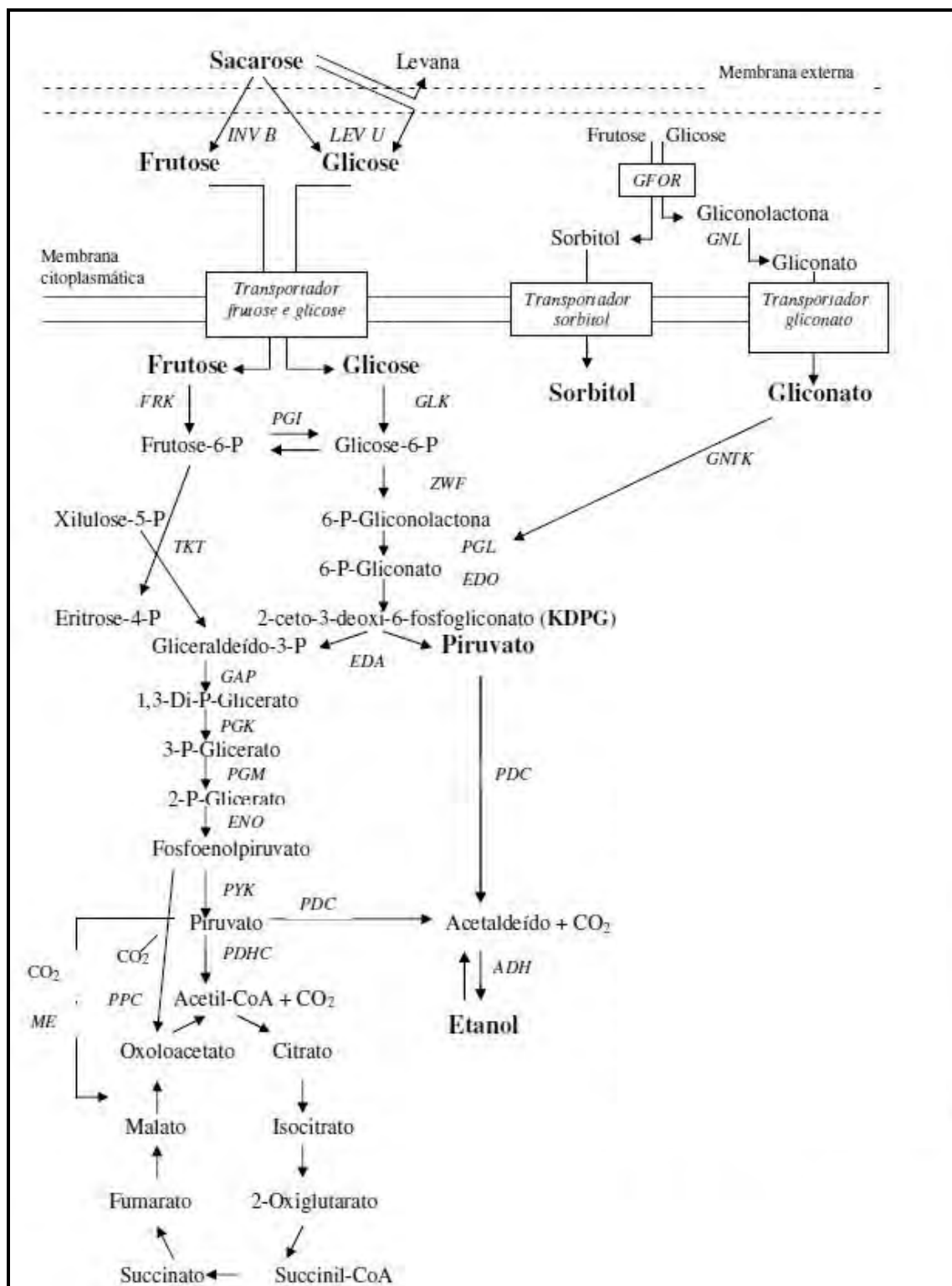
Durante a produção de levana por *Z. mobilis* existem três enzimas distintas que estão envolvidas na hidrólise da sacarose: a sacarase intracelular (SacA), a sacarase extracelular (SacC ou InvB), chamadas invertases, e a levanasacarase extracelular (SacB ou LevU). A levanasacarase é a enzima que converte a sacarose em frutanas, e o pH ótimo para sua atividade é de 6,5 e a temperatura ótima está na faixa de 25 a 30 °C, porém, em culturas contendo sacarose pode-se utilizar pH com valores menores para a produção adequada de levana pela mesma enzima (ERNANDES, 2006; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009a; BOFO, 2009).

Esta bactéria usa de forma eficiente a via Entner-Doudoroff (2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate, KDPG) para degradação das hexoses, seguido pela descarboxilação do piruvato, obtidos como produtos finais etanol e CO₂ (BEKERS et al., 2000).

O metabolismo do açúcar de *Z. mobilis* aparece como uma via ramificando rotas metabólicas colaterais, com as diferentes etapas fora da célula (clivagem da sacarose), sistemas de captação de carboidratos e fluxo de carbono em etanol, dióxido de carbono e aos subprodutos (SPRENGER, 1996).

Outras bactérias que podem expressar levanasacarase são *Pseudomonas* ssp., *Acetobacter aceti*, *Aerobacter levanicum*, *Bacillus natto*`, *Bacillus polymyxa* e *Bacillus subtilis* (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009 a).

Figura 2 – Metabolismo de carboidratos pela *Zymomonas mobilis* e a via Entner-Doudoroff. Adaptado de: Ernandes (2009), Fonte: Sprenger (1996).



LEGENDA: INV B: invertase - LEV U: levansacarase - GFOR: glicose-frutose oxidorreductase - GNL: gliconolactonase - FRK: frutoquinase - GLK: glicoquinase - PGI: fosfoglicose isomerase - ZWF: glicose-6-fosfato desidrogenase - GNTK: gliconatoquinase - TKT: *transketolase* - PGL: 6-fosfogliconolactonase - EDO: 6-fosfogliconato desidrogenase - GAP: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - EDA: 2-ceto 3-dioxi 6-fosfogliconato aldolase - PGK: fosfoglicerato quinase - PGM: fosfoglicerato mutase - ENO: enolase - PYK: piruvato quinase - PDHC: *piruvato desidrogenase* - ADH: piruvato descarboxilase álcool deidrogenase - PDC: fosfatase.

Na indústria de alimentos, devido as suas propriedades reológicas, viscosidade, solubilidade em água e óleo e formação de filmes, entre outras, a levana pode ser empregada como fixador de sabores e cores, como espessante e estabilizante de vários alimentos e ainda como invólucro de embutidos. Nos alimentos probióticos, representa um aditivo que influencia de modo benéfico o funcionamento do trato intestinal (ASSIS et al., 2008; ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005). É possível o uso de levana em medicina como um componente funcional dotado de atividade biológica para o funcionamento adequado do organismo humano (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2005).

O alto custo de produção de polissacarídeos como a xantana e dextrana incita novas pesquisas para estudar outros polissacarídeos microbianos, como a levana; além de suas aplicações em diversas áreas, como saúde e alimentação humana, é de interesse econômico fundamental o seu aproveitamento, uma vez que se trata de um subproduto da fermentação durante a produção de etanol (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009a).

Embora existam muitos trabalhos sobre a produção de levana, ainda ocorrem às desvantagens do baixo rendimento e contaminação de produtos impuros. Nos últimos anos, estratégias para melhorar o rendimento da produção de levana por micro-organismos têm atraído maior atenção, e a imobilização celular é uma dessas estratégias estudadas (SHIH; CHEN; WU, 2010).

3.5 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

O termo imobilização celular implica o confinamento físico das células em uma região definida de espaço, na qual são mantidas suas atividades catalíticas em processos de operação contínua ou descontínua possibilitando a reutilização das mesmas. Também é definida como o movimento não independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema, por estarem alojadas dentro ou na superfície do agente imobilizador (CANILHA et al., 2006).

A reutilização das células imobilizadas é considerada uma das grandes vantagens da imobilização celular, uma vez que a maior concentração de células microbianas no suporte garante a síntese dos metabólitos e aumenta a eficiência da fermentação. Também surgiu como alternativa à imobilização de

enzimas, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação (COVIZZI et al., 2007).

A biotecnologia tem sido bastante explorada nos últimos anos para a obtenção de inúmeros produtos de interesse econômico e social. Os processos biotecnológicos têm se mostrado promissores e com inúmeras vantagens em relação aos processos convencionais (CUNHA et al., 2005).

Nos últimos anos houve um grande aumento das pesquisas na área de biocatálise envolvendo a imobilização de enzimas e células de micro-organismos (KAWAGUTI; SATO, 2008). Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Para aplicação industrial, a imobilização de enzimas ou células vivas em suportes inertes é uma abordagem muito atraente porque oferece várias vantagens sobre as células livres para fermentação, uma vez que pode facilitar o isolamento dos produtos e o reaproveitamento do biocatalisador. Além disso, o sistema imobilizado de células vivas tem capacidade metabólica ativa para sintetizar bioprodutos complicados (SHIH; CHEN; WU, 2010).

A imobilização de células em fermentação alcoólica tem grande atenção devido às inúmeras vantagens tecnológicas e econômicas envolvidas com as células de levedura imobilizada quando comparadas com sistemas de células livres. Tal consideração pode melhorar a estabilidade das células, a eficiência da fermentação, e reduzir os custos associados com a reciclagem e processamento (MOHAMMADI et al., 2011).

Há três motivos básicos para aceitar a imobilização de células: 1- reutilizar o biocatalisador por mais de um ciclo fermentativo; 2- usar um processo contínuo sem reciclo celular; 3- aumentar a estabilidade do biocatalisador, em relação às variações de pH, temperatura e concentração de nutrientes (CANILHA et al., 2006).

3.6 TÉCNICAS E SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO CELULAR

As técnicas são classificadas em: naturais, como formação de biofilmes e adesão/adsorção microbiana em suportes sintéticos ou naturais; e artificiais,

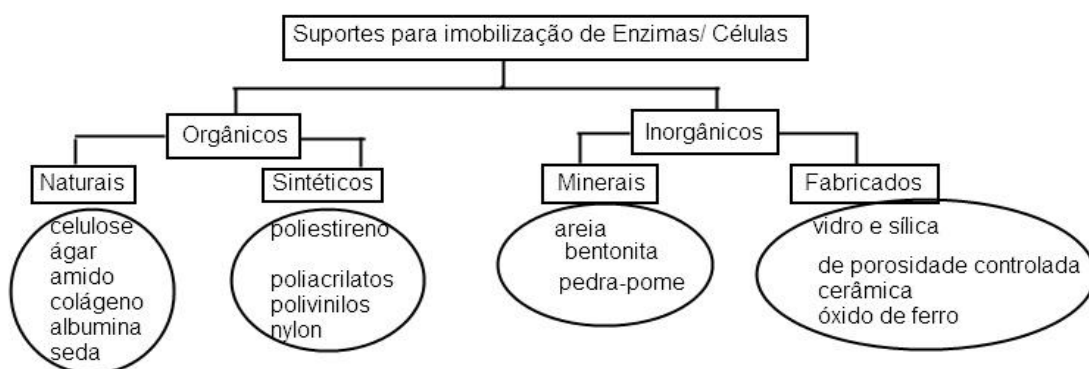
como a encapsulação em matrizes de alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes (COVIZZI et al., 2007).

As técnicas empregadas para a imobilização de células podem ser divididas em quatro grandes categorias de acordo com o mecanismo físico de imobilização: (a) aprisionamento dentro de uma matriz porosa, (b) adsorção a uma superfície, (c) auto-agregação ou floculação e a (d) contenção em barreiras (CUNHA, 2006).

De acordo com Chang e Tseng (1998), muitos polímeros naturais e sintéticos têm sido utilizados para imobilização celular, mas cada um tem suas desvantagens. Polímeros naturais (ágar, alginato, kappa-carragena) possuem baixa resistência mecânica e durabilidade, embora não sejam tóxicos para micro-organismos. Por outro lado, polímeros sintéticos têm resistência mecânica e durabilidade fortes, mas são muitas vezes tóxico para os micro-organismos.

A escolha de uma matriz adequada para a imobilização de células é de grande importância para a obtenção do produto desejado (COVIZZI et al., 2007). Na figura 3 estão apresentados alguns suportes mais utilizados em imobilização celular e enzimática.

Figura 3 – Classificação dos suportes para imobilização de enzimas e células (adaptado de Zanin; Moraes, 2004).



3.6.1 Aprisionamento dentro de uma matriz porosa

Esta técnica se baseia na inclusão artificial das células que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semi-rígida, que impede a difusão destas para o meio de cultivo. O mecanismo clássico de imobilização por

aprisionamento é a mistura de células microbianas com um composto polimérico que apresenta cargas negativas (alginato, por exemplo), onde grânulos esféricos de polímeros com diâmetros variando de 0,3 a 3,0 mm e imobilização de biomassa são produzidos (COVIZZI et al., 2007; KAWAGUTI; SATO, 2008).

3.6.2 Adsorção a uma superfície

Esta técnica é um método de adsorção muito utilizado pela sua simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de suportes (COVIZZI et al., 2007).

A imobilização de células em um suporte sólido ocorre pela adsorção física por meio de forças eletrostáticas ou pela ligação covalente entre a membrana celular e o suporte (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Dentre as técnicas de imobilização disponíveis, a adsorção pode ter um elevado potencial comercial, pois esse método é mais simples, menos dispendioso do que outras técnicas e pode ser mantida uma alta atividade catalítica (DALLA-VECCHIA et al., 2005).

3.6.3 Auto-agregação ou floculação

Consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes (COVIZZI et al., 2007). Tem sido definida também, como a capacidade de agregação natural das células para formar uma grande unidade ou como uma propriedade das células em suspensão em aderir-se em grupos e rapidamente sedimentar (KAWAGUTI; SATO, 2008).

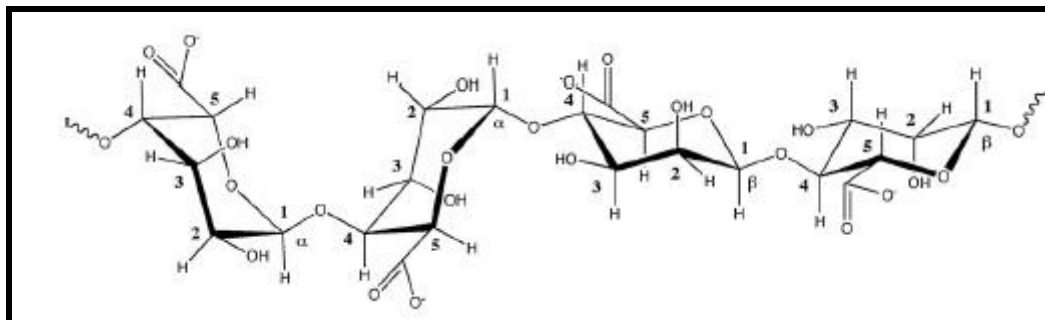
3.6.4 Contenção em barreiras

A contenção em barreiras ou encapsulação implica que as células ficam envoltas por uma membrana e não há uma malha entre as células por ela envolvidas (COVIZZI et al., 2007). Esta técnica de imobilização é utilizada quando se requer um produto livre de células, mínima transferência de compostos ou quando produtos de alta massa molecular precisam ser separados a partir do efluente (KAWAGUTI; SATO, 2008). A imobilização em gel de alginato tem sido a mais utilizada em processos fermentativos envolvendo bactérias e leveduras (COVIZZI et al., 2007).

3.7 ALGINATO

É um polissacarídeo constituído por unidades de ácido manurônico unido por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) e por ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) nas unidades de ácido gulurônico (COVIZZI et al., 2007), como mostra a figura 4.

Figura 4 – Estrutura da molécula de alginato de sódio (Adaptado de Mollica et al., 2012).



Refere-se a um grupo de polissacarídeos que ocorrem naturalmente na parede celular de algas marinhas marrons (*Phaeophyceae*) onde existe como o sal misto de cálcio-sódio-potássio do ácido algínico (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

Embora as algas marinhas sejam, normalmente, a fonte comercial de alginato, os de origem bacteriana são sugeridos como os possíveis substitutos (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

O alginato bacteriano foi descoberto em 1964, quando foi isolado a partir de uma cepa mucóide de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de pacientes portadores de fibrose cística submetidos a tratamento com antibióticos. Posteriormente foram identificadas bactérias do gênero *Azotobacter* e *Pseudomonas* como produtoras deste biopolímero (MÜLLER; SANTOS; BRIGIDO, 2011).

O alginato é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de células microbianas por ser uma metodologia simples e barata; a gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de íons de cálcio sem alterações drásticas na temperatura, pH e pressão osmótica, o que permite preservar a atividade e a viabilidade dos micro-organismos imobilizados (KAWAGUTI; SATO, 2008; SANTANA et al., 2009). Ele atua como um mecanismo de troca

iônica absorvendo exsudatos e formando um gel não-aderente (CHHATRI et al., 2011).

Na indústria de alimentos, os alginatos são utilizados como aditivos com a capacidade de aumentar a viscosidade, estabilizar, emulsificar e gelificar soluções aquosas (GARCIA-CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

Na imobilização com alginato uma suspensão de micro-organismos é misturada a uma solução de alginato de sódio, suficiente para formar um gel firme. Essa mistura é submetida à extrusão, com auxílio de mangueiras e bomba peristáltica, sendo gotejada em solução contendo sais de íons bivalentes, como cloreto de cálcio, formando grânulos (KAWAGUTI; SATO, 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

Foi utilizada a bactéria *Z. mobilis* CCT 4494, obtida da Coleção de Culturas da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello” - Campinas - SP.

4.2 MEIOS DE CULTURA

4.2.1 Meio de Manutenção da Cultura

A bactéria *Z. mobilis* CCT 4494 foi cultivada e mantida no meio de manutenção com a seguinte composição em g/L: peptona de carne 10,0; extrato de levedura 10,0 e glicose 20,0.

Após o desenvolvimento do micro-organismo a temperatura de 30 °C por 24 horas, a cultura foi mantida em temperatura de refrigeração (7 °C), sendo reativada a cada 90 dias.

4.2.2 Meio de Pré-Fermentação

O meio de pré-fermentação teve a mesma composição do meio de manutenção de cultura (item 4.2.1) e foi chamado de “Caldo *Z. mobilis*” (CZM).

4.2.3 Meio de Fermentação

O meio de fermentação é composto de um meio sintético proposto por Rodriguez e Callieri (1986) com algumas modificações, constituído em g/L de: extrato de levedura 5,0; KH_2PO_4 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0; e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,0. A este meio foram adicionadas diferentes concentrações de sacarose (5, 10, 15, 20, 25 e 30%), sendo esterilizadas separadamente da solução de sais, a 121 °C/15 minutos. O pH inicial também foi ajustado para os diferentes valores avaliados (4,0; 5,7 e 7,0).

4.3 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

4.3.1 Preparo do pré - inóculo

A cepa de *Z. mobilis* CCT 4494 foi repicada em tubos com CZM e incubada a 30 °C por 24 horas.

4.3.2 Pré - fermentação

Após 24 horas, 10 tubos com a cultura crescida foram transferidos para frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de CZM, em shaker

(incubadora refrigerada), modelo MA 830 Marconi com controle de temperatura para 30 °C e sem agitação, por um período máximo de 24 horas.

Posteriormente a massa celular foi centrifugada e re-suspendida em água destilada estéril para padronização do inóculo.

4.4 FERMENTAÇÃO

4.4.1 Padronização do inóculo

A concentração de células imobilizadas utilizadas nos processos fermentativos foi padronizada por espectrofotometria com absorbância 0.8 a 570 nm a partir da suspensão celular diluída em água destilada em condições assépticas. Uma curva de calibração foi estabelecida para correlacionar o peso celular seco (gramas), com a absorbância a 570 nm, resultando em inóculo inicial de 0,06 gramas de células / 2 gramas de massa seca (apêndice 1A e 2A).

4.5 IMOBILIZAÇÃO CELULAR

4.5.1 Aprisionamento das células em gel de alginato

As células de *Z. mobilis* em concentração pré-estabelecida foram adicionadas em solução de alginato de sódio 2% (Dinâmica), previamente preparada e esterilizada, sob agitação por 15 minutos, e então esta mistura foi gotejada (utilizando-se uma seringa de 5 mL) em solução de cloreto de cálcio 3% (Sigma) sob agitação, obtendo-se esferas de alginato de cálcio com aproximadamente 2,5 mm de diâmetro, mantidas por 30 minutos sob agitação e, após este período, foram adicionadas ao meio de fermentação (50 mL), 2 gramas de esferas.

4.6 PARÂMETROS FERMENTATIVOS ANALISADOS

4.6.1 Concentração de sacarose

Para determinar a concentração ótima foram testadas as concentrações de sacarose 5, 10, 15, 20, 25 e 30% nos frascos contendo meio de fermentação, sem agitação.

4.6.2 Temperatura de incubação

Para a verificação da temperatura ótima foram testadas as temperaturas de 30 e 40 °C nos frascos contendo meio de fermentação, sem agitação, em shaker (incubadora refrigerada), modelo MA 830 Marconi com controle de temperatura.

4.6.3 Período de fermentação

Para determinar o período de melhor atividade das células imobilizadas, na produção de levana e etanol, foram avaliados os diferentes tempos de fermentação: 24, 48, 72 e 96 horas.

4.6.4 pH inicial e pH final

Foram testados os valores de pH inicial 4,0; 5,7 e 7,0 no meio sintético, e após o período de fermentação, amostras foram retiradas para determinação do pH final. e o pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria em pHmetro Digimed DM20.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Foram retiradas amostras durante todo o processo fermentativo para a determinação do crescimento celular no suporte; da biomassa desprendida para o meio de fermentação; da produção e produtividade de etanol e da produção de levana.

Todas as análises foram realizadas em duplicata.

4.7.1 Determinação da concentração de células aderidas ao suporte e da biomassa desprendida para o meio de fermentação

O crescimento da bactéria *Z. mobilis* foi verificado por meio da curva de calibração correlacionando peso celular seco e absorbância (apêndice 1A e 2A).

Após o processo fermentativo as esferas foram separadas do meio sintético utilizando uma peneira e adicionadas a um Erlenmeyer com 6 mL de citrato de sódio 2M, permanecendo em placa agitadora por 15 minutos para dissolução.

A concentração de células foi quantificada por meio da leitura da densidade óptica das esferas dissolvidas, sendo correlacionado com o peso celular seco (gramas), a 570 nm.

A biomassa desprendida foi determinada na amostra do caldo fermentado por meio da leitura da densidade óptica do meio sintético da amostra em análise, sendo correlacionada com o peso celular seco (gramas), a 570 nm.

4.7.2 Produção de etanol pelo sistema imobilizado

A concentração de etanol foi determinada utilizando o cromatógrafo a gás Hewlett Packard series II modelo 5890 equipado com coluna SPB-35 e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230 °C. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40 °C, sendo aumentada a uma velocidade de 20 °C/minuto até a temperatura final de 100 °C. Como gás de arraste foi usado nitrogênio, uma taxa split de 1:20 e tempo de corrida de 3 minutos. A amostra do “headspace” (50 µL) foi retirada por meio de seringa própria para gases. A quantificação de etanol foi de acordo com o tempo de retenção do padrão (apêndice 3A e apêndice 4A).

4.7.3 Produção de levana pelo sistema imobilizado

A determinação da levana foi realizada adotando-se a técnica de Viikari (1984), com algumas modificações segundo Moro e colaboradores (2011). Retirou-se 2 mL do sobrenadante obtido após a centrifugação a 3660 rpm/15 minutos e adicionou-se 6,0 mL de etanol anidro, previamente resfriado. As amostras foram congeladas a -1 °C por 24 horas para precipitação do biopolímero.

Após esse período ocorreu centrifugação a 3660 rpm/30 minutos, a temperatura ambiente, descartou-se o sobrenadante e a adicionou-se novamente 6,0 mL de etanol para aumentar o grau de pureza do material isolado. Após 24 horas congeladas, as amostras foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores e, após descarte do etanol, a última centrifugação foi feita com a adição de 6,0 mL de H₂O destilada, para solubilizar açúcares que poderiam estar presentes na amostra.

A levana precipitada foi hidrolisada em frutose, com 7 mL de HCl concentrado 0,5% à 100 °C/ 60 minutos. Neutralizou-se o material hidrolisado com 0,7 mL de NaOH 2M por 20 minutos e a quantidade de levana foi estimada indiretamente como unidades de frutose (em g/L) pelo método Somogyii (1952) e Nelson (1944).

Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 540 nm tendo como base amostras de frutose com concentrações conhecidas e, posteriormente, foi construída uma curva de calibração utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (figura 3A e tabela 3A - apêndice).

4.7.4 Produtividade de etanol

Após determinação da produção de etanol foi calculada a produtividade de etanol utilizando-se a equação 1.

Equação 1 -

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

Onde:

P = produtividade;

P₀ = massa produto inicial (g/L);

P_f = massa de produto final (g/L);

t_f = tempo final (h);

t₀ = tempo inicial (h);

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados utilizando o programa computacional Minitab 15 Statistical Software.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTO I: TEMPERATURA DE 30 °C E pH INICIAL 5,7

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 30 °C, com pH inicial de 5,7, e concentrações de sacarose que variaram de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.1.1 Variação do pH final a 30 °C, com pH inicial 5,7

A tabela 1 mostra os valores de pH final para cada período de fermentação até 96 horas, no pH inicial de 5,7 e na temperatura de incubação de 30 °C.

Observou-se que o pH final variou de 5,7 a 3,1, e os menores valores foram encontrados ao final do ciclo de 4 dias de fermentação para todas as concentrações de sacarose testadas e ocorrendo uma queda brusca nas primeiras 24 horas (pH inicial 5,7 para 3,6 após 24 horas). Posteriormente permaneceu estável até o final do processo de fermentação. A tabela 1 mostra os valores de pH final durante todo o processo fermentativo a 30 °C, com pH inicial 5,7.

Tabela 1 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C.

Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	5,7	4,3	4,0	3,9	3,1
10%	5,7	3,9	3,8	3,8	3,7
15%	5,7	3,6	3,7	3,7	3,3
20%	5,7	3,6	3,5	3,6	3,5
25%	5,7	3,4	3,4	3,7	3,4
30%	5,7	3,6	3,5	3,6	3,3

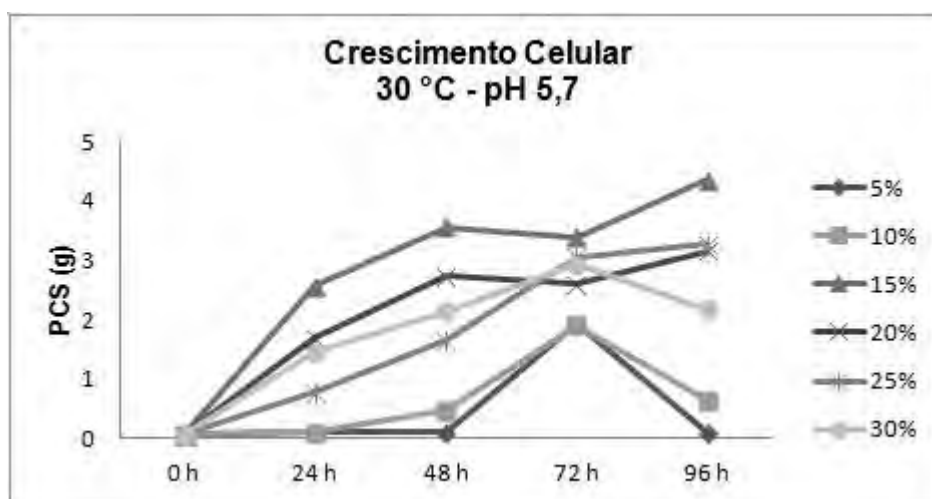
5.1.2 Crescimento celular dentro das esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 5,7

Na figura 5 estão representados os valores obtidos para o crescimento celular dentro das esferas. Nesta é possível observar o menor desenvolvimento nas concentrações de 5% e 10% de sacarose. Já nas demais concentrações de sacarose testadas (15% a 30%), a bactéria *Z. mobilis* teve comportamento

similar durante os diferentes tempos de fermentação, utilizando o substrato para crescimento celular durante todo o processo fermentativo, sendo verificado o maior valor de biomassa (4,4 g) na concentração de 15% de sacarose, com 96 horas de fermentação.

O valor da biomassa livre no meio sintético foi inferior a 0,06 gramas, mostrando a eficiência da imobilização celular durante o processo fermentativo, mantendo as células da bactéria *Z. mobilis* no interior das esferas de alginato, crescendo e não extravasando para o meio sintético.

Figura 5 – Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C.

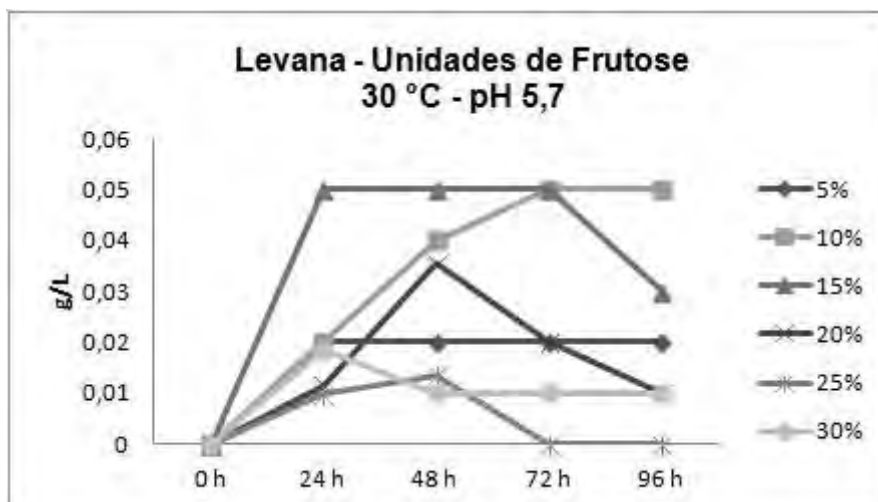


5.1.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 5,7

Na figura 6 temos os valores da produção de levana após fermentação a 30 °C e pH inicial 5,7, que mostram a baixa produção do biopolímero nas condições testadas, atingindo valores máximos de 0,05 g/L, na concentração de sacarose 15% durante os 3 primeiros dias do processo.

Valores superiores aos da figura 6 foram relatados no trabalho de Park e Baratti (1993), que estudaram a produção de levana por *Z. mobilis* na fermentação por suspensão de células em diferentes temperaturas e pH, e observaram que os melhores rendimentos para produção da goma ocorreram em condições similares às do presente trabalho, a 30 °C e pH 5,0.

Figura 6 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C.



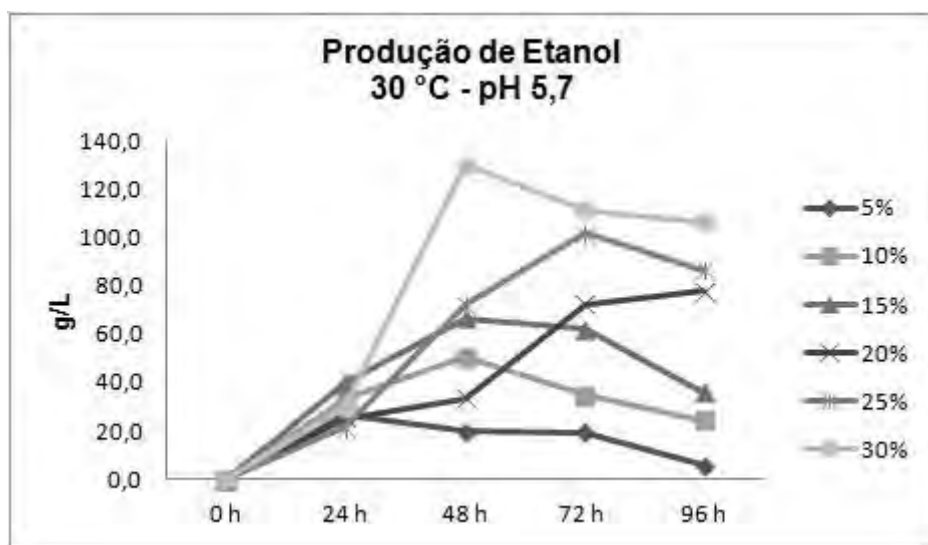
Valores muito superiores aos mostrados na figura 6 para produção de levana foram obtidos no trabalho de Ernandes e García-Cruz (2011 a), utilizando células livres de *Z. mobilis*, em processo fermentativo a 30 °C, pH inicial 6,0 e concentração de sacarose de 20%, porém, com agitação de 200rpm, alcançando valores próximos a 90 g/L.

Porém, no trabalho de Lorenzetti, Moro e García-Cruz (2011) também foi encontrada a baixa produção de levana com células de *Z. mobilis* imobilizadas em esferas de alginato e álcool polivinílico, não ultrapassando 0,04 g/L em 18 horas de processo fermentativo a 30 °C, pH inicial 5,7, assim como observado neste experimento (figura 6).

5.1.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 5,7

Na figura 7 é possível observar os resultados da análise por cromatografia gasosa das amostras obtidas com pH inicial 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C. Nesta, foi verificada alta produção de etanol para as concentrações de sacarose acima de 15%.

Figura 7 – Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 30 °C.



A produção máxima de etanol (130,1 g/L) foi obtida na concentração de 30% de sacarose no 2º dia de fermentação (figura 7). Esse valor é superior aos relatados por outros pesquisadores como, por exemplo, Ananthalakshmy e Gunasekaran (1999), os quais obtiveram etanol com cepas de *Z. mobilis* B4286 e dois mutantes (ZML1 e ZML2), obtidos por meio do tratamento com NTG (Nmetil N'nitroso Guanidina), atingindo uma produção máxima de etanol de 55,1; 41,0 e 44,2 g/L, respectivamente, em 24 horas de fermentação, a 30 °C, com 15% de concentração de sacarose, utilizando células livres.

Os resultados encontrados nesta pesquisa (figura 7) estão de acordo com a literatura consultada, uma vez que, os maiores valores descritos são de Rogers e colaboradores (1979), que estudaram a cinética de produção de etanol por *Z. mobilis* ATCC 10988 e *Saccharomyces carlsbergensis* (*uvarum*), em altas concentrações de açúcar, observaram que ambos os micro-organismos 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.

5.2 EXPERIMENTO II: TEMPERATURA DE 30 °C, E PH INICIAL 4,0

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 30 °C, com pH inicial 4,0, nas concentrações de sacarose de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.2.1 Variação do pH a 30 °C, com pH inicial 4,0

A tabela 2 mostra que o pH final das amostras deste experimento com pH inicial 4,0, a 30 °C, variou de 4,0 a 3,1, durante 96 horas de fermentação.

Na tabela 2 ainda é possível observar que a maior diminuição ocorreu do 1° para o 2° dia de fermentação (pH 4,0 para pH 3,2), e após o 2° dia de fermentação o pH permaneceu estável até o fim do processo fermentativo.

Tabela 2 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C.

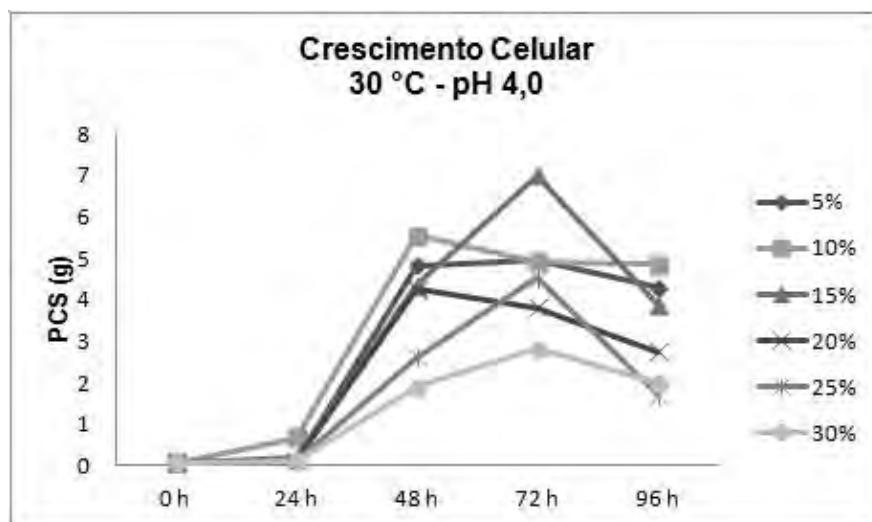
Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	4,0	3,5	3,5	3,7	3,6
10%	4,0	3,3	3,3	3,4	3,4
15%	4,0	3,8	3,2	3,3	3,2
20%	4,0	3,9	3,1	3,4	3,2
25%	4,0	4,0	3,2	3,3	3,3
30%	4,0	4,0	3,4	3,3	3,2

5.2.2 Crescimento celular dentro das esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 4,0

Na figura 8 observa-se o crescimento da bactéria dentro das esferas, com valor máximo de 7,0 gramas, após 3 dias de fermentação, na concentração de sacarose 15% e pH final de 3,3. Comparando-se o crescimento celular destas condições com o valor obtido em pH inicial 5,7, temos resultados que contrariam os estudos de Wendt (2001), que afirmaram que, o pH ótimo para o desenvolvimento é 7,3 e o pH final depois de 3 dias a 30 °C em meio padrão está entre 4,8 e 5,2.

Na figura 8 também se observa que o pH inicial 4,0 favoreceu a maior concentração de células imobilizadas em relação ao pH inicial 5,7 testado anteriormente (experimento I) neste mesmo trabalho, mostrando a influência do pH no crescimento da bactéria *Z. mobilis*.

Figura 8 - Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



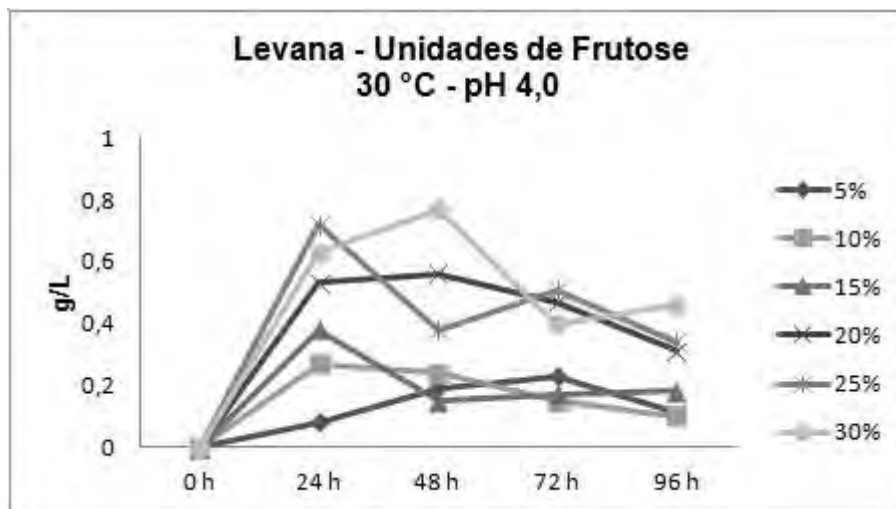
Foram encontrados para este experimento valores similares ao crescimento celular dentro das esferas para a concentração de células desprendidas para o meio sintético, que pode ter ocorrido provavelmente pelo rompimento das esferas, o que também foi verificado no trabalho de Bekers e colaboradores (2001), demonstrando que durante curtos períodos de fermentação as esferas de alginato de cálcio com células de *Z. mobilis* imobilizadas podem ser usadas como geradores de inóculo para produção de levana e etanol. No entanto, os mesmos autores complementaram que, durante a fermentação o volume das esferas aumenta e a estrutura torna-se alterada e parcialmente danificada. É possível que a formação de levana e de etanol dentro das esferas, juntamente com o aumento da biomassa celular e CO₂ podem aumentar o volume das esferas de gel de alginato de cálcio e finalmente ocasionar seu rompimento.

5.2.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 4,0

A figura 9 mostra a produção de levana por células imobilizadas, obtendo a maior concentração de levana (0,8 g/L) em 48 horas de fermentação, com 30% de concentração de sacarose, a 30 °C e pH final 3,4.

O pH inicial 4,0, além de favorecer o crescimento celular, aumentou a produção do biopolímero em 8 vezes se comparado com pH inicial 5,7 testado neste trabalho (experimento I), onde concentrações de sacarose acima de 20% foram as que proporcionaram maior produção como mostra a figura 9.

Figura 9 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



Resultados diferentes foram obtidos por Ernandes e García-Cruz (2011a), onde a maior síntese de levana por células livres de *Z. mobilis* ocorreu nos valores de pH final 4,4-4,6; e por Silva (1996), que estudou a influência do pH sobre a produção de levana por células livres de *Z. mobilis*, ZAG-12, na faixa de pH 4,5-6,0. Este pesquisador realizou experimentos nas seguintes condições: 20% de sacarose a 25 °C, com e sem controle de pH. Ajustando apenas o pH inicial, ele não observou vantagem do controle do pH na produção de levana.

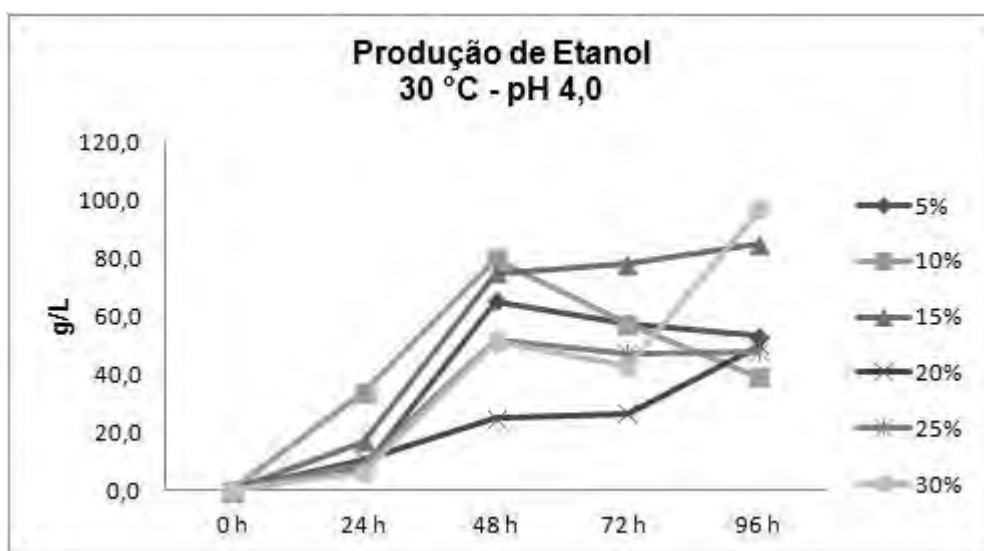
No trabalho de Calazans e colaboradores (2007) as fermentações foram iniciadas com pH 5,0, e as concentrações de 15 a 25% de sacarose, variando agitação e quantidade de extrato de levedura no MS; obtendo 1,5 g/L de levana a 30 °C, com extrato de levedura 5 g/L, 15% de sacarose e agitação de 50 rpm, utilizando células livres de *Z. mobilis*, ZAG-12. Ficou evidente a importância e o efeito da agitação na produção da goma, bem como o aumento da concentração de sacarose, pois a 20 °C e 25% de sacarose com agitação de 100 rpm, neste mesmo trabalho a produção de levana foi de 14,67 g/L.

5.2.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 4,0

A figura 10 mostra a produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C.

Observando de um modo geral a figura 10, a produção de etanol nas concentrações de 10% e 15% de sacarose (79,5 e 77,7 g/L respectivamente) foram superiores aos demais experimentos avaliados neste mesmo trabalho utilizando as mesmas concentrações. Porém, a produção máxima foi obtida em 96 horas de processo fermentativo a 30 °C, na máxima concentração de sacarose testada (30%), resultando em 97,0 g/L de etanol (figura 10).

Figura 10 - Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



A concentração máxima de etanol (97,0 g/L) foi obtida na concentração de 30% de sacarose, no 4º dia de fermentação (figura 10), sendo esse valor 3 vezes superior ao relatado por Skotnicki e colaboradores (1981) que avaliaram a produção de etanol por células livres de 11 linhagens diferentes de *Zymomonas* e o máximo de produção de etanol obtido após 20 horas de fermentação, com 10% de sacarose a 30 °C, e pH inicial 5,0, foi de 29,2 g/L, produção essa próxima à obtida neste estudo na mesma concentração de sacarose (10%) analisada nas primeiras 24 horas do processo fermentativo (33,7 g/L), como mostra a figura 10.

No estudo de Calazans e colaboradores (2007) a agitação foi um fator importante para a produção máxima de etanol (44,76 g/L). Estes pesquisadores utilizaram condições similares às deste trabalho, temperatura de 30 °C, 15% de sacarose, 5 g/L de extrato de levedura no meio de fermentação, e duas variáveis distintas, agitação de 50 rpm e pH inicial 5,0. No presente estudo,

quando utilizada a temperatura de 30 °C e pH inicial 4,0, na concentração de 15% de sacarose, após 24 horas, sem agitação, a produção de etanol foi de 16,7 g/L, como mostra a figura 10.

5.3 EXPERIMENTO III: TEMPERATURA DE 30°C, E PH INICIAL 7,0

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 30 °C, com pH inicial 7,0, concentrações de sacarose de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.3.1 Variação do pH a 30 °C, com pH inicial 7,0

A tabela 3 mostra a variação do pH final após fermentação de 4 dias, com pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C e concentrações de 5 a 30% de sacarose.

Os valores variaram de 7,0 a 3,7 (tabela 3), apresentando diferença entre o pH inicial e o pH final semelhante à observada no trabalho de Ernandes e García-Cruz (2011b), que realizaram fermentação submersa com células livres de *Z. mobilis* para produção de levana em temperatura controlada de 30 °C, a 200 rpm e por 72 horas, onde a variação foi de pH inicial 7,0 para o pH final 4,4.

Tabela 3 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C.

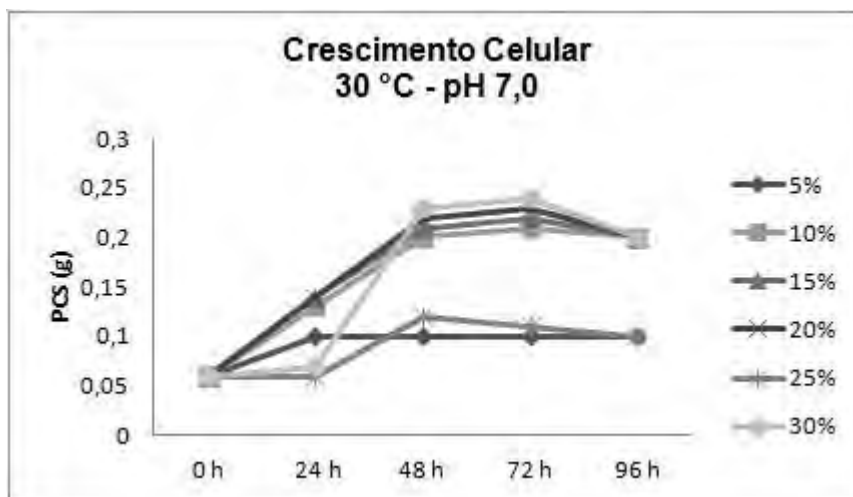
Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	7,0	6,6	5,3	5,0	4,8
10%	7,0	6,3	5,0	4,3	4,1
15%	7,0	6,0	5,0	4,1	4,0
20%	7,0	5,6	5,0	4,0	3,9
25%	7,0	5,4	4,8	3,8	3,8
30%	7,0	5,3	4,8	3,7	3,7

5.3.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 30 °C, com pH inicial 7,0

Observando a figura 11 nota-se o menor crescimento celular da bactéria *Z. mobilis* imobilizada em alginato quando comparado aos demais

experimentos deste trabalho, com 0,25 g de células, em 72 horas de processo fermentativo, a 30 °C e concentração de sacarose de 30%.

Figura 11 – Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



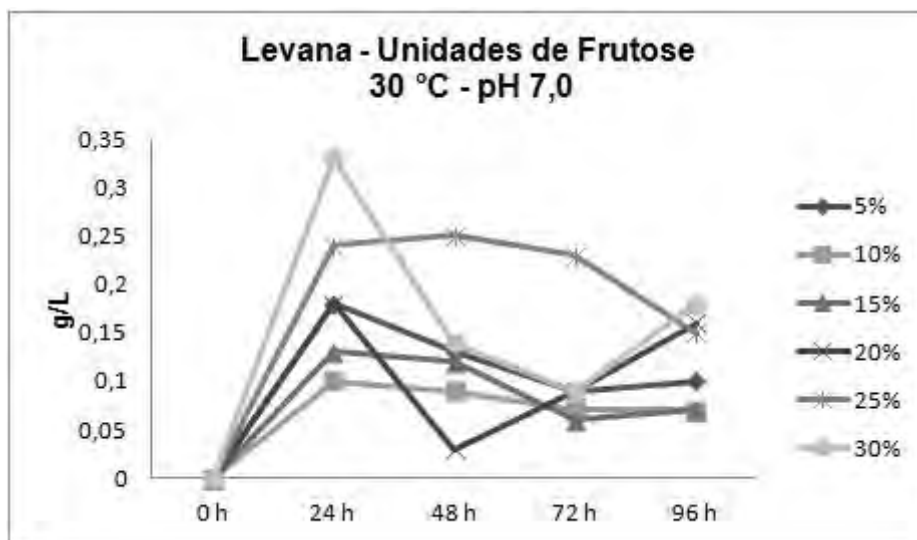
A figura 11 mostra o crescimento celular dentro das esferas durante o processo fermentativo, se comparado aos demais experimentos deste trabalho, observa-se o menor crescimento, não ultrapassando 0,25 g de células, indicando a maior concentração celular no meio sintético.

Observações semelhantes às encontradas no experimento III para avaliação da biomassa livre no MS foram obtidas por Bekers (2001), onde foi verificado que 94-97% da biomassa total de células foi localizada como células-livres, dispersas no meio de fermentação em todos os três métodos de imobilização utilizados no trabalho.

5.3.3 Produção de levana a 30 °C, com pH inicial 7,0

A figura 12 mostra a produção de levana na temperatura de incubação de 30 °C, com pH inicial 7,0. Nesta, observa-se a produção de levana com valor máximo de 0,33 g/L, após 24 horas e na concentração 30% de sacarose. A produção da goma não ultrapassou 0,25 g/L nas outras concentrações de sacarose testadas (5 a 25%) em 24 horas, e nos demais intervalos analisados a produção do biopolímero diminuiu com o aumento do tempo de fermentação.

Figura 12 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



Han e Clarke (1990) observaram aumento na produção do polissacarídeo quando a cultura foi levemente agitada durante a fermentação, variável não testada no presente estudo, que pode justificar os valores baixos de produção do biopolímero durante todo o processo fermentativo do experimento III, como mostra a figura 12.

No trabalho de Ernandes e García-Cruz (2011 b) utilizando células livres de *Z. mobilis*, a agitação de 200rpm foi o fator determinante para a produção de 26,1 g/L de levana, em 72 horas de fermentação, a 30 °C, pH inicial 7,0 e concentração de 10% de sacarose, chegando até a produção de 85,4 g/L quando utilizada a concentração de 20% de sacarose, valor esse muito superior ao encontrado no presente trabalho (figura 12), onde as mesmas condições foram utilizadas, porém com células imobilizadas e processo fermentativo estático.

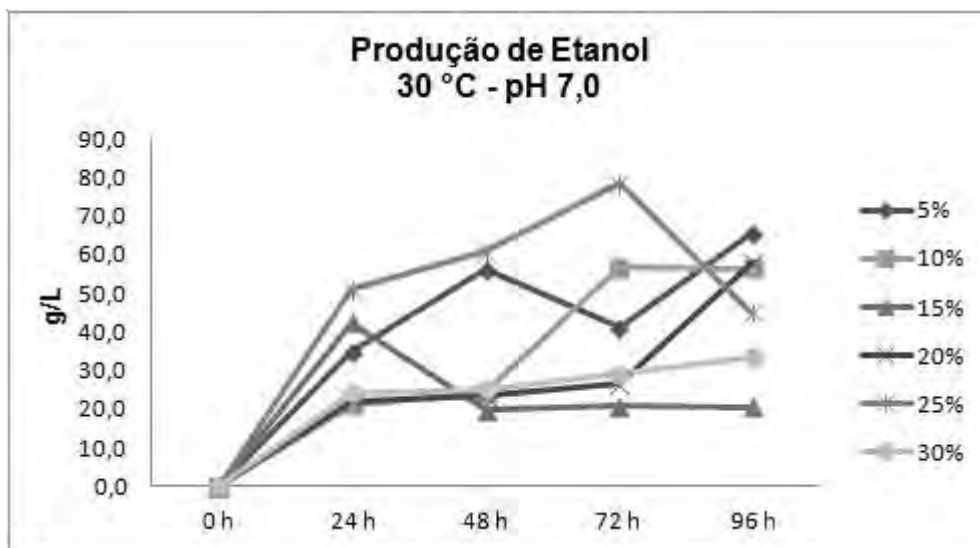
Valores obtidos por Skotnicki e colaboradores (1981), onde foram testadas condições semelhantes às encontradas no presente estudo, demonstraram a baixa produção de levana por outras linhagens de *Z. mobilis*.

5.3.4 Produção de etanol a 30 °C, com pH inicial 7,0

A figura 13 mostra a produção de etanol a 30 °C, pH inicial 7,0 e nas concentrações de 5 a 30% de sacarose.

O maior valor da produção de etanol com pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C, foi de 78,5 g/L, com 25% de sacarose e 72 horas de fermentação, como mostra a figura 13.

Figura 13 – Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 30 °C.



Diferindo dos demais experimentos realizados neste trabalho, temos alta produção de etanol também nas concentrações de 5% e 10% de sacarose (figura 13), mostrando que a combinação de fatores pH inicial e concentração de sacarose influencia a produção.

5.4 ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE DE ETANOL A 30 °C

A produção de etanol foi analisada em cada experimento, além desta, foi analisada também a produtividade de etanol para todos os intervalos de tempo de todos os experimentos realizados neste trabalho, mostrando a velocidade de produção de etanol pela bactéria *Z. mobilis* imobilizada em esferas de alginato em relação ao tempo de fermentação.

A tabela 4 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 30 °C e pH inicial 5,7, com o maior valor encontrado em 48 horas e máxima concentração de sacarose testada (30%), atingindo 2,7 g/L*h, e o menor valor, de 0,1 g/L*h, em 96 horas de fermentação e a mínima concentração de sacarose testada (5%).

Tabela 4 – Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7 e na temperatura de incubação de 30 °C.

pH 5,7	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	1,1	0,4	0,3	0,1
10%	1,4	1,0	0,5	0,3
15%	1,7	1,4	0,9	0,4
20%	1,0	0,7	1,0	0,8
25%	0,9	1,5	1,4	0,9
30%	1,2	2,7	1,5	1,1

A tabela 5 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 30 °C e pH inicial 4,0, com o maior valor encontrado em 48 horas e na concentração de sacarose de 10%, atingindo 1,7 g/L*h, e o menor valor, de 0,3 g/L*h, nas primeiras 24 horas de fermentação e a mínima concentração de sacarose testada (5%).

Valores semelhantes aos da tabela 5 foram obtidos no trabalho de Santana et al. (2009), onde células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato produziram 1,65 g/L*h de etanol em processo fermentativo a 32 °C, com pH inicial 4,5, porém em concentração de glicose de 3%. A produtividade foi ainda maior quando estes autores aumentaram a concentração inicial de glicose para 15%, chegando a 3,76 g/L*h de etanol, mostrando a eficiência da *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada.

Tabela 5 - Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0 e na temperatura de incubação de 30 °C.

pH 4,0	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	0,3	1,4	0,8	0,6
10%	1,4	1,7	0,8	0,4
15%	0,7	1,6	1,1	0,9
20%	0,4	0,5	0,4	0,5
25%	0,4	1,1	0,7	0,5
30%	0,3	1,1	0,6	1,0

A tabela 6 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 30 °C e pH inicial 7,0, com o maior valor encontrado em 24 horas e na concentração de sacarose de 25%, atingindo 2,1 g/L*h, e o

menor valor, de 0,2 g/L*h, em 96 horas de fermentação e na concentração de 15% de sacarose.

Tabela 6 - Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0 e na temperatura de incubação de 30 °C.

pH 7,0	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	1,5	1,2	0,6	0,7
10%	0,9	0,5	0,8	0,6
15%	1,8	0,4	0,3	0,2
20%	0,9	0,5	0,4	0,6
25%	2,1	1,3	1,1	0,5
30%	1,0	0,5	0,4	0,3

No trabalho de Alencar et al. (2009), a produtividade variou de 1,6 a 1,9 g/L*h para o experimento utilizando várias culturas de células livres de *Saccharomyces cerevisiae*, em temperatura de incubação de 28 °C, 24 horas de processo fermentativo em caldo-de-cana esterilizado, valores similares aos encontrados para 24 horas do presente trabalho (tabela 6).

5.5 EXPERIMENTO IV: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 5,7

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 40 °C, com pH inicial 5,7, concentrações de sacarose de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.5.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 5,7

O pH final das amostras com pH inicial 5,7, a 40 °C, variou de 5,7 a 3,3 como mostra a tabela 7.

Os valores de pH finais encontrados para este experimento IV, a 40 °C e pH inicial de 5,7, são similares aos valores encontrados no experimento I deste mesmo trabalho, onde a temperatura de incubação testada foi de 30 °C.

Tabela 7 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C.

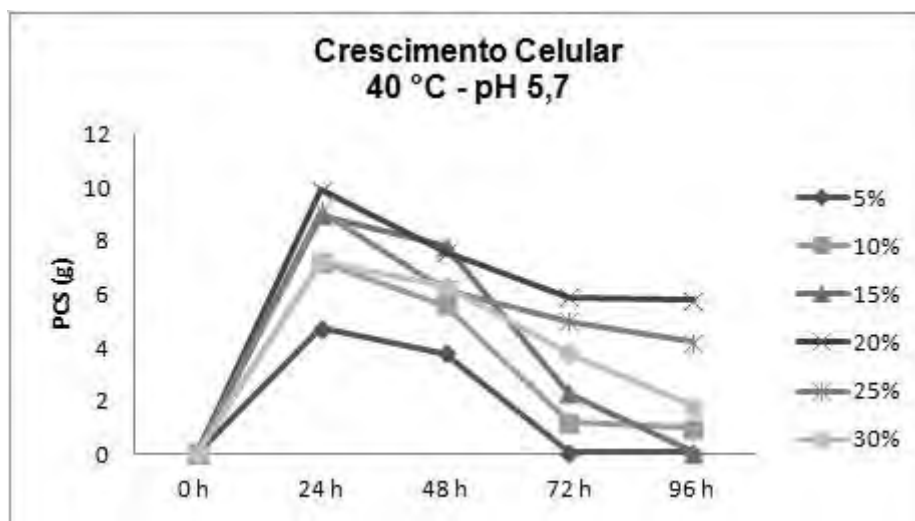
Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	5,7	5,5	5,0	4,4	4,6
10%	5,7	4,9	3,9	4,1	3,6
15%	5,7	4,8	4,2	3,7	3,5
20%	5,7	4,3	3,8	3,4	3,3
25%	5,7	4,0	3,4	3,6	3,5
30%	5,7	4,0	3,9	3,8	3,8

5.5.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 5,7

A figura 14 mostra a biomassa dentro das esferas de alginato durante o processo fermentativo a 40 °C, pH inicial 5,7.

No primeiro dia de fermentação, a bactéria apresentou o máximo de seu crescimento, chegando a 9,9 g de células imobilizadas, em 20 % de concentração de sacarose (figura 14). Nos demais intervalos analisados, o crescimento foi menor e houve pouco desprendimento de biomassa livre para o meio sintético (menor que 0,06 g).

Figura 14 – Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C.



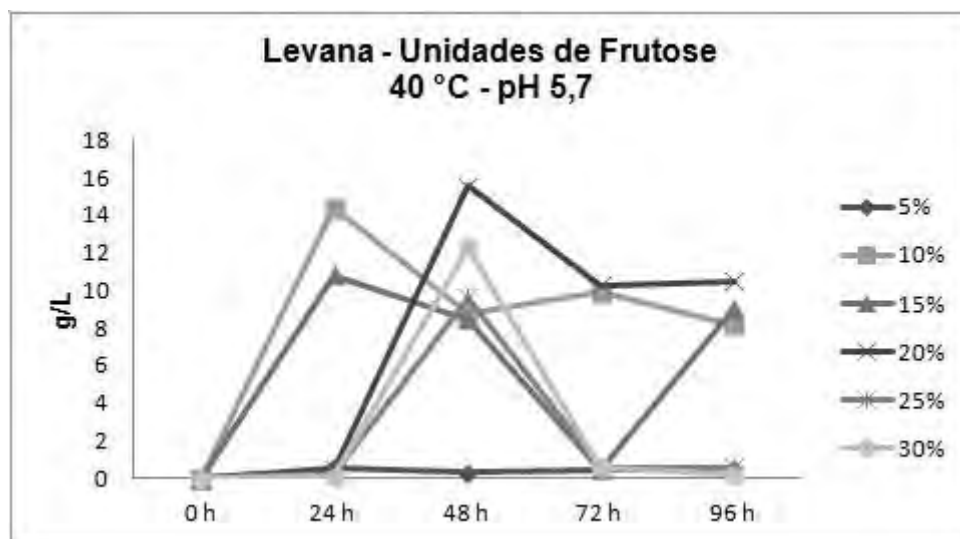
5.5.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 5,7

A figura 15 mostra a máxima produção de levana de 15,5 g/L em 48 horas de fermentação, na concentração de 20% de sacarose, em pH final 3,8, a 40 °C.

Analisando a figura 15, segundo o trabalho de Borsari e colaboradores (2006), altas concentrações de sacarose e temperaturas elevadas estimulam a síntese de fruto-oligossacarídeos e a redução das mesmas leva a um aumento na produção de etanol, o que foi observado no presente trabalho ao compararmos os resultados do experimento a 30 °C, com o mesmo pH inicial 5,7 (experimento I) com os resultados mostrados na figura 15, com alta produção de levana, referentes ao experimento IV, a 40 °C, pH inicial 5,7.

Observa-se também alta produção de levana em 24 horas de fermentação, a 40 °C e concentração de sacarose de 10%, com produção de 14,4 g/L de levana, e para produção em 48 horas, na máxima concentração de sacarose testada (30%), com produção de 12,3 g/L de levana (figura 15).

Figura 15 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C.



No trabalho de Shih, Chen e Wu (2010), utilizando células de *Bacillus subtilis* imobilizadas em esferas de alginato, foi observado alta eficiência na produção de levana (70,6 g/L), após 72 horas de fermentação, a 37 °C, pH 5,8 e agitação de 100 rpm, em comparação com células livres. O alto valor produzido deve-se ao fato dos mesmos autores relatarem que a taxa de produção de levana é de 50 g/L/d para células de *Bacillus subtilis* contra a taxa de 5 g/L/d da *Z. mobilis*.

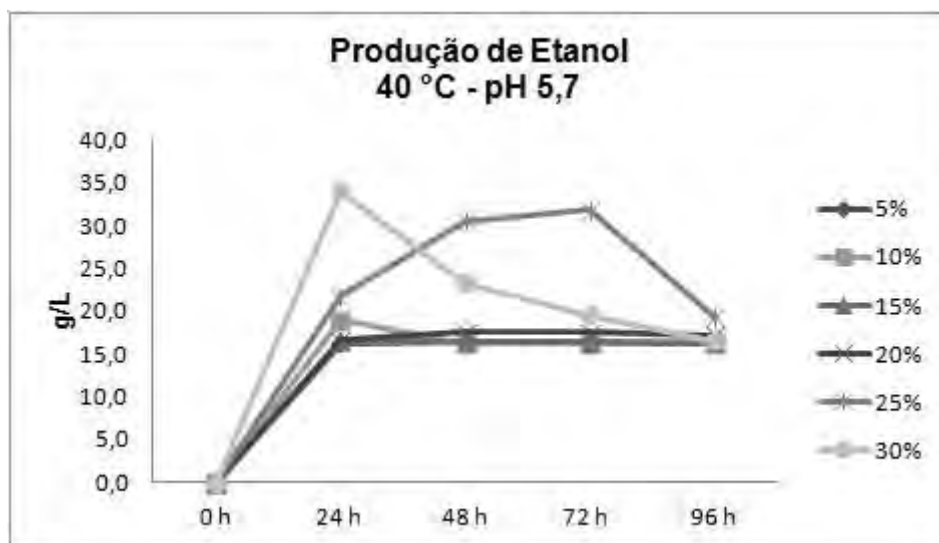
A produção de levana no presente trabalho, no experimento IV, sob condições similares ao trabalho de Shih, Chen e Wu (2010), não ultrapassou 15,5 g/L (figura 15).

5.5.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 5,7

A figura 16 mostra a máxima produção de etanol de 34,0 g/L em 24 horas de fermentação, na concentração de 30% de sacarose, em pH final 4,0, a 40 °C.

Na figura 16 observa-se que, assim como no trabalho de Ernandes (2009), que obteve 76,6 g/L como maior produção de etanol nas condições de 200 rpm, após 24 horas de fermentação, pH inicial 8,0, temperatura de 40 °C e 25% de sacarose utilizando células livres de *Z. mobilis*, neste experimento a maior produção de etanol também ocorreu com 24 horas de fermentação e na máxima concentração de sacarose testada.

Figura 16 – Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 5,7, na temperatura de incubação de 40 °C.



No trabalho de Bekers e colaboradores (2001), a produção de etanol obtida por células de *Z. mobilis* 113 “S” imobilizadas em esferas de alginato de cálcio em temperatura de incubação de 30 °C, pH 4,9, sem agitação foi de 14,0 g/L em 24 horas e 28,7 g/L em 48 horas, valores parecidos aos obtidos no experimento do presente trabalho, porém, como mostra a figura 16 na temperatura de 40 °C e pH inicial 5,7.

5.6 EXPERIMENTO V: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 4,0

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 40 °C, com pH inicial 4,0, concentrações de sacarose de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.6.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 4,0

A tabela 8 mostra os valores de pH final para cada período de fermentação até 96 horas, no pH inicial de 4,0 e na temperatura de incubação de 40 °C.

O pH final das amostras com pH inicial 4,0, a 40 °C não teve grande variação durante todo o processo fermentativo, diferindo dos valores de pH finais na temperatura de 30 °C também avaliada neste trabalho (experimento II), sendo encontrado o menor valor de pH 3,8 em 96 horas, como mostra a tabela 8.

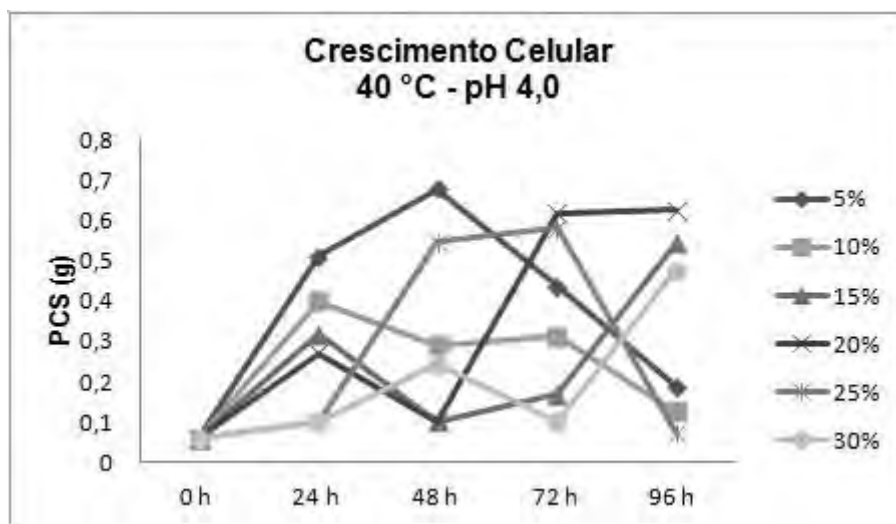
Tabela 8 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C.

Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	4,0	4,2	4,1	4,1	4,0
10%	4,0	3,9	3,9	3,9	3,8
15%	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0
20%	4,0	4,0	4,0	4,0	3,9
25%	4,0	4,0	4,0	3,9	3,9
30%	4,0	4,0	4,0	3,8	3,8

5.6.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 4,0

A figura 17 mostra o crescimento celular dentro das esferas de alginato a 40 °C, pH inicial 4,0, durante todo o processo fermentativo. Nesta, observa-se o baixo crescimento celular sob estas condições, além de variações entre as concentrações de sacarose testadas.

Figura 17 – Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C.



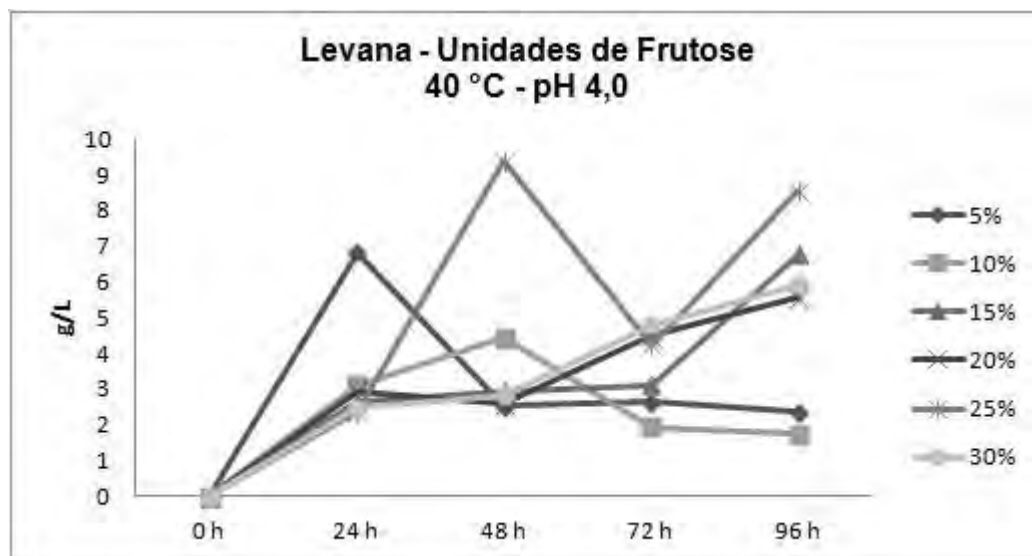
O maior valor encontrado para a biomassa foi de 0,7 gramas, em 48 horas de processo fermentativo, na concentração de 5% de sacarose (figura 17), condição esta que diferiu dos demais experimentos realizados neste trabalho, onde foi verificado o maior crescimento celular em concentrações de sacarose superiores a 20%.

5.6.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 4,0

Na figura 18 observa-se a produção de levana elevada em 48 horas de fermentação, na concentração de 25% de sacarose e pH final 4,0, obtendo aproximadamente 10 g/L do biopolímero (9,4 g/L).

Valores similares aos obtidos neste experimento (figura 18) foram obtidos no trabalho de Bekers et al. (2001), com produção de levana por células imobilizadas de *Z. mobilis* 113 “S” de 8,5 g/L em 24 horas e 13,7 g/L em 48 horas, em pH inicial 4,9 e sem agitação.

Figura 18 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C.

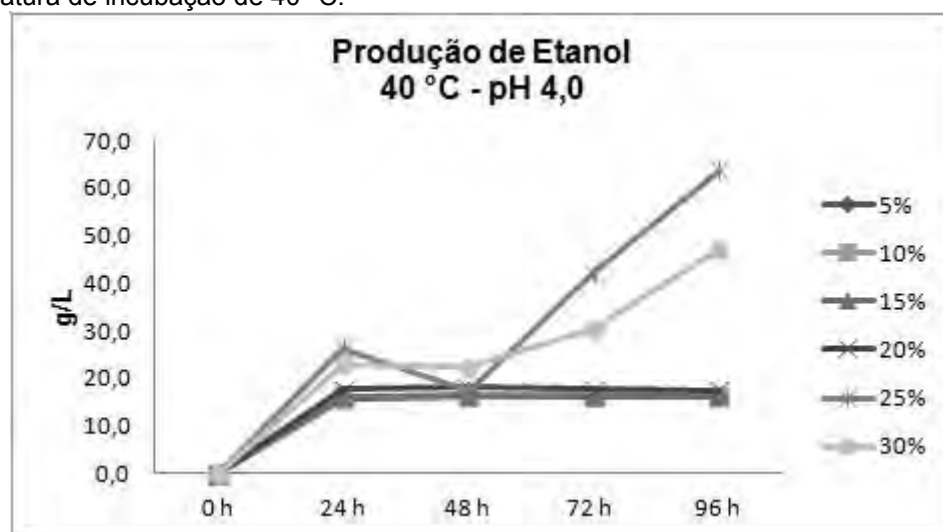


5.6.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 4,0

A figura 19 mostra a produção de etanol durante 96 horas de fermentação a 40 °C e pH inicial 4,0, com destaque para a produção máxima de 63,9 g/L de etanol, em 96 horas de fermentação, concentração de sacarose de 25%, e para a produção de 47,1 g/L de etanol também em 96 horas, com 30% de concentração de sacarose.

Nota-se que para as demais concentrações de sacarose testadas (5% a 20%) não houve produção de etanol superior a 18 g/L ao longo do processo fermentativo (figura 19).

Figura 19 – Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 4,0, na temperatura de incubação de 40 °C.



5.7 EXPERIMENTO VI: TEMPERATURA DE 40 °C, E PH INICIAL 7,0

Neste experimento foi utilizada a temperatura de 40 °C, com pH inicial 7,0, concentrações de sacarose de 5% a 30%, durante 96 horas de processo fermentativo.

5.7.1 Variação do pH a 40 °C, com pH inicial 7,0

O pH final das amostras com pH inicial 7,0 a 40 °C, variou de 7,0 a 4,5, como mostra a tabela 9.

Tabela 9 – Variação do pH final durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C.

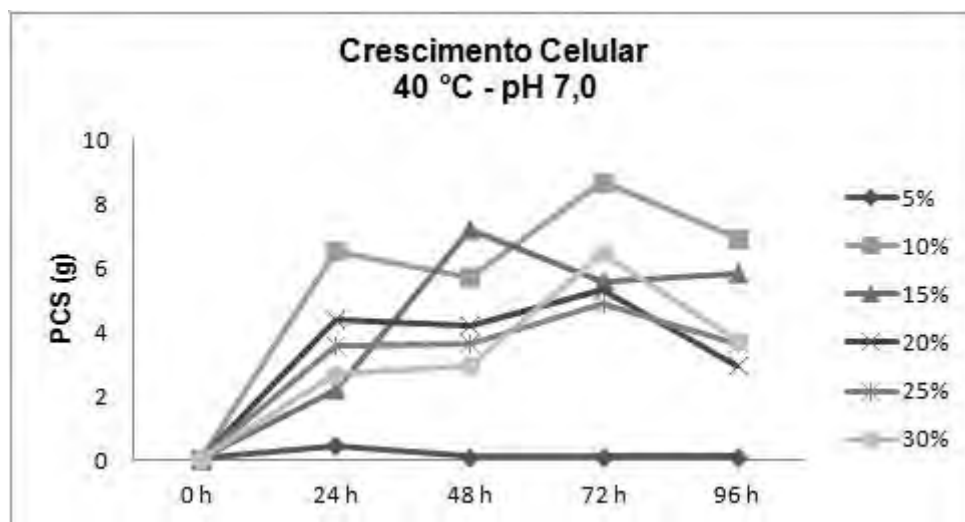
Sacarose	0 hora	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5%	7,0	5,8	5,6	5,4	5,3
10%	7,0	5,7	5,5	5,3	5,4
15%	7,0	5,2	5,2	5,3	4,8
20%	7,0	4,7	4,5	4,9	4,9
25%	7,0	4,7	4,5	4,8	4,7
30%	7,0	4,6	4,6	4,6	4,5

Nota-se que após o 1° dia de fermentação o pH diminuiu, o que pode ser devido à formação de ácidos orgânicos durante o processo fermentativo de *Z. mobilis*, e se estabiliza ao final do processo em faixa considerada ótima para o crescimento da bactéria (tabela 9).

5.7.2 Crescimento celular nas esferas e biomassa livre no meio sintético (MS) a 40 °C, com pH inicial 7,0

A figura 20 mostra o crescimento celular da bactéria dentro das esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, com pH inicial 7,0, em todas as concentrações de sacarose testadas e na temperatura controlada de 40 °C.

Figura 20 – Biomassa nas esferas de alginato durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C.



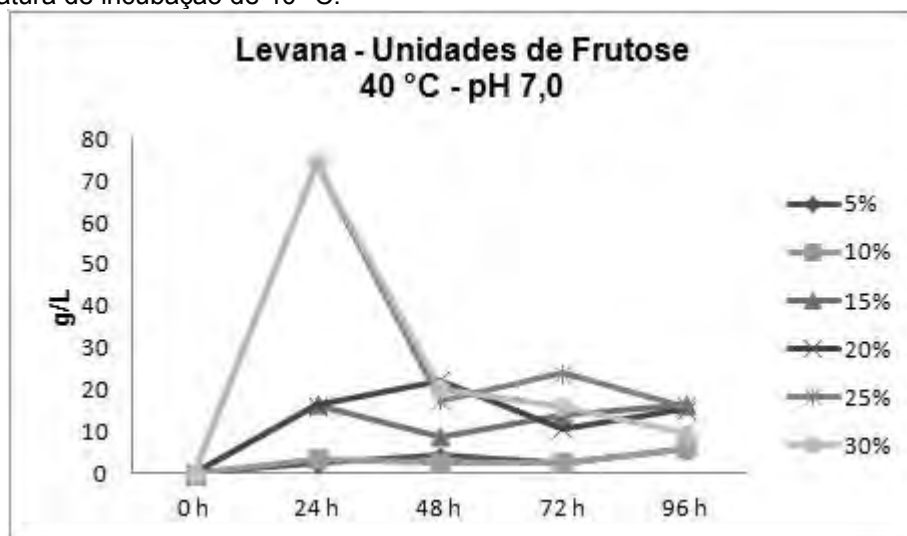
5.7.3 Produção de levana a 40 °C, com pH inicial 7,0

A figura 21 mostra a produção do biopolímero levana, por células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato na temperatura de 40 °C, pH inicial 7,0, obtendo valor máximo de 74,2 g/L em 24 horas, na concentração de 30% de sacarose.

Observa-se também na figura 21 a alta produção de levana (73,9 g/L) na concentração de 25% de sacarose, em 24 horas de fermentação. Os maiores valores para produção de levana foram obtidos nas maiores concentrações de sacarose testadas neste trabalho, assim como no trabalho de Santos e colaboradores (2011), que obteve maior produção de levana na concentração de 25% de sacarose (16,5 g/L) em 24 horas de fermentação, com células de *Z. mobilis* imobilizadas em alginato de cálcio.

No trabalho de Ernandes e García-Cruz (2011 a) a produção de levana foi similar à produção deste experimento VI (figura 21), obtendo-se 79,5 g/L de levana por células livres de *Z. mobilis*, após 72 horas de processo fermentativo, pH inicial 7,0, agitação de 200 rpm, 20% de sacarose e temperatura de incubação de 35 °C. No mesmo trabalho, os autores ainda relataram que, o aumento do pH inicial para 8,0, mantendo-se os demais parâmetros, a produção do biopolímero caiu para 4,7 g/L, provavelmente pela inibição da enzima levanasacarase, cujo pH ótimo para sua atividade está em torno de 6,5 (ERNANDES; GARCÍA-CRUZ, 2011 a).

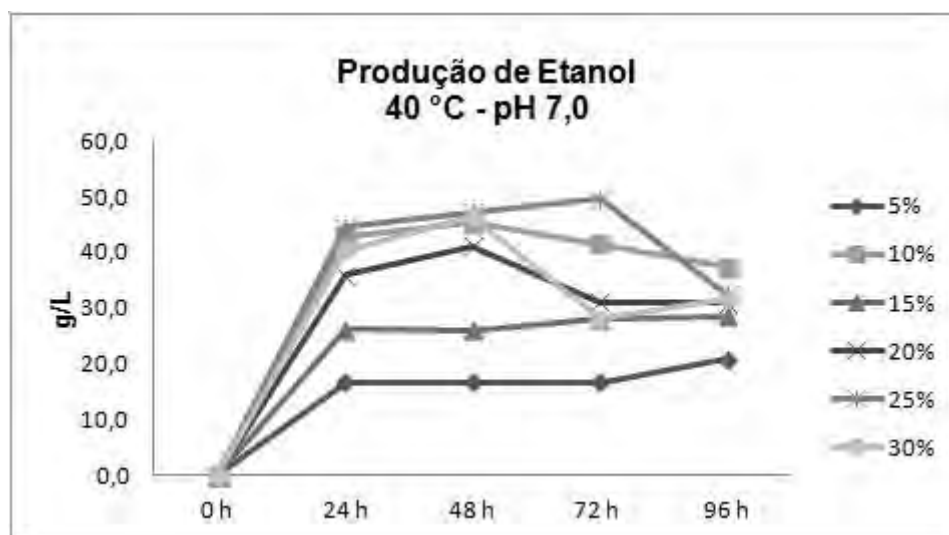
Figura 21 – Produção de levana durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C.



5.7.4 Produção de etanol a 40 °C, com pH inicial 7,0

A figura 22 mostra a produção de etanol durante processo fermentativo a 40 °C, pH inicial 7,0, com o valor máximo de 49,6 g/L de etanol em 72 horas, na concentração de sacarose de 25%.

Figura 22 – Produção de etanol durante fermentação de 96 horas, no pH inicial de 7,0, na temperatura de incubação de 40 °C.



5.8 ANÁLISE DA PRODUTIVIDADE DE ETANOL A 40 °C

A produção de etanol foi analisada em cada experimento, além dessa, foi analisada também a produtividade de etanol para todos os intervalos de

tempo de todos os experimentos deste trabalho, mostrando a velocidade de produção de etanol pela bactéria *Z. mobilis* imobilizada em esferas de alginato.

A tabela 10 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 40 °C e pH inicial 5,7, com o maior valor encontrado em 24 horas e máxima concentração de sacarose testada (30%), atingindo 1,4 g/L*h, e o menor valor, de 0,2 g/L*h, em 72 e 96 horas de fermentação em todas as concentração de sacarose testadas (5 a 30%).

Tabela 10- Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 5,7 e na temperatura de incubação de 40 °C.

pH 5,7	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	0,7	0,3	0,2	0,2
10%	0,8	0,3	0,2	0,2
15%	0,7	0,3	0,2	0,2
20%	0,7	0,4	0,2	0,2
25%	0,9	0,6	0,4	0,2
30%	1,4	0,5	0,3	0,2

A tabela 11 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 40 °C e pH inicial 4,0, com o maior valor encontrado em 24 horas e na concentração de sacarose de 25%, atingindo 1,1 g/L*h, e o menor valor, de 0,2 g/L*h, a partir do 3° dia de fermentação e nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20% de sacarose.

Tabela 11 - Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 4,0 e na temperatura de incubação de 40 °C.

pH 4,0	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	0,7	0,3	0,2	0,2
10%	0,7	0,3	0,2	0,2
15%	0,7	0,3	0,2	0,2
20%	0,7	0,4	0,2	0,2
25%	1,1	0,4	0,6	0,7
30%	1,0	0,5	0,4	0,5

A tabela 12 mostra os valores da produtividade de etanol (g/L*h) durante o processo fermentativo a 40 °C e pH inicial 7,0, com o maior valor encontrado em 24 horas e na concentração de sacarose de 25%, atingindo 1,9 g/L*h, e o menor valor, de 0,2 g/L*h, em 96 horas de fermentação e na concentração de 5% de sacarose. Resultados similares para produtividade de etanol foram

obtidos neste mesmo trabalho com a temperatura de incubação de 30 °C e no pH inicial 7,0.

Tabela 12 - Produtividade de etanol (g/L*h) durante fermentação de 96 horas, no pH inicial 7,0 e na temperatura de incubação de 40 °C.

pH 7,0	24 h	48 h	72 h	96 h
5%	0,7	0,3	0,2	0,2
10%	1,8	0,9	0,7	0,4
15%	1,1	0,5	0,4	0,3
20%	1,5	0,9	0,4	0,3
25%	1,9	1,0	0,7	0,3
30%	1,7	1,0	0,4	0,3

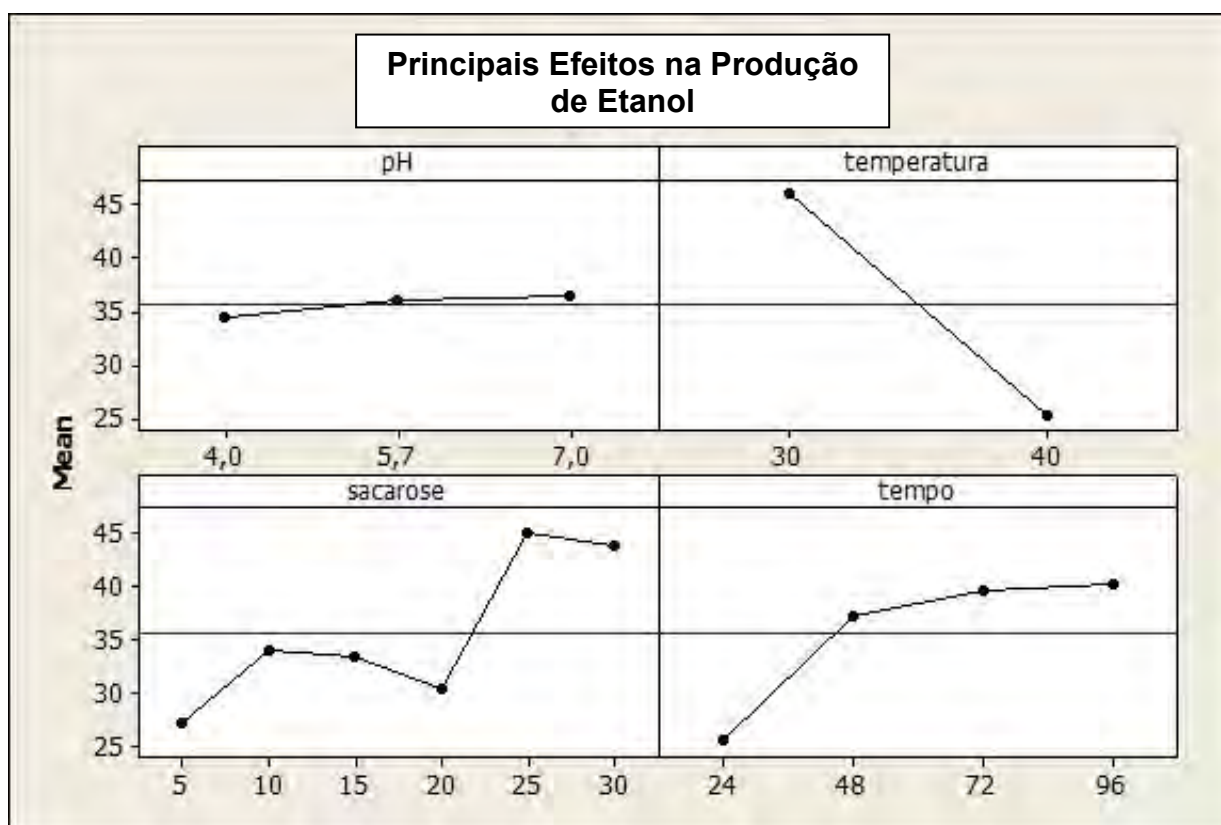
Se compararmos os valores apresentados nas tabelas 10, 11 e 12, referentes à produtividade de etanol na temperatura de 40 °C, com os valores das tabelas 4, 5 e 6, referentes à produtividade de etanol na temperatura de 30 °C, observa-se os maiores valores nas primeiras 24 horas para experimentos na menor temperatura (30 °C).

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.

A análise dos resultados e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados utilizando o programa computacional Minitab 15 Statistical Software.

A figura 23 mostra os principais efeitos na produção de etanol após todos os experimentos finalizados. Todas as variáveis testadas foram significativas ($p < 0,005$).

O pH foi a variável testada que menos influenciou na produção de etanol. Já a temperatura foi o fator determinante para a maior produção de etanol a 30 °C. Entre as concentrações de sacarose testadas, foi observada a maior produção de etanol com o aumento de 15% para 20%, e as maiores produções de etanol nas concentrações de 25% e 30%, e analisando o fator tempo, o maior aumento ocorreu entre 24 horas e 48 horas.

Figura 23 – Principais efeitos na produção de etanol.

A tabela 13 mostra os graus de liberdade, a soma de quadrados, os quadrados médios e os valores F e P para todos os fatores testados e suas combinações, onde todos foram significativos ($p < 0,005$) e a temperatura foi o fator mais que mais influenciou a produção de etanol ($F=1603,12$), seguido pela interação entre temperatura e pH ($F= 253,19$).

Os demais valores F demonstram a importância de cada uma das variáveis para a produção de etanol. Nota-se ainda o tempo como a 4ª variável mais influente e a combinação de temperatura e tempo com o 5º maior valor de valor F.

O valor de pH inicial foi a variável que menos influenciou nos resultados para produção de etanol para todos os experimentos avaliados neste trabalho ($F=5,71$).

Tabela 13 – Análise de variância do efeito do pH, da temperatura, da concentração de sacarose e do tempo, na produção de etanol por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Minitab Statistical Software).

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	P
A	2	221,6	110,8	5,71	0,004
B	1	31121,0	31121,0	1603,12	<0,001
C	5	12454,9	2491,0	128,32	<0,001
D	3	10139,6	3379,9	174,11	<0,001
A*B	2	9830,0	4915,0	253,19	<0,001
A*C	10	14148,1	1414,8	72,88	<0,001
A*D	6	4368,4	728,1	37,50	<0,001
B*C	5	1692,0	338,4	17,43	<0,001
B*D	3	9116,2	3038,7	156,53	<0,001
C*D	15	6055,0	403,7	20,79	<0,001
A*B*C	10	19410,7	1941,1	99,99	<0,001
A*B*D	6	2990,5	498,4	25,68	<0,001
A*C*D	30	12727,3	424,2	21,85	<0,001
B*C*D	15	5134,8	342,3	17,63	<0,001
A*B*C*D	30	11597,5	388,8	19,91	<0,001
Erro	144	2795,4	19,4		
Total	287	153803,1			

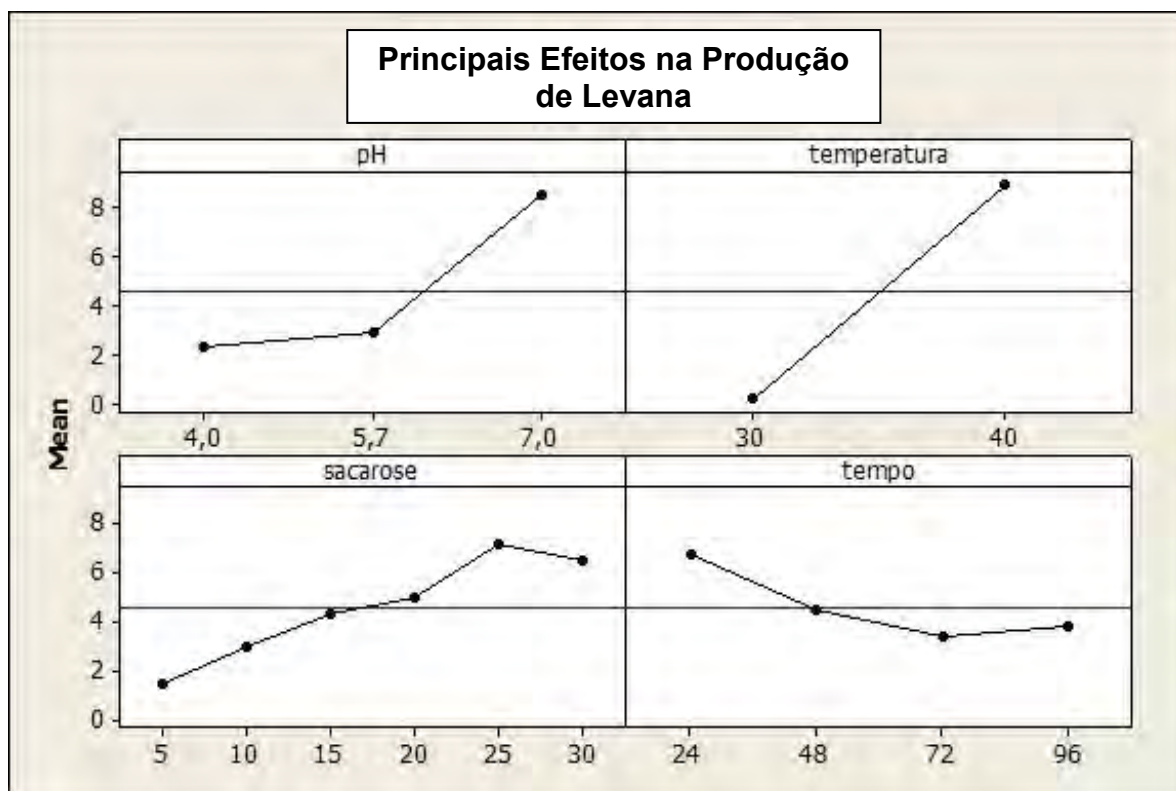
Fatores	Níveis
A = pH	4,0 – 5,7 – 7,0
B = Temperatura	30°C – 40°C
C = Concentração Sacarose	5% 10% 15% 20% 25% 30%
D = Tempo	24 h – 48 h – 72 h – 96 h

A figura 24 mostra os principais efeitos na produção de levana após todos os experimentos finalizados. Todas as variáveis testadas foram significativas ($p < 0,005$).

O tempo foi a variável testada que menos influenciou na produção de levana. Já a temperatura foi o fator determinante para a maior produção de levana a 40 °C. Entre as concentrações de sacarose testadas, foi observada a maior produção de levana com o aumento de 20% para 25%. Em relação ao tempo, a produção de levana diminuiu com o aumento do tempo do processo fermentativo.

Os menores valores para produção de levana foram encontrados no pH inicial 4,0, na concentração de sacarose de 5% e com 96 horas de processo fermentativo, a 30 °C.

Figura 24 – Principais efeitos na produção de levana.



Nota-se ainda na figura 24 a importância do pH para a produção de levana, obtendo as maiores concentrações do biopolímero quando utilizado o pH inicial 7,0. Para a produção de etanol (figura 23) o pH foi um fator menos importante.

A tabela 14 os graus de liberdade, a soma de quadrados, os quadrados médios e os valores F e P para todos os fatores testados e suas combinações, onde todos foram significativos ($p < 0,005$) e, assim como para a produção de etanol, a temperatura foi o fator mais que mais influenciou a produção de levana ($F = 46570,03$), seguido pela interação entre temperatura e pH ($F = 9895,60$).

Diferentemente da influência na produção de etanol, o pH foi o terceiro fator que mais influenciou a produção de levana, além de todos os demais fatores apresentarem valores de importância muito superiores aos valores

encontrados na tabela 13 para produção de etanol, mostrando que a combinação das variáveis testadas teve mais influência também para a produção de levana (tabela 14).

Tabela 14 – Análise de variância do efeito do pH, da temperatura, da concentração de sacarose e do tempo, na produção de levana por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis* (Minitab Statistical Software).

Fator	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F	P
A	2	2246,29	1123,14	9802,23	<0,001
B	1	5447,16	5447,16	46570,03	<0,001
C	5	1107,72	221,54	1894,07	<0,001
D	3	490,62	163,54	1398,16	<0,001
A*B	2	2314,92	1157,46	9895,80	<0,001
A*C	10	2418,00	241,80	2067,25	<0,001
A*D	6	1339,40	223,23	1908,52	<0,001
B*C	5	1043,72	208,74	1784,83	<0,001
B*D	3	458,01	152,67	1305,23	<0,001
C*D	15	971,97	64,80	553,99	<0,001
A*B*C	10	2422,42	242,24	2071,03	<0,001
A*B*D	6	1335,26	222,54	1902,62	<0,001
A*C*D	30	2727,93	90,93	777,41	<0,001
B*C*D	15	974,7	64,98	555,54	<0,001
A*B*C*D	30	2758,96	91,97	786,25	<0,001
Erro	144	16,84	0,12		
Total	287	28073,91			

Fatores	Níveis
A = pH	4,0 – 5,7 – 7,0
B = Temperatura	30°C - 40°C
C = Concentração Sacarose	5% 10% 15% 20% 25% 30%
D = Tempo	24 h – 48 h – 72 h – 96 h

6 CONCLUSÕES

As condições para produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* imobilizadas em alginato são diferentes. A temperatura de 30 °C favoreceu a maior produção de etanol e a temperatura de 40 °C favoreceu a maior produção de levana.

O pH inicial 4,0 favoreceu o crescimento celular nos experimentos realizados na temperatura de 30 °C, e o pH inicial 5,7 favoreceu o crescimento celular na temperatura de 40 °C.

A concentração de 5% de sacarose promoveu os menores valores para a produção de levana, produção de etanol e crescimento celular em todos os experimentos realizados; e as concentrações de sacarose acima de 15% favoreceram em geral a produção de etanol, a produção de levana e o crescimento celular, com destaque para a concentração de sacarose que, além de não inibir o crescimento de *Zymomonas mobilis*, proporcionou a maior produção de etanol.

O alginato, utilizado como suporte para imobilização celular de *Zymomonas mobilis* neste trabalho, foi eficiente e satisfatório, com a maior parte do crescimento da biomassa aprisionada nas esferas.

Os maiores valores para síntese de levana foram verificados nas primeiras 24 horas de processo fermentativo, e para síntese de etanol, após 48 horas.

A maior produtividade de etanol foi de 2,7 g/L*h no experimento realizado com pH inicial 5,7; concentração de sacarose 30%, 48 horas de fermentação e na temperatura de incubação de 30 °C.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, E. M. B. et al. Fermentation capacity of *Saccharomyces cerevisiae* cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 52, n. 4, p. 819-824, 2009.

ASSIS, T. F. et al. Produção de levana por *Erwinia herbicola* em diferentes condições de cultivo. In: ENCONTRO DE BOLSISTAS DO PROGRAMA DE APOIO A AÇÕES AFIRMATIVAS PARA INCLUSÃO SOCIAL, 3., 2008, Londrina. **Anais...** Londrina, 2008.

BEKERS, M. et al. 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.

_____. et al. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment. **Process Biochemistry**, London, v. 36, p. 979-986, 2001.

BOFO, D. C. S. **Caracterização de levanasacarase produzida por *Zymomonas mobilis* CCT 4494 em meio de cultura contendo sacarose.** 2009. 90 f. Dissertação (Mestrado)—Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

BORSARI, R. R. J. et al. Influence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 604-609, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do agronegócio.** Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

CALAZANS, G. M. T. et al. Application of fractional factorial design to levain production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, p. 45-51, 2007.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Biocatalizadores imobilizados: uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, ano IX, n. 36, p. 48-57, 2006.

_____. et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 3: Polissacarídeos e enzimas. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 20, p. 32-41, 2005/2006.

CHANG, C. C.; TSENG, S. K. Immobilization of *Alcaligenes eutrophus* using PVA crosslinked with sodium nitrate. **Biotechnology Techniques**, Kew, v. 12, p. 865-867, 1998.

CHHATRI, A. et al. Cryogenic fabrication of savlon loaded macroporous blends of alginate and polyvinyl alcohol (PVA). Swelling, deswelling and antibacterial behaviors. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 83, p. 876-882, 2011.

COVIZZI, L. G. et al. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. Tese (Doutorado)–Escola de Engenharia, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

_____. et al. Uso de células imobilizadas em gel de PVA: uma nova estratégia para produção biotecnológica de Xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 61-70, 2005.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

_____. et al. Carboxymethylcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipases immobilization. **Process Biochemistry**, London, v. 40, p. 2677-2682, 2005.

DONOT, F. et al. Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics and extraction. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, n. 2, p. 951-962, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.08.083>>. Acesso em: 22 jan. 2012.

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

ERNANDES, F. M. P. G. **Produção de levana por *Bacillus subtilis* e *Zymomonas mobilis* utilizando três meios sintéticos e um alternativo (caldo de cana-de-açúcar)**. 2006. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2006.

_____. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. 147 f. Tese (Doutorado)–Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2009.

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

_____; GARCIA-CRUZ, C. H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 26, n. 1, p. 69-80, 2005.

_____; _____. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009a.

_____; _____. Nutritional requirements of *Zymomonas mobilis* CCT 4494 for levan production. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 54, n. 3, p. 589-600, 2011a.

_____; _____. Uso de caldo de cana-de-açúcar para produção de levana por *Zymomonas mobilis* CCT4494. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 354-360, 2011b.

_____; _____. *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 30, n. 4, p. 889-908, 2009b.

GARCIA-CRUZ, C. H. Uso de hidrocolóides em alimentos: revisão. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 87, p. 19-29, 2001.

_____; FOGGETTI, U.; SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

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

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 134-143, 2008.

KOUVELIS, V. N. et al. Complete genome sequence of the ethanol producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 191, n. 22, p. 7140-7141, 2009.

LORENZETTI, M. F. S.; MORO, M. R.; GARCÍA-CRUZ, C. H. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* imobilizadas em sistema híbrido alginato de sódio/álcool polivinílico. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 23., 2011. **Anais...** São José do Rio Preto, 2011.

MOLLICA, G. et al. Characterization of insoluble calcium alginates by solid-state NMR. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 87, p. 383-391, 2012.

MOHAMMADI, A. et al. Comparison between sugar consumption and ethanol production in wort by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces ludwigii* and *Saccharomyces rouxii* on brewer's spent grain. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, p. 605-615, 2011.

MORO, M. R. et al. Adaptação da técnica para análise de levana produzida por células imobilizadas de *Zymomonas mobilis*. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., 2011. Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul, 2011.

MÜLLER, J. M.; SANTOS, R. L.; BRIGIDO, R. V. Produção de alginato por microrganismos. **Polímeros**, São Carlos, v. 21, n. 4, p. 305-310, 2011.

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

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

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

SANTANA, L. N. S. et al. Estudo cinético da produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* imobilizado em alginato de sódio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, 2009.

SANTOS, V. A. Q. et al. Biossíntese de levana por células de *Zymomonas mobilis* CCT4494 imobilizadas em alginato de cálcio. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 18., Caxias do Sul. **Anais...** Caxias do Sul, 2011.

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

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. et al. Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, p. 889-893, 1981.

SOMOGYII, M. Notes on sugar determination. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 195, p. 19-23, 1952.

SOUZA, D. M.; GARCIA-CRUZ, C. H. Produção fermentativa de polissacarídeos extracelulares por bactérias. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 25, n. 4, p. 331-340, 2004.

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.

TOMA, M. M. et al. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**, London, v. 38, p. 1347-1350, 2003.

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

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.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. (Ed.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. cap. 4, p. 35-86.

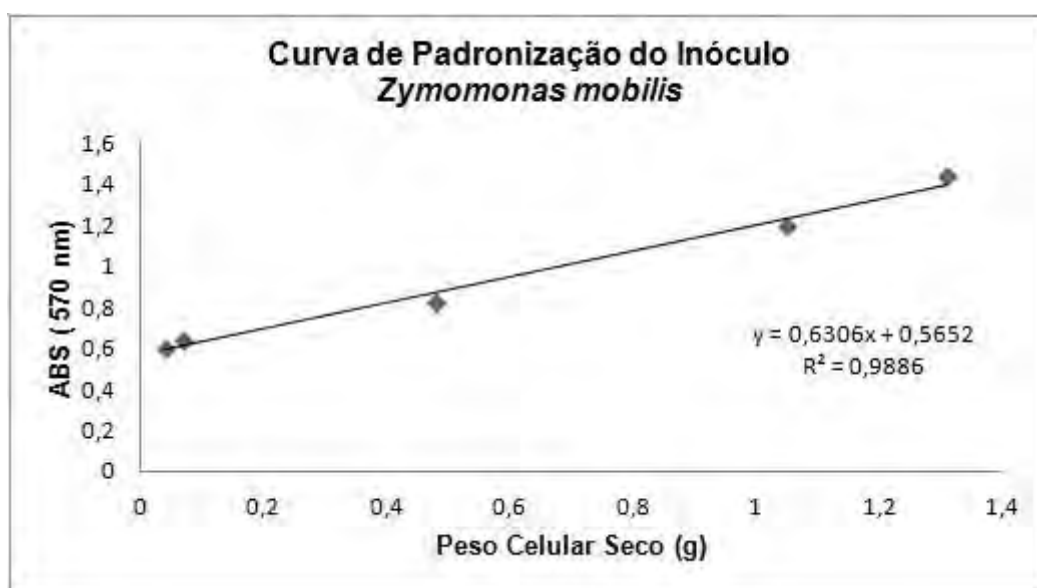
ZIKMANIS, P. et al. Hydrophobicity of bacteria *Zymomonas mobilis* under varied environmental conditions. **Process Biochemistry**, London, v. 42, p. 745-750, 2007.

APÊNDICES

Apêndice 1A – Valores da absorbância de suspensões de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 a 570 nm, após pré-fermentação a 30 °C, por 72 horas em shaker (incubadora refrigerada) sem agitação, utilizando CZM.

Diluição	Peso Celular Seco (PCS) (g)	ABS (570 nm)
2x	1,31	1,435
3x	1,05	1,191
5x	0,48	0,823
7,5x	0,07	0,635
9x	0,04	0,602
15x	0,02	0,313
20x	0,01	0,246

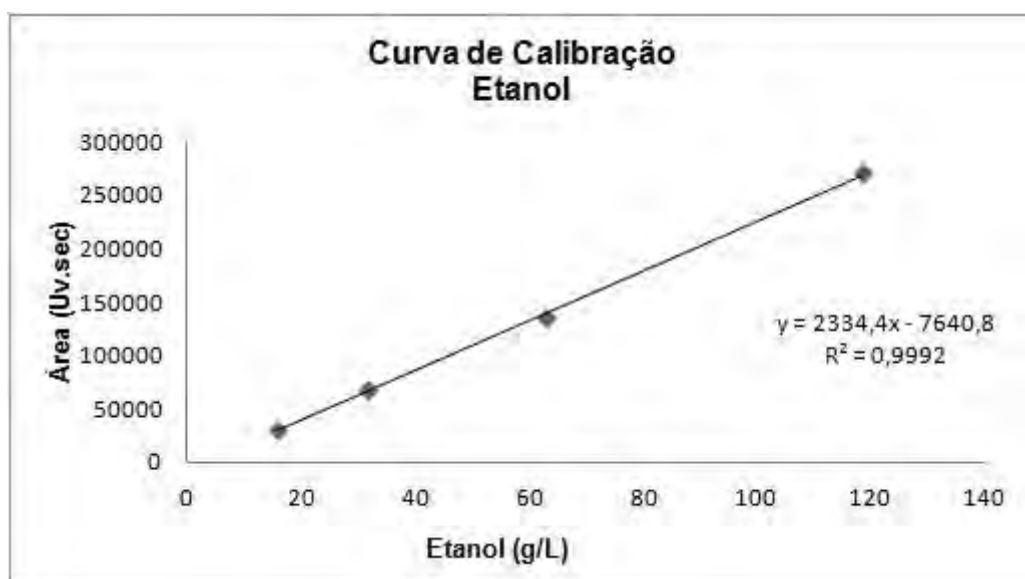
Apêndice 2A – Curva de calibração da concentração celular para padronização do inóculo de *Zymomonas mobilis* CCT 4494, obtida a partir da absorbância de suspensões celulares após pré-fermentação a 30 °C, por 72 horas em shaker (incubadora refrigerada) sem agitação, utilizando CZM.



Apêndice 3A – Áreas dos picos do cromatograma da análise de soluções-padrão de etanol, obtidas por cromatografia gasosa.

Diluição	Etanol (g/L)	Área (Uv.sec)
2%	15,78	29734,31
4%	31,56	68112,07
8%	63,12	135433,3
15%	118,35	270281,1

Apêndice 4A – Curva de calibração obtida a partir da análise de soluções-padrão de etanol, por cromatografia gasosa.



Apêndice 5A – Valores da absorbância a 540 nm obtidas de amostras contendo diferentes concentrações de glicose para confecção da curva de calibração pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

Concentração de Glicose (g/L)	ABS (540 nm)
0,02	0,115
0,03	0,189
0,04	0,242
0,06	0,395
0,07	0,485
0,08	0,557
0,1	0,705
0,12	0,847

Apêndice 6A– Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de glicose pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).

