



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Juliana Ferreira

**Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde
por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***

**São José do Rio Preto
2017**

Juliana Ferreira

**Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde
por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***

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

Financiadora: CAPES - DS

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto
2017

Ferreira, Juliana.

Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus* / Juliana Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2017

117 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Bioetanol – Indústria. 3. Resíduos industriais. 4. Lignocelulose. 5. Biomassa. 6. *Zymomonas mobilis*. 7. Levedos – Cultura e meios de cultura. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

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

Juliana Ferreira

**Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde
por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***

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

Financiadora: CAPES - DS

COMISSÃO EXAMINADORA

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

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

Prof. Dr. Mauricio Boscolo
UNESP - São José do Rio Preto

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCAR - Araras

Prof. Dr. Dr. Harvey Alexander Villa Vélez
UFMA- São Luiz

São José do Rio Preto
24 de março de 2017

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz por abrir as portas do seu laboratório e aceitar-me como sua aluna desde o Mestrado, pelos ensinamentos, pela confiança, paciência, transmissão de tranquilidade e amizade.

Aos estagiários Adriano, Amanda e Aline pela colaboração nas análises desse trabalho, pela troca de conhecimentos, além da nossa amizade e alegria compartilhada.

Aos meus pais, Anizio e Nida, por nunca terem medido esforços para a minha formação. Ao meu irmão, Fernando, minha cunhada, Mariana, e meus sobrinhos Ana Beatriz e João Pedro por serem meu ponto de apoio.

Ao meu namorado, Nivaldo, pelo companheirismo, incentivo e compressão pelas vezes que precisei me ausentar em função do doutorado.

À todas as doutorandas, mestrandas e estagiários do laboratório de biopolímeros, agradeço por toda ajuda.

Aos professores, Dr. Mauricio Boscolo e Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, os quais fizeram parte da banca de qualificação e muito contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, membros da banca de defesa, que gentilmente aceitaram o convite para avaliar este trabalho.

À todos os funcionários da seção de Pós-graduação do IBILCE e do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e auxílio prestados.

À técnica de laboratório, Tânia, por todo apoio, estando sempre disposta a colaborar com a execução do trabalho.

À todas as minhas amigas “adquiridas” em Rio Preto, Ana Karla e Família, Cíntia, Juliana, Lady, Luana, Michelle Coimbra, Michele Menis, Natalia, Vidiany e Tatiane, vocês tornaram tudo mais fácil e feliz.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

As crises no fornecimento de petróleo, a possibilidade de sua escassez, instabilidade dos preços e, principalmente, os efeitos negativos ao meio ambiente, aumentaram, nos últimos anos, o interesse pela procura de fontes alternativas para produção de energia. A possibilidade de produzir etanol a partir de resíduos lignocelulósicos é um grande atrativo para os pesquisadores, pois reduziria a necessidade em aumentar as áreas plantadas para incremento da produção, a competição direta com a produção de alimentos e o custo de matéria-prima. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção de etanol por culturas individuais e co-culturas de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus* usando cascas de banana, maracujá e coco verde hidrolisadas. O pré-tratamento ácido, seguido de hidrólise enzimática das cascas de banana, maracujá e coco, promoveram a liberação de 74,1, 87,2 e 13,4 g L⁻¹ de açúcares totais, respectivamente. Foram avaliadas três concentrações de substrato (5, 10 e 15%) e três pH iniciais dos meios de fermentação (4,5; 5,0 e 5,5). Nas fermentações com a bactéria *Z. mobilis*, com os três resíduos avaliados, foi verificado que o substrato mais concentrado não contribuiu para um aumento significativo da produção de etanol. Além disso, a maior concentração do produto foi de 2,9 g L⁻¹, obtido nas fermentações de cascas de banana hidrolisadas com concentração de 5%. Já nas fermentações com a levedura *P. tannophilus*, as maiores produções de etanol foram determinadas utilizando hidrolisado de cascas de maracujá com concentração de sólidos de 10%, proporcionando a produção de 10 g L⁻¹ de etanol. E a associação da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *P. tannophilus*, no processo de co-cultura, mostrou potencial para a fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos. O sistema de inoculação que apresentou melhores resultados foi aquele no qual a bactéria foi inoculada no início do processo, e depois de 7 h de fermentação, a levedura foi inoculada. Além do mais, os melhores resultados obtidos com esse sistema foram os das fermentações com cascas de banana hidrolisadas, sendo determinada concentração 11,3 g L⁻¹ de etanol.

Palavras-Chaves: etanol, co-fermentação, resíduos lignocelulósicos, hidrolisados, bactéria, levedura.

ABSTRACT

Crises in oil supply, the possibility of their scarcity, price instability and, especially, the negative effects to the environment have increased the interest in alternative sources for energy production, in recent years. The possibility of producing ethanol from lignocellulosic residues is a great attractive to the researchers, because it would reduce the need for increasing the planted areas to increase production, the direct competition with food production and the high costs of raw materials. In this context, the objective of this work was to study the ethanol production by individual cultures and co-cultures of *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus* using banana, passion fruit and coconut peels hydrolysate. The acid pretreatment, followed by enzymatic hydrolysis of banana, passion fruit and coconut peels promoted the liberation of 74.1, 87.2 and 13.4 g L⁻¹ of total sugars, respectively. Three substrate concentrations (5, 10 and 15%) and three initial pH of fermentation media (4.5; 5.0 and 5.5) were evaluated. In the fermentations with *Z. mobilis* bacteria, using the three residues, it was found that the most concentrated substrate did not contribute to a significant increase in ethanol production. In addition, the highest product concentration was 2.9 g L⁻¹, obtained in hydrolysed banana peels fermentations at 5% concentration. In the fermentations with yeast *P. tannophilus*, the highest ethanol yields were determined using passion fruit peel hydrolysates at 10% solids concentration, providing the ethanol production of 10 g L⁻¹. And the association of *Z. mobilis* bacteria and *P. tannophilus* yeast, in the co-culture process, showed potential for the lignocellulosic hydrolysates fermentation. The inoculation system that showed the best results was the one in which the bacterium was inoculated at the beginning of the process, and after 7 h of fermentation, the yeast was inoculated. Moreover, the best results obtained with this system were those with hydrolysed banana peels fermentations, with 11.3 g L⁻¹ of ethanol concentration.

Keywords: ethanol, co-fermentation, lignocellulosic residues, hydrolysate, bacteria, yeast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da celulose.....	24
Figura 2 – Estrutura molecular da hemicelulose.....	25
Figura 3 – Estrutura molecular da lignina.....	26
Figura 4 – Estrutura do coco.....	32
Figura 5 – Metabolismo dos carboidratos em <i>Z. mobilis</i>	35
Figura 6 – Fluxograma da via metabólica de glicose e xilose em leveduras xilose-fermentadoras.....	37
Figura 7 – Fluxograma com os fatores avaliados na produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> CCT 4494.....	46
Figura 8 – Fluxograma com os fatores avaliados na produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> CCT 1891.....	47
Figura 9 – Liberação de Açúcares Totais (AT) durante a hidrólise enzimática de cascas de banana pré-tratadas.....	51
Figura 10 – Liberação de Açúcares Totais (AT) durante a hidrólise enzimática de cascas de maracujá pré-tratadas.....	52
Figura 11 – Cascas de coco verde, trituradas e desidratadas.....	53
Figura 12 – Avaliação do açúcar residual (g L^{-1}) e da produção de etanol, durante a fermentação de glicose por <i>Z. mobilis</i> , incubada a 30°C, sem agitação, por 12 h.....	56
Figura 13 – Relação entre pH final e crescimento celular de <i>Z. mobilis</i> na fermentação da glicose, incubada a 30°C, sem agitação, por 12 h.....	57
Figura 14 – Produção de etanol pela levedura <i>P. tannophilus</i> , por 24 h, durante o processo de fermentação estática e com agitação de 100 rpm, incubada a temperatura de 30°C utilizando glicose como substrato do meio sintético.....	60

Figura 15 – Crescimento celular da levedura <i>P. tannophilus</i> durante 24 h de fermentação utilizando glicose com substrato do meio sintético, incubada a 30°C, com agitação de 100 rpm e sem agitação.....	61
Figura 16 - Determinação do pH final da fermentação utilizando glicose com substrato do meio sintético, pela levedura <i>P. tannophilus</i> durante 24 h, incubada a 30°C, com agitação de 100 rpm e sem agitação.....	61
Figura 17 – Produtividade de etanol da levedura <i>P. tannophilus</i> para os dois ensaios realizados, com agitação de 100 rpm e sem agitação, incubada a 30°C por 24 h.....	62
Figura 18 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> , incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	64
Figura 19 – Efeito do pH inicial e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de banana usado como substrato sobre a produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> , incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	66
Figura 20 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de maracujá usado como substrato na produção de etanol pela bactéria <i>Z. mobilis</i> , incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	68
Figura 21 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol pela bactéria <i>Z. mobilis</i> , incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	71
Figura 22 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> , incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	74
Figura 23 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de banana usado como substrato na produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> , incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	76
Figura 24 – Efeito do pH inicial e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> , incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	78

Figura 25 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol por <i>P. tannophilus</i> , incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	80
Figura 26 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	82
Figura 27 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de banana usado como substrato na produção de etanol empregando a co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	84
Figura 28 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol, empregando a co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	87
Figura 29 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	89
Figura 30 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 2), incubada a 30°C, sob agitação de 100 rpm.....	91
Figura 31 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de banana usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 2), incubada a 30°C, sob agitação de 100 rpm.....	94
Figura 32 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 2), incubada a 30°C, sob agitação de 100 rpm.....	96

Figura 33 – Produção de etanol e açúcares residuais da fermentação do meio sintético, usando glicose como substrato, conduzida em biorreator por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, agitação de 100 rpm, por 96 h.....98

Figura 34 – Produção de etanol e açúcares residuais apresentados na fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana, conduzida em biorreator, empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C, agitação de 100 rpm, por 72 h.....100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Enzimas e dosagens recomendadas e empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática das cascas de banana, maracujá e coco verde.....	40
Tabela 2 – Meio de manutenção do micro-organismo <i>P. tannophilus</i> CCT 1891.....	42
Tabela 3 – Meio de manutenção do micro-organismo <i>Z. mobilis</i> CCT 4494.....	42
Tabela 4 – Composição do Meio Sintético.....	44
Tabela 5 – Concentração de Sólidos Totais (ST) e Compostos Fenólicos (CF) determinados antes e após o tratamento de detoxificação do hidrolisado das cascas de banana, maracujá e coco.....	54
Tabela 6 – pH final, biomassa, substrato consumido e concentrações de etanol determinadas durante a avaliação da influência da agitação na produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> , utilizando glicose como substrato do meio sintético, durante 7 h, a 30°C.....	58
Tabela 7 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação da glicose utilizada como substrato do meio sintético por <i>Z. mobilis</i> , a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	65
Tabela 8 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação no meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por <i>Z. mobilis</i> , a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	67
Tabela 9 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá por <i>Z. mobilis</i> , a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	69
Tabela 10 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de coco por <i>Z. mobilis</i> , a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.....	72
Tabela 11 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação da glicose usada como substrato do meio sintético por <i>P. tannophilus</i> , a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	75

Tabela 12 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por <i>P. tannophilus</i> , a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	77
Tabela 13 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá por <i>P. tannophilus</i> , a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	79
Tabela 14 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de coco por <i>P. tannophilus</i> , a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	81
Tabela 15 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação glicose usada como substrato do meio sintético por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	83
Tabela 16 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	85
Tabela 17 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo caldo hidrolisado de cascas de maracujá por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	88
Tabela 18 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo caldo hidrolisado de cascas de coco, por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 1), a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.....	90
Tabela 19 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação da glicose usada como substrato do meio sintético, por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 2), a 30°C e agitação de 100 rpm.....	92
Tabela 20 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por co-cultura de <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> (Co-cultura 2), a 30°C e agitação de 100 rpm.....	95

Tabela 21 – Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), a 30°C e agitação de 100 rpm.....97

Tabela 22 – Valores médios de biomassa (g L^{-1}), açúcares totais (g L^{-1}), produtividade e rendimento da fermentação utilizando glicose como substrato do meio sintético, realizada em fermentador de 5 L, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), a 30°C, agitação de 100 rpm, por 96 h.....99

Tabela 23 – Valores médios de biomassa (g L^{-1}), açúcares totais (g L^{-1}), produtividade e rendimento da fermentação realizada com meio composto por hidrolisado de cascas de banana, em fermentador de 5 L, empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), a 30°C, agitação de 100 rpm, por 72 h.....101

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	21
2.1 Geral.....	21
2.2 Específicos	21
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1 Etanol.....	22
3.2 Biomassa lignocelulósica.....	23
3.3 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos	26
3.3.1 Pré-tratamento	26
3.3.2 Hidrólise enzimática.....	28
3.4 Detoxificação	28
3.5 Casca de banana.....	29
3.6 Casca de maracujá	30
3.7 Casca de coco verde.....	31
3.8 Micro-organismos	33
3.8.1 <i>Zymomonas mobilis</i>	33
3.8.2 Micro-organismos fermentadores de pentoses.....	36
3.8.3 <i>Pachysolen tannophilus</i>	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 Matéria-prima	39
4.1.1 Preparo da matéria-prima	39
4.2 Pré-tratamento da biomassa	39
4.3 Hidrólise enzimática da biomassa.....	40
4.4 Detoxificação	41
4.5 Micro-organismos	41

4.5.1 Meio de manutenção	41
4.5.2 Preparo do pré-inóculo	42
4.5.3 Pré-fermentação	42
4.5.4 Padronização do inóculo	43
4.6 Meios de fermentação	43
4.6.1 Meio sintético.....	43
4.6.2 Meio contendo os hidrolisados lignocelulósicos.....	44
4.7 Condições de fermentação	44
4.7.1 Testes preliminares.....	44
4.7.1.1 Parâmetros cinéticos da bactéria <i>Z. mobilis</i>	44
4.7.1.2 Parâmetros cinéticos da levedura <i>P. tannophilus</i>	45
4.7.2 Parâmetros das fermentações	45
4.8 Co-cultura	48
4.9 Métodos analíticos	48
4.9.1 Determinação dos sólidos totais.....	48
4.9.2 Determinação do pH final	48
4.9.3 Determinação da concentração celular.....	48
4.9.4 Determinação de etanol.....	49
4.9.5 Determinação de açúcares totais (AT)	49
4.9.6 Determinação de açúcares redutores (AR).....	49
4.9.7 Determinação dos teores de compostos fenólicos.....	49
4.10 Análises estatísticas	50
4.11 Parâmetros de fermentação	50
4.11.1 Fator de conversão do substrato em etanol	50
4.11.2 Produtividade em etanol	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Ensaio de hidrólise	51

5.1.1 Cascas de banana.....	51
5.1.2 Cascas de maracujá	52
5.1.3 Casca de coco	53
5.1.4 Detoxificação	54
5.2 Ensaio de fermentação.....	55
5.2.1 Parâmetros cinéticos da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	55
5.2.2 Parâmetros cinéticos da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	59
5.3 Fermentações com a bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	62
5.3.1 Meio sintético.....	63
5.3.2 Hidrolisado de casca de banana	65
5.3.3 Hidrolisado de casca de maracujá	68
5.3.4 Hidrolisado de casca de coco	70
5.4 Fermentações com a levedura <i>P. tannophilus</i>	73
5.4.1 Meio sintético.....	73
5.4.2 Hidrolisado de casca de banana	75
5.4.3 Hidrolisado de casca de maracujá	77
5.4.4 Hidrolisado de casca de coco	79
5.5 Ensaio de Co-cultura	81
5.5.1 Co-cultura <i>Z. mobilis</i> e <i>P. tannophilus</i> inoculados juntos no início da fermentação (Co-cultura 1).....	82
5.5.1.1 Meio sintético.....	82
5.5.1.2 Hidrolisado de casca de banana	84
5.5.1.3 Hidrolisado de Casca de maracujá	86
5.5.1.4 Hidrolisado de Casca de coco	88
5.5.2 Co-cultura de <i>Z. mobilis</i> inoculada no início e <i>P. tannophilus</i> inoculada depois de 7 h de fermentação (Co-cultura 2).....	90
5.5.2.1 Meio Sintético	90

5.5.2.2 Hidrolisado de Casca de banana.....	93
5.5.2.3 Hidrolisado de Casca de maracujá	95
5.6 Fermentações em biorreator.....	97
5.6.1 Meio Sintético	98
5.6.2 Casca de Banana.....	100
6 CONCLUSÕES.....	103
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
ANEXOS	112
APÊNDICES	113

1 INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis têm sido objeto de grande interesse nos últimos anos, uma vez que sua utilização contribui para reduzir a emissão de gases ligados ao efeito estufa e, portanto, para a mitigação do aquecimento global. Além disso, seu uso poderia constituir uma das alternativas ao petróleo, cuja oferta mundial deverá sofrer consideráveis restrições no futuro próximo.

O termo biocombustível refere-se a combustíveis líquidos ou gasosos com aplicação no setor de transporte e predominantemente produzidos de biomassa. Dentre os principais combustíveis produzidos a partir destes recursos naturais, pode-se destacar o etanol.

No entanto, os biocombustíveis enfrentam uma limitação fundamental na sua produção: originam-se, em geral, de plantações que exigem áreas de cultivo extensas. Para amenizar esse problema, têm se desenvolvido processos biotecnológicos que permitem a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica, abundantemente geradas nos setores agrícolas e florestais.

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores agrícolas do mundo e, em consequência disso, gera grandes quantidades de resíduos agroindustriais. Dentre os possíveis usos desses resíduos (cascas, folhas, bagaço e palhas), pode-se destacar sua aplicação como biomassa para a produção de Bioetanol de Segunda Geração.

A produção de bioetanol, com base na biomassa lignocelulósica, utiliza processos químicos (empregando bases ou ácidos) e biológicos (empregando enzimas), para a quebra de moléculas de celulose e hemicelulose e liberação de açúcares, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos. Entretanto, não há um único micro-organismo que possa converter, eficientemente, os açúcares (hexoses e pentoses) contidos nos hidrolisados hemicelulósicos, para isso o processo fermentativo requer micro-organismos fermentadores de hexoses e pentoses, em particular da xilose. O emprego da “Co-cultura” é uma opção bastante interessante, pois utiliza dois micro-organismos simultaneamente em um único sistema de fermentação. Pode-se utilizar um fermentador de hexoses, como a bactéria *Zymomonas mobilis*, que apresenta grande potencial industrial para a produção de etanol, e, ao mesmo tempo, um fermentador de pentoses.

Os micro-organismos naturalmente capazes de fermentar pentoses incluem algumas linhagens de leveduras como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Spathaspora arborariae* e *Pachysolen tannophilus*. Dentre essas espécies, a *P. tannophilus* tem recebido grande

destaque por apresentar altos rendimentos na produção de etanol a partir da fermentação de xilose.

Com base nos argumentos anteriores ressalta-se a importância do estudo de co-cultura para melhorar o rendimento fermentativo e posterior produção de etanol através do uso de resíduos lignocelulósicos e co-culturas de micro-organismos, bactérias e leveduras.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a produção de etanol por co-culturas de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* a partir de hidrolisados hemicelulósicos, usando cascas de banana, maracujá e coco verde.

2.2 Específicos

- Avaliar o efeito da hidrólise enzimática nas cascas de banana, maracujá e coco verde a serem utilizados como substrato;
- Estudar a produção de etanol com culturas puras de *Z. mobilis* e *P. tannophilus*;
- Estudar a produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus*;
- Avaliar a produção de etanol utilizando meio sintético e caldo hidrolisado obtido de cascas de banana, maracujá e coco verde, pelo estudo dos efeitos dos seguintes parâmetros: pH e diferentes concentrações de substrato;
- Utilizar os melhores parâmetros para ampliação da escala de produção de etanol.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Etanol

A produção de biocombustíveis foi insignificante até o fim da década de 1970. De fato, o etanol era, até esse período, utilizado essencialmente como insumo para as indústrias de bebidas e alguns segmentos da indústria química. A totalidade da produção mundial de etanol – quase todo destinado a usos não energéticos equivalia a menos de um milésimo da extração de petróleo. Este panorama mudou sensivelmente com a implantação pelo Governo Brasileiro, em 1975, do Programa Nacional do Álcool – Proálcool (ROSA; GARCIA, 2009). Em resposta às crises do petróleo nos anos 70 e 80, foram feitas diversas tentativas em todo o mundo para substituir derivados do petróleo por fontes renováveis. A única experiência de grande porte, com êxito, foi o uso energético da cana-de-açúcar, no Brasil. O Proálcool provocou o primeiro grande impacto no setor sucroalcooleiro brasileiro, gerando a primeira grande onda transformista.

O Proálcool teve por objetivo criar uma fonte alternativa de combustível para veículos providos de motor a explosão com ciclo Otto, e fomentar a criação de empregos no Brasil. Este programa, apesar de suas falhas, injetou considerável soma de capital no setor, fomentando o início do desenvolvimento tecnológico em todos os segmentos econômicos relacionados com a produção de álcool a partir da cana-de-açúcar, principalmente (SOARES; ROSSELL, 2007).

Em apenas dez anos o álcool já superava a gasolina como combustível automotivo, e reduzia o impacto na balança comercial de dezenas de bilhões de dólares. Isto exigiu transformações radicais do mercado consumidor, do setor produtivo e de logística para introduzir em todo o território um novo combustível líquido. Investimentos em desenvolvimento tecnológico aumentaram a produtividade agrícola e industrial. Melhorou, também, a eficiência de conversão do caldo da cana em álcool, que se aproxima dos limites teoricamente possíveis (ERBER; HOLLANDA, 2007).

Após um período de estagnação de cerca de 15 anos, motivada, essencialmente, pela queda dos preços do petróleo, a produção mundial de etanol voltou a crescer acentuadamente. Um dos fatores que explicam esse crescimento foi, a partir de 2003, a introdução dos veículos com motor flex no Brasil (ROSA; GARCIA, 2009).

Mais recentemente, a percepção do risco de catástrofes climáticas provocadas pelo aquecimento global propiciou grande aumento na demanda por biocombustíveis. Tal aumento

se manifesta, principalmente, pela introdução ou aumento de metas de utilização de combustíveis de origem orgânica em diferentes países (ROSA; GARCIA, 2009).

O novo conceito de etanol (ou bioetanol) corresponde a sua fabricação utilizando como matéria-prima a biomassa lignocelulósica. Essas matérias-primas provenientes de sobras e resíduos de produtos naturais (como o sabugo e a palha do milho, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar, cascas de frutas, entre outros) são fundamentais para a expressiva ampliação pretendida da produção de etanol, que hoje esbarraria em limitações para expansão da área plantada, seja por competir com a produção de alimentos, seja pelo nível de seus preços relativos frente ao petróleo e aos próprios alimentos (BASTOS, 2007).

Com o crescimento econômico e populacional, conseqüentemente, com o aumento no número de veículos, houve um aumento na demanda global por energia, e com isso a necessidade energética tornou-se um problema comum em todo o mundo. Há uma previsão de que o crescimento na produção de petróleo e gás não corresponderá à taxa de demanda projetada para 2040-2050, uma vez que a demanda por petróleo vai passar de 85 Mb.dia⁻¹ (Milhões de barris por dia) em 2008 para 105 Mb.dia⁻¹ em 2030, e posteriormente para valores maiores, ao passo que o número de veículos vai passar de 1,3 bilhões em 2030 para 2 bilhões em 2050 (BRADSHAW, 2010).

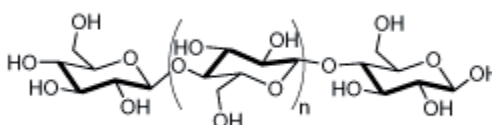
Diante de todos esses fatores, como a necessidade de redução na emissão de poluentes, necessidade energética, alta nos preços do barril do petróleo e limitações de área para cultivo de matéria-prima para produção de etanol, é de extrema necessidade que outras fontes alternativas para produção de combustíveis sejam utilizadas. Dentro desse panorama, a produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica apresenta-se como uma das mais importantes e vantajosas tecnologias para a produção sustentável de combustíveis (SUKUMARAN et al., 2009).

3.2 Biomassa lignocelulósica

Entende-se por biomassa toda a matéria-prima derivada de organismos vivos que abrange uma extensa variedade de materiais que podem ser disponibilizados como matérias-primas para produção de combustíveis ou para diversos fins. Pode-se considerar um recurso natural renovável em curto prazo, tendo como principais vantagens o baixo custo, além de permitir o aproveitamento dos resíduos, sendo menos poluente que outras opções energéticas (SCHULZ, 2010).

A biomassa lignocelulósica é um material abundante na natureza, não compete com a produção de alimentos, além de estar disponível como resíduos agrícolas, florestais e industriais. A lignocelulose é o principal componente da parede celular de plantas, é composta principalmente por celulose (40-60% do peso seco total), hemicelulose (20-40%) e lignina (10-25%). A celulose, representada na Figura 1, é o polissacarídeo mais abundante na natureza, é a base estrutural das células das plantas, e é a substância natural mais importante produzida por organismos vivos. As moléculas de celulose são constituídas de monômeros de glicose, unidas através de ligações glicosídicas (β -1,4), tendo entre 2.000-25.000 unidades de glicose, resultando em um polímero de alto peso molecular (BAEYENS et al., 2015).

Figura 1 - Estrutura molecular da celulose.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

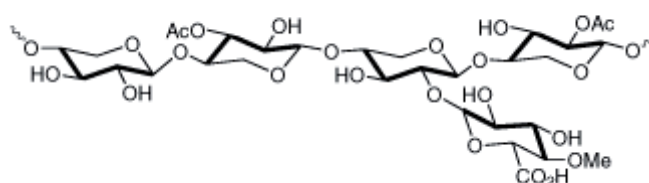
Cada resíduo de glicose está orientado em 180° em relação ao próximo resíduo. As ligações de hidrogênio intramoleculares mantêm a rede mais fixa e com características hidrofóbicas. As interações de Van der Waals entre as cadeias poliméricas formam zonas com estruturas cristalinas, em sua maioria, bastante ordenadas, que não permitem a água penetrar no seu interior. Porém, outras zonas amorfas e secas podem absorver água e tornar a celulose macia e flexível. Apesar da natureza higroscópica das moléculas individuais de celulose, a absorção de moléculas de água só é possível nas zonas amorfas devido à falta de espaços vazios na estrutura cristalina. A organização cristalina da celulose influencia a sua reatividade ao controlar o acesso de substâncias químicas ou enzimas aos grupos funcionais e às ligações químicas nas regiões cristalinas (NISHIYAMA et al., 2003).

Os processos de dissolução da celulose começam com a degradação das fibras e estruturas fibrilares e resulta na completa desintegração modificando o comprimento das cadeias. A degradação da estrutura supramolecular ocorre pela inserção de grupos químicos que quebram as ligações intermoleculares e solvatam as moléculas deslocadas da cadeia (MARABEZI, 2009).

A hemicelulose, representada na Figura 2, é formada por uma classe heterogênea de polímeros, contendo uma mistura de pentoses (β -D-xilose, α -L-arabinose), hexoses (β -D-

glicose, β -D-manose, α -D-galactose) e/ou ácidos urônicos (α -D-glucurônicos, α -D-4-O-metilgalacturônico e ácidos α -D-galacturônicos). Outros açúcares também podem estar presentes em menores quantidades, como a α -L-ramnose e a α -L-fucose (GÍRIO et al., 2010). As hemiceluloses não são cristalinas e encontram-se intercaladas às microfibrilas da celulose, dando elasticidade e impedindo que elas se toquem, variam nas estruturas e nas composições dependendo da fonte natural (FERREIRA; ROCHA; SILVA, 2009).

Figura 2 - Estrutura molecular de fragmento da hemicelulose.

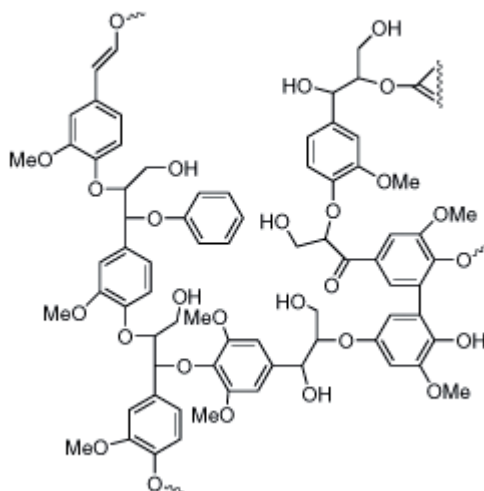


Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

Já a estrutura química da fração de lignina, representada na Figura 3, não está relacionada a moléculas simples de açúcar, não sendo pretendida para a produção de bioetanol por rotas fermentativas. Essa fração, no entanto, desempenha um papel fundamental para o sucesso da tecnologia de hidrólise (NOGUEIRA et al., 2008). Sua presença representa um importante problema para o processo de conversão da biomassa, porque a estrutura física da lignocelulose é intrinsecamente resistente ao ataque enzimático, especialmente celulose, a qual é protegida pela matriz circundante de lignina, hemicelulose e pectina (OGEDA; PETRI, 2010).

Apesar de ser possível produzir diversos produtos com base na lignina, atualmente o foco dos estudos tem se voltado para o uso desse material como fonte de energia para os processos, o que garantiria a auto-suficiência e, eventualmente, até a possibilidade de exportar alguma energia elétrica excedente (NOGUEIRA et al., 2008).

Figura 3 - Estrutura molecular de fragmento da lignina.



Fonte: FERREIRA; ROCHA; SILVA (2009).

3.3 Produção de bioetanol a partir de resíduos lignocelulósicos

A produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica está emergindo como uma das mais importantes tecnologias para a produção sustentável de combustíveis (SUKUMARAN et al., 2009), uma vez que representam uma importante fonte de açúcares fermentescíveis para a produção destes biocombustíveis e existem em grande disponibilidade (EL-ZAWAWY et al., 2011).

Para o melhor aproveitamento do material lignocelulósico para a produção de bioetanol, são necessários três processos, o pré-tratamento, a hidrólise enzimática e a fermentação. O pré-tratamento é o processo inicial e mais importante, pois promove a separação da celulose do resíduo agro-industrial. A segunda etapa é a hidrólise enzimática, que também é importante, pois hidrolisa os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis e, por último, é necessário realizar a fermentação, para converter esses açúcares em etanol (GUPTA; PRAKASH, 2015).

3.3.1 Pré-tratamento

A hidrólise da celulose para glicose em meio aquoso, catalisada por enzimas celulolíticas, possui uma taxa de rendimento muito baixa, principalmente devido à cristalinidade da celulose, baixa área superficial acessível, proteção pela lignina e

hemicelulose, aos graus de polimerização da celulose e de acetilação da hemicelulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008), em conjunto dificultam o acesso aos sítios ativos do substrato. A dificuldade aumenta também porque algumas celulasas se adsorvem fisicamente sobre ligninas. Além disso, a lignina restringe a hidrólise, pois esconde a superfície celulósica impedindo o intumescimento das fibras. Logo, torna-se necessário o processo chamado pré-tratamento para romper a cristalinidade das fibras lignocelulósicas e remover lignina, expondo as moléculas de celulose e hemicelulose à ação enzimática (OGEDA; PETRI, 2010).

Vários métodos de pré-tratamentos têm sido propostos e desenvolvidos. Esses métodos podem ser classificados de diferentes formas, pré-tratamentos físicos, químicos, biológicos ou uma combinação destes no intuito de reduzir a recalcitrância da biomassa lignocelulósica (SUN; CHENG, 2002).

A hidrólise ácida é utilizada no pré-tratamento da biomassa, promovendo a quebra da matriz lignocelulósica e hidrólise da hemicelulose, resultando na liberação de quantidade significativa de pentoses, principalmente xilose e, monômeros de glicose que também podem ser liberados nessa etapa. Além disso, o pré-tratamento reduz o grau de cristalinidade das cadeias de celulose e aumenta a porção de celulose amorfa, a qual é mais susceptível à hidrólise (ALZATE; TORO, 2006).

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

Durante a hidrólise com ácidos diluídos, o material lignocelulósico é misturado com um ácido (H_2SO_4 , tipicamente) diluído em água - catalisador - e aquecido por certo tempo. Os grupos acetila ligados à hemicelulose são clivados e também atuam como catalisadores da hidrólise. Grande parte da hemicelulose é removida. Por outro lado, a remoção da lignina ocorre de maneira bastante limitada. Embora haja fusão e despolimerização desta fração durante o pré-tratamento, também há repolimerização e redistribuição superficial intensa. Estas reações acarretam em alterações radicais na estrutura da parede celular vegetal, favorecendo a acessibilidade das enzimas para a hidrólise subsequente da celulose (LI; HENRIKSSON; GELLERSTEDT, 2007; SCHELL et al., 2004).

3.3.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é uma das rotas utilizadas para aumentar a eficiência do pré-tratamento. A hidrólise dos materiais lignocelulósicos é conduzida utilizando enzimas celulasas, que são altamente específicas. Os três maiores grupos de celulasas que estão envolvidos no processo de hidrólise são as endoglucanases, que atacam regiões de baixa cristalinidade na fibra celulósica, as exoglucanases, que degradam ainda mais a molécula separando as unidades de celobiose e as β -glucosidases, que hidrolisam a celobiose liberando glicose (SUN; CHENG, 2002).

Muitos fatores podem afetar a hidrólise enzimática da celulose, como por exemplo, a concentração de substrato, a atividade da celulase e as condições da reação (temperatura, pH, bem como outros parâmetros). Para melhorar o rendimento e a taxa de hidrólise, é necessário otimizar o processo e reforçar a atividade das celulasas (SUN; CHENG, 2002).

Essa etapa é considerada de grande potencialidade devida a sua baixa toxicidade, ao baixo custo de operação e menos problemas de corrosão em comparação com a hidrólise ácida ou alcalina. Além disso, no processo de hidrólise enzimática não são formados subprodutos tóxicos (GUPTA; PRAKASH, 2015). No entanto, ainda enfrenta vários gargalos tecnológicos; destes, o principal é o elevado custo das enzimas utilizadas no processo (STROPARO et al., 2012).

3.4 Detoxificação

Uma das dificuldades associada ao processo de hidrólise é a formação de subprodutos da degradação de açúcares e lignina, os quais são tóxicos para os micro-organismos fermentativos, inibindo seu metabolismo. Durante a hidrólise ácida do material lignocelulósico, além dos açúcares, também são formados ácidos alifáticos (ácido acético, fórmico e levulínico), derivados de furano, furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), e compostos fenólicos (CHANDEL et al., 2007).

Os furanos (furfural e HMF) são compostos que afetam os micro-organismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas (MODIG; LIDÉN; TAHERZADEH, 2002).

Os tipos de compostos tóxicos e a sua concentração no caldo hidrolisado dependem da matéria-prima e das condições operacionais empregadas na hidrólise. Dessa forma, é interessante que o processo de hidrólise seja otimizado para minimizar a formação de

inibidores e que se usem processos de purificação do caldo hidrolisado antes da fermentação. Em geral, a fermentação de hidrolisados não tratados é caracterizada por cinética lenta, rendimento e produtividade limitados. Vários tipos de processos de purificação do hidrolisado já foram propostos, como por exemplo, o tratamento do hidrolisado com carvão ativado (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a).

Quando se mistura um sólido finamente moído em uma solução diluída corada, observa-se que a intensidade da coloração decresce pronunciadamente. O corante é adsorvido sobre a superfície do sólido. A intensidade do efeito depende da temperatura, da natureza da substância adsorvida, da natureza e agregação do adsorvente (o sólido finamente dividido) e da concentração do corante (CASTELLAN, 1999).

O tratamento do hidrolisado lignocelulósico utilizando carvão ativo baseia-se na capacidade deste material poroso, de origem vegetal, de adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas na superfície por interações físicas fracas denominadas forças ou interações de Van der Waals. Estas interações são resultantes de uma atração intermolecular de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre vários materiais comumente usados em processos de adsorção física, o carvão ativo apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m² g⁻¹, dependendo da matéria-prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974 apud CARVALHO, 2005).

3.5 Casca de banana

Dentre os produtos agrícolas brasileiros, destaca-se a produção e consumo da banana. A cultura da banana ocupa o segundo lugar em volume de frutas produzidas no Brasil, perdendo apenas para a laranja. Segundo IBGE, a produção de banana na safra de 2016 foi de 6,9 milhões de toneladas, em uma área de, aproximadamente, 514 mil hectares, apresentando um rendimento médio de 15 kg/ha. Considerando que a porcentagem da produção de banana que é industrializada neste país é de 3% (FOLEGATTI; MATSUURA, 2008), e que a casca da banana corresponde a 40% do seu peso, tem-se uma geração de resíduo industrial anual de 86 mil toneladas de cascas de banana. Além disso, das bananas que são colhidas nas lavouras, somente cerca de 40 a 50% chegam efetivamente às mãos dos consumidores (SANCHES et al., 2004). O resto é perdido em diversas fases, desde o plantio até o consumidor final.

Segundo Mesquita et al. (2009), o processamento da banana apresenta-se como alternativa para o aproveitamento dos frutos excedentes ou fora dos padrões exigidos pelo

mercado, possibilitando a redução de perdas pós-colheita e representando uma forma de aumentar a vida de prateleira e agregar valor ao produto.

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

Schulz (2010) em seu estudo de produção de etanol a partir de rejeitos (polpa e cascas) de banana, com fermentação em biorreator, obteve uma produção de etanol na ordem de 7,9 e 7,1 g L⁻¹, com o uso de cascas *in natura*, com concentrações iniciais de açúcares totais de 19,5 e 12,2 g L⁻¹, respectivamente.

3.6 Casca de maracujá

O Brasil é o principal produtor e consumidor mundial de maracujá. Conforme censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), o país produziu 690 mil toneladas de maracujá em 2015 e a região Nordeste detiveram 65% dessa produção, sendo a Bahia o destaque, com produção de 297 mil toneladas, seguido pelo Ceará com 93 mil toneladas.

O maracujá pode ser consumido *in natura*, mas a maior parte das frutas produzidas é destinada a indústria, principalmente para a extração de suco. O suco, além de ser consumido no mercado interno, é também exportado. Os frutos podem ainda ser processados como polpa, geléia, néctar, dentre outros (LIMA et al., 2006). A fruta *in natura* e o suco são produtos muito apreciados em função de suas características sensoriais (MACORIS et al., 2011).

As cascas e as sementes de maracujá, provenientes do processo de corte e extração da polpa para obtenção do suco, são, ainda, em grande parte, descartadas e representam cerca de 40% do peso total do fruto. Como este descarte representa inúmeras toneladas, agregar valor a esses subprodutos é de interesse econômico, científico e tecnológico (CARVALHO et al., 2005; FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004). Estudos anteriores têm reportado a aplicação de resíduo de maracujá para diversos fins, como a extração de óleo a partir das sementes (FERRARI; COLUSSI; AYUB, 2004); enriquecimento de alimentação animal (NEIVA et al., 2006); aproveitamento das fibras para produção de barras de cereais (SILVA et al., 2009); biscoitos enriquecidos com a farinha da casca de maracujá (ABUD; NARAIN, 2009;

ISHIMOTO et al., 2007); fabricação de produtos flavorizados (CARVALHO et al., 2005) e doce em calda da casca de maracujá (OLIVEIRA et al., 2002).

De acordo com Lousada Júnior et al. (2006), os subprodutos do maracujá (mesocarpo e casca) apresentam em sua composição, em média, 39% de celulose, 10% de hemicelulose, 9% de lignina e 25% de pectina. Portanto, de acordo com a composição, as cascas de maracujá podem ser utilizadas como biomassa para a produção de bioetanol lignocelulósico.

3.7 Casca de coco verde

Pesquisas do IBGE mostram uma produção de coco no ano 2016 ao redor de 1,7 milhões frutos, em uma área de 245 mil hectares, sendo que a maior produção encontra-se na região Nordeste, com um volume de aproximadamente 1,4 milhões de frutos. A Bahia é o estado que tem a maior produção, representando 29,5% do total (IBGE, 2016).

O coco (*Cocos nucifera* L.) é considerado, em todo o mundo, uma fruta fornecedora de óleo, tendo aplicações diversas, nas mais distintas áreas industriais e culinárias. O Brasil é o único país produtor no qual o coco é tratado como uma fruta e não como uma oleaginosa, com uma vasta aplicação do fruto *in natura* e seus derivados tanto como insumo industrial, como na forma de condimentos, bebidas, especiarias e outros modos de utilização (SCHNEIDER et al., 2012).

O fruto do coqueiro é constituído por albúmen líquido (água de coco), albúmen sólido ou amêndoa, endocarpo conhecido popularmente como “Quenga” e casca (Figura 4). A casca representa em torno de 57% do fruto sendo composta pelo mesocarpo (fibra e pó) e epicarpo (camada mais externa da casca). O volume e o peso da casca variam com as condições climáticas da região, forma de plantio, adubação, tratos culturais e fitossanitários do coqueiro e a variedade cultivada (NUNES; SANTOS; SANTOS, 2007).

Figura 4 - Estrutura do coco.



Fonte: MATTOS et al. (2011).

O crescimento agroindustrial, se por um lado é um vetor de desenvolvimento, por outro contribui para o aumento da geração de resíduos sólidos, que muitas vezes podem criar um impacto negativo para o meio ambiente. Um dos exemplos é a água de coco verde, que vem despontando como um produto bastante promissor no mercado brasileiro, com crescimento de mercado estimado em 20% ao ano. O problema, no entanto, é que o aumento na produção e no consumo da água-de-coco está gerando cerca de 2,29 bilhões de casca/ano, transformando-se em um sério problema ambiental, principalmente para as grandes cidades (NUNES; SANTOS; SANTOS, 2007). O estado da Bahia é o maior gerador de resíduos de cascas de coco no Brasil, com um montante de 98 mil tonelada/ano. Ao se analisar as grandes regiões em relação ao país, nota-se que a produção de resíduos está concentrada no Nordeste, com 69% de participação (SCHNEIDER et al., 2012).

Segundo Corradini et al. (2009) a fibra da casca do coco verde é constituída por cerca de 40% de lignina, 35% de celulose e 25% de componentes secundários, como a hemicelulose. Devido às grandes quantidades de resíduos do coco verde gerado e a composição da fibra da casca, justifica-se a importância de avaliar o potencial desta matéria-prima para a obtenção de etanol lignocelulósico.

Vaithanomsat et al. (2011) estudaram a produção de bioetanol a partir de cascas de coco, as cascas foram pré-tratadas com solução de hidróxido de sódio, hidrolisadas por enzimas comerciais e fermentadas por *Saccharomyces cerevisiae* a 30°C por 72 h. A partir de uma concentração de glicose de 50 g L⁻¹ foi obtida a concentração de etanol de 22,8 g L⁻¹.

Gonçalves et al. (2014) avaliaram o pré-tratamento das cascas com peróxido de hidrogênio e NaOH (Alk-H₂O₂), hidrólise com enzimas comerciais e produção de etanol pelo processo de sacarificação e fermentação simultâneas por *S. cerevisiae* PE2, *Pichia stipitis* Y7124 e *Z. mobilis* B14023, a 30°C, por 48 h. As concentrações de etanol e rendimentos (g etanol/ g açúcar) obtidos foram 8,4 g L⁻¹ e 84,6%, 9,1 g L⁻¹ e 79,3%, 8,3 g L⁻¹ e 82%, para *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Z. mobilis*, respectivamente.

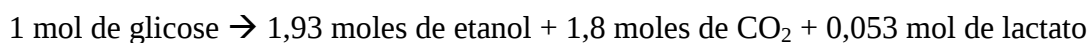
3.8 Micro-organismos

3.8.1 *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa, não patogênica que engloba apenas uma espécie, dividida em duas subespécies: *Z. mobilis* subespécie *mobilis* e *Z. mobilis* subespécie *pomaceae* (SWINGS; DE LEY, 1977).

As células dessas bactérias podem ocorrer isoladamente, embora seja mais comum sua ocorrência aos pares. Não possuem cápsulas e não formam esporos e, em sua grande maioria, não possuem mobilidade (algumas linhagens perderam a mobilidade, embora cerca de 30% sejam móveis). Suas células possuem a forma de bastonetes com 2 a 6 µm de comprimento e de 1 a 1,5 µm de largura, com extremidades arredondadas, possuindo de 1 a 4 flagelos polares. As colônias apresentam coloração branca ou creme, crescem em temperaturas em torno de 30°C (FALCÃO DE MORAIS, 1983).

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



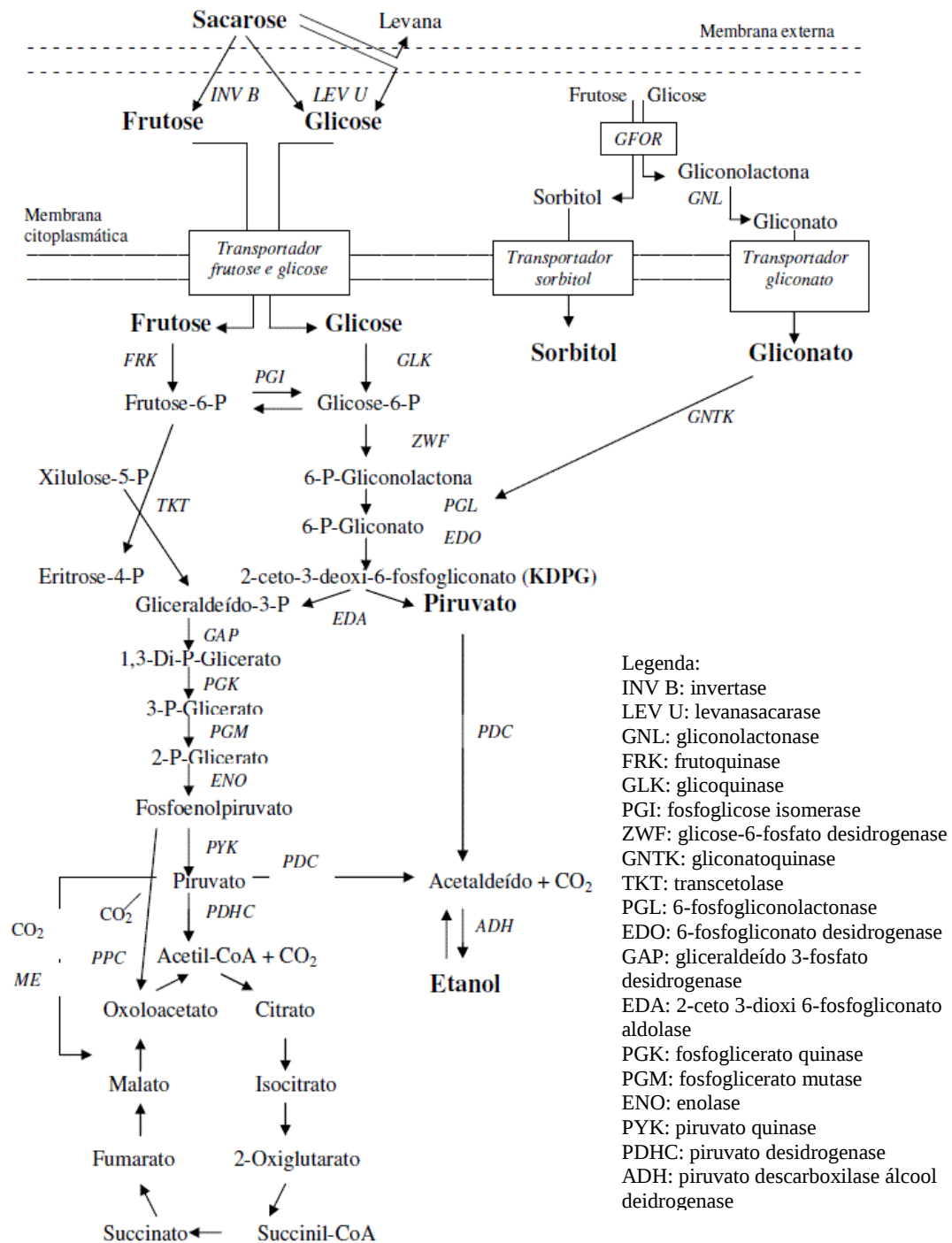
Z. mobilis é apontada por alguns pesquisadores como um micro-organismo capaz de substituir a levedura *S. cerevisiae*, pois possui algumas características superiores quando comparadas à essa levedura e está sendo estudada intensivamente nas últimas décadas (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008; ERNANDES; BOSCOLO; GARCIA-CRUZ, 2010; SANTOS; GARCIA-CRUZ, 2016). Apresenta alta tolerância ao etanol, maiores velocidades

específicas de consumo de substrato, de produção de etanol e consequentemente, maior rendimento.

Metaboliza açúcares pela via Entner–Doudoroff (ED), a qual produz menos ATP e menos biomassa. Devida à menor produção de ATP durante a fermentação de etanol, *Z. mobilis* mantém um fluxo metabólico de glicose superior, normalmente de três a cinco vezes maior ao da *S. cerevisiae* (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

O metabolismo de açúcares por *Z. mobilis* está ilustrado na Figura 5. A sacarose é hidrolisada a glicose e frutose pela ação das enzimas invertase (INV B) e levanasacarase (LEV U). As duas hexoses entram na célula via sistema de difusão facilitada (GLF) ou são convertidas pela GFOR (glicose-frutose oxirredutase), uma enzima contendo NADP (nicotinamida-adenina dinucleotídeo-fosfato) que existe na bactéria *Z. mobilis*. A enzima GFOR, que está localizada no periplasma, oxida glicose a gliconolactona e reduz frutose a sorbitol. A gliconolactona é, então, convertida pela gliconolactonase (GL), outra enzima periplasmática, em ácido glicônico (gliconato). Ambas as enzimas (GL e GFOR) são os principais constituintes do periplasma, formando aproximadamente 20 a 30% das proteínas deste compartimento. O ácido glicônico é consumido pelas células e pode ser completamente degradado (como um co-substrato) a etanol e ácido acético. O sorbitol é produzido para neutralizar o efeito prejudicial de estresse osmótico (SPRENGER, 1996).

Figura 5 - Metabolismo dos carboidratos em *Z. mobilis*.



Fonte: SPRENGER (1996).

3.8.2 Micro-organismos fermentadores de pentoses

Apesar das inúmeras vantagens apresentadas pela *Z. mobilis* para a produção de etanol, ela não é adequada para a fermentação de todos os açúcares obtidos na hidrólise da biomassa lignocelulósica. Ela é incapaz de fermentar xilose, que em geral é de 30-40% do total de açúcares fermentescíveis liberados no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica (SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014).

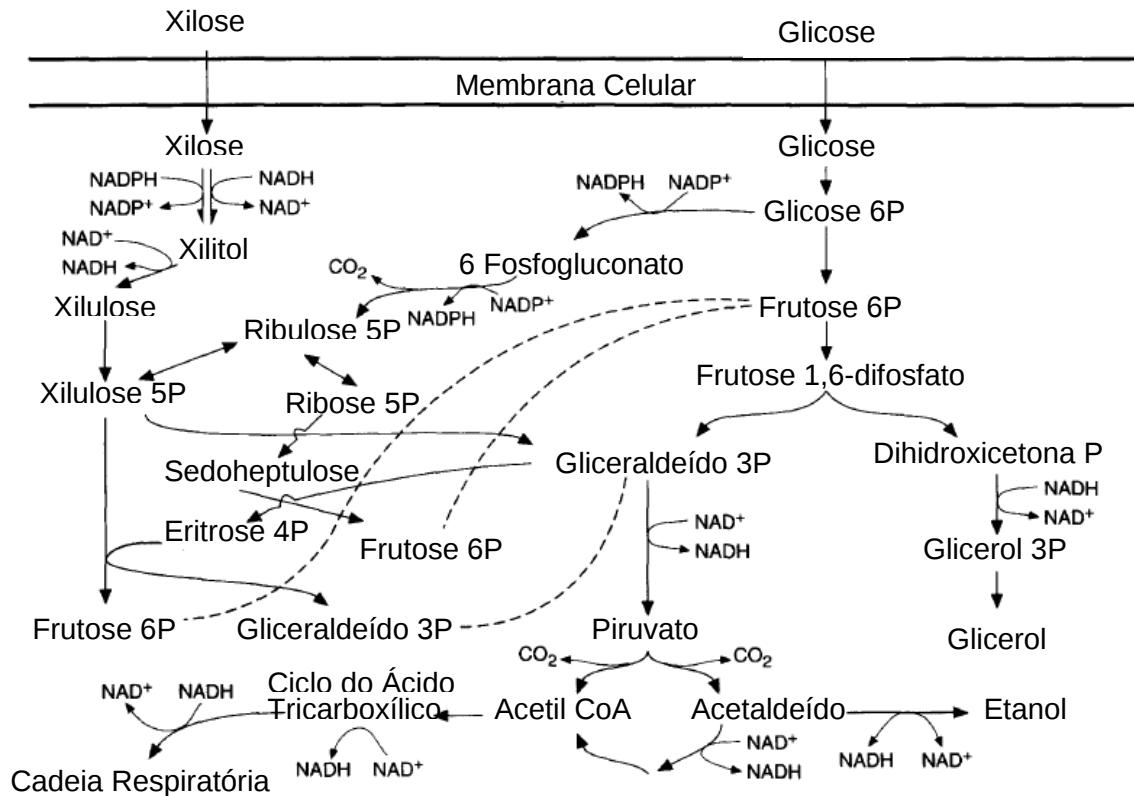
Na literatura são encontradas duas alternativas para o melhor aproveitamento dos açúcares (hexoses e pentoses) liberados na hidrólise da biomassa. A primeira baseia-se na utilização de micro-organismos geneticamente modificados, os quais são estudados e modificados com o objetivo de fermentar tanto a glicose como a xilose. Dentre os micro-organismos, destacam-se cepas geneticamente modificadas de *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* e *Escherichia coli* (ZHANG; LYND, 2010). Outra opção é a utilização de dois micro-organismos, simultaneamente, em um único sistema de fermentação, definido como “Co-cultura”.

Um sistema eficiente de co-cultura envolve a combinação de micro-organismos que não afetem as atividades metabólicas, como o crescimento, um do outro, e a competição por substrato ou nutrientes seja mínima, de forma a maximizar a produção de etanol. Entretanto, um micro-organismo capaz de fermentar de forma eficiente glicose e xilose deve ser escolhido cuidadosamente. As leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são alguns dos micro-organismos relatados por produzir quantidades significativas de etanol a partir de xilose (SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014). Estão sendo realizadas várias pesquisas para avaliar a co-cultura na produção de etanol por co-fermentação de glicose e xilose derivadas da hidrólise de biomassa lignocelulósica (SINGH; MAJUMDER; GHOSH, 2014; SURIYACHAI et al., 2013; CHEN, 2011; PATLE; LAL, 2008; FU; PEIRIS, 2008).

A utilização de xilose por leveduras é possível graças à capacidade que alguns destes micro-organismos apresentam de metabolizar essa pentose. A transformação das pentoses segue uma via metabólica diferente das hexoses, chamada de via das pentoses-fosfato, como ilustrado na Figura 6. A metabolização da xilose procede por meio de duas etapas, uma de redução e outra de oxidação, as quais são mediadas pela xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), transformando a xilose em xilitol e posteriormente em xilulose. Assim, a xilose entra para a via da pentose fosfato (PPP) através da xilulose, que pela xiluloquinase (XK) é fosforilada a xilulose-5P. A PPP é considerada como tendo duas fases. A fase

oxidativa converte a hexose, glicose-6P, para a pentose ribulose-5P, mais CO_2 e NADPH. A fase não oxidativa converte ribulose-5P em ribose-5P, xilulose-5P, sedo-heptulose-7P e eritrose-4P, que finalmente através da frutose-6P e gliceraldeído-3P, retornam os carbonos para a glicólise, permitindo a posterior fermentação do açúcar (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Figura 6 - Fluxograma da via metabólica de glicose e xilose em leveduras xilose-fermentadoras.



FONTE: Adaptado Hahn-Hägerdal et al. (1994).

3.8.3 *Pachysolen tannophilus*

A levedura *P. tannophilus* foi isolada pela primeira vez a partir de extratos de madeira (SLININGER, BOLEN, KURTZMAN, 1987) e passou a atrair a atenção dos pesquisadores devido a sua capacidade de utilizar xilose para produção de etanol (SALEH et al., 2014; SATHESH-PRABU; MURUGESAN, 2011; FU, PEIRIS, 2008). *P. tannophilus* cresce em meio contendo glicose, galactose, xilose e frutose, mas não utiliza sacarose e nem lactose como fonte de carbono (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

De acordo com Zhao, Zhang e Tan (2008), na fermentação de um meio contendo hexoses e pentoses, a levedura tem preferência pela hexose e o consumo de xilose inicia-se somente após a exaustão da glicose, além disso, em meios contendo apenas xilose, há maior formação de biomassa e menor produção de etanol.

Fu e Peiris (2008) investigaram a produção de etanol por co-fermentação de *Z. mobilis* e *P. tannophilus*, em um meio sintético composto por glicose e xilose. Essa mistura de açúcares foi utilizada para simular a composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, e pode ser observado que a co-cultura foi vantajosa, tendo alcançado um rendimento de 0,33 g etanol/g substrato.

Sathesh-Prabu e Murugesan (2011) avaliaram o potencial de utilização de resíduos do cultivo de sorgo para produção de etanol combustível empregando as leveduras *P. tannophilus* e *S. cerevisiae*. Foi obtida concentração máxima de etanol de 56 g L⁻¹ por *P. tannophilus* a partir da palha de sorgo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima

Foram utilizadas como biomassa, cascas de banana (*Mussa acuminata* AAA var. Cavendish anão) popularmente conhecida como banana nanica, cascas de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e cascas de coco verde (*Cocos nucifera*). As cascas de banana foram coletadas no Restaurante Universitário do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE/UNESP, São José do Rio Preto – SP. As cascas de maracujá foram coletadas no mercado local de São José do Rio Preto – SP. E as cascas de coco verde foram coletadas nas barracas de venda, localizadas na represa municipal de São José do Rio Preto – SP.

4.1.1 Preparo da matéria-prima

As cascas foram cortadas manualmente com auxílio de uma faca inox em pedaços menores que 3 cm, distribuídas em bandejas de inox e expostas ao sol, durante aproximadamente 24 h, até que ficassem duras e quebradiças.

As amostras secas foram moídas em um moedor de facas até a obtenção de um pó com tamanho máximo de partículas de 1,41 mm. Após a moagem, as amostras foram peneiradas em uma malha serie Tyler #14, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas a temperatura ambiente.

Para todos os ensaios de hidrólise ácida e enzimática, bem como de fermentação descontínua, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL.

4.2 Pré-tratamento da biomassa

O pré-tratamento foi realizado de acordo com o método proposto por Monsalve, Perez e Colorado (2006), com algumas modificações. Foram adicionados 50 mL de ácido sulfúrico a 5% (v/v) para cada 10 g de casca de banana; para as cascas de maracujá e coco verde, o volume de ácido foi duplicado (100 mL). Todos foram aquecidos em autoclave a 121°C, 1 atm, durante 15 min.

Ao término do pré-tratamento, o pH do material hidrolisado foi neutralizado, até pH 7,0, utilizando uma solução de NaOH a 50% (m/v).

4.3 Hidrólise enzimática da biomassa

Foram empregadas enzimas comerciais fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda. Foi utilizado um complexo enzimático, contendo arabinase, β -glucanase, celulase, hemicelulase, pectinase e xilanase e um complexo de celulase, de acordo com Schulz (2010), com algumas modificações.

Todas as enzimas foram utilizadas de uma só vez, empregando as doses máximas recomendadas pelo fornecedor. As dosagens enzimáticas utilizadas, assim como o pH inicial (5,5) e a temperatura de reação (50°C) foram definidas de modo que os seus valores estivessem dentro das faixas recomendadas pelo fornecedor das enzimas (ANEXO A).

A solução enzimática foi preparada em solução tampão Citrato 0,1 M, pH 5,5. A massa de cada uma das enzimas utilizadas na solução foi calculada de forma que 10 mL desta solução resultassem nas concentrações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Enzimas e dosagens empregadas nos ensaios de hidrólise enzimática das cascas de banana, maracujá e coco verde.

Enzima	Descrição	Dosagem (% m/m)
NS22086 Celulase-complexo	Os principais produtos da reação são a celobiose e a glicose	5,0
NS22083 Xilanase	É um purificado de endo-xilanase com alta especificidade para pentosanas	0,25
NS22118 β -glicosidase	Hidrolisa a celobiose, um dímero de glicose. Também conhecida como celobiase	0,6
NS22119 Complexo enzimático	Contém arabinase, β -glucanase, celulase, hemicelulase, pectinase e xilanase	0,4
NS22002 β -glucanase Xilanase	Contém uma mistura de enzimas com atividade β -glucanase e xilanase	2,0

*% m/m: porcentagem em massa.

Como reatores foram empregados frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 90 mL de substrato (pré-tratado por ácido) e 10 mL de solução enzimática. Os tempos de reação

avaliados foram de: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 24 h. As reações foram conduzidas em incubadora de movimento giratório (Shaker) com agitação de 100 rpm.

Ao final de cada tempo de reação foram retiradas amostras, sendo estas filtradas em papel filtro Whatman, para separação dos sólidos. O líquido obtido foi então utilizado para as determinações do teor de sólidos totais e das concentrações de açúcares totais, conforme descrito nos itens 4.9.1 e 4.9.5, respectivamente.

Após as etapas de hidrólises, a biomassa obtida foi filtrada em papel filtro Whatman N° 1 para separação dos sólidos, os quais foram descartados, permanecendo somente o líquido hidrolisado.

4.4 Detoxificação

O processo de detoxificação foi realizado de acordo com Mussatto e Roberto (2004), com algumas modificações. Primeiramente, empregando o método de alteração de pH, o pH inicial foi ajustado para 10, pela adição de óxido de cálcio sob agitação. A mistura permaneceu em repouso por meia hora, seguida de centrifugação (3000 g, 20 min) e filtração. Depois o pH do hidrolisado foi reduzido para 6 usando H_2SO_4 concentrado. Ao hidrolisado, foi então adicionado 2,5% (m/v) de carvão ativo, a mistura foi submetida a agitação de 200 rpm, a 30° C, por 1 h. A mistura foi então novamente centrifugada (3000 g, 20 min) e filtrada. O hidrolisado tratado foi caracterizado quanto à concentração de Açúcares Totais e Compostos Fenólicos.

4.5 Micro-organismos

Foram utilizados dois micro-organismos, a bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e a levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891, adquiridos da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello - Pesquisa e Tecnologia de Campinas, SP.

4.5.1 Meio de manutenção

A levedura foi mantida em geladeira a 4°C, após o crescimento prévio em estufa a 28°C por 24 h em meio de manutenção, conforme especificados na Tabela 2, sendo reativada mensalmente.

Tabela 2 - Meio de manutenção do micro-organismo *P. tannophilus* CCT 1891.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona de carne	5,0
Agar	20,0

A linhagem bacteriana foi mantida em geladeira a 4°C, após o crescimento prévio em estufa a 30°C por 24 h em meio de manutenção, conforme especificados na Tabela 3, sendo reativada mensalmente.

Tabela 3 - Meio de manutenção do micro-organismo *Z. mobilis* CCT 4494.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	20,0
Extrato de levedura	10,0
Peptona de carne	10,0

4.5.2 Preparo do pré-inóculo

A partir das culturas de *Z. mobilis* e/ou *P. tannophilus* armazenadas em geladeira, em meio de manutenção, foi feito o pré-inóculo para a reativação das células. A cepa foi inoculada em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção do micro-organismo *Z. mobilis*, conforme descrito no item 4.5.1, e incubados em estufa a 30°C, por 24 h.

As cepas *P. tannophilus* foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10 mL do meio de manutenção, conforme descrito no item 4.5.1, e incubados em estufa a 28°C, por 24 h.

4.5.3 Pré-fermentação

Para a pré-fermentação, 5 tubos de ensaio com crescimento celular obtidos no pré-inóculo foram transferidos para frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de manutenção previamente esterilizados. Os Erlenmeyers inoculados com a bactéria *Z. mobilis*

foram incubados em agitador orbital rotatório, mantido a 30°C, por 24 h, sem agitação. Os Erlenmeyers inoculados com a levedura *P. tannophilus* foram incubados a 28°C, por 24 h, com agitação de 100 rpm.

4.5.4 Padronização do inóculo

A padronização do inóculo foi realizada de acordo com Vignoli (2003) para garantir que a concentração de inóculo inicial fosse igual para todos os ensaios de fermentação.

A suspensão celular obtida na pré-fermentação (item 4.5.3) foi centrifugada a 6941g, por 15 min, para separação de células, e ressuspensas em água destilada estéril de forma a se obter uma suspensão celular com absorvância da ordem de 0,600 a 570 nm.

Separadamente foi construída uma curva analítica com diferentes concentrações da suspensão celular de *Z. mobilis* CCT 4494 (APÊNDICE A) e *P. tannophilus* (APÊNDICE B), que relaciona a absorvância com concentração celular (g L^{-1}), com a qual foi possível calcular o inóculo inicial de células transferido para os frascos de Erlenmeyer contendo o meio de fermentação. O espectrofotômetro utilizado para determinações fotométricas foi o Biochrom modelo: Libra 22.

4.6 Meios de fermentação

Para a produção de etanol foram utilizados os meios de fermentação especificados a seguir:

4.6.1 Meio sintético

O meio sintético foi semelhante ao definido por Rodríguez e Callieri (1986), com algumas modificações, conforme especificado na Tabela 4. Para os ensaios utilizando a levedura, foi utilizada uma mistura de açúcares (glicose e xilose), simulando o hidrolisado. A glicose e xilose foram utilizadas nas proporções de 60% e 40%, respectivamente, com três concentrações diferentes, além disso, houve variação do pH inicial do meio, a variação de ambos está especificada no item 4.7.2. Já para ensaios com a bactéria utilizou-se apenas glicose. A solução de açúcares foi esterilizada separadamente a 121°C, por 15 min, e depois de resfriadas até a temperatura ambiente, foi misturada assepticamente no momento do

preparo do meio de fermentação contendo os demais constituintes que foram previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados.

Tabela 4 - Composição do Meio Sintético.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose e/ou Xilose	5; 10 e 15%
Extrato de levedura	5,0
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0

4.6.2 Meio contendo os hidrolisados lignocelulósicos

Os hidrolisados de casca de banana, maracujá e coco foram padronizados com base nas concentrações de sólidos totais, os quais foram medidos em Refratômetro (Quimis), com três concentrações diferentes, conforme apresentado no item 4.7.2. Os outros componentes do meio estão especificados na Tabela 4.

Os frascos de Erlenmeyer, contendo o caldo hidrolisado de cada casca, com a concentração adequada de sólidos totais, foram esterilizados separadamente a 121°C, por 15 min, e depois de resfriados até a temperatura ambiente, misturados assepticamente para o preparo do meio de fermentação contendo os demais constituintes, previamente dissolvidos em água destilada e esterilizados. Cada hidrolisado foi estudado separadamente.

4.7 Condições de fermentação

4.7.1 Testes preliminares

4.7.1.1 Parâmetros cinéticos da bactéria *Z. mobilis*

Para determinar as melhores condições de metabolismo da bactéria, foram realizados testes para determinar o melhor tempo de fermentação para produção de etanol. Foi realizada uma fermentação, utilizando meio sintético, acrescido de glicose (100 g L⁻¹), incubada a 30°C, sem agitação, com tempo de fermentação de 12 h, com retirada de amostras a cada hora.

Depois de determinado o melhor tempo para produção de etanol, foi avaliada a agitação, com meio sintético, acrescido de glicose (45 g L^{-1}), pH 5,5, a 30°C , foram estudadas: a fermentação estática e agitada a 50; 100; 150 e 200 rpm.

4.7.1.2 Parâmetros cinéticos da levedura *P. tannophilus*

Para determinar as melhores condições do metabolismo da levedura, foram realizados testes para determinar o melhor tempo e agitação para condução da fermentação para produção de etanol. Foi realizada uma fermentação, utilizando meio sintético, acrescido de glicose (100 g L^{-1}), incubada a 30°C , durante 24 h, foi estudada a fermentação estática e agitada a 50 e 100 rpm.

Após a definição da melhor condição de agitação, foi realizada uma fermentação durante 24 h, com retiradas de amostras a cada hora, para determinar o tempo ótimo de produção de etanol.

4.7.2 Parâmetros das fermentações

Depois de estabelecidos as melhores condições de tempo e agitação para produção de etanol, os micro-organismos, *Z. mobilis* e *P. tannophilus*, foram empregados para avaliar os substratos (cascas de banana, maracujá e coco verde e meio sintético), quanto as concentrações (5, 10 e 15%) e pH inicial de cada meio (4,5; 5,0 e 5,5). As fermentações foram realizadas em agitador orbital rotatório, a 30°C .

As fermentações com a bactéria *Z. mobilis* foram conduzidas por 7 h e 50 rpm. E com a levedura *P. tannophilus* a fermentação foi realizada por 19 h, com agitação de 100 rpm. Nas Figuras 7 e 8 estão apresentados os fluxogramas para as fermentações com *Z. mobilis* e *P. tannophilus*.

Figura 7 – Fluxograma com os fatores avaliados na produção de etanol por *Z. mobilis* CCT 4494.

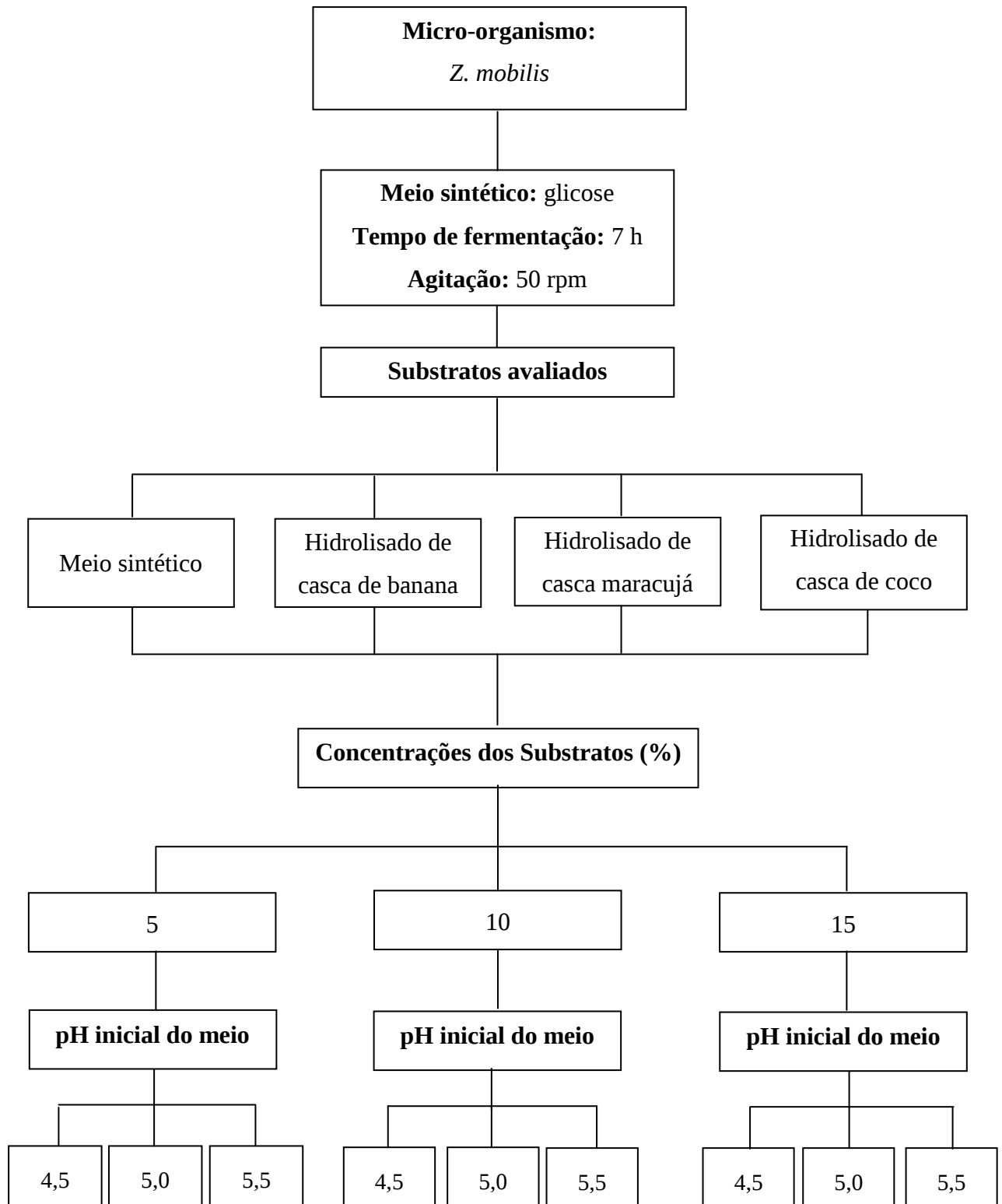
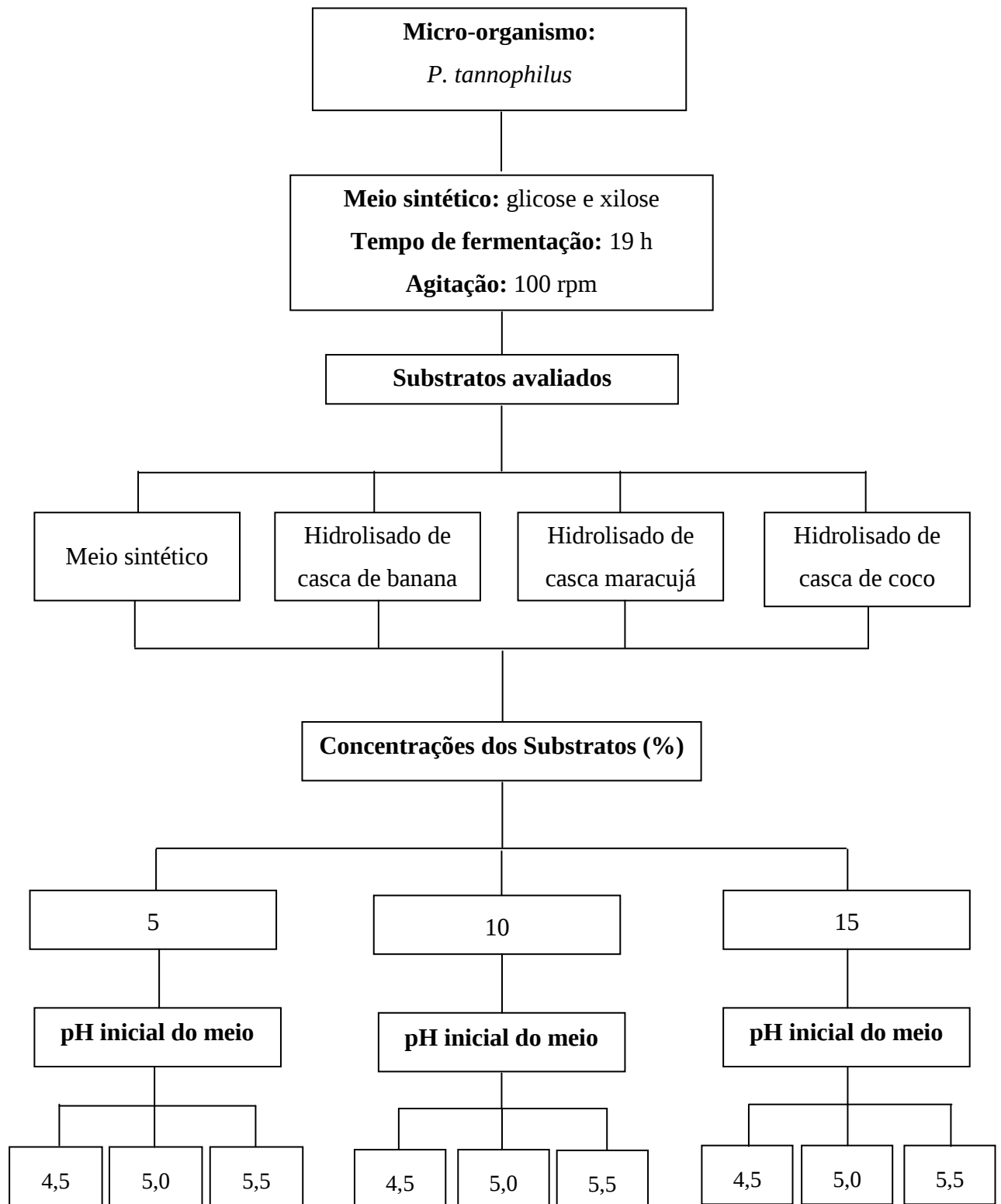


Figura 8 – Fluxograma com os fatores avaliados na produção de etanol por *P. tannophilus* CCT 1891.



4.8 Co-cultura

Os ensaios de co-fermentação de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* foram avaliados por dois métodos. O primeiro (co-cultura 1) foi realizado com inoculação simultânea de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* no início do processo fermentativo, a fermentação foi conduzida em Erlenmeyer, contendo 50 mL do meio de fermentação, incubada em shaker, a 30°C, agitação de 100 rpm, durante 19 h.

No segundo método de co-cultura (co-cultura 2) a *Z. mobilis* foi inoculada no início da fermentação, a qual foi estática, a 30°C, depois de 7 h o meio foi centrifugado, assepticamente, para remoção das células da bactéria, e então a *P. tannophilus* foi inoculada. A fermentação foi realizada durante 19 h, a 30°C e agitação de 100 rpm.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Determinação dos sólidos totais

O teor de sólidos totais foi determinado utilizando um refratômetro Quimis (°Brix).

4.9.2 Determinação do pH final

O pH final foi determinado diretamente no caldo fermentado por potenciometria em pHmetro (modelo DM20, Digmed, Brasil).

4.9.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi monitorada através das medidas de absorbância no espectrofotômetro Biochrom, modelo Libra S22, das suspensões diluídas do meio de fermentação, num comprimento de onda de 570 nm. A conversão da suspensão em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) foi obtida através das curvas de crescimento de cada micro-organismo.

4.9.4 Determinação de etanol

O etanol foi determinado por cromatografia gasosa utilizando um Cromatógrafo (Modelo GC Focus, Thermo Scientific, USA) acoplado a um detector de chama ionizante (FID) (*Flame Ionization Detector*), temperatura do forno de 100°C (mantendo esta temperatura por toda a corrida - isotérmica); tempo da corrida de 5 min; temperatura do injetor de 230°C; temperatura do detector de 270°C; injeção de 200 µL de vapor da amostra. As amostras foram aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C.

4.9.5 Determinação de açúcares totais (AT)

Os açúcares totais (AT) foram determinados pelo método fenol-sulfúrico, descrito por Dubois et al. (1956). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 490 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando o método fenol-sulfúrico (APÊNDICE D).

4.9.6 Determinação de açúcares redutores (AR)

Os açúcares redutores (AR) foram determinados de acordo com o método do cuproarsenato descrito por Somogyi (1952) e Nelson (1944). Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 570 nm, e a quantificação foi determinada por curva padrão de glicose utilizando o método Somogyi (1952) e Nelson (1944) (APÊNDICE E).

4.9.7 Determinação dos teores de compostos fenólicos

A concentração de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin-Ciocalteu modificado, descrito por Chaovanalikit e Wrolstad (2004). Uma amostra de 0,5 mL de hidrolisado foi misturada com 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e 7,5 mL de água destilada. A mistura foi deixada em repouso por 10 min, à temperatura ambiente. Depois foram adicionados 1,5 mL de carbonato de sódio (20%), as amostras foram deixadas em repouso novamente, por 20 min, à temperatura ambiente.

Foram realizadas leituras de absorbância no comprimento de onda de 755 nm tendo como base amostras de ácido vanílico com concentrações conhecidas e, posteriormente, foi

construída uma curva analítica (APÊNDICE F). O resultado foi expresso em concentração de polifenóis correspondente a ácido vanílico.

4.10 Análises estatísticas

Os resultados das variáveis respostas analisadas foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), e quando houve diferença estatística, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4.11 Parâmetros de fermentação

4.11.1 Fator de conversão do substrato em etanol

Os valores de rendimento de etanol em função do substrato consumido, expressos em porcentagem, foram obtidos por meio da Equação 1.

$$Y_{p/s} = \frac{(P)}{(S_o - S_f)} \quad (\text{Equação 1})$$

4.11.2 Produtividade em etanol

Os valores de produtividade total de etanol, expressos em massa do produto formado por unidade de tempo e volume ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), foram obtidos por meio da Equação 2.

$$Q_p = \frac{(P)}{(t_f - t_o)} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

$Y_{p/s}$ = rendimento de etanol por substrato (%);

Q_p = produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$);

P = massa de etanol (g L^{-1});

S_o = Concentração inicial de açúcares (g L^{-1});

S_f = Concentração final de açúcares (g L^{-1});

t_f = tempo final de fermentação (h);

t_o = tempo inicial de fermentação (h);

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

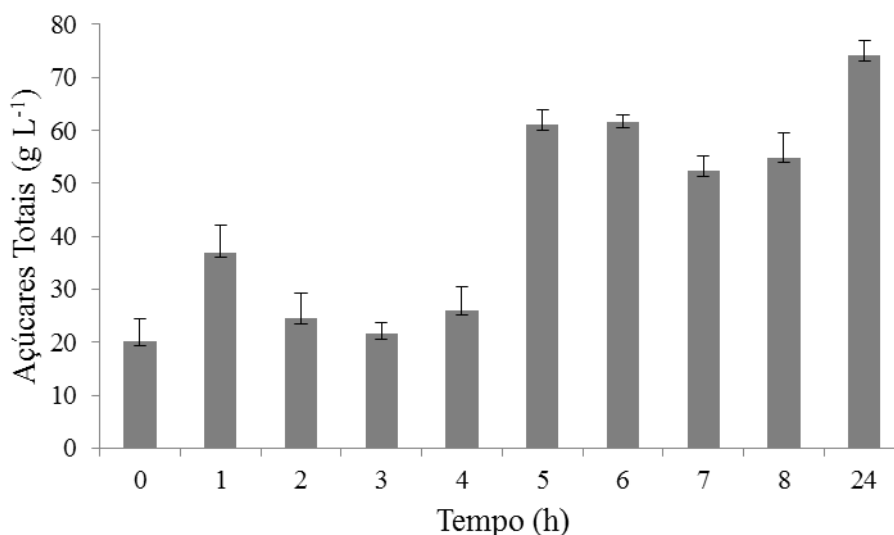
5.1 Ensaios de hidrólise

5.1.1 Cascas de banana

Os parâmetros do pré-tratamento ácido das cascas de frutas utilizadas nesse trabalho foram estudados e definidos em trabalhos anteriores (FERREIRA, 2013). As cascas de banana foram secas, trituradas e padronizadas quanto ao tamanho de partícula, com tamanhos menores ou iguais a 1,41 mm. Após a padronização da matéria-prima, estas foram submetidas ao pré-tratamento com ácido sulfúrico a 5%, durante 15 min, etapa a qual promoveu a liberação de 20,3 g L⁻¹ de açúcares totais.

Após a etapa de pré-tratamento, as amostras foram hidrolisadas enzimaticamente. Na Figura 9 são apresentadas as concentrações de açúcares totais obtidas durante o tratamento enzimático das cascas de banana, nos tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 24 h.

Figura 9 - Liberação de Açúcares Totais (AT) durante a hidrólise enzimática de cascas de banana pré-tratadas.



A Análise de Variância e comparação das médias pelo Teste de Tukey, a 5% de significância, mostraram diferença significativa entre as amostras, e a hidrólise enzimática durante 24 h teve maior liberação de açúcares (74,1 g L⁻¹). A hidrólise enzimática aumentou a concentração de açúcares em praticamente 4 vezes da concentração inicial. Após essas

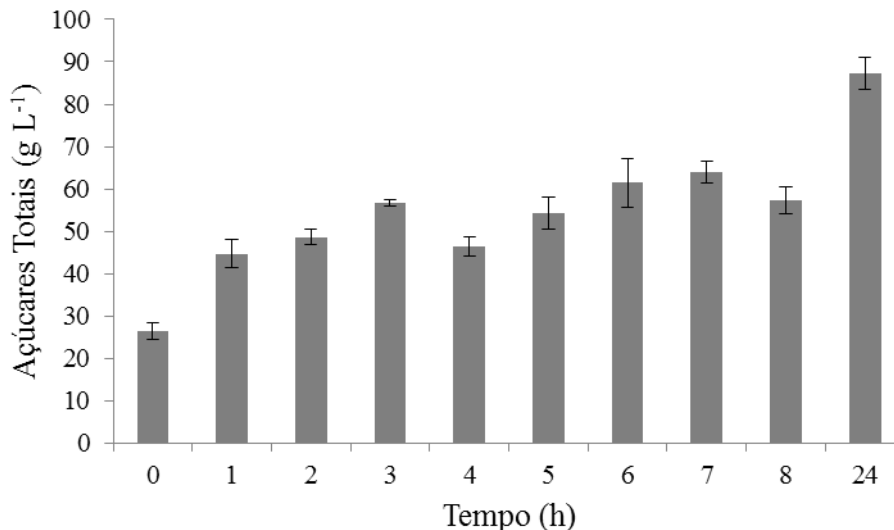
análises, foi padronizado o tempo de 24 h para a realização de hidrólise enzimática de todas as cascas de banana utilizadas no trabalho.

5.1.2 Cascas de maracujá

Assim como as cascas de banana, as cascas de maracujá também foram secas, trituradas e padronizadas quanto ao tamanho de partícula. Após a padronização, as cascas de maracujá foram submetidas ao pré-tratamento ácido, o qual promoveu uma liberação de 26,4 g L⁻¹ de açúcares totais.

Após o pré-tratamento, as cascas foram submetidas ao processo de hidrólise enzimática, realizada durante os tempos de 0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8 e 24 h. Na Figura 10 são apresentadas as concentrações de açúcares totais obtidos durante o tratamento enzimático das cascas de maracujá.

Figura 10 – Liberação de Açúcares Totais (AT) durante a hidrólise enzimática de cascas de maracujá pré-tratadas.



A Análise de Variância e comparação das médias pelo Teste de Tukey, a 5% de significância, mostraram diferença significativa entre as amostras, e a hidrólise enzimática durante 24 h teve maior liberação de açúcares (87,2 g L⁻¹).

As cascas de maracujá são pouco exploradas como matéria-prima para produção de etanol, não são encontrados muitos dados na literatura, um dos estudos encontrados foi realizado por Almeida et al. (2015). Esses pesquisadores avaliaram a produção de β -

glicosidases utilizando casca de maracujá como substrato e depois as hidrolisaram, utilizando essas enzimas produzidas. Para isto, as cascas foram pré-tratadas utilizando um processo alcalino e então hidrolisadas pelas enzimas β -glicosidases. Houve uma liberação de $6,4 \text{ g L}^{-1}$ de glicose, o que correspondeu a 45,54 % de rendimento do processo.

5.1.3 Casca de coco

As cascas de coco verde foram trituradas e secas ao sol. Devido ao aspecto fibroso das cascas de coco, conforme apresentado na Figura 11, esse resíduo não foi padronizado quanto ao tamanho de partícula. Após a secagem da matéria-prima, estas foram submetidas ao pré-tratamento com ácido sulfúrico a 5%, durante 15 min, que promoveu a liberação de $9,4 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais. Valores próximos foram determinados por Prado et al. (2014), que a partir da hidrólise da casca de coco com água no estado subcrítico, a 259°C , por 30 min, encontraram $11,7 \text{ g}$ de açúcares redutores para cada 100 g de matéria seca.

Figura 11 – Cascas de coco verde, trituradas e desidratadas.



FONTE: Elaborada pelo autor.

Após a etapa de pré-tratamento, as amostras foram hidrolisadas enzimaticamente por 24 h, o que proporcionou aumento na concentração de açúcares totais, sendo determinados $13,4 \text{ g L}^{-1}$. Se comparadas às outras cascas avaliadas, houve baixo rendimento na liberação de açúcares. Isso pode ser justificado devido ao alto teor de lignina desse substrato, pois segundo Vaithanomsat et al. (2011), a casca de coco tem em torno de 30 % de lignina. Segundo Ayeni

et al. (2016), a lignina interfere na hidrólise enzimática, pois bloqueia o acesso da celulase e promove uma ligação irreversível com as enzimas hidrolíticas.

Isso foi comprovado por Cabral (2015), quando as cascas de coco foram pré-tratadas por H_2SO_4 a 5%, houve pouca liberação de açúcares após a hidrólise enzimática ($2,7 \text{ g L}^{-1}$). Os resultados mais satisfatórios foram obtidos do material pré-tratado em meio alcalino, com 5% de NaOH, após a conversão enzimática, determinaram $8,7 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares. Essa diferença pode ser explicada devido ao uso de NaOH. O pré-tratamento alcalino reduz a concentração de lignina do substrato, enquanto a biomassa pré-tratada por ácido possui grande quantidade de lignina em sua composição, a qual favorece a inibição dos agente enzimáticos.

5.1.4 Detoxificação

Os hidrolisados de casca de banana, maracujá e coco foram tratados com carvão ativo comercial (tamanho de partícula $<100 \mu\text{m}$) para remover compostos inibitórios. O teor de compostos fenólicos presentes foi determinado antes e após o processo de detoxificação, e os valores estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Concentração de Sólidos Totais (ST) e Compostos Fenólicos (CF) determinados antes e após o tratamento de detoxificação do hidrolisado das cascas de banana, maracujá e coco.

Ensaio	ST _{antes} (%)	ST _{depois} (%)	CF _{antes} (g L^{-1})	CF _{depois} (g L^{-1})
Casca de banana	17	17	$0,8 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,1$
Casca de maracujá	12	11	$1,0 \pm 0,0$	$0,2 \pm 0,0$
Casca de coco	10	12	$2,3 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,0$

Analisando os dados da Tabela 5, verifica-se que, após o tratamento de detoxificação, 75% dos compostos fenólicos foram removidos dos hidrolisados de casca de banana e analisando o teor de sólidos totais, não houve alteração após o tratamento. Na avaliação dos resultados obtidos para o hidrolisado de casca de maracujá, 80% dos compostos fenólicos foram removidos e, com relação à concentração de sólidos totais, houve uma pequena redução, a concentração inicial era de 12%, após o tratamento com o carvão ficou em 11%.

Os dados apresentados na Tabela 5 mostram que as cascas de coco apresentaram a maior concentração de compostos fenólicos após os tratamentos de hidrólise ($2,3 \text{ g L}^{-1}$) em comparação as demais cascas, que pode ser devida a composição desse substrato, o qual tem

alta concentração de lignina. Segundo Vaithanomsat et al. (2011), as cascas de coco contêm em torno de 30% de lignina. Ainda analisando a Tabela 5, verifica-se que em torno de 91% desses compostos foram removidos do caldo após a detoxificação. Já com relação aos sólidos totais, observou-se um comportamento diferente, após a etapa de desintoxicação, houve um pequeno aumento, de 10 passou para 12%.

Portanto, o tratamento de detoxificação foi vantajoso para os hidrolisados, uma vez que removeu grande quantidade dos compostos fenólicos do meio, os quais poderiam ser tóxicos aos micro-organismos, e, de acordo com Mussatto e Roberto (2004b), compostos tóxicos podem estressar micro-organismos fermentativos, reduzindo a capacidade de assimilação dos açúcares e, consequentemente, a formação do produto.

Günan Yücel e Aksu (2015) obtiveram resultados parecidos com esse trabalho, a remoção compostos fenólicos foi de 71,1%, após o processo de detoxificação do hidrolisado de bagaço de beterraba, utilizando carvão ativo comercial.

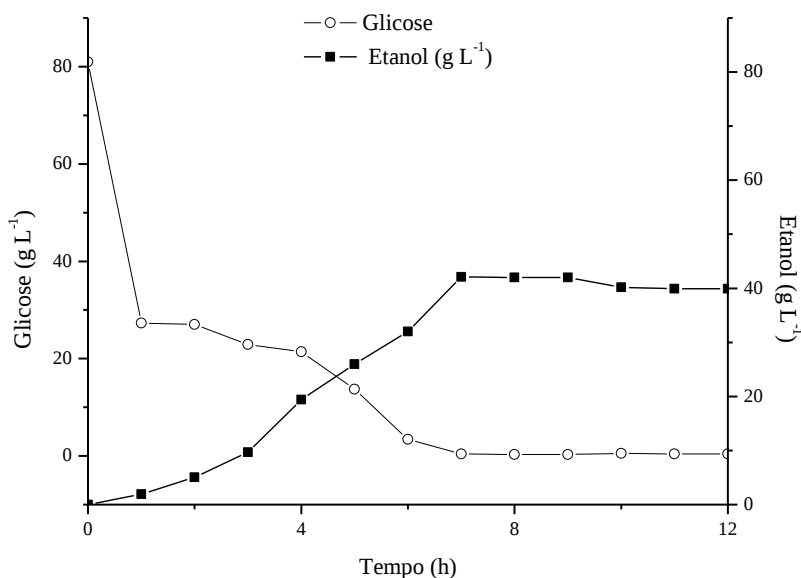
5.2 Ensaio de fermentação

5.2.1 Parâmetros cinéticos da bactéria *Zymomonas mobilis*

Visando avaliar o comportamento da bactéria *Z. mobilis* na fermentação alcoólica, realizou-se um ensaio de fermentação com meio sintético utilizando glicose como fonte de carbono durante 12 h. O perfil fermentativo determinado nessa fermentação está apresentado nas Figura 12 e 13.

Analisando as figuras, observa-se que nas primeiras sete horas ocorreram as maiores transformações, o substrato foi praticamente consumido nesse período, com aumento significativo da produção de etanol (Figura 12), redução do pH e crescimento celular (Figura 13).

Figura 12 – Avaliação do açúcar residual (g L^{-1}) e da produção de etanol, durante a fermentação de glicose por *Z. mobilis*, incubada a 30°C , sem agitação, por 12 h.

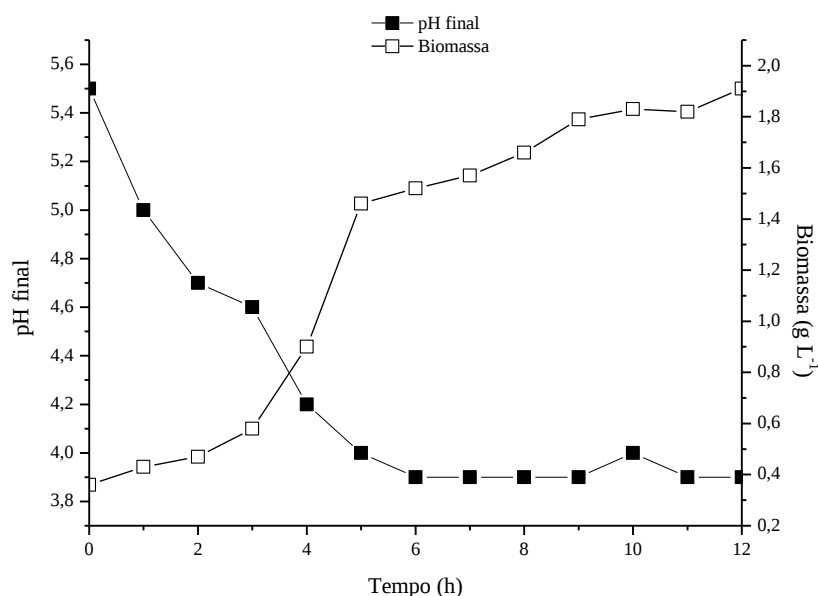


Com relação à produção de etanol (Figura 12), pode ser verificado que desde as primeiras horas ocorreu produção, com crescente aumento durante o processo fermentativo. A produção máxima de etanol, $42,1 \text{ g L}^{-1}$, foi alcançada em 7 h de fermentação, com redução do pH para 3,9, biomassa de $1,6 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade $6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O tempo ápice da produção de etanol do trabalho de Fu e Peiris (2008), fermentando glicose por *Z. mobilis* com agitação de 100 rpm, também foi próximo ao encontrado nesse trabalho, a maior concentração do produto, $23,5 \text{ g L}^{-1}$, foi determinada em 8 h. Também foi verificado uma correlação entre o baixo pH final e a produção de etanol, segundo esses pesquisadores, o pH do meio é um bom indicador do andamento da fermentação. A redução do pH é devido a produção de dióxido de carbono (CO_2), ácido acético e ácidos orgânicos, durante a produção do etanol.

Pode ser observado na Figura 13, que nas primeiras 6 horas ocorreu redução do pH do meio, o qual passou de 5,5 para 3,9, permanecendo praticamente constante até o final da fermentação. Na literatura são encontrados diversos trabalhos mostrando o mesmo comportamento em relação ao pH final, Santos, Bianchi e Garcia-Cruz (2014) avaliaram a cinética de *Z. mobilis* em meio adicionado de sacarose, a 30°C , e também observaram a redução do pH nas primeiras horas de fermentação; o pH final ficou entre 3,6 e 3,8, para o meio com pH inicial de 5,0. Esses pesquisadores afirmam que essa redução no pH final é

decorrente da capacidade da *Z. mobilis* em produzir metabólitos típicos durante o crescimento celular e o consumo de açúcares.

Figura 13 – Relação entre pH final e crescimento celular de *Z. mobilis* na fermentação da glicose, incubada a 30°C, sem agitação, por 12 h.



O crescimento celular teve aumento proporcional ao aumento do tempo de fermentação e consumo do substrato, com maior massa, 1,9 g L⁻¹, encontrada em 12 h de fermentação. Pode ser verificado que nas primeiras horas houve pouco crescimento, com aumento de biomassa a partir da terceira hora. Entretanto, esse crescimento não foi muito alto, e de acordo com a literatura, essa é uma característica marcante dessa bactéria, baixo crescimento celular e utilização do substrato para a síntese de etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Após a determinação do melhor tempo para a produção de etanol, avaliou-se a influência da agitação na produção de etanol por *Z. mobilis*; as fermentações foram conduzidas a 30°C, durante 7 h, utilizando um meio sintético, com concentração inicial de glicose de 45 g L⁻¹ e pH inicial de 5,5. A agitação empregada nesses ensaios e as concentrações de etanol obtidas estão apresentadas na Tabela 6. De acordo com a análise estatística, pode ser verificado que houve diferença entre as amostras, a agitação teve influência na produção de etanol e a maior concentração obtida foi de 22,5 g L⁻¹ de etanol, com agitação de 50 rpm. Com relação ao crescimento celular, não houve muita variação entre

as amostras, a biomassa variou de 1,2 a 1,7 g L⁻¹. Além disso, os maiores consumos de substrato foram determinados nos ensaios com agitação de 50 rpm e estática, quando a agitação foi igual ou maior que 100 rpm, o consumo reduziu. O mesmo foi observado por Toma et al. (2003) no estudo da influência da agitação na fermentação de glicose por *Z. mobilis*, a taxa de consumo do substrato diminuiu paralelamente ao aumento da agitação (rpm) empregada no processo.

Tabela 6 – pH final, biomassa, substrato consumido e concentrações de etanol determinadas durante a avaliação da influência da agitação na produção de etanol por *Z. mobilis*, utilizando glicose como substrato do meio sintético, durante 7 h, incubada a 30°C.

Condições avaliadas (rpm)	pH final	Biomassa (g L⁻¹)	Substrato consumido (g L⁻¹)	Etanol (g L⁻¹)
0	3,9	1,5 ± 0,2	44,6 ± 0,0	18,5 ± 0,9 ^b
50	3,6	1,7 ± 0,1	44,5 ± 0,1	22,5 ± 1,0 ^a
100	3,8	1,5 ± 0,1	33,6 ± 1,5	12,8 ± 0,5 ^c
150	4,0	1,2 ± 0,0	31,3 ± 0,4	11,4 ± 0,3 ^c
200	3,7	1,2 ± 0,2	37,9 ± 1,5	6,8 ± 0,1 ^d

*Letras iguais na mesma coluna indicam que as médias são iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância.

De acordo com Melo et al. (2007), além da oxigenação, a agitação também facilita a homogeneidade do meio, permitindo um melhor acesso do micro-organismo ao substrato. No entanto, a agitação de até 100 rpm pode aumentar, consideravelmente, a oxigenação do meio e, segundo Ishikawa, Nobayashi e Tanaka (1990), o oxigênio desvia a via metabólica de síntese de etanol para produção de acetaldeído, o qual inibe o crescimento celular de *Z. mobilis*. As observações desses pesquisadores podem explicar o comportamento da bactéria e a escolha da melhor agitação (50 rpm), pelo fato de que não foi uma agitação muito forte, ao ponto de aumentar a oxigenação do meio, mas foi suficiente para promover a homogeneização, favorecendo o desenvolvimento e crescimento celular e consequentemente, a produção de etanol.

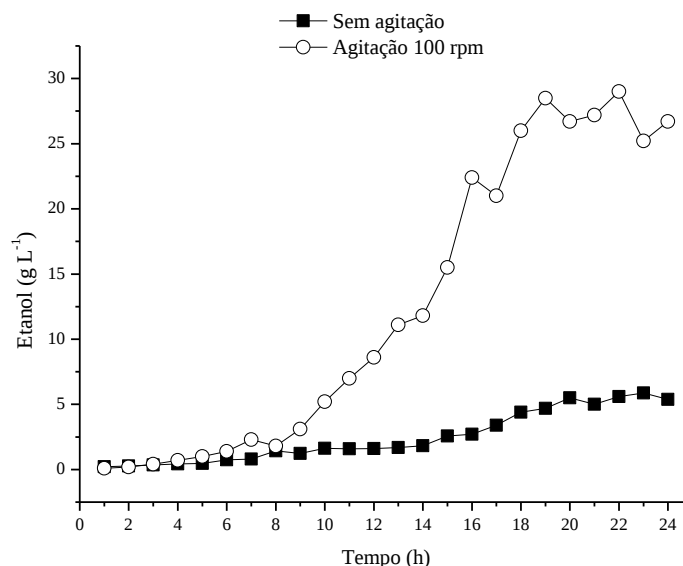
De acordo com os resultados apresentados e discutidos, foram estabelecidos, para as próximas etapas do trabalho, os parâmetros de tempo de fermentação e agitação de 7 h e 50 rpm, respectivamente.

5.2.2 Parâmetros cinéticos da levedura *Pachysolen tannophilus*

Inicialmente foram realizados alguns testes para avaliar a influência da agitação e o melhor tempo de fermentação para produção de etanol por *P. tannophilus*. As fermentações foram realizadas durante 24, 48 e 72 h, sem agitação e sob agitação de 50 e 100 rpm. Nos processos realizados sem agitação, a síntese de etanol ocorreu de forma mais lenta, em 24 horas a produção foi de 7,8 g L⁻¹, passando para 33,7 g L⁻¹ em 72 horas de fermentação. Com agitação de 50 rpm, a produção máxima foi de 32,3 g L⁻¹, determinada em 48 h. Já com agitação de 100 rpm a maior produção de etanol foi determinada em 24 h, com produção máxima de 31,0 g L⁻¹. Foi observado também que agitação aliada a longo tempo de fermentação provoca redução na concentração de etanol, notado nos dois experimentos com agitação, de 50 e 100 rpm. De acordo com a literatura, a *P. tanophilus* pode consumir o etanol produzido e essa taxa aumenta paralelamente ao aumento da intensidade de aeração do meio (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982).

Foram realizados dois experimentos, um com agitação de 100 rpm e outro sem agitação, durante 24 h, para determinar a melhor condição para produção de etanol. Os resultados dessas análises estão apresentados na Figura 14. Pode se observar que a agitação do meio favoreceu a produção de etanol, as concentrações obtidas do produto oscilaram entre 0,1 e 29,0 g L⁻¹, enquanto que no meio sem agitação as concentrações variaram de 0,2 a 5,9 g L⁻¹. Nos ensaios realizados sob agitação, foram encontrados dois picos de produção de etanol, em 19 e 22 h, e, de acordo com as análises estatísticas (ANOVA), os tempos de 19 e 22 h, com produção de etanol de 28,5 e 29,0 g L⁻¹, respectivamente, foram iguais ao nível de significância de 5%.

Figura 14 - Produção de etanol pela levedura *P. tannophilus*, por 24 h, durante o processo de fermentação estática e com agitação de 100 rpm, incubada à temperatura de 30°C utilizando glicose como substrato do meio sintético.



O crescimento celular (Biomassa) e o pH final estão apresentados na Figura 15. Avaliando a biomassa, nota-se uma grande diferença nos valores obtidos, a maior massa encontrada foi de 1,6 g L⁻¹ nos ensaios realizados sem agitação, e com agitação a maior massa foi de 9,7 g L⁻¹. O mesmo foi observado para os valores de pH final, na fermentação estática houve pequena variação, já com o processo realizado sob agitação, a redução do pH final foi maior, com variação de 5,3 na primeira hora para 3,2 no final da fermentação.

A maioria das leveduras necessita de um ambiente anaeróbio para produção de etanol, entretanto existem algumas exceções, como a *P. tannophilus*: segundo Neirinck, Maleszka e Schneider (1984), o crescimento dessa levedura, utilizando glicose e xilose, requer oxigenação do meio.

Figura 15 - Crescimento celular da levedura *P. tannophilus* durante 24 h de fermentação utilizando glicose com substrato do meio sintético, incubada a 30°C, com agitação de 100 rpm e sem agitação.

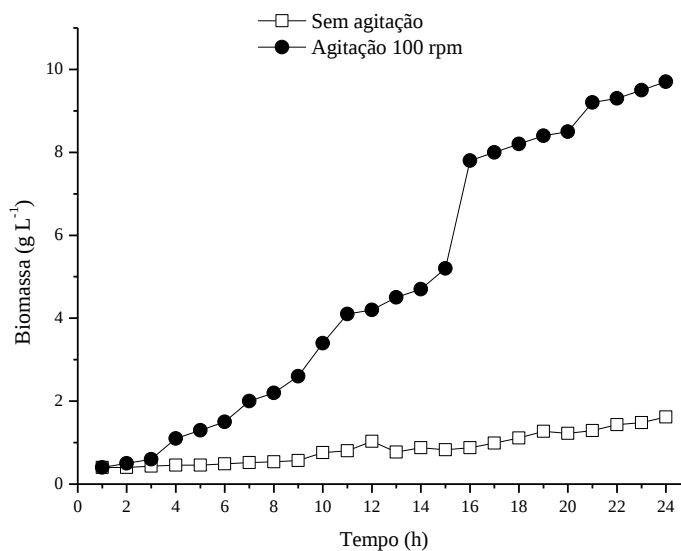
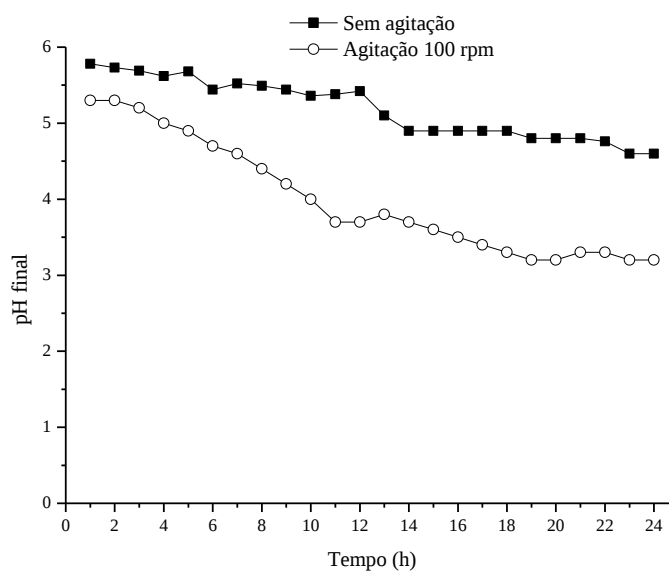
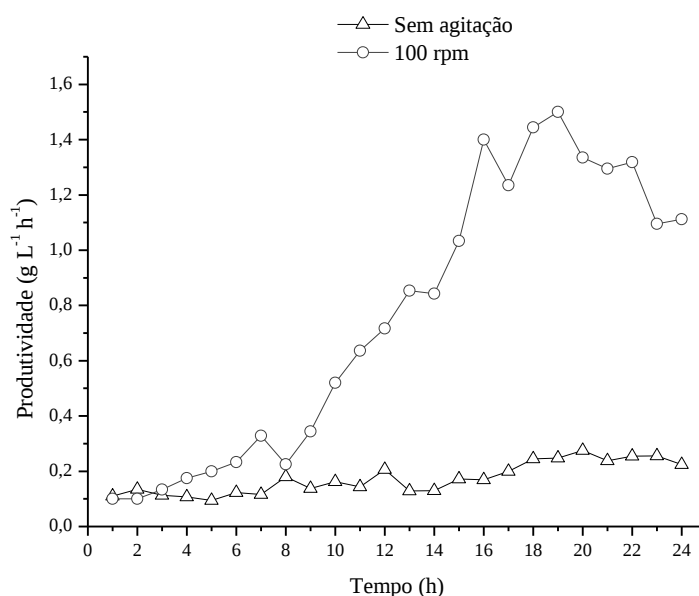


Figura 16 – Determinação do pH final da fermentação utilizando glicose com substrato do meio sintético, pela levedura *P. tannophilus* durante 24 h, incubada a 30°C, com agitação de 100 rpm e sem agitação.



Com as massas de etanol obtidas e os tempos de fermentação, foi possível calcular a produtividade de etanol (Q_p) para cada ensaio realizado (Figura 17), de acordo com a equação 2. A maior produtividade encontrada foi de $1,5 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de etanol, determinados na 19ª h de fermentação, nos experimentos realizados sob agitação a 100 rpm. Já nos ensaios sem agitação, a produtividade não passou de $0,3 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esse valor, somado à análise estatística, mostram que o tempo de 19 h de fermentação e agitação a 100 rpm são as melhores condições para os processos envolvendo a levedura *P. tanophilus* na produção de etanol.

Figura 17 - Produtividade de etanol da levedura *P. tannophilus* para os dois ensaios realizados, com agitação de 100 rpm e sem agitação, incubada a 30°C por 24 h.



De acordo com os resultados apresentados e discutidos, foram definidos para as próximas etapas do trabalho o melhor tempo de fermentação para produção de etanol e agitação de 19 h e 100 rpm, respectivamente.

5.3 Fermentações com a bactéria *Zymomonas mobilis*

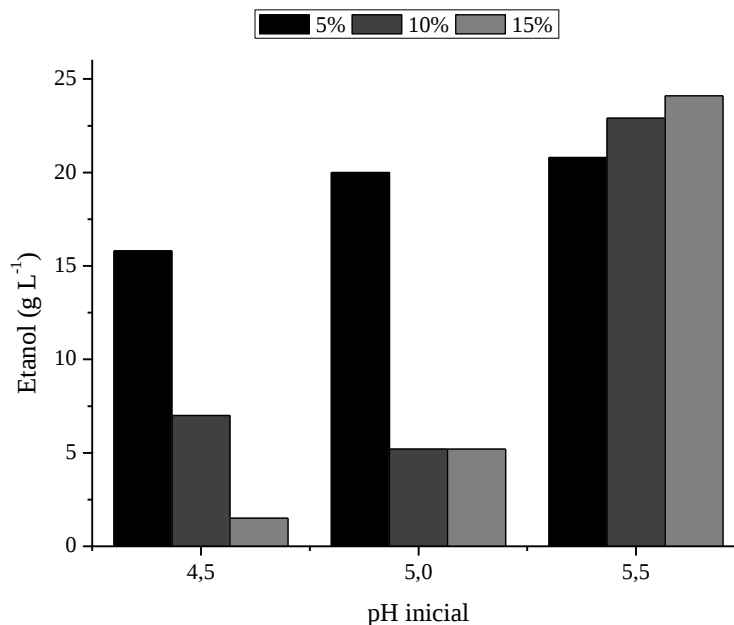
Foram realizadas fermentações descontínuas em triplicata, com o meio sintético, meios compostos pelos hidrolisados de cascas de banana, maracujá e coco, variando as concentrações de substrato e pH inicial do meio. As fermentações foram realizadas durante 7

h, com coletas de amostras de todos os ensaios para determinação do pH final, açúcares totais, biomassa e etanol.

5.3.1 Meio sintético

Os resultados médios da produção de etanol, para as diferentes concentrações de glicose usadas como substrato, estão apresentados na Figura 18. As produções de etanol com o meio contendo glicose com concentração de 5% não apresentaram diferença significativa quanto aos diferentes valores de pH inicial dos meios avaliados. Verifica-se que as concentrações de etanol variaram de 15,8 a 20,8 g L⁻¹. Com essa concentração, foi determinado o maior rendimento, 0,45 g g⁻¹ de etanol pelo substrato consumido (Tabela 7). Já para as concentrações de substrato de 10 e 15%, houve diferença significativa entre os valores de pH inicial testados, sendo o pH inicial de 5,5 o melhor para as duas concentrações. Com esse pH inicial, foram encontradas produções e produtividade de etanol de 22,9 g L⁻¹ e 3,3 g L⁻¹ h⁻¹ e 24,1 g L⁻¹ e 3,4 g L⁻¹ h⁻¹ com concentração do substrato de 10 e 15%, respectivamente. Com pH 4,5 e 5,0, para ambas concentrações de substrato, foram encontrados valores menores, conforme pode-se observar na Figura 18.

Figura 18 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.



Com relação ao crescimento celular (Tabela 7), nos ensaios utilizando 5% de glicose, a biomassa média foi de 1,4 g L⁻¹ entre os pH iniciais avaliados. Pode ser observado que, nesses ensaios, houve grande redução do pH final, ficando em torno de 3,6. Com concentração de glicose de 10%, o comportamento da bactéria foi diferente: o crescimento celular foi baixo e a concentração da biomassa ficou entre 0,1 e 0,9 g L⁻¹. Esse maior crescimento celular (0,9 g L⁻¹) foi determinado nos ensaios com pH inicial de 5,5, o qual teve redução para 3,6 no final da fermentação, além de ter favorecido a produção de etanol (22,9 g L⁻¹).

Já com o substrato na concentração de 15%, a bactéria apresentou o maior crescimento de todos os ensaios. A maior concentração de biomassa, 3,2 g L⁻¹, foi encontrada nos ensaios de fermentação com pH inicial de 4,5. Apesar do crescimento do micro-organismo, a síntese do produto não foi proporcional, pelo contrário, foram os menores valores encontrados de produção, produtividade e rendimento de etanol, 1,5 g L⁻¹, 0,2 g L⁻¹ h⁻¹ e 0,14 g g⁻¹, respectivamente. Estas análises deixaram evidente que o pH inicial de 4,5 e o aumento da concentração do substrato não contribuíram para o aumento da produção de etanol. Já com pH inicial de 5,5, a *Z. mobilis* conseguiu crescer e sintetizar o etanol, encontrando-se valores de biomassa e produto de 1,9 e 24,1 g L⁻¹, respectivamente.

Tabela 7 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação da glicose utilizada como substrato do meio sintético por *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	1,1 ± 0,1	3,6	43,0 ± 0,1	2,3	0,37
10%	0,1 ± 0,1	3,9	20,4 ± 2,0	1,0	0,34
15%	3,2 ± 0,3	4,0	10,6 ± 1,5	0,2	0,14
pH 5,0					
5%	1,5 ± 0,6	3,5	46,1 ± 0,1	2,9	0,43
10%	0,5 ± 0,2	4,3	15,4 ± 0,8	0,7	0,33
15%	0,1 ± 0,2	4,3	20,7 ± 2,0	0,7	0,25
pH 5,5					
5%	1,5 ± 0,5	3,6	46,1 ± 0,1	3,0	0,45
10%	0,9 ± 0,1	3,6	61,4 ± 1,6	3,3	0,37
15%	1,9 ± 0,1	3,6	71,1 ± 1,9	3,4	0,34

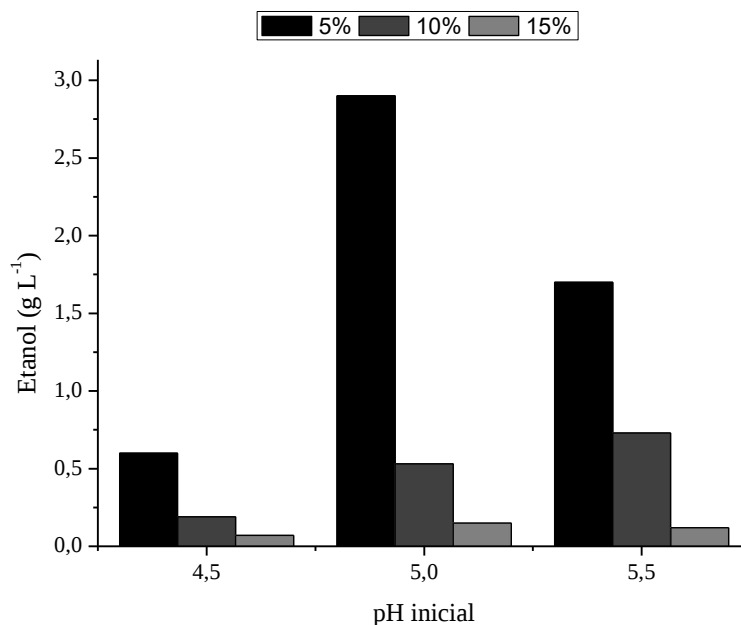
Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

5.3.2 Hidrolisado de casca de banana

As concentrações de etanol obtidas durante a fermentação do hidrolisado de casca de banana estão apresentadas na Figura 19. Foram avaliadas três concentrações de substrato, 5, 10 e 15%, as quais correspondem as concentrações de açúcares de 16,8 g L⁻¹, 29,8 g L⁻¹ e 57,2 g L⁻¹, respectivamente, e para cada concentração de substrato foram avaliados três pH iniciais dos meios. O pH inicial do meio influenciou a produção de etanol nos ensaios com concentrações de substrato de 5 e 10 %. Já com a concentração de 15%, não houve diferença significativa entre as médias de produção de etanol em relação ao pH inicial do meio, além das menores produções de etanol terem sido encontradas nesses ensaios.

Figura 19 – Efeito do pH inicial e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de banana usado como substrato sobre a produção de etanol por *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.



A maior produção, produtividade e rendimento de etanol ($2,9 \text{ g L}^{-1}$; $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; $0,38 \text{ g g}^{-1}$) foram encontrados na fermentação realizada com concentração de substrato de 5% e pH inicial de 5,0. Nesse experimento a biomassa encontrada foi de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ e o pH final praticamente não alterou. O crescimento celular foi muito parecido entre todos os ensaios, ficando com uma média de $0,1 \text{ g L}^{-1}$. A produção de etanol foi inversamente proporcional ao aumento na concentração de açúcares do meio, essa observação também foi feita por Cazetta et al. (2007), durante a fermentação de melaço de cana, contendo diversas concentrações de açúcares, por *Z. mobilis*. Estes pesquisadores observaram que a produção de etanol foi reduzida com aumento de concentração do substrato, e concluíram que essa redução no meio contendo alta concentração de açúcares ocorreu devido ao aumento na pressão osmótica do meio.

Nas outras condições avaliadas (10 e 15%), a produção de etanol ficou abaixo de 1 g L^{-1} . Resultados parecidos foram encontrados por Monsalve et al. (2006), avaliando a hidrólise ácida de cascas de banana para produção de etanol por *Z. mobilis*, onde foram encontrados valores menores que $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de etanol.

De acordo com a Tabela 8, *Z. mobilis* apresentou baixa produção de biomassa ($0,1 - 0,3 \text{ g L}^{-1}$) em todas as condições testadas. A maior produção de biomassa não foi proporcional

a maior produção de etanol. De acordo com a Tabela 8, o maior valor de biomassa a(0,3 g L⁻¹) foi observado usando cascas de banana hidrolisadas na concentração de 15% e pH inicial de 5,0 e 5,5. Além disso, as concentrações de substrato consumido em cada ensaio, apresentados na Tabela 8, mostraram que *Z. mobilis* conseguiu metabolizar o substrato, mas a maior parte não foi usada para o crescimento celular. Para fornecer energia suficiente para o crescimento, *Z. mobilis* metaboliza substratos com altas taxas específicas, resultando em baixo rendimento de biomassa (TOMA et al., 2003). Segundo Cazetta et al. (2007), baixa produção de biomassa é uma característica da bactéria *Z. mobilis*, na qual crescimento celular e produção de etanol não estão acoplados.

Tabela 8 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação no meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	0,1 ± 0,0	4,6	6,1 ± 1,3	0,09	0,1
10%	0,2 ± 0,0	4,6	4,2 ± 2,9	0,03	0,04
15%	0,2 ± 0,0	4,7	17,0 ± 1,1	0,01	0,004
pH 5,0					
5%	0,1 ± 0,0	5,1	7,6 ± 1,7	0,41	0,38
10%	0,1 ± 0,0	5,1	7,1 ± 0,6	0,08	0,07
15%	0,3 ± 0,0	5,1	20,5 ± 0,2	0,02	0,007
pH 5,5					
5%	0,2 ± 0,0	5,4	8,3 ± 0,5	0,24	0,20
10%	0,2 ± 0,0	5,6	5,6 ± 1,9	0,10	0,13
15%	0,3 ± 0,0	5,5	21,4 ± 2,2	0,02	0,006

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

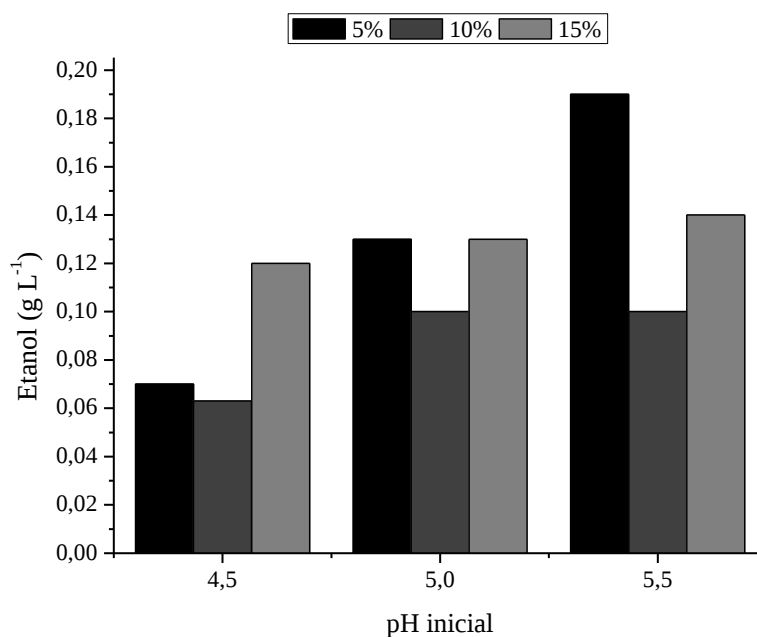
Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

5.3.3 Hidrolisado de casca de maracujá

O hidrolisado de casca de maracujá também foi fermentado pela bactéria *Z. mobilis*, sendo testadas três concentrações de substrato 5, 10 e 15%, os quais correspondem às concentrações de açúcares de 33,6; 41,3 e 48,4 g L⁻¹, respectivamente, em três pH iniciais (4,5; 5,0 e 5,5). Os resultados da produção de etanol estão apresentados na Figura 20 e a biomassa, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação estão apresentados na Tabela 9.

As produções de etanol utilizando cascas de maracujá foram muito pequenas, ficaram abaixo de 1 g L⁻¹, em todos os ensaios realizados. Avaliando a concentração de sólidos de 5%, houve diferença significativa entre as médias avaliadas em relação ao pH inicial do meio de fermentação, sendo 0,19 g L⁻¹ o maior valor de etanol encontrado, com pH inicial de 5,5. Com 10%, apesar de haver diferença significativa, a produção foi pequena, com 0,1 g L⁻¹. Testando 15% de concentração de sólidos, não houve diferença entre as amostras em relação ao pH inicial do meio, e as produções de etanol ficaram em torno de 0,13 g L⁻¹.

Figura 20 - Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de maracujá usado como substrato na produção de etanol pela bactéria *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.



Analisando os dados de crescimento celular (Tabela 9), verifica-se que *Z. mobilis* apresentou maior massa celular do que nas fermentações utilizando casca de banana, condições nas quais a biomassa celular não passou de $0,3 \text{ g L}^{-1}$. Com hidrolisado de casca de maracujá, a massa celular ficou entre $0,4$ e $0,8 \text{ g L}^{-1}$. Com relação ao consumo de substrato, pode ser inferido que os maiores consumos ocorreram nos ensaios empregando substrato com menor concentração (5%), foram utilizados em torno de 24 g L^{-1} dos açúcares presentes no meio. Já com concentração de 10% e 15%, o consumo não passou de 20 g L^{-1} . E o pH final do meio não diminuiu em nenhum dos ensaios avaliados. Além disso, a produtividade em todos os ensaios ficou abaixo de $1 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabela 9 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá por *Z. mobilis*, incubada a 30°C , por 7 h e agitação de 50 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L^{-1})	pH final	Substrato consumido (g L^{-1})	Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ (g g^{-1})
pH 4,5					
5%	$0,6 \pm 0,2$	4,6	$24,7 \pm 1,0$	0,01	0,003
10%	$0,7 \pm 0,1$	4,6	$14,7 \pm 1,7$	0,01	0,004
15%	$0,8 \pm 0,1$	4,6	$17,5 \pm 1,3$	0,02	0,007
pH 5,0					
5%	$0,4 \pm 0,1$	5,1	$24,4 \pm 1,1$	0,02	0,005
10%	$0,6 \pm 0,0$	5,1	$19,3 \pm 0,6$	0,01	0,005
15%	$0,7 \pm 0,2$	5,1	$16,6 \pm 0,5$	0,02	0,008
pH 5,5					
5%	$0,4 \pm 0,1$	5,5	$25,0 \pm 0,6$	0,03	0,008
10%	$0,7 \pm 0,1$	5,5	$20,6 \pm 0,3$	0,01	0,005
15%	$0,4 \pm 0,2$	5,5	$20,4 \pm 1,0$	0,02	0,007

$Y_{p/s} (\text{g g}^{-1})$ = rendimento de etanol por substrato.

$Q_p (\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1})$ = produtividade de etanol.

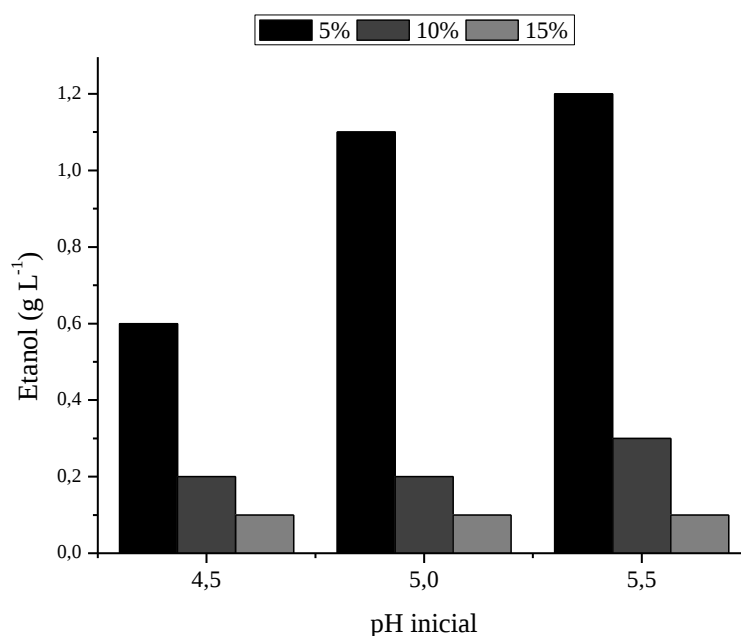
Edwards e Doran-Peterson (2012) apresentaram uma revisão dos principais resíduos ricos em pectina (resíduos do processamento de citros, maçã e beterraba) que podem ser utilizados para produção de etanol, e, segundo esses pesquisadores, biomassa rica em pectina

tem baixa concentração de lignina, e alta concentração de pectina, variando de 12 a 35%. A pectina é um carboidrato complexo que tem em sua maior composição ácido galacturônico (70%), podendo conter também ramnose, xilose, arabinose e galactose. Entretanto, um dos pontos negativos da utilização desse tipo de resíduo na produção de etanol é que o ácido galacturônico e arabinose não podem ser fermentados pelos micro-organismos comumente utilizados na fermentação alcoólica. Essa informação pode ser relacionada à baixa produção de etanol obtida com a *Z. mobilis*, pois a casca de maracujá tem em média 25% de pectina (LOUSADA JÚNIOR et al., 2006), esse micro-organismo além de não fermentar pentoses, também não fermenta o ácido galacturônico, liberado na hidrólise da biomassa.

5.3.4 Hidrolisado de casca de coco

Cascas de coco hidrolisadas também foram utilizadas como substrato para produção de etanol por *Z. mobilis*. Foram testadas três concentrações diferentes do substrato, 5, 10 e 15%, as quais correspondem à concentração de açúcares redutores de 11,2; 20,5 e 24,3 g L⁻¹, respectivamente. A produção de etanol por *Z. mobilis* usando cascas de coco hidrolisadas está apresentada na Figura 21. As produções de etanol não passaram de 1,2 g L⁻¹ em todos os ensaios avaliados. A melhor concentração de sólidos utilizada foi de 5%, houve diferença significativa entre os pH iniciais do meio avaliados, sendo que pH inicial de 5,0 e 5,5 foram os melhores para produção de etanol, e nessas condições, a concentração de etanol e produtividade foi de 1,1 g L⁻¹ e 0,16 g L⁻¹ h⁻¹ (pH 5,0) e 1,2 g L⁻¹ e 0,17 g L⁻¹ h⁻¹ (pH 5,5), respectivamente. Além disso, o melhor rendimento (0,26 g g⁻¹) também foi encontrado nesses ensaios. De acordo com os dados apresentados, o aumento na concentração de sólidos (15%) não favoreceu ao aumento na síntese de etanol, nesses ensaios o produto ficou entre 0,06 e 0,09 g L⁻¹.

Figura 21 - Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol pela bactéria *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.



Conforme dados apresentados na Tabela 10, observa-se que a bactéria apresentou baixo crescimento em todos os ensaios avaliados. Em relação ao pH final do caldo fermentado, nos ensaios com pH inicial de 4,5, houve um pequeno aumento durante a fermentação, cujos pH finais ficaram em 4,8, já com os pH iniciais de 5,0 e 5,5, não houve alteração. Além disso, o consumo de substrato não foi alto, variou de 4,2 (5%; pH 4,5) a 7,3 g L⁻¹ (15%; pH 5,5). Isso evidencia que a *Z. mobilis* não conseguiu se adaptar a esse meio para sintetizar os açúcares e produzir etanol.

Tabela 10 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de coco por *Z. mobilis*, incubada a 30°C, por 7 h e agitação de 50 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	0,2 ± 0,0	4,8	4,5 ± 0,2	0,09	0,13
10%	0,3 ± 0,0	4,8	5,4 ± 0,5	0,03	0,04
15%	0,3 ± 0,0	4,8	6,4 ± 0,1	0,01	0,02
pH 5,0					
5%	0,2 ± 0,0	5,0	4,2 ± 0,2	0,16	0,26
10%	0,3 ± 0,0	5,0	6,2 ± 0,2	0,03	0,03
15%	0,3 ± 0,0	5,2	7,2 ± 0,0	0,01	0,01
pH 5,5					
5%	0,2 ± 0,0	5,5	4,6 ± 0,3	0,17	0,26
10%	0,3 ± 0,0	5,5	6,0 ± 0,0	0,04	0,05
15%	0,3 ± 0,0	5,6	7,3 ± 0,8	0,01	0,01

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol

Algumas observações foram comuns nas fermentações utilizando os hidrolisados (banana, maracujá e coco), como a produção de etanol e o pH final do meio. A produção de etanol por *Z. mobilis* utilizando os hidrolisados foi menor do que utilizando somente glicose como fonte de carbono. Isso pode estar relacionado à explicação dada por Doelle e Doelle (1990), nas fermentações utilizando melaço como fonte de carbono mostram menores rendimentos na produção de etanol devido ao grande número de compostos inorgânicos e outros materiais que inibem o processo. A composição dos meios utilizando os hidrolisados é pouco conhecida, e pode conter substâncias diversas, as quais interagem, também, de diversas maneiras com os micro-organismos. Além disso, segundo Khoja et al. (2015), aqueles meios onde não se usam açúcares puros podem conter impurezas, as quais inibem a produção de etanol e reprime a atividade enzimática dos micro-organismos.

Em relação ao pH final do meio, houve grande diferença em comparação a fermentação com o meio sintético, composto por glicose. Nesses ensaios, o pH foi bastante

reduzido ao longo da fermentação. Já nas fermentações com os hidrolisados, o pH permaneceu constante durante o processo, devido ao efeito tamponante desses meios, diferente dos resultados obtidos em uma pesquisa onde as fermentações utilizaram como substrato melaço de cana-de-açúcar, no qual o efeito tamponante é obtido pela composição química do meio (GUILMAN; BUZATO; CELLIGOI, 2000) e, nos hidrolisados utilizados neste trabalho, esse efeito ocorre devido a adição de solução tampão na etapa de hidrólise enzimática dos substratos.

5.4 Fermentações com a levedura *P. tannophilus*

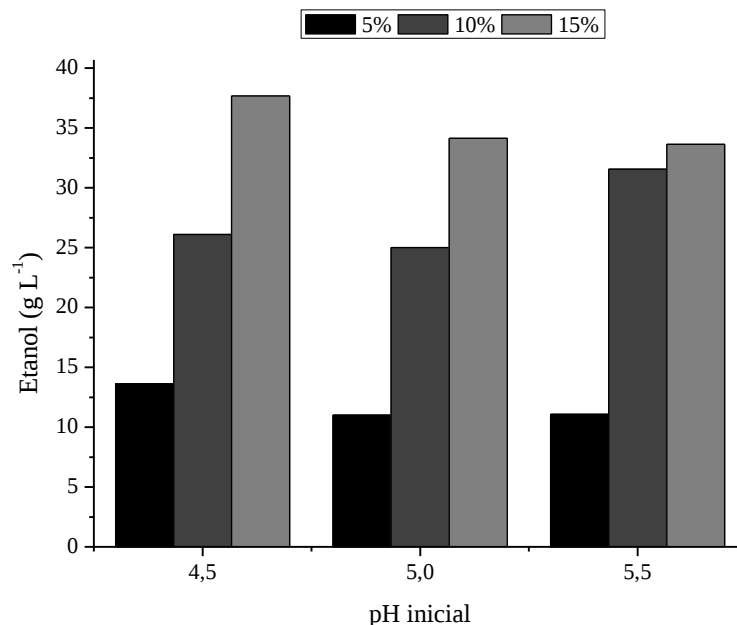
Foram realizadas fermentações descontínuas em triplicata, com o meio sintético, meios compostos pelos hidrolisados de cascas de banana, maracujá e coco. Os meios foram fermentados por 19 h, a 30°C, com retiradas de amostras de todos os ensaios para determinação do pH final, açúcares totais, biomassa e etanol.

5.4.1 Meio sintético

Foi utilizado um meio sintético, composto por glicose e xilose, para simular a fração hemicelulósica dos hidrolisados lignocelulósicos nas fermentações empregando a levedura *P. tannophilus*. Os dados de concentração de etanol estão apresentados na Figura 22, e os dados de biomassa, pH final do meio de fermentação, substrato consumido, produtividade e rendimento estão apresentados na Tabela 11.

A maior produção de etanol foi de 38 g L⁻¹, determinada nos ensaios utilizando concentração de substrato de 15% e pH inicial do meio de 4,5. Nesse ensaio foram determinados produtividade de 1,98 g L⁻¹ h⁻¹, rendimento de 0,30 g g⁻¹, crescimento celular de 8,3 g L⁻¹ e o pH final reduzido para 2,3.

Figura 22 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.



Apenas as produções de etanol das fermentações utilizando 10% de substrato apresentaram diferença significativa nas variações de pH inicial do meio de fermentação. A maior produção e produtividade foi de 31,5 g L⁻¹ e 1,66 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, com pH inicial de 5,5, formando 10,5 g L⁻¹ de biomassa e redução de pH final para 2,5.

O melhor rendimento de produto formado em relação ao substrato consumido foi de 0,50 g g⁻¹, encontrado nos ensaios com substrato na concentração de 5% e pH inicial de 4,5. Com essa concentração de sólidos, não houve diferença significativa em relação aos diferentes valores de pH inicial do meio avaliados para produção de etanol.

Tabela 11 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação da glicose usada como substrato do meio sintético por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	7,9 ± 0,2	2,6	27,0 ± 0,5	0,72	0,50
10%	9,0 ± 0,0	2,4	74,1 ± 0,8	1,37	0,35
15%	8,3 ± 0,6	2,3	97,5 ± 1,9	1,98	0,39
pH 5,0					
5%	7,9 ± 0,0	2,7	25,8 ± 0,7	0,58	0,43
10%	11,0 ± 0,2	2,4	71,4 ± 2,6	1,32	0,35
15%	8,3 ± 0,7	2,4	92,4 ± 1,6	1,80	0,37
pH 5,5					
5%	8,5 ± 0,2	2,8	25,4 ± 0,0	0,58	0,44
10%	10,5 ± 0,2	2,5	76,5 ± 0,3	1,66	0,41
15%	8,7 ± 0,3	2,6	88,8 ± 1,6	1,77	0,38

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

As fermentações com concentração de substrato de 5% não apresentaram grandes produções, a máxima concentração de etanol foi de 13,6 g L⁻¹, com pH inicial de 4,5.

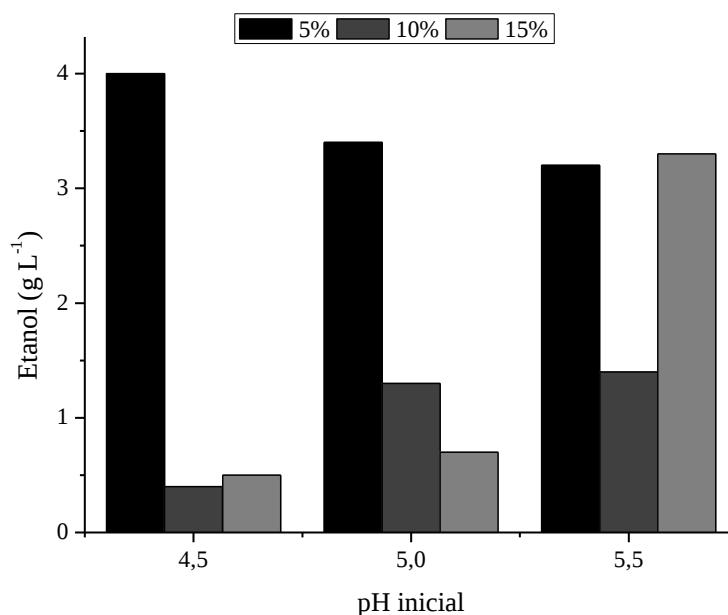
O pH final teve muita variação durante os processos fermentativos, com grande redução em todos os ensaios analisados, os valores ficaram em torno de 2,3 a 2,8.

5.4.2 Hidrolisado de casca de banana

A Figura 23 e Tabela 12 apresentam os dados obtidos na fermentação do hidrolisado de casca de banana por *P. tannophilus*. Na avaliação dos dados da produção de etanol nos experimentos utilizando o caldo hidrolisado na concentração de 5% de sólidos totais, o pH inicial do meio não apresentou diferença estatística entre as amostras. Entretanto a maior produção, produtividade e rendimento de etanol (4,0 g L⁻¹; 0,21 g L⁻¹ h⁻¹; 0,32 g g⁻¹) foi obtida com essa concentração de substrato, com pH inicial de 4,5. Nesses experimentos não houve

diferenças no pH final dos meios, mas houve crescimento celular, apresentando um crescimento médio de $3,4 \text{ g L}^{-1}$.

Figura 23 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de casca de banana usado como substrato na produção de etanol por *P. tannophilus*, incubada a 30°C , por 19 h e agitação de 100 rpm.



Avaliando a concentração de 10%, pode ser observado que houve diferença entre os valores de pH inicial determinados, sendo que pH inicial de 5,0 e 5,5 foram iguais entre si, e os ensaios apresentaram crescimento celular bem próximos. Já no pH inicial de 4,5 foi encontrada a menor produção de etanol e menor biomassa formada, $0,4$ e $1,0 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Nos estudos de Manikandan, Saravanan e Viruthagiri (2008), o pH inicial do meio também apresentou influencia na produção de etanol, utilizando a levedura *S. cerevisiae* na fermentação de cascas de banana, com concentração de 10%, numa faixa de pH de 3,5 a 5,5, houve aumento da produção até o pH 4,5, sendo encontrado o valor máximo de $9,2 \text{ g L}^{-1}$, e decréscimo na produção com aumento do pH.

A análise estatística dos ensaios de fermentação usando caldo com concentração de sólidos de 15% mostrou diferença significativa entre as médias. A produção de etanol obtida nos meios com pH iniciais de 4,5 e 5,0 apresentaram valores de produção de etanol menores que 1 g L^{-1} . O maior valor foi encontrado com pH inicial de 5,5, cuja produção de etanol foi

de 3,3 g L⁻¹. Nessa concentração de sólidos testada a biomassa variou de 0,7 a 2,1 g L⁻¹ e não houve variações de pH final.

Tabela 12 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	3,2 ± 0,2	4,5	12,6 ± 0,9	0,21	0,32
10%	1,0 ± 0,1	4,5	12,8 ± 0,9	0,02	0,03
15%	0,7 ± 0,1	4,5	24,7 ± 1,2	0,03	0,02
pH 5,0					
5%	3,3 ± 0,4	5,1	14,0 ± 0,7	0,18	0,24
10%	2,0 ± 0,3	5,0	7,7 ± 1,5	0,07	0,17
15%	2,1 ± 0,2	5,0	25,9 ± 2,7	0,04	0,03
pH 5,5					
5%	3,8 ± 0,2	5,5	14,6 ± 0,4	0,17	0,22
10%	2,4 ± 0,4	5,3	10,0 ± 1,1	0,07	0,14
15%	1,0 ± 0,1	5,6	27,8 ± 1,6	0,17	0,12

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

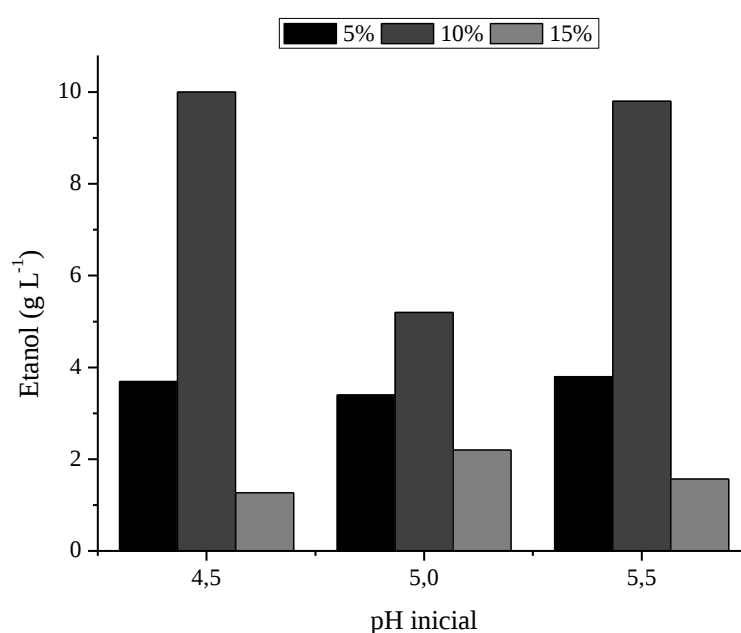
5.4.3 Hidrolisado de casca de maracujá

Os resultados de etanol obtidos nos experimentos utilizando casca de maracujá pela levedura *P. tannophilus* estão apresentados na Figura 24, e os dados de biomassa, pH final do caldo de fermentação, substrato consumido, produtividade e rendimento estão apresentados na Tabela 13. Foram testadas três concentrações do substrato 5, 10 e 15%, os quais correspondem às concentrações de açúcares de 33,6; 41,3 e 48,4 g L⁻¹, respectivamente.

A melhor concentração de sólidos utilizada para produção de etanol por *P. tannophilus* foi de 10%. As médias de produção de etanol do pH inicial de 4,5 e 5,5 foram iguais estatisticamente, com produção de 10 e 9,8 g L⁻¹, respectivamente. E as maiores

produtividades também foram determinadas nesses ensaios, sendo encontrados os valores de 0,53 (pH 4,5) e 0,52 g L⁻¹ h⁻¹ (5,5). O crescimento celular foi similar entre os ensaios avaliados, a massa celular encontrada foi maior que 2 g L⁻¹, e os pH finais apresentaram uma pequena variação.

Figura 24 – Efeito do pH inicial e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.



Nos testes empregando a concentração de sólidos de 5%, não houve diferença significativa entre as amostras, a produção média de etanol foi de 3,6 g L⁻¹. Em relação ao crescimento celular, o maior crescimento foi observado nessa concentração de sólidos (5%), apresentando uma concentração de 3,8 g L⁻¹ de massa celular, obtida no ensaio com pH inicial de 5,5.

Analisando os dados obtidos nas fermentações com 15% de sólidos totais, pode ser verificado que houve diferença significativa entre as amostras, entretanto as concentrações de etanol foram muito baixas, variando de 1,3 a 2,2 g L⁻¹. Relacionada à pequena formação do produto está o crescimento celular, que também foi baixo, foi encontrada uma média de 1,0 g L⁻¹ de biomassa. Além disso, os menores consumos de substrato foram encontrados nesses ensaios, onde a *P. tannophilus* consumiu 19 g L⁻¹ dos 48,4 g L⁻¹ fornecidos.

Tabela 13 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	2,9 ± 0,2	4,7	28,2 ± 1,8	0,19	0,13
10%	2,1 ± 0,1	4,7	29,6 ± 0,3	0,53	0,34
15%	1,1 ± 0,0	4,7	19,7 ± 0,6	0,07	0,06
pH 5,0					
5%	3,1 ± 0,4	5,3	30,0 ± 0,3	0,18	0,11
10%	2,5 ± 0,3	5,1	32,2 ± 0,6	0,27	0,16
15%	1,0 ± 0,0	5,3	19,6 ± 1,0	0,12	0,11
pH 5,5					
5%	3,8 ± 0,7	5,5	25,1 ± 0,7	0,20	0,15
10%	2,6 ± 0,2	5,5	31,2 ± 1,8	0,52	0,31
15%	1,4 ± 0,3	5,5	19,2 ± 1,2	0,08	0,08

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

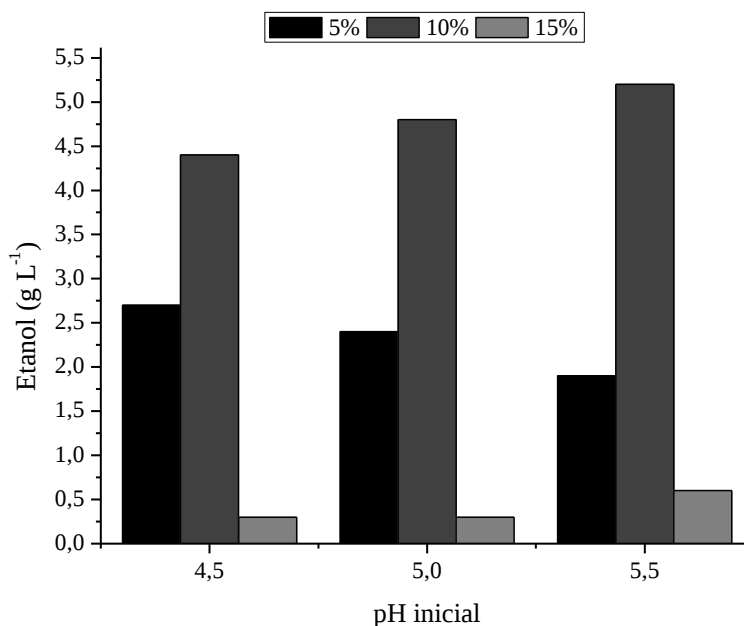
Com relação ao pH final dos meios, houve similaridade entre os dados obtidos nas fermentações com a bactéria e com a levedura, nos meios sintéticos houve grande redução do pH no decorrer do processo fermentativo. Já nos meios utilizando os hidrolisados de casca de banana e maracujá, os pH finais de todos os ensaios, tanto da bactéria, quanto da levedura, permaneceram praticamente inalterados e, quando apresentaram mudanças, essas foram muito pequenas ao contrário do meio sintético, o pH aumentou nas fermentações com o hidrolisado.

5.4.4 Hidrolisado de casca de coco

A Figura 25 apresenta os resultados para produção de etanol utilizando os hidrolisados de cascas de coco por *P. tannophilus*. Das três concentrações de sólidos avaliadas (5, 10 e 15%), a que apresentou melhores resultados foi 10%, apesar do pH inicial do meio não ter apresentado influencia significativa na produção de etanol: a maior concentração foi de 5,2 g

L^{-1} , com pH inicial de 5,5, e a maior produtividade ($0,27 \text{ g L}^{-1}$) e rendimento ($0,37 \text{ g g}^{-1}$) também foram determinados nesse ensaio.

Figura 25 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol por *P. tannophilus*, incubada a 30°C , por 19 h e agitação de 100 rpm.



Nas fermentações utilizando substrato com concentração de 5%, o pH inicial do meio não apresentou influência significativa na produção de etanol ($p > 0,05$), os valores variaram de 1,9 a $2,7 \text{ g L}^{-1}$. A *P. tannophilus* utilizou o substrato fornecido. De acordo com os dados apresentados na Tabela 14, foram utilizados em torno de 8 g L^{-1} dos açúcares disponibilizados no meio.

Os valores de biomassa apresentados na Tabela 14 indicam que a *P. tannophilus* não conseguiu crescer, no meio utilizando cascas de coco, tanto quanto nos outros meios avaliados (meio sintético, cascas de banana e maracujá). O crescimento celular ficou entre $0,14 \text{ g L}^{-1}$ (15%; pH 5,0) e $0,49 \text{ g L}^{-1}$ (5%; pH 5,5).

Na Tabela 14 destaca-se o baixo consumo do substrato nos ensaios que utilizaram 15% de concentração do hidrolisado, por isso nesses ensaios foram determinados os menores valores de crescimento celular, produção e produtividade de etanol. Com essa concentração de sólidos (15%) o pH inicial do meio apresentou influencia estatística na produção de etanol.

Tabela 14 – Crescimento celular, pH final, substrato consumido, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de coco por *P. tannophilus*, incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	0,35 ± 0,0	4,5	8,0 ± 0,1	0,14	0,34
10%	0,30 ± 0,0	4,5	13,7 ± 0,4	0,23	0,32
15%	0,15 ± 0,0	4,7	5,3 ± 0,8	0,02	0,06
pH 5,0					
5%	0,42 ± 0,0	4,8	8,1 ± 0,1	0,07	0,30
10%	0,35 ± 0,0	4,9	13,6 ± 0,4	0,25	0,35
15%	0,14 ± 0,0	5,0	3,7 ± 0,2	0,02	0,08
pH 5,5					
5%	0,49 ± 0,0	5,4	8,6 ± 0,0	0,10	0,22
10%	0,46 ± 0,0	5,3	14,2 ± 0,4	0,27	0,37
15%	0,22 ± 0,0	5,5	3,2 ± 0,8	0,03	0,19

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

Comparando estas fermentações com as realizadas por *Z. mobilis*, *P. tannophilus* apresentou maior eficiência na fermentação do hidrolisado de casca de coco. A maior produção por *Z. mobilis* foi de 1,2 g L⁻¹, já com *P. tannophilus* foi de 5,2 g L⁻¹.

A produção de etanol determinada em nossa pesquisa foi muito próxima à concentração obtida por Cabral et al. (2016), esses pesquisadores avaliaram o pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática de cascas de coco e, com esse processo obtiveram 16,2 g L⁻¹ de açúcares redutores, os quais foram fermentados por *S. cerevisiae*, com produção máxima de 6,2 g L⁻¹ de etanol em 7 h de fermentação.

5.5 Ensaios de Co-cultura

Para aumentar o consumo de açúcares, principalmente glicose e xilose, e consequentemente aumentar a produção de etanol, foram empregados os ensaios de co-

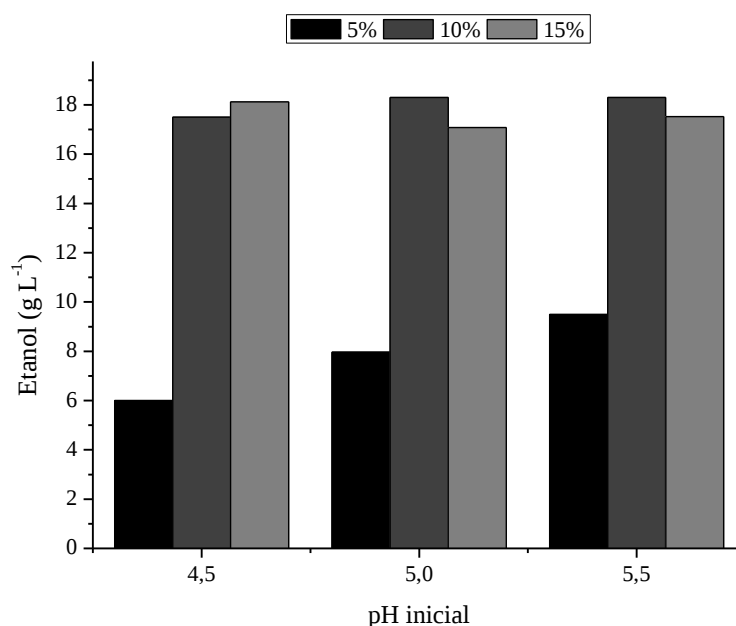
cultura, com a *Z. mobilis* e *P. tannophilus*. Foram adotadas duas estratégias diferentes de inoculação, a primeira foi a inoculação dos dois micro-organismos simultaneamente, no início da fermentação, a qual foi nomeada Co-cultura 1. Já a segunda estratégia, foi a inoculação da *Z. mobilis* no início da fermentação e, depois de 7 h de processo, inoculação da *P. tannophilus*, finalizando após 19 h de fermentação.

5.5.1 Co-cultura *Z. mobilis* e *P. tannophilus* inoculados juntos no início da fermentação (Co-cultura 1)

5.5.1.1 Meio sintético

A produção de etanol para os ensaios de co-cultura 1 estão apresentados na Figura 26. Os valores de produção de etanol para os ensaios utilizando concentração de substrato de 10 e 15% ficaram muito próximos, não houve diferença entre as variáveis analisadas, sendo encontrada uma média de $17,8 \text{ g L}^{-1}$ de etanol.

Figura 26 – Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C , por 19 h e agitação de 100 rpm.



Já com concentração de substrato de 5%, o pH inicial do meio apresentou influência significativa na produção de etanol, entretanto com essas condições foram encontrados os menores valores, os quais variaram de 6,0 g L⁻¹ (pH inicial de 4,5) a 9,5 g L⁻¹ (pH inicial 5,5).

Analisando estes dados apresentados na Tabela 15, verifica-se que houve redução do pH final para todos os ensaios, os quais ficaram em torno de 2,2. Verificou-se, também crescimento celular em todos os ensaios, entretanto, este não foi tão alto quando comparado aos experimentos com os micro-organismos inoculados individualmente.

Analisando o rendimento, destaca-se o maior, 0,40 g g⁻¹, no meio com concentração de sólidos de 15% e pH inicial de 4,5. Nesses ensaios foram encontrados 18,1 g L⁻¹ e 0,92 g L⁻¹ h⁻¹ de produção e produtividade de etanol, respectivamente.

Tabela 15 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação glicose usada como substrato do meio sintético por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	3,4 ± 0,0	2,2	34,4 ± 0,6	0,3	0,17
10%	3,4 ± 0,0	2,2	52,8 ± 0,7	0,92	0,33
15%	3,3 ± 0,0	2,1	45,3 ± 0,1	0,92	0,40
pH 5,0					
5%	2,5 ± 0,0	2,2	34,4 ± 0,0	0,4	0,23
10%	3,5 ± 0,0	2,1	54,2 ± 0,8	0,96	0,34
15%	3,5 ± 0,0	2,1	48,9 ± 0,7	0,9	0,35
pH 5,5					
5%	2,0 ± 0,0	2,3	33,9 ± 0,6	0,5	0,28
10%	3,6 ± 0,0	2,1	56,7 ± 1,9	0,96	0,32
15%	3,9 ± 0,0	2,1	54,6 ± 1,7	0,92	0,32

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

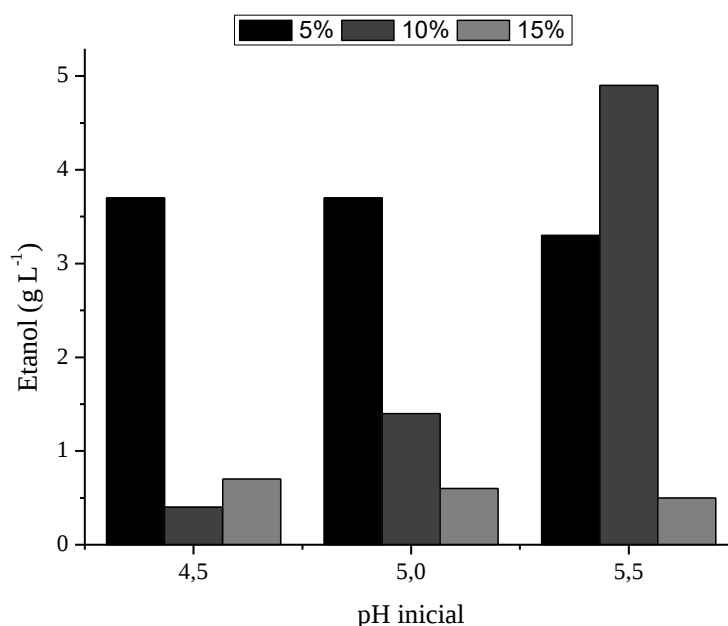
Valores próximos a esses foram encontrados por Chandel et al. (2011) na fermentação do meio sintético, adicionado de 32,8 g L⁻¹ açúcares (xilose, glicose, arabinose, manose e

galactose), simulando um meio do hidrolisado hemicelulósico, fermentado por co-cultura de *P. stipitis* e *S. cerevisiae*, obtiveram valor máximo de $15,8 \text{ g L}^{-1}$ de etanol.

5.5.1.2 Hidrolisado de casca de banana

A Figura 27 apresenta o resultado da produção de etanol obtida na fermentação do caldo hidrolisado de casca de banana por co-cultura. O maior valor foi de $4,9 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de $0,26 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, usando 10% de concentração do substrato e pH inicial de 5,5.

Figura 27 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de banana usado como substrato na produção de etanol empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C , por 19 h e agitação de 100 rpm.



O crescimento da biomassa nessa co-cultura foi maior com 5% e pH inicial de 5,5 (Tabela 16). Por outro lado, o consumo de substrato aumentou quando foi adicionada a maior concentração (15%), mas esta não foi utilizada para produção de etanol ou biomassa, conforme observa-se na Figura 27 e Tabela 16. Os micro-organismos podem ter usado este substrato para biosíntese de outros compostos que não foram determinando nesse estudo.

Tabela 16 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração do substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	1,0 ± 0,0	4,5	11,9 ± 0,5	0,19	0,31
10%	0,2 ± 0,0	4,7	3,0 ± 2,6	0,02	0,13
15%	0,6 ± 0,4	4,6	30,1 ± 0,5	0,04	0,02
pH 5,0					
5%	1,6 ± 0,0	5,0	12,9 ± 0,0	0,19	0,28
10%	0,3 ± 0,0	5,0	3,8 ± 2,0	0,07	0,37
15%	0,1 ± 0,1	4,9	31,7 ± 2,5	0,03	0,02
pH 5,5					
5%	1,9 ± 0,0	5,5	12,7 ± 0,3	0,17	0,26
10%	0,9 ± 0,0	5,3	14,0 ± 0,8	0,26	0,35
15%	0,2 ± 0,1	5,2	31,7 ± 2,5	0,02	0,01

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

A co-cultura apresentou melhores resultados quando comparada com os experimentos realizados somente por *Z. mobilis*, a qual, apresentou um aumento de 2,9 para 4,9 g L⁻¹ na produção de etanol. Da mesma forma, em relação às fermentações somente por *P. tannophilus*, com a co-fermentação, a concentração de etanol aumentou de 4,0 para 4,9 g L⁻¹.

Estes baixos resultados obtidos com os experimentos de co-cultura inoculando bactéria e levedura ao mesmo tempo no meio de fermentação podem ter sido causados pela competição entre as cepas. Observações similares foram feitas para *Z. mobilis* na co-cultura com *Pichia stipitis* (FU et al., 2009). De acordo com esses pesquisadores, uma possível explicação poderia ser a redução do oxigênio pelas células de *Z. mobilis*, embora essa bactéria seja estritamente fermentativa, elas possuem, na membrana celular externa, um sistema completo de enzimas redox, que são capazes de consumir rapidamente o oxigênio em condições aeróbias. Consequentemente, a eficiência da fermentação da xilose é reduzida devida a competição por oxigênio entre *Z. mobilis* e *P. stipitis* (FU et al., 2009). Essas

informações podem ser relacionadas aos resultados apresentados, a baixa produção de etanol poderia ser causada pela competição de oxigênio entre *Z. mobilis* e a levedura fermentadora de xilose, *P. tannophilus*, uma vez que, as fermentações em co-cultura foram realizadas sob agitação de 100 rpm.

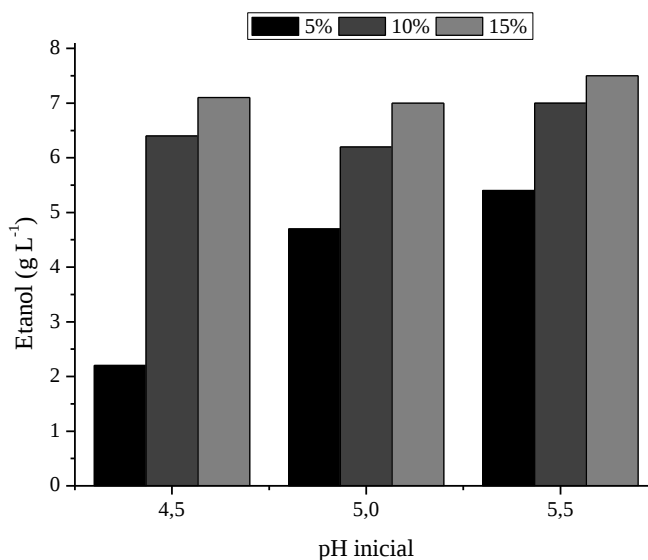
5.5.1.3 Hidrolisado de Casca de maracujá

O caldo do hidrolisado das cascas de maracujá foi utilizado para compor o meio de fermentação. Esse caldo foi padronizado em três concentrações de sólidos totais, 5, 10 e 15%, os quais correspondem às concentrações de açúcares redutores de 33,6; 41,3 e 48,4 g L⁻¹, respectivamente.

Os resultados da fermentação estão apresentados na Figura 28. Nesta, pode ser observado que a maior produção de etanol foi de 7,5 g L⁻¹, a qual foi obtida nos ensaios utilizando 15% de sólidos totais e pH inicial de 5,5, e um crescimento celular de 1,7 g L⁻¹. A análise estatística do pH inicial do meio não apresentou influência na produção de etanol nesses ensaios. Analisando os dados da Tabela 17, a maior produtividade, 0,39 g L⁻¹, também foi determinada nessas condições.

O pH inicial do meio também não apresentou influência estatística nos experimentos realizados com adição de 10% de substrato. Somente nos ensaios contendo substrato na concentração de 5%, o pH inicial do meio apresentou influência estatística, de acordo com a ANOVA os pHs 5,0 e 5,5 são iguais ao nível de significância de 5%, com produção de etanol de 4,7 e 5,4 g L⁻¹, respectivamente, e no pH inicial de 4,5 foi determinado o menor valor, 2,2 g L⁻¹, tanto com 5% de concentração, quanto com 10 e 15%.

Figura 28 - Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol, empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.



Com relação ao crescimento celular (Tabela 17), pode ser observado que o pH inicial do meio influenciou no crescimento da levedura. Os menores valores de biomassa foram encontrados nos meios onde o pH inicial foi 4,5. A maior biomassa, 1,9 g L⁻¹, foi encontrada com pH inicial de 5,5 e concentração de sólidos totais de 10%.

Analisando os valores de pH final (Tabela 17), pode ser verificado que na concentração de sólidos totais de 5%, o pH final do meio sofreu aumento, principalmente no ensaio com pH inicial de 5,0, e ao final da fermentação o pH ficou em 5,8. O aumento do pH final não é uma característica comum das fermentações, entretanto esse comportamento já foi observado em outros estudos utilizando material lignocelulósico como fonte de carbono. Coimbra (2015) em seu estudo, utilizando cascas de banana hidrolisadas, concentração inicial de açúcares de 50 g L⁻¹ e co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis*, encontrou um aumento no valor do pH final, de 4,5 passou para 5,15.

Nos experimentos com concentração de sólidos de 10% e 15% e pH inicial de 5,0 e 5,5, o pH final diminuiu. Nesses ensaios o pH final está relacionado com crescimento celular, sendo que, nos ensaios com pH inicial de 4,5, não houve alteração do pH ao final da fermentação e a biomassa foi pequena, em relação aos outros ensaios.

Tabela 17 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo caldo hidrolisado de cascas de maracujá por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	0,8 ± 0,0	4,8	30,8 ± 0,2	0,12	0,07
10%	0,8 ± 0,0	4,5	38,8 ± 0,1	0,34	0,16
15%	0,2 ± 0,0	4,5	39,6 ± 0,2	0,37	0,18
pH 5,0					
5%	1,7 ± 0,0	5,8	32,4 ± 0,3	0,25	0,14
10%	1,3 ± 0,0	4,8	38,9 ± 0,0	0,33	0,16
15%	1,0 ± 0,0	4,9	40,4 ± 0,4	0,37	0,17
pH 5,5					
5%	0,9 ± 0,0	5,9	32,1 ± 0,2	0,28	0,17
10%	1,9 ± 0	5,3	38,7 ± 0,2	0,37	0,18
15%	1,7 ± 0	5,3	41,6 ± 0,3	0,39	0,18

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

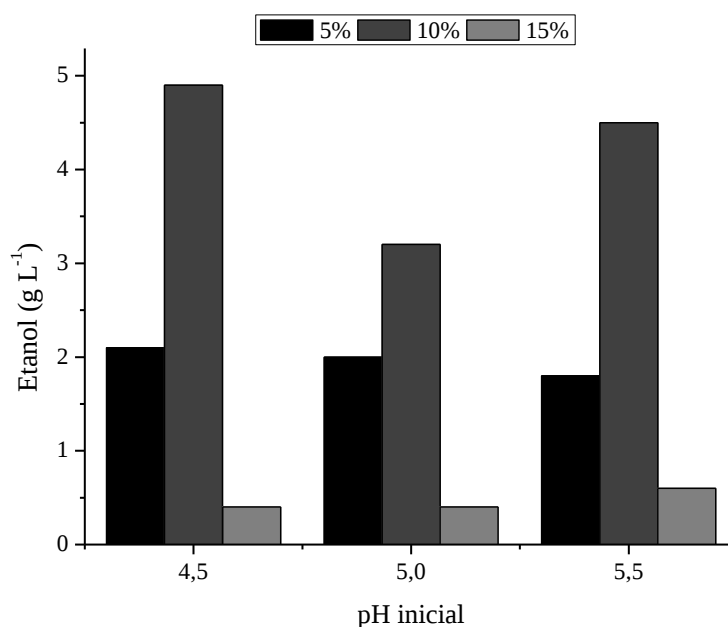
O consumo de substrato de cada ensaio está apresentado na Tabela 17 e, pode ser observado que em todos os ensaios houve grande consumo de açúcares. Entretanto esse substrato consumido não foi utilizado para síntese de etanol e nem para o crescimento do micro-organismo. Uma hipótese é a de que os açúcares consumidos tenham sido destinados à formação de outros produtos, os quais não foram detectados nos métodos analíticos utilizados nesta pesquisa.

5.5.1.4 Hidrolisado de Casca de coco

Na Figura 29 estão apresentados os resultados para produção de etanol por co-cultura 1, utilizando casca de coco hidrolisadas. De todas as concentrações de substrato testadas, a concentração de 10% proporcionou melhores resultados na produção de etanol. De acordo

com as análises estatísticas, o pH inicial do meio apresentou influência na produção de etanol ao nível de 5% de significância, e os valores variaram de 3,2 (pH 5,0) a 4,9 g L⁻¹ (pH 4,5). Os maiores consumos de substratos também foram nesses ensaios, onde a *P. tannophilus* consumiu 11 g L⁻¹ dos açúcares fornecidos. Além disso, com pH inicial de 4,5 foi determinada o maior rendimento, 0,44 g g⁻¹.

Figura 29 – Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de coco usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.



De acordo com os dados apresentados na Tabela 18, o crescimento celular foi menor nos meios utilizando concentração de substrato de 15%, com valores entre 0,1 e 0,4 g L⁻¹. Os menores consumos de substrato também foram determinados nestes mesmos ensaios. A maior biomassa (1,7 g L⁻¹) foi encontrada com o substrato na concentração de 5% e pH inicial de 5,0.

Tabela 18 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo caldo hidrolisado de cascas de coco, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, por 19 h e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5					
5%	1,4 ± 0,0	5,1	9,3 ± 0,0	0,11	0,22
10%	0,6 ± 0,0	4,7	11,2 ± 0,2	0,26	0,44
15%	0,4 ± 0,0	4,7	3,6 ± 0,8	0,02	0,11
pH 5,0					
5%	1,7 ± 0,0	6,1	9,2 ± 0,0	0,11	0,23
10%	1,2 ± 0,0	5,2	11,5 ± 0,2	0,31	0,28
15%	0,4 ± 0,0	5,0	5,6 ± 0,6	0,02	0,07
pH 5,5					
5%	1,0 ± 0,0	6,2	8,9 ± 0,0	0,10	0,21
10%	1,0 ± 0,0	5,4	11,7 ± 0,2	0,24	0,38
15%	0,1 ± 0,0	5,4	5,2 ± 0,3	0,03	0,11

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

5.5.2 Co-cultura de *Z. mobilis* inoculada no início e *P. tannophilus* inoculada depois de 7 h de fermentação (Co-cultura 2).

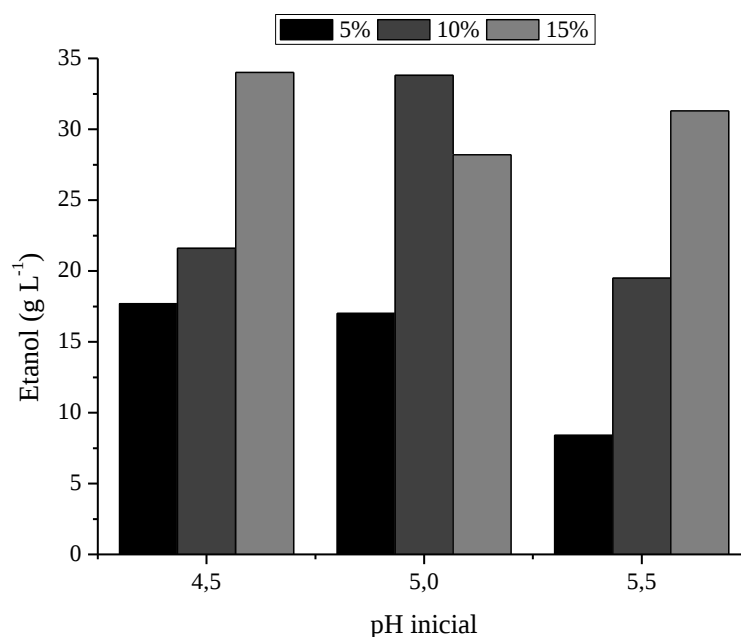
A co-cultura 2 foi realizada com inoculação sucessiva das cepas. Inicialmente *Z. mobilis* foi inoculada e depois de 7 h de fermentação, *P. tannophilus* foi adicionada. De acordo com Fu and Peiris (2008) essa sequência de inoculação é realizada para eliminar a repressão do catabolismo da xilose pela glicose na *P. tannophilus*.

5.5.2.1 Meio Sintético

Resultados da co-cultura 2 utilizando meio sintético, formulado com glicose e xilose, estão apresentados na Figura 30. Após a análise de variância (ANOVA) não foi encontrada diferença estatística em relação ao pH inicial dos meios nos experimentos utilizando

concentração de substrato de 15%. A produção de etanol variou de 28,2 a 34 g L⁻¹, com pH inicial de 5,0 e 4,5, respectivamente, sendo 34 g L⁻¹ a maior produção entre as três concentrações de substrato avaliadas.

Figura 30 - Efeito de diferentes concentrações de glicose usadas como substrato do meio sintético e do pH inicial sobre a produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C, sob agitação de 100 rpm.



Já em menores concentrações, 5 e 10% de substrato, o pH inicial dos meios apresentou influência estatística na produção de etanol. Com 10% de concentração de substrato, a maior produção foi de 33,8 g L⁻¹, pH inicial de 5,0, além disso essa condição diferiu dos outros pH, sendo que pH inicial de 4,5 e 5,5 foram considerados iguais ao nível de significância de 5%.

Nas fermentações dos meios com concentração de substrato de 5%, o pH inicial dos meios de 4,5 e 5,0 foram iguais estatisticamente ($p > 0,05$). A menor produção de etanol foi determinada no ensaio com concentração de substrato de 5% e pH inicial de 5,5, sendo encontrado o valor de 8,4 g L⁻¹. Nessas condições avaliadas, os micro-organismos podem ter desviado a rota metabólica, pois o consumo de substrato deste ensaio (Tabela 19) ficou próximo ao ensaio cuja concentração de substrato utilizada também era de 5% (pH 4,5), e a produção de etanol encontrada nessa condição foi de 17,7 g L⁻¹.

Em geral, pode ser verificado que o crescimento celular não foi tão alto, quando comparado às culturas individuais. O crescimento da *Z. mobilis* foi menor em praticamente

todos os ensaios, apresentando uma variação de 0,3 a 1,2 g L⁻¹. *P. tannophilus* não conseguiu produzir grande quantidade de biomassa, o crescimento celular da levedura ficou entre 0,9 e 4,1 g L⁻¹.

Observando os valores de pH final (Tabela 19), verifica-se que houve redução em todos os ensaios observados, entretanto a redução não foi tão grande quanto a observada na co-cultura 1. Os valores de pH final variaram de 2,9, nos ensaios com pH inicial 4,5, a 3,7, com pH inicial de 5,5, ambos com concentração de substrato de 15%.

A maior produtividade encontrada utilizando co-cultura 2 foi de 1,9 g L⁻¹ h⁻¹, nos ensaios com pH inicial de 5,0 e concentração do substrato de 10%. O maior rendimento, 0,49 g g⁻¹, foi determinado na concentração de substrato de 5% e pH inicial de 4,5.

Tabela 19 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação da glicose usada como substrato do meio sintético, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa - <i>Z. mobilis</i> (g L ⁻¹)	Biomassa - <i>P. tannophilus</i> (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5						
5%	0,9 ± 0,1	2,9 ± 0,0	3,4	36,4 ± 2,5	0,9	0,49
10%	0,3 ± 0,2	1,7 ± 0,3	3,6	58,9 ± 1,3	1,1	0,37
15%	0,4 ± 0,0	3,6 ± 0,0	2,9	102,4 ± 1,1	1,8	0,33
pH 5,0						
5%	1,0 ± 0,5	4,1 ± 0,0	3,1	39,0 ± 0,9	0,9	0,43
10%	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,1	3,4	74,7 ± 0,1	1,9	0,45
15%	0,8 ± 0,0	2,4 ± 0,2	3,5	96,8 ± 0,2	1,5	0,29
pH 5,5						
5%	1,1 ± 0,0	3,6 ± 0,0	3,5	36,1 ± 1,6	0,4	0,23
10%	1,2 ± 0,5	0,9 ± 0,0	3,3	53,7 ± 0,1	1,0	0,36
15%	0,4 ± 0,0	3,6 ± 0,0	3,7	74,1 ± 0,2	1,6	0,42

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

Fu and Peiris (2008) também avaliaram co-cultura destes mesmos micro-organismos empregados nesta pesquisa. Estes pesquisadores utilizaram uma mistura de açúcares (60 g glicose/L e 40 g xilose/L), e a fermentação foi conduzida a uma temperatura de 30°C. As condições ótimas de fermentação foram verificadas inoculando *Z. mobilis* sem aeração, seguida da inativação da bactéria depois do consumo total da glicose, e então a *P. tannophilus* foi inoculada para fermentar a xilose, produzindo as concentrações de etanol de 26,2 g L⁻¹ e 6,3 g L⁻¹, respectivamente.

O mesmo sistema de co-fermentação foi empregado por Fu et al. (2009), usando *Z. mobilis* e a levedura *P. stipitis*. Aplicando a cultura sequencial, usando uma mistura de açúcares, com 30 g L⁻¹ glicose e 20 g L⁻¹ de xilose, a 30°C, agitação de 150 rpm, células livres de *Z. mobilis* foram inoculadas no início da fermentação e inativadas, por autoclavagem a 115°C, depois da fermentação completa da glicose; então, células livres de *P. stipitis* foram inoculadas para fermentar a xilose residual a etanol. A cultura sequencial dos dois micro-organismos promoveu o aumento na produtividade de etanol, que passou de 0,52 para 0,83 g L⁻¹ h⁻¹. Um aumento proporcional também foi encontrado nessa pesquisa, em uma das melhores condições avaliadas (concentração de substrato a 10% e pH inicial de 4,5), a produtividade passou de 0,92 para 1,8 g L⁻¹ h⁻¹.

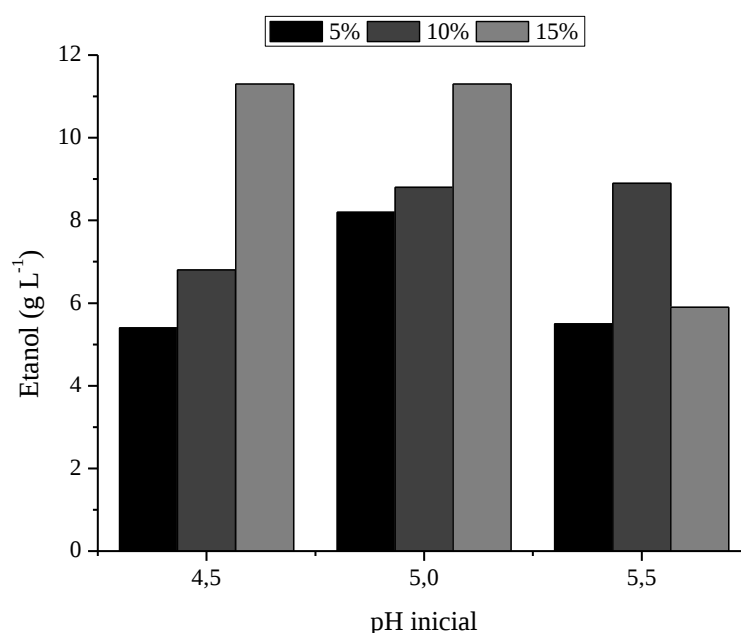
Abate et al. (1996) também avaliaram o sistema de co-cultura, com *Z. mobilis* e *Saccharomyces* sp, encontrando rendimento de 0,5 g de etanol/g de substrato consumido. Os resultados obtidos mostram que a co-cultura proporcionou aumento na produção de etanol e que não houve diferença na sequencia de inoculação, tanto dos micro-organismos inoculados juntos, quanto separados. Esse rendimento foi o mesmo obtido nos ensaios utilizando substrato com concentração de 5% e pH inicial de 4,5. Entretanto, contrariando as informações dos autores, inocular a levedura após a fermentação ser realizada com bactéria apresentou diferença, houve aumento de 65% de rendimento em relação ao ensaio citado anteriormente (5%; pH 4,5), no qual os micro-organismos foram inoculados juntos, no início da fermentação.

5.5.2.2 Hidrolisado de Casca de banana

Na Figura 31, a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* na fermentação do meio de cascas de banana hidrolisadas mostram ser mais eficientes quando as cepas foram inoculadas sucessivamente. De acordo com análise estatística o pH inicial do meio não apresentou influência na produção de etanol nos ensaios utilizando concentração de sólidos de 15%, pode

ser observado que a maior produção de etanol, $11,3 \text{ g L}^{-1}$, foi igual para dois ensaios, com pH inicial do meio de 4,5 e 5,0. Além da produção de etanol, o consumo máximo de substrato e crescimento celular com ambos os micro-organismos foi observado usando 15% de concentração do meio, mas com pH inicial do meio de 5,5 (Tabela 20).

Figura 31 - Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de banana usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C , sob agitação de 100 rpm.



A cultura sequencial dos dois micro-organismos proporcionou desempenho melhor na fermentação. Esta co-cultura (2) foi mais eficiente para produção de etanol ($11,3 \text{ g L}^{-1}$) quando comparada com as fermentações realizadas usando co-cultura 1 ($4,9 \text{ g L}^{-1}$), *Z. mobilis* ($2,9 \text{ g L}^{-1}$) ou *P. tannophilus* ($4,0 \text{ g L}^{-1}$), separadamente. Este comportamento pode ter ocorrido devido a limitação do consumo de xilose pela glicose no meio de fermentação (SÁNCHEZ et al., 2002), (ZHAO; ZHANG; TAN, 2008), pois como a glicose é o substrato preferido, esta foi consumida antes do início da fermentação da xilose (AGBOGBO et al., 2006). Além disso, o experimento de co-cultura foi iniciado inoculando a *Z. mobilis* no meio de fermentação, uma parte da glicose foi metabolizada a etanol e outros compostos e, quando, a levedura *P. tannophilus* foi inoculada (depois de 7 horas), a concentração de glicose era muito baixa e não foi suficiente para inibir o metabolismo da xilose, a qual foi usada para produzir etanol, aumentando a concentração final do produto (Figura 31).

Tabela 20 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C e agitação de 100 rpm.

Concentração do substrato	Biomassa - <i>Z. mobilis</i> (g L ⁻¹)	Biomassa - <i>P. tannophilus</i> (g L ⁻¹)	pH final	Consumo de substrato (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5						
5%	0,15 ± 0,0	1,3 ± 0,0	4,4	20,5 ± 0,2	0,28	0,26
10%	0,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	4,8	22,7 ± 0,5	0,36	0,30
15%	0,3 ± 0,2	1,4 ± 0,1	4,7	28,6 ± 1,0	0,60	0,39
pH 5,0						
5%	0,02 ± 0,0	1,9 ± 0,0	5,0	19,6 ± 0,5	0,43	0,42
10%	0,2 ± 0,0	1,6 ± 0,0	5,1	22,5 ± 0,5	0,46	0,40
15%	0,5 ± 0,0	1,6 ± 0,1	5,0	28,6 ± 1,0	0,60	0,39
pH 5,5						
5%	0,02 ± 0,0	1,9 ± 0,0	5,5	21,3 ± 0,5	0,29	0,26
10%	0,2 ± 0,0	1,8 ± 0,0	5,4	21,4 ± 2,1	0,47	0,41
15%	0,7 ± 0,0	1,9 ± 0,1	5,3	30,1 ± 0,9	0,31	0,20

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

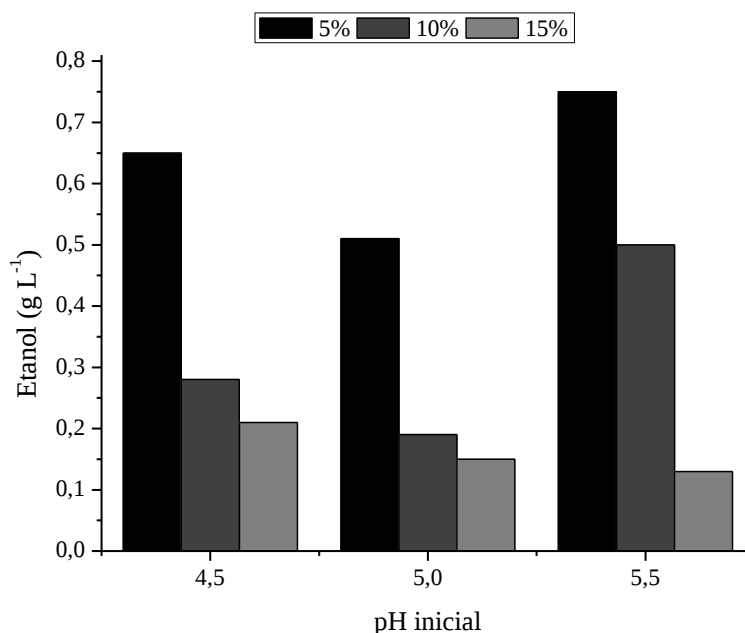
Os maiores valores de produção de etanol encontrados nessa pesquisa (Figura 31) ficaram próximos aos determinados por Chandel et al. (2011), avaliando a co-cultura de *P. stipitis* e *S. cerevisiae*-VS₃ na fermentação do hidrolisado de cana selvagem (*Saccharum spontaneum*), com concentração de açúcares de 32,8 g L⁻¹, encontraram 15 g L⁻¹ de etanol.

5.5.2.3 Hidrolisado de Casca de maracujá

Os resultados obtidos para produção de etanol com a co-cultura 2, utilizando o meio composto por hidrolisado de casca de maracujá estão apresentados na Figura 32. De acordo com os dados apresentados, verifica-se que aumento na concentração do substrato não favoreceu a produção de etanol. As concentrações de etanol obtidas foram de 0,13 g L⁻¹,

concentração de substrato de 15% e pH inicial de 5,5, a $0,75 \text{ g L}^{-1}$, concentração de substrato de 15% e pH inicial de 5,5.

Figura 32 - Efeito do pH inicial do meio e da adição de diferentes concentrações do hidrolisado de cascas de maracujá usado como substrato na produção de etanol por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C , sob agitação de 100 rpm.



O crescimento celular está apresentado na Tabela 21. Nessa condição de inoculação avaliada, a biomassa ficou na faixa de $0,3$ a $0,7 \text{ g L}^{-1}$ para *Z. mobilis*, e de $0,8$ a $1,7$ para *P. tannophilus*. Apesar da pequena produção de etanol e crescimento dos micro-organismos, pode ser verificado, na Tabela 21, que, nos ensaios com concentração de substrato de 5 e 10%, houve consumo do substrato.

Na fermentação do meio com concentração de substrato de 15%, foram encontrados os menores valores de consumo de açúcares; observa-se, na Tabela 21, que o consumo máximo foi de $3,3 \text{ g L}^{-1}$, com pH inicial do meio de 5,0. Nesse meio, a produção de etanol também foi muito baixa, não passou de $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

O pH final do meio nos ensaios com concentração de sólidos de 10 e 15% apresentou comportamento diferente das outras condições de fermentação. Com pH inicial de 5,0 houve uma pequena redução no pH (de 5,0 para 4,6) e com pH inicial de 5,5 a redução foi um pouco maior (de 5,5 para 5,0).

Tabela 21 - Crescimento celular, pH final, consumo de açúcares, produtividade e rendimento da fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de maracujá, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C e agitação de 100 rpm.

Concentração Substrato	Biomassa – <i>Z. mobilis</i> (g L ⁻¹)	Biomassa – <i>P. tannophilus</i> (g L ⁻¹)	pH final	Substrato consumido (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
pH 4,5						
5%	0,3 ± 0,2	0,8 ± 0,0	4,4	34,2 ± 0,4	0,03	0,02
10%	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,0	4,5	15,5 ± 0,3	0,01	0,02
15%	0,7 ± 0,1	1,7 ± 0,0	4,5	1,9 ± 0,0	0,01	0,11
pH 5,0						
5%	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	4,6	34,5 ± 0,3	0,03	0,01
10%	0,6 ± 0,0	0,9 ± 0,0	4,7	17,7 ± 1,0	0,01	0,01
15%	0,7 ± 0,2	1,6 ± 0,0	4,7	3,3 ± 1,0	0,01	0,04
pH 5,5						
5%	0,3 ± 0,1	0,8 ± 0,0	4,9	34,0 ± 0,2	0,04	0,02
10%	0,7 ± 0,0	1,1 ± 0,0	5,0	17,8 ± 1,0	0,03	0,03
15%	0,5 ± 0,2	1,7 ± 0,0	5,0	1,0 ± 0,0	0,01	0,13

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

Para a fermentação da casca de maracujá, esse método de co-cultura (2) não apresentou vantagens, pois nessa condição a produção de etanol foi muito baixa, variando de 0,13 a 0,75 g L⁻¹. Já empregando a co-cultura 1, foram obtidos resultados mais satisfatórios, a produção de etanol variou de 2,2 a 7,5 g L⁻¹. Durante o crescimento da bactéria *Z. mobilis* podem ter sido formados alguns compostos ou os produtos do metabolismo da bactéria que podem ter alterado o meio de cultura, tornando-o inadequado para o desenvolvimento da levedura *P. tannophilus*.

5.6 Fermentações em biorreator

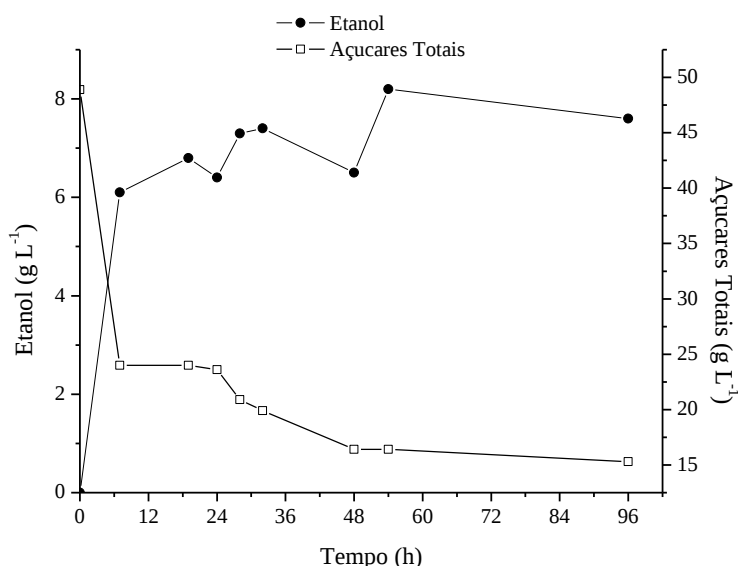
Para aumento de volume na produção de etanol, foram realizadas fermentações com o meio sintético, adicionado de glicose e xilose, e com o hidrolisado de casca de banana.

5.6.1 Meio Sintético

A fermentação em biorreator com meio sintético foi realizada nas seguintes condições: co-cultura 1, com *Z. mobilis* e *P. tannophilus* inoculados no início da fermentação, pH inicial de 4,5, agitação de 100 rpm e concentração inicial de açúcares de 5%. A temperatura foi mantida a 30°C e as amostras foram retiradas após 7, 19, 24, 28, 32, 48, 54 e 96 h de processo. Utilizou-se um biorreator com capacidade para 5 L e a fermentação foi realizada com volume de trabalho de 2 L. As amostras foram avaliadas, em duplicata, quanto ao crescimento celular, concentração de etanol e açúcares totais.

Na Figura 33 estão apresentados os resultados das análises de etanol e açúcares totais residuais. Na primeira retirada de amostra foi observado que, em 7 h de processo, quase metade do substrato já havia sido consumido, e os micro-organismos já haviam sintetizado o etanol, com uma concentração de 6,1 g L⁻¹. Entretanto, houve pouca variação na produção de etanol, sendo encontrado um valor máximo de 8,2 g L⁻¹ com 54 h de processo fermentativo.

Figura 33 – Produção de etanol e açúcares residuais da fermentação do meio sintético, usando glicose como substrato, conduzida em biorreator por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C, agitação de 100 rpm, por 96 h.



Na Tabela 22 estão apresentados os valores de biomassa, açúcares totais, produtividade e rendimento de cada tempo de fermentação. Os micro-organismos cresceram até 48 h, e depois desse tempo, permaneceu estável até o final do processo, mesmo assim,

esse crescimento não foi tão alto quanto aqueles determinados nas fermentações descontínuas. O consumo de substrato iniciou-se desde as primeiras horas de fermentação, com consumo de açúcares até 48h de processo, depois o resíduo permaneceu com a mesma concentração até o final da fermentação. A maior produtividade foi determinada com 7 h de fermentação, com valor de $0,87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. E a menor, $0,14 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com 48 h. Já com relação ao rendimento, foram encontrados valores muito similares, variando de $0,20 \text{ g g}^{-1}$ (48 h) a $0,27 \text{ g g}^{-1}$ (19 h).

Tabela 22 - Valores médios de biomassa (g L^{-1}), açúcares totais (g L^{-1}), produtividade e rendimento da fermentação utilizando glicose como substrato do meio sintético, realizada em fermentador de 5 L, por co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 1), incubada a 30°C , agitação de 100 rpm, por 96 h.

Tempo (h)	Biomassa (g L^{-1})	AT (g L^{-1})	Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$Y_{p/s}$ (g g^{-1})
7	$1,1 \pm 0,1$	$24,0 \pm 0,5$	0,87	0,24
19	$1,1 \pm 0,4$	$24,0 \pm 1,4$	0,36	0,27
24	$1,0 \pm 0,3$	$23,6 \pm 1,0$	0,27	0,25
28	$1,3 \pm 0,1$	$20,9 \pm 2,3$	0,26	0,26
32	$1,0 \pm 0,1$	$19,9 \pm 0,5$	0,23	0,26
48	$1,3 \pm 0,3$	$16,4 \pm 1,4$	0,14	0,20
54	$1,3 \pm 0,3$	$16,4 \pm 1,2$	0,15	0,25
96	$1,3 \pm 0,3$	$15,3 \pm 2,0$	0,08	0,23

$Y_{p/s}$ (g g^{-1}) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) = produtividade de etanol.

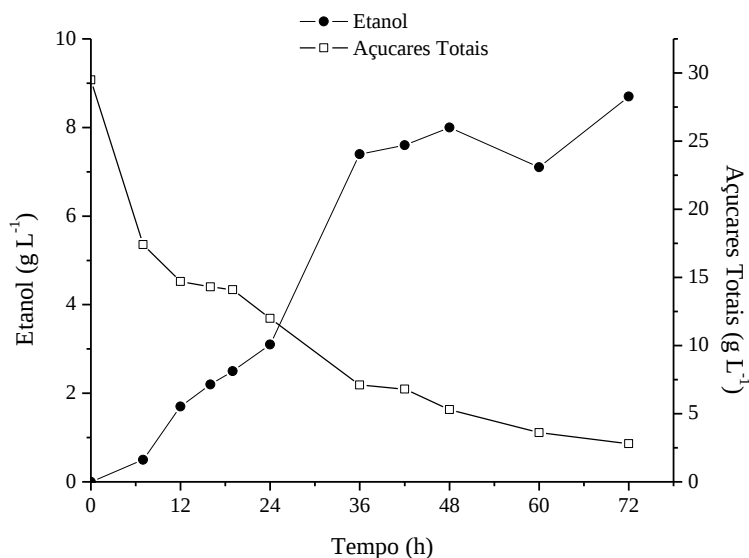
Outras pesquisas já foram realizadas utilizando co-cultura em biorreator. Singh, Majumder e Ghosh (2014) usaram co-cultura de *Z. mobilis* e *P. stipitis* para produção de bioetanol, mas adotaram uma estratégia diferente, inocularam primeiro a *P. stipitis*, em um meio com 60 g L^{-1} de xilose. Essa etapa teve duração de 24h e depois adicionaram 200 g L^{-1} de glicose e então inocularam a *Z. mobilis*, e a fermentação foi conduzida até 44h. Encontraram rendimento e produtividade de $0,47 \text{ g g}^{-1}$ e $1,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Comparando-se aos resultados obtidos, pode ser verificado que a fermentação contínua com *Z. mobilis* e *P. tannophilus* foi vantajosa, pois mesmo usando concentração de substrato inferior (50 g L^{-1}) foi possível obter uma produtividade de $0,87 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

5.6.2 Casca de Banana

A fermentação em biorreator com o meio contendo o hidrolisado de casca de banana foi realizada nas condições que apresentaram a maior produção de etanol nas fermentações descontínuas: co-cultura 2, com a *Z. mobilis* inoculada no início do processo e *P. tannophilus* inoculada depois de 7 h, pH 5,0, agitação de 100 rpm e concentração inicial de sólidos totais de 15%. A temperatura foi mantida a 30°C e as amostras foram retiradas após 7, 12, 16, 19, 24, 36, 42, 48, 60 e 72 h de processo. Foi utilizado para o processo de fermentação um biorreator com capacidade para 5 L e a fermentação foi realizada com volume de trabalho de 2 L.

Na Figura 34 está apresentada a relação entre concentração de etanol e a concentração final de açúcares totais. A produção de etanol aumentou de acordo com o tempo de fermentação, pode ser observado que a maior produção foi determinada após 36 h de fermentação. A máxima concentração obtida foi de 8,7 g L⁻¹ em 72 h. No final da fermentação, a concentração de açúcares totais diminuiu ao menor valor, 2,8 g L⁻¹, mostrando que o substrato foi consumido ao longo da fermentação.

Figura 34 – Produção de etanol e açúcares residuais apresentados na fermentação do meio composto pelo hidrolisado de cascas de banana, conduzida em biorreator, empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C, agitação de 100 rpm, por 72 h.



Na Tabela 23 estão apresentados os resultados de crescimento celular; o inoculo inicial da bactéria foi de 0,13 g e, após 7 h a bactéria apresentou um crescimento de 0,67 g. O inoculo inicial da levedura foi de 0,4 g, e a partir da 7ª h de fermentação, a quantificação da biomassa foi feita com os dois micro-organismos juntos. Pode ser observado que os micro-organismos cresceram bem, simultaneamente, houve aumento da biomassa até o final da fermentação, com uma massa celular final de 4,2 g L⁻¹. E esse crescimento está relacionado ao consumo de açúcares, analisando os dados da Tabela 24, a concentração de açúcares foi diminuindo até o final do processo fermentativo.

Tabela 23 - Valores médios de biomassa (g L⁻¹), açúcares totais (g L⁻¹), produtividade e rendimento da fermentação realizada com meio composto por hidrolisado de cascas de banana, em fermentador de 5 L, empregando a co-cultura de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* (Co-cultura 2), incubada a 30°C, agitação de 100 rpm, por 72 h.

Tempo (h)	Biomassa (g L ⁻¹)	AT (g L ⁻¹)	Q _p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{p/s} (g g ⁻¹)
7	0,8 ± 0,1	17,4 ± 1,7	0,07	0,04
12	3 ± 0,4	14,7 ± 1,0	0,14	0,12
16	2,8 ± 0,3	14,3 ± 0,1	0,14	0,14
19	1,9 ± 0,1	14,1 ± 0,9	0,13	0,15
24	2 ± 0,1	12 ± 1,1	0,13	0,18
36	2,3 ± 0,3	7,1 ± 0,6	0,21	0,33
42	3,5 ± 0,3	6,8 ± 1,4	0,18	0,33
48	3,9 ± 0,3	5,3 ± 0,0	0,17	0,33
60	4 ± 0,3	3,6 ± 0,3	0,12	0,27
72	4,2 ± 0,2	2,8 ± 0,6	0,12	0,33

Y_{p/s} (g g⁻¹) = rendimento de etanol por substrato.

Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) = produtividade de etanol.

O rendimento em etanol com relação aos açúcares consumidos (Tabela 24) aumentou até 36 h de fermentação, depois se manteve praticamente inalterado até o final do processo fermentativo. Além disso, a maior produtividade, 0,21 g L⁻¹ h⁻¹, também foi determinada nesse ensaio. Avaliando esses resultados, pode se dizer que a fermentação poderia ter sido interrompida com 36 h, não havendo necessidade de o processo durar 72 h, pois o rendimento não aumentou. Entretanto, este aumento do tempo de fermentação pode acarretar maiores

custos de processo, principalmente, gasto com energia para manter o biorreator em funcionamento. Isto corrobora os resultados obtidos por Roviero et al. (2015), os quais consideram 72 h de fermentação um tempo muito longo para a produção de etanol em escala industrial. Esses pesquisadores investigaram a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico, usando leveduras que fermentam tanto pentoses quanto hexoses, e o tempo de fermentação foi semelhante a esta pesquisa (72 h). Ainda, segundo estes pesquisadores, após 72 h, há redução na viabilidade celular, e isso ocorre devido ao metabolismo natural das leveduras, as quais convertem açúcar em produtos, como o etanol, ácidos, glicerol e outros compostos, os quais se acumulam no meio e inibem o processo metabólico, afetando negativamente as células.

6 CONCLUSÕES

- O pré-tratamento ácido das cascas de banana promoveu a liberação de $20,3 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais. E a hidrólise enzimática realizada durante 24 h favoreceu o aumento no rendimento de açúcares totais, aumentou até a concentração final de $74,1 \text{ g L}^{-1}$;
- As cascas de maracujá submetidas ao pré-tratamento ácido apresentaram uma liberação de $26,4 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais e após a hidrólise enzimática, durante 24 h, a concentração de açúcares totais incrementou até $87,2 \text{ g L}^{-1}$;
- As cascas de coco submetidas ao pré-tratamento ácido apresentaram uma liberação de $9,4 \text{ g L}^{-1}$ de açúcares totais e após a hidrólise enzimática, durante 24 h, a concentração de açúcares totais foi de $13,4 \text{ g L}^{-1}$;
- Das três cascas avaliadas, a que mostrou maior potencial como fonte lignocelulósica para obtenção de açúcares fermentescíveis foi a de maracujá, seguida das cascas de banana;
- Nas fermentações com a bactéria *Z. mobilis*, com os três substratos avaliados, foi verificado que o substrato mais concentrado não contribuiu para um aumento significativo da produção de etanol. Além disso, a maior concentração de etanol foi de $2,9 \text{ g L}^{-1}$, obtido nas fermentações de cascas de banana hidrolisadas com concentração de 5%;
- Nas fermentações com a levedura *P. tannophilus* as maiores produções de etanol foram determinadas utilizando hidrolisado de cascas de maracujá com concentração de sólidos de 10%, proporcionando a produção de 10 g L^{-1} de etanol;
- A associação da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *P. tannophilus* no processo de co-cultura mostrou potencial para a fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos. O sistema de inoculação que apresentou melhores resultados foram aqueles no qual a bactéria foi inoculada no início do processo de fermentação, e depois de 7 h de processo, a levedura foi inoculada. Além disso, o substrato que apresentou melhores resultados foi o de cascas de banana hidrolisadas, com $11,3 \text{ g L}^{-1}$ de etanol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATE, C. et al. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 45, n. 5, p. 580–583, 1996.
- ABUD, A. K. D. S.; NARAIN, N. Incorporação da farinha de resíduo do processamento de polpa de fruta em biscoitos: uma alternativa de combate ao desperdício. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 257–265, 2009.
- AGBOGBO, F. K. et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, London, v. 41, n. 11, p. 2333–2336, 2006.
- ALMEIDA, J. M. et al. Passion fruit peel as novel substrate for enhanced β -glucosidases production by *Penicillium verruculosum*: Potential of the crude extract for biomass hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 216–226, 2015.
- ALZATE, C. A. C.; TORO, O. J. S. Energy consumption analysis of integrated flowsheets for production of fuel ethanol from lignocellulosic biomass. **Energy**, Oxford, v. 31, n. 13, p. 2447–2459, 2006.
- AYENI, A. O. et al. Effective alkaline peroxide oxidation pretreatment of shea tree sawdust for the production of biofuels: kinetics of delignification and enzymatic conversion to sugar and subsequent production of ethanol by fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 33–45, 2016.
- BAEYENS, J. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. **Progress in Energy and Combustion Science**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 60–88, 2015.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, New York, v. 26, n. 1, p. 89–105, 2008.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. Rio de Janeiro: BNDES Setorial, 2007. v. 1.
- BRADSHAW, M. J. Global energy dilemmas: a geographical perspective. **The Geographical Journal**, United Kingdom, v. 176, n. 4, p. 275–290, 2010.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- CABRAL, M. M. S. **Aproveitamento da casca do coco verde para a produção de etanol de segunda geração**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2015.
- CABRAL, M. M. S. et al. Bioethanol production from coconut husk fiber. **Ciência Rural**,

Santa Maria, v. 46, n. 10, p. 1872–1877, 2016.

CARVALHO, A. V. et al. Aproveitamento do mesocarpo do maracujá na fabricação de produtos flavorizados. **Comunicado Técnico 147, Embrapa**, p. 1–6, dez. 2005.

CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-química**. 10. ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos S.A, 1999.

CAZETTA, M. L. et al. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 15, p. 2824–2828, 2007.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.

CHANDEL, A. K. et al. Bioconversion of Saccharum spontaneum (wild sugarcane) hemicellulosic hydrolysate into ethanol by mono and co-cultures of *Pichia stipitis* NCIM3498 and thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*-VS 3. **New Biotechnology**, v. 28, n. 6, p. 593–599, 2011.

CHANG, V. S.; HOLTZAPPLE, M. T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, Berlin, v. 84–86, n. 1–9, p. 5–37, 2000.

CHAOVANALIKIT, A.; WROLSTAD, R. E. Total anthocyanins and total phenolics of fresh and processed cherries and their antioxidant properties. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 69, n. 1, p. 67–72, 2004.

CHEN, Y. Development and application of co-culture for ethanol production by co-fermentation of glucose and xylose: A systematic review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 38, n. 5, p. 581–597, 2011.

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

CONSIDINE, D. M. **Chemical and process technology encyclopedia**. New York: McGraw-Hill, 1974 apud CARVALHO, G. B. M. de. **Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção biotecnológica de xilitol**. 2005. 110 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

CORRADINI, E. et al. Composição química, propriedades mecânicas e térmicas da fibra de frutos de cultivares de coco verde. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 3, p. 837–846, 2009.

DOELLE, M. B.; DOELLE, H. W. Sugar-cane molasses fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 33, n. 1, p. 31–35, 1990.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Whashington, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EDWARDS, M. C.; DORAN-PETERSON, J. Pectin-rich biomass as feedstock for fuel ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 95, p. 565–575, 2012.

EL-ZAWAWY, W. K. et al. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydrate Polymers**, Barking, v. 84, n. 3, p. 865–871, 2011.

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

ESSIEN, J. P.; AKPAN, E. J.; ESSIEN, E. P. Studies on mould growth and biomass production using waste banana peel. **Bioresource Technology**, Essex, v. 96, n. 13, p. 1451–1456, 2005.

FALCÃO DE MORAIS, J. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações industriais. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 14, n. 1, p. 6–10, 1983.

FERRARI, R. A.; COLUSSI, F.; AYUB, R. A. Caracterização de subprodutos da industrialização do maracujá-aproveitamento das sementes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 26, n. 1, p. 101–102, 2004.

FERREIRA, J. **Produção de Levana e Bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R. DA; SILVA, F. D. C. DA. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 623–638, 2009.

FOLEGATTI, M. I. S.; MATSUURA, F. C. A. U. Processamento. In: **Banana**. Brasília: EMBRAPA, 2008. p. 232–244.

FU, N. et al. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, Oxford, v. 45, n. 3, p. 210–217, 2009.

FU, N.; PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 1091–1097, 2008.

GIBBS, M.; DEMOSS, R. D. Anaerobic dissimilation of C14, labelled glucose and fructose by *Pseudomonas lindneri*. **Journal of Biology Chemistry**, v. 207, n. 2, p. 689–694, 1954.

GÍRIO, F. M. et al. Bioresource Technology Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.

GONÇALVES, F. A. et al. Comparison of delignified coconuts waste and cactus for fuel-ethanol production by the simultaneous and semi-simultaneous saccharification and fermentation strategies. **Fuel**, London, v. 131, p. 66–76, 2014.

GONÇALVES, F. A. et al. Bioethanol production from coconuts and cactus pretreated by autohydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 1–12, 2015.

GUILMAN, F.; BUZATO, L. B.; CELLIGOI, M. A. P. C. Comparação da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* em meio de melaço de cana-de-açúcar puro e pré-tratado com invertase. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 20/21, n. 2, p. 39–43, 2000.

GÜNAN YÜCEL, H.; AKSU, Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: Use of new detoxification methods. **Fuel**, London, v. 158, n. 1, p. 793–799, 2015.

GUPTA, A.; PRAKASH, J. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 41, n. 1, p. 550–567, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 16, n. 11, p. 933–943, 1994.

HOLLANDA, J. B. DE; ERBER, P. Cana de açúcar: Usando todo seu potencial energético. In: **Cana de açúcar: Usando todo seu potencial energético**. v. 5, São Paulo: NAIPPE/USP, 2007. p. 20.

ISHIKAWA, H.; NOBAYASHI, H.; TANAKA, H. Mechanism of fermentation performance of *Zymomonas mobilis* under oxygen supply in batch culture. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Oosaka, v. 70, n. 1, p. 34–40, 1990.

ISHIMOTO, F. Y. et al. Aproveitamento alternativo da casca do Maracujá-Amarelo (*Passiflora edulis* f. var. *flavicarpa* Deg.) para produção de biscoitos. **Ciências Exatas e Naturais**, Guarapuava, v. 9, n. 2, p. 279–292, 2007.

KHOJA, A. H. et al. Comparative study of bioethanol production from sugarcane molasses by using *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 31, p. 2455–2462, 2015.

LI, J.; HENRIKSSON, G.; GELLERSTEDT, G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 16, p. 3061–3068, 2007.

LIMA, A. A. et al. **A cultura do maracujá**. 3. ed., Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

LOUSADA JÚNIOR, J. E. et al. Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, n. 1, p. 70–76, 2006.

- MACORIS, M. S. et al. Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 430–435, 2011.
- MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Concurrent production and consumption of ethanol by cultures of *Pachysolen tannophilus* growing on D-xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 909–912, 1982.
- MANIKANDAN, K.; SARAVANAN, V.; VIRUTHAGIRI, T. Kinetics studies on ethanol production from banana peel waste using mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 83–88, 2008.
- MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de Lignina e Holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de- Açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.
- MATTOS, A. L. A. et al. Beneficiamento da casca de coco verde. **Embrapa Agroindústria Tropical**, Fortaleza, p. 37, 2011.
- MELO, I. R. et al. Application of fractional factorial design to levain production by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 45–51, 2007.
- MESQUITA, K. S. et al. Elaboração, caracterização química e avaliação sensorial de néctares de bananas das variedades prata, nanica e marmelo. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 3, p. 451–455, 2009.
- MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **The Biochemical journal**, London, v. 363, n. 3, p. 769–776, 2002.
- MOHAPATRA, D.; MISHRA, S.; SUTAR, N. Banana and its by-product utilisation: an overview. **Journal of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v. 69, n. 5, p. 323–329, 2010.
- MONSALVE, J. F.; PEREZ, V. I. M.; COLORADO, A. A. R. Ethanol production of banana shell and cassava starch. **Dyna**, Medellin, v. 150, p. 21–27, 2006.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de Xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 1, p. 94–100, 2004a.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004b.
- NEIRINCK, L. G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. The requirement of oxygen for incorporation of carbon from d-xylose and d-glucose by *Pachysolen tannophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 228, n. 1, p. 13–21, 1984.

- NEIVA, J. N. M. et al. Valor nutritivo de silagens de capim-elefante enriquecidas com subproduto do processamento do maracujá. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4 SUPPL., p. 1845–1851, 2006.
- NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **Biochemistry**, v. 153, n. 2, p. 375–380, 1944.
- NISHIYAMA, Y. et al. Crystal structure and hydrogen bonding system in cellulose I β from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 125, n. 47, p. 14300–14306, 2003.
- NOGUEIRA, L. A. H. et al. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1. ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- NUNES, M. U. C.; SANTOS, J. R.; SANTOS, T. C. Tecnologia para biodegradação da casca de coco seco e de outros resíduos do coqueiro. **Embrapa Tabuleiros Costeiros. Circular Técnica**, p. 1–5, nov. 2007.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* F. *Flavicarpa*) para produção de doce em calda. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 259–262, 2002.
- PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 596–602, 2008.
- PRADO, J. M. et al. Obtaining sugars from coconut husk, defatted grape seed, and pressed palm fiber by hydrolysis with subcritical water. **Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 89, p. 89–98, 2014.
- RODRÍGUEZ, 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, n. 10, p. 745–748, 1986.
- ROSA, S. DA; GARCIA, J. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 117–156, 2009.
- ROVIERO, J. P. et al. Ethanol production using hemicellulosic hydrolyzate and sugarcane juice with yeasts that converts pentoses and hexoses. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 6, p. 519–524, 2015.
- SALEH, M. et al. Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 90, n. 1, p. 286–293, 2014.
- SANCHES, J. et al. Avaliação de danos mecânicos causados em banana “Nanicão” durante as

etapas de beneficiamento, transporte e embalagem. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v. 24, n. 1, p. 195–201, 2004.

SÁNCHEZ, S. et al. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Oxford, v. 77, n. 6, p. 641–648, 2002.

SANTOS, V. A. Q.; BIANCHI, V. L. D.; GARCIA-CRUZ, C. H. Effect of initial pH in levan production by *Zymomonas mobilis* immobilized in sodium alginate. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 36, n. 2, p. 349, 2014.

SANTOS, V. A. Q.; GARCIA-CRUZ, C. H. Ethanol and levan production by sequential bath using *Zymomonas mobilis* immobilized on alginate and chitosan beads. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá, v. 38, n. 3, p. 263–271, 2016.

SATHESH-PRABU, C.; MURUGESAN, A. G. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 3, p. 2788–2792, 2011.

SCHELL, D. J. et al. A bioethanol process development unit: Initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. **Bioresource Technology**, Essex, v. 91, n. 2, p. 179–188, 2004.

SCHNEIDER, V. E. et al. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada - IPEA, 2012.

SCHULZ, M. A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) - Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.

SILVA, I. Q. et al. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 321–329, 2009.

SINGH, L. K.; MAJUMDER, C. B.; GHOSH, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 82, n. 1, p. 150–157, 2014.

SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: Properties and process considerations for ethanol production from d-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 9, n. 1, p. 5–15, 1987.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. **O setor sucroalcooleiro e o domínio tecnológico**. 1. ed. São Paulo: Núcleo de Análise Interdisciplinar de Políticas e Estratégias da Universidade de São Paulo (NAIPPE/USP), 2007.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 19–23, 1952.

SPRENGER, G. A. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas mobilis*: a catabolic highway with

some scenic routes. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 145, n. 3, p. 301–307, 1996.

STROPARO, E. C. et al. Seleção de fungos filamentosos e de resíduos agroindustriais para a produção de enzimas de interesse biotecnológico. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 6, p. 2267–2278, 2012.

SUKUMARAN, R. K. et al. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Renewable Energy**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 421–424, 2009.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.

SURIYACHAI, N. et al. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, Essex, v. 142, n. 1, p. 171–178, 2013.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The biology of *Zymomonas*. **Bacteriological reviews**, Baltimore, v. 41, n. 1, p. 1–46, 1977.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621–1651, 2008.

TOMA, M. M. et al. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. **Process Biochemistry**, London, v. 38, n. 9, p. 1347–1350, 2003.

VAITHANOMSAT, P. et al. The potential of coconut husk utilization for bioethanol production. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 45, n. 1, p. 159–164, 2011.

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

ZHANG, J.; LYND, L. R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v. 107, n. 2, p. 235–244, 2010.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 32, n. 12, p. 1156–1161, 2008.

ANEXOS

ANEXO A – Tabela com informações sobre as enzimas fornecidas pela Novozymes Latin America Ltda.

Tabela 1 A - Classificação e densidade das enzimas fornecidas pela Novozymes® e faixas de pH, temperatura e dose recomendadas pela empresa.

Classificação da enzima	Densidade ¹	pH	Temperatura (°C)	Dosagem ² (% m/m (TS))
NS22086 Cellulase-complexo	1,15	5,0–5,5	45–50	1,0–5,0
NS22083 Xilanase	1,09	4,5–6,0	35–55	0,05–0,25
NS22118 β -glicosidase	1,2	2,5–6,5	45–70	0,2–0,6
NS22119 Complexo enzimático	1,19	4,5–6,0	25–55	0,05–0,4

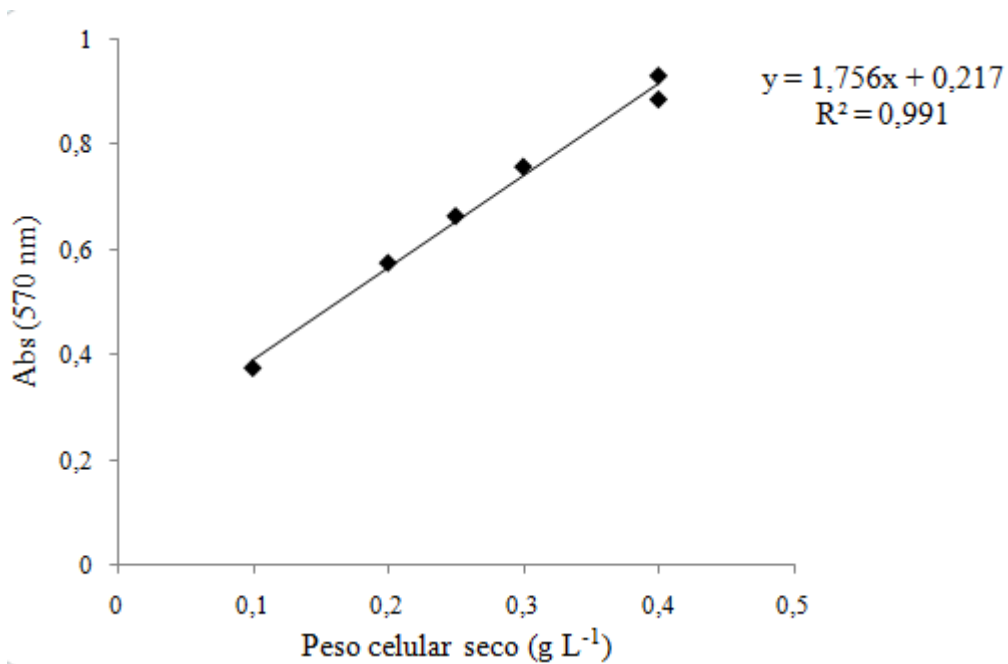
¹ Valores aproximados de densidade.

² Dosagem requerida é fortemente dependente do tipo de substrato, dos pré-tratamentos e das condições operacionais empregadas.

APÊNDICES

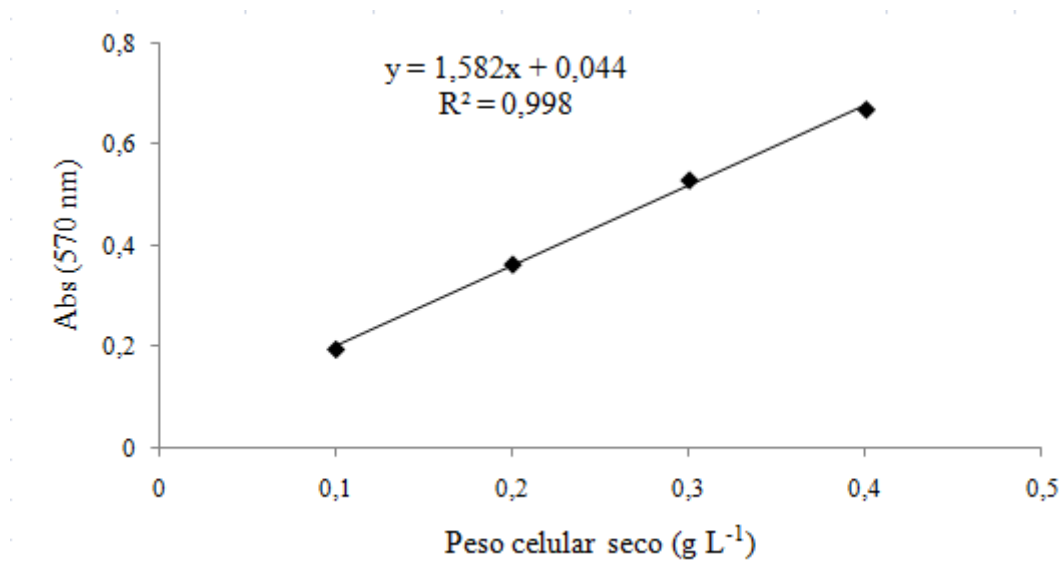
APÊNDICE A - Curva analítica para determinação da concentração celular de *Z. mobilis* CCT 4494

Figura 1 A. Curva analítica da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494.



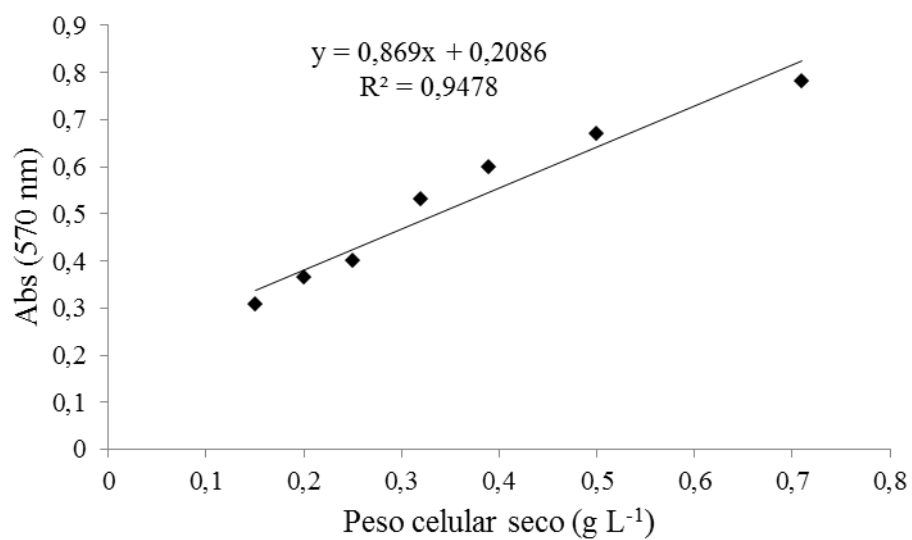
APÊNDICE B - Curva analítica para determinação da concentração celular de *P. tannophilus*
CCT 1891

Figura 1 B. Curva analítica da concentração celular obtida a partir de suspensões de *P. tannophilus* CCT 1891.



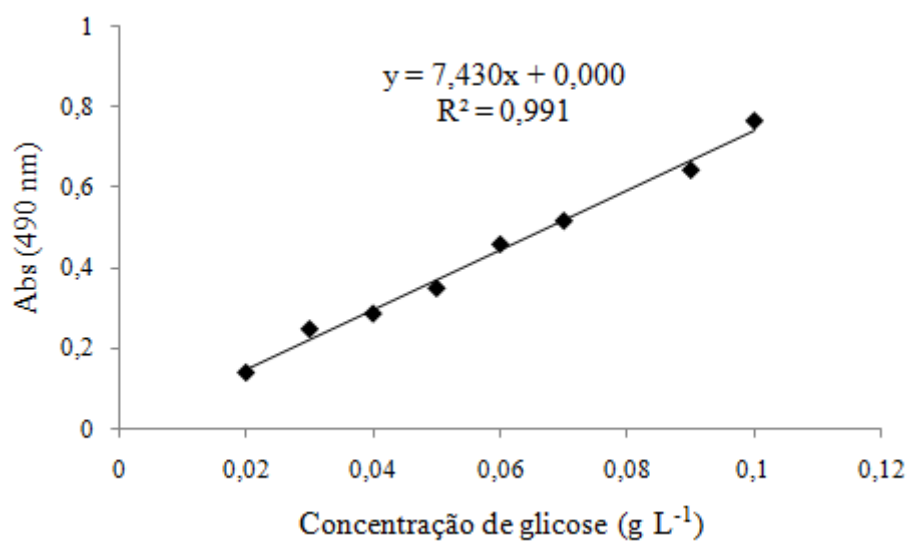
APÊNDICE C - Curva analítica para determinação da concentração celular de *Z. mobilis* CCT 4494 e *P. tannophilus* CCT 1891.

Figura 1 C. Curva analítica da concentração celular obtida a partir de suspensões de *Z. mobilis* CCT 4494 e *P. tannophilus* CCT 1891.



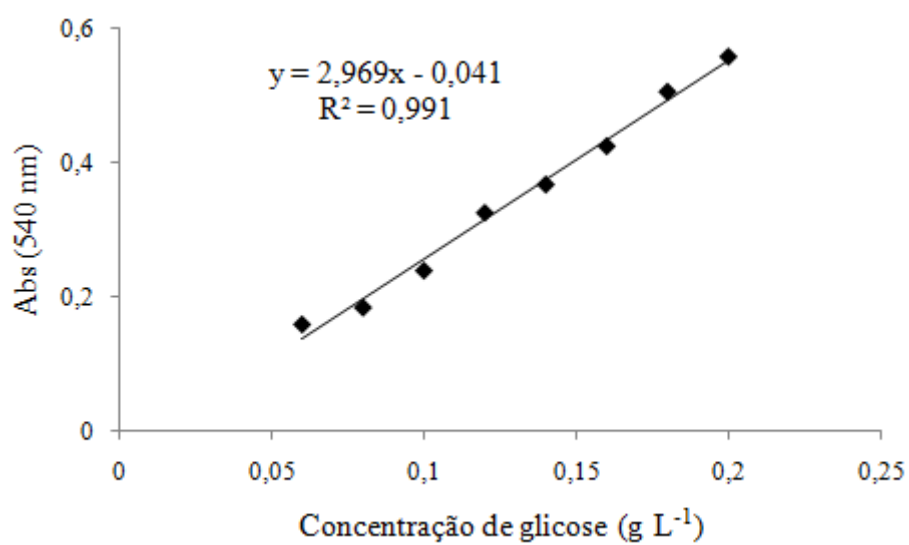
APÊNDICE D – Curva analítica da Concentração de Açúcares Totais.

Figura 1 D. Curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g L^{-1}) pelo método Dubois e colaboradores (1956).



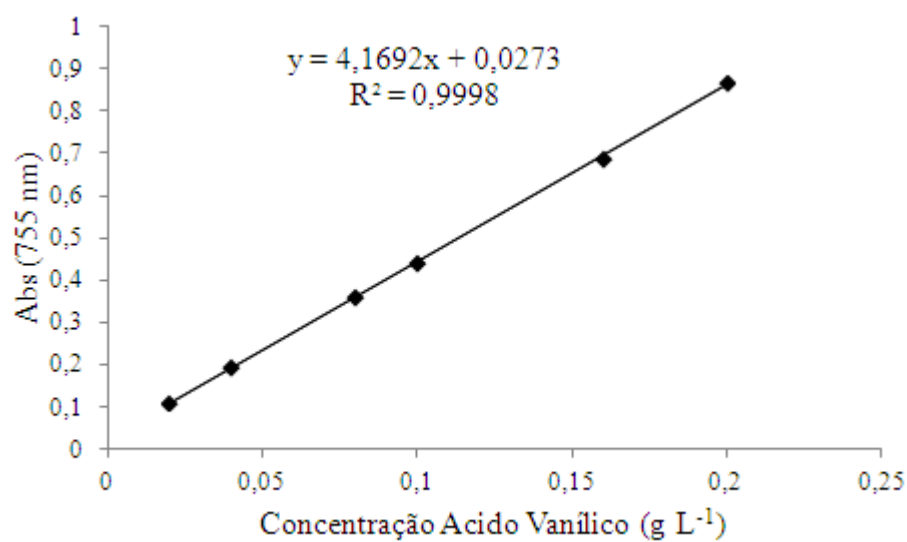
APÊNDICE E – Curva analítica da Concentração de Açúcares Redutores.

Figura 1 E. Curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de glicose (g L^{-1}) pelo método Somogyi (1952) e Nelson (1944).



APÊNDICE F – Curva analítica da Concentração de Ácido Vanílico.

Figura 1 F. Curva analítica obtida a partir de diferentes concentrações de Ácido Vanílico (g L^{-1}) pelo método Folin-Ciocalteu.





TERMO DE REPRODUÇÃO XEROGRÁFICA

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

São José do Rio Preto, 10 de abril de 2017.



Juliana Ferreira