

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

CLARISSA BRITO CARVALHO DE SÁ

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE
Saccharomyces cerevisiae E *Zymomonas mobilis*
PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

RECIFE
2012

CLARISSA BRITO CARVALHO DE SÁ

CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE
Saccharomyces cerevisiae E *Zymomonas mobilis*
PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador:
Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior

Co-orientador:
Prof. Dr. Irapuan Oliveira Pinheiro

RECIFE
2012

CLARISSA BRITO CARVALHO DE SÁ

**CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS DE
Saccharomyces cerevisiae E *Zymomonas mobilis*
PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Elba Pinto da Silva Bon
Departamento de Bioquímica do Instituto de Química/UFRJ

Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia
Departamento de Antibióticos /UFPE

Profa. Dra. Ana Maria Souto-Maior
Departamento de Antibióticos /UFPE

Recife, 01 de março de 2012.

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Sá, Clarissa Brito Carvalho de
Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e
***Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol/ Clarissa**
Brito Carvalho de Sá– Recife: O Autor, 2012.

72 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Souto Maior

Coorientador: Irapuan Oliveira Pinheiro

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial, 2012.

Inclui bibliografia

1. Etanol 2. Fermentação 3. Cana de açúcar- bagaço I. Souto Maior, Ana Maria (orientadora) II. Pinheiro, Irapuan Oliveira (coorientador) III. Título

547.031

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 034

Dedico aos meus pais Luiz (*in memoriam*) e
Tereza. Aos meus irmãos Emanoela e Emmanuel.
Ao meu namorado Filipe Melo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abençoar e guiar pelos caminhos tortuosos que percorri.

Ao meu pai Luiz, que foi responsável pela criação do meu caráter, e mesmo distante acompanhou mais essa etapa de minha vida, estando sempre presente nos meus pensamentos e orações, Te amo Pai, Saudades.

À minha mãe Tereza, fonte de toda força que precisei para concluir mais esse trabalho, agradeço por todo afeto e amor dedicado a mim nas horas mais difíceis. Te amo muito minha mãe.

Aos meus irmãos, Emanoela e Emmanuel, que apesar de várias entrelinhas, estão sempre presentes ajudando nas horas mais complicadas.

À minha avó Adalgisa pelo carinho e por todas as lições de vida passadas a mim através de suaves palavras.

Aos meus tios, tias, primas e primos, em especial a Hallison por sempre me ajudar quando precisei, pelo estímulo e incentivos em todos os momentos.

Ao meu namorado Filipe por está sempre ao meu lado, suportando a minha ausência em vários momentos e por compreender todo esforço para terminar minha dissertação. Te amo.

À minha amiga-irmã Hamanda, por sempre me entender, escutar e mostrar os erros cometidos sempre identificando os caminhos para não repeti-los.

Às minhas amigas, Joseanna, Suelda e Tathiana, que mesmo com a distância estão sempre presentes na minha vida.

À minha amiga Catharina, que sempre me apoiou, mesmo distante, nessa longa estrada do início até a sua finalização.

Aos meus amigos Ana, Amâncio, Luanna, Ronaldo, Helena, Amanda e Andresa, pelos incentivos nos momentos mais incertos da minha vida.

À minha cunhada Izabella e a Goretti, sua mãe, pela força e por sempre ajudar quando necessário.

À minha amiga Ludhimilla Suellen, pela companhia durante todas as etapas desse desafio, servindo pelas muitas vezes como psicóloga, além de todo incentivo e auxílio em todos os momentos.

À Profa. Glícia Calazans, pela confiança a mim dedicada nos momentos iniciais e tumultuados do início da minha carreira e por auxiliar nos momentos teóricos e estressantes da confecção deste trabalho.

À minha amiga Thaís Mota, por ouvir minhas lamurias e incertezas e por me incentivar a nunca desistir.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Fermentativos: Bruno, Rafael, Filipe, Wagner, Fernando, Elza e Teresa por todo carinho.

À Profa. Ana Maria Souto Maior, por orientar esta dissertação, por todo empenho, sabedoria, compreensão e paciência a mim dedicada nas horas mais complicadas do aprendizado acadêmico.

Ao Prof. Irapuan Oliveira Pinheiro, pela co-orientação e colaboração que foram necessários para a realização deste trabalho.

Aos estagiários, Bruna, Juliana, Jessica, Vanessa e David, por ajudarem durante o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Solange, Márcia e Carol, por estarem sempre dispostas a ajudar e escutar meus dilemas.

Aos Doutorandos, Thiago e Cynthia, por repassarem conhecimentos que até um dado momento eram desconhecidos para mim.

Aos meus coleguinhas do mestrado, Bruno, Débora, Gabriel, Luana, Luciana e Ingrid, pelas boas risadas e os momentos de descontração, quando o trabalho permitia.

Ao Departamento de Antibióticos, excepcionalmente ao Laboratório de Processos Biotecnológicos, pela infraestrutura fornecida para o desenvolvimento dessa dissertação.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial e a todos que fizeram e/ou fazem parte da coordenação deste programa.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

E a todas as pessoas que durante este tempo foram envolvidas, direta ou indiretamente, na realização deste projeto, portanto, recebam desde já a minha sincera gratidão.

*“Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no
que você não conhece como eu mergulhei.
Não se preocupe em entender, viver
ultrapassa qualquer entendimento.”*

Clarice Lispector, 1920 – 1977.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar microrganismos etanologênicos eficientes e robustos para aplicação industrial. Inicialmente, foi comparada a produção de etanol entre 10 linhagens industriais de *S. cerevisiae* e entre 10 linhagens de *Z. mobilis*, pertencentes à Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da UFPE. Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio (50 mL), em meios a base de glicose, com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado foi obtido por tratamento hidrotérmico (195° C, 16 min.) em reator descontínuo de 20 L (Regmed AU/E-20). Por análise estatística, duas linhagens, uma de cada grupo (*S. cerevisiae* IA1238 e *Z. mobilis* ZAP), foram selecionadas para caracterização cinética em biorreator de bancada (New Brunswick Scientific, Bioflo 110). Foram avaliados, também, os efeitos individuais e sinérgicos de inibidores (furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e ácido gálico) sobre as duas linhagens selecionadas. Na caracterização cinética em biorreator, na ausência de hidrolisado, o rendimento de etanol de *S. cerevisiae* IA1238 (0,36 g g⁻¹) foi um pouco inferior ao de *Z. mobilis* ZAP (0,42 g g⁻¹). No entanto, *S. cerevisiae* IA1238 foi capaz de fermentar na presença do hidrolisado, embora com inibição do crescimento, enquanto *Z. mobilis* ZAP foi totalmente inibida. Na análise individual de inibidores, o ácido acético e o ácido fórmico, em concentrações presentes no hidrolisado, apresentaram maior poder de inibição, tanto sobre *S. cerevisiae* IA1238 (53% e 26%, respectivamente) como sobre *Z. mobilis* ZAP (93% e 73% , respectivamente). Embora *Z. mobilis* apresente vantagem metabólica em meio de glicose (*i.e.* maior rendimento de etanol), *S. cerevisiae* se mostrou, em geral, mais robusta para aplicação industrial. Em particular, a linhagem IA1238, utilizada atualmente em processos industriais de primeira geração, mostrou ser uma boa plataforma para modificações genéticas futuras, para aplicação em processos de segunda geração.

Palavras-chave: Fermentação; bagaço de cana-de-açúcar; *Saccharomyces cerevisiae*; *Zymomonas mobilis*; inibidores.

ABSTRACT

The aim of this work was the selection of efficient and robust ethanologenic microorganisms for industrial application. Ethanol production were initially compared among 10 industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* and among 10 strains of *Zymomonas mobilis*, deposited in the Microorganism Culture Collection of the Department of Antibiotics from UFPE. The experiments were carried out in test tubes (50 mL) on glucose medium, without and with hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse. The hydrolysate was obtained by hydrothermal pretreatment (195° C, 16 min.) in a 20-L batch reactor (Regmed AU/E-20). By statistical analysis, two strains, one of each group (*S. cerevisiae* IA1238 and *Z. mobilis* ZAP), were selected for kinetic analysis in benchtop batch bioreactor (New Brunswick Scientific, Bioflo 110). The individual and synergic effects of inhibitors (furfural, HMF, acetic acid, formic acid and galic acid) on the two selected strains were also evaluated. Kinetic characterization in medium not containing hydrolysate showed a lower ethanol yield for *S. cerevisiae* IA1238 (0.36 g g⁻¹) compared to *Z. mobilis* ZAP (0.42 g g⁻¹). However, *S. cerevisiae* IA1238 was capable of fermenting in the presence of the hydrolysate, although growth was inhibited, while *Z. mobilis* ZAP was totally inhibited. Individually, acetic acid and formic acid (in concentrations found in the hydrolysate) showed higher inhibition power on both *S. cerevisiae* IA1238 (53% and 26%, respectively) and *Z. mobilis* ZAP (93% and 73%, respectively). Although *Z. mobilis* has metabolic advantage in fermenting glucose (*i.e.* higher ethanol yield), *S. cerevisiae* showed, in general, to be more robust for industrial application. In particular, the strain IA1238, used currently in first generation industrial processes, could be a good platform for future genetic modifications for application in second generation processes.

Key-words: Fermentation; sugarcane bagasse; *Saccharomyces cerevisiae*; *Zymomonas mobilis*; inhibitors.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xvi
NOMENCLATURA	xviii
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo Geral.....	3
2.2 Objetivos Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Biocombustíveis.....	4
3.2 Etanol de Segunda Geração.....	6
3.2.1 Inibidores da fermentação.....	9
3.3 Fermentação Alcoólica.....	10
3.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.3.2 <i>Zymomonas mobilis</i>	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Microrganismos.....	18
4.2 Meios de Cultura.....	19
4.2.1 Meio de conservação.....	19
4.2.2 Meio de preparação de inóculo.....	20
4.2.3 Meio de fermentação.....	21
4.2.4 Hidrolisado hemicelulósico.....	22
4.3 Procedimento Experimental.....	24
4.3.1 Caracterização inicial e seleção de linhagens.....	24
4.3.2 Caracterização cinética das linhagens selecionadas.....	26
4.3.3 Caracterização do efeito de inibidores em meio sintético.....	26
4.4 Métodos Analíticos.....	28
4.4.1 Determinação de concentração celular.....	28
4.4.2 Determinação das concentrações de substratos, produtos e inibidores.....	29
4.5 Métodos Matemáticos.....	30
4.5.1 Cálculo de parâmetros cinéticos.....	30

4.5.2	Análise estatística	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Caracterização e Seleção das Linhagens	33
5.1.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i>	33
5.1.2	Linhagens de <i>Z. mobilis</i>	41
5.2	Caracterização Cinética das Linhagens Seleccionadas	46
5.2.1	<i>S. cerevisiae</i> IA 1238	46
5.2.2	<i>Z. mobilis</i> ZAP	50
5.3	Efeito de Inibidores sobre os Microrganismos Seleccionados	54
5.3.1	<i>S. cerevisiae</i> IA 1238	54
5.3.2	<i>Z. mobilis</i> ZAP	59
6	CONCLUSÃO	64
7	REFERÊNCIAS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado de CANILHA et al. (2010).....	7
Figura 3.2	Alterações estruturais na microfibrila celulósica determinadas pelo pré-tratamento, seguidas pela hidrólise enzimática e fermentação. Fonte: Adaptado de CANILHA et al. (2010).....	8
Figura 3.3	Via metabólica de formação de produtos da fermentação de carboidratos por <i>S. cerevisiae</i> (via Embden-Meyerhof). Fonte: Modificado de WALKER (1998).....	12
Figura 3.4	Via metabólica de formação de produtos da fermentação de carboidratos por <i>Z. mobilis</i> (via Entner-Doudoroff). Fonte: ERNANDES; GARCIA-CRUZ (2009).....	15
Figura 4.1	Reator (REGMED AU/E-20) utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	22
Figura 4.2	Fluxograma do tratamento hidrotérmico utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	23
Figura 4.3	Mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, C25KC), contendo frascos Erlenmeyer de 500 mL com inóculos.....	25
Figura 4.4	Tubos de 50 mL (Falcon) utilizados na seleção de linhagens.....	25
Figura 4.5	Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado nos experimentos de caracterização cinética das linhagens.....	27
Figura 4.6	Esquema da Câmara de Neubauer e da microscopia em objetiva de 40X. Fonte: Adaptado de ALVES (2006).....	29
Figura 4.7	Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, série 1100) utilizado para a determinação de concentrações de substrato, produtos e inibidores.....	30
Figura 5.1	Concentração de biomassa das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	33
Figura 5.2	Concentração de células viáveis das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	34

Figura 5.3	Consumo de glicose das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	36
Figura 5.4	Produção de etanol pelas 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	37
Figura 5.5	Produção de ácido succínico, ácido acético e glicerol pelas 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	39
Figura 5.6	Produção de ácido acético pelas 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentação, em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	39
Figura 5.7	Concentração de biomassa formada pelas 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	41
Figura 5.8	Consumo de glicose pelas 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	43
Figura 5.9	Produção de etanol pelas 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	43
Figura 5.10	Produção de ácido acético pelas 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	45
Figura 5.11	Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por <i>S. cerevisiae</i> IA1238, durante fermentação em alta concentração de glicose (200 g L ⁻¹), em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	47
Figura 5.12	Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e glicerol por <i>S. cerevisiae</i> IA1238, durante fermentação em baixa concentração de glicose (50 g L ⁻¹), em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	47
Figura 5.13	Velocidade específica máxima de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> IA1238, em meio de glicose (200 g L ⁻¹) sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	48
Figura 5.14	Velocidade específica máxima de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> IA1238, em meio de glicose (50 g L ⁻¹) sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	48

Figura 5.15	Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e glicerol por <i>S. cerevisiae</i> IA1238, durante fermentação em baixa concentração de glicose, em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	49
Figura 5.16	Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de <i>S. cerevisiae</i> IA1238 em baixa concentração de glicose (50 g L ⁻¹), em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	50
Figura 5.17	Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> ZAP, durante fermentação em alta concentração de glicose, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	51
Figura 5.18	Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por <i>Z. mobilis</i> ZAP, durante fermentação em baixa concentração de glicose, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	51
Figura 5.19	Velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial da curva de crescimento, durante fermentação de glicose por <i>Z. mobilis</i> ZAP, em meio sem hidrolisado hemicelulósico, com alta concentração de glicose (150 g L ⁻¹).....	52
Figura 5.20	Velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial da curva de crescimento, durante fermentação de glicose por <i>Z. mobilis</i> ZAP, em meio sem hidrolisado hemicelulósico, com baixa concentração de glicose (50 g L ⁻¹).....	52
Figura 5.21	Densidade óptica e concentração de biomassa durante fermentação de glicose por <i>Z. mobilis</i> ZAP, em meio com hidrolisado hemicelulósico, com baixa concentração de glicose (50 g L ⁻¹).....	53
Figura 5.22:	Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de <i>Z. mobilis</i> ZAP em baixa concentração de glicose (50 g L ⁻¹), em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	53
Figura 5.23:	Concentração de biomassa formada pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238 e percentual de inibição do crescimento, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	54
Figura 5.24:	Concentração de células viáveis e a viabilidade de <i>S. cerevisiae</i> IA1238, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	55

Figura 5.25:	Consumo de glicose pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	56
Figura 5.26:	Produção de etanol pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	57
Figura 5.27:	Produção de glicerol pela linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238 após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	58
Figura 5.28:	Variação das concentrações dos inibidores, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	59
Figura 5.29:	Concentração de biomassa formada pela linhagem <i>Z. mobilis</i> ZAP e percentual de inibição do crescimento, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	60
Figura 5.30:	Consumo de glicose pela linhagem <i>Z. mobilis</i> ZAP, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	61
Figura 5.31:	Produção de etanol pela linhagem <i>Z. mobilis</i> ZAP, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	62
Figura 5.32:	Variação das concentrações dos inibidores, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Balanco de energia na producao de etanol, com diversas materias-primas. Fonte: MACEDO (2007).....	5
Tabela 4.1	Linhagens de <i>S. cerevisiae</i> investigadas neste trabalho.....	18
Tabela 4.2	Linhagens de <i>Z. mobilis</i> investigadas neste trabalho.....	19
Tabela 4.3	Composicao dos meios de cultura utilizados nas etapas de ativacao, conservacao e reativacao das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Z. mobilis</i> ...	20
Tabela 4.4	Composicao do meio de cultura utilizado na preparacao do inoculo nas linhagens de <i>S. cerevisiae</i> e <i>Z. mobilis</i>	21
Tabela 4.5	Composicao do meio de fermentacao (por litro de agua ou hidrolisado hemiceluloseico).....	21
Tabela 4.6	Composicao do hidrolisado obtido e utilizado nas fermentacoes.....	23
Tabela 4.7	Concentracoes dos inibidores utilizadas (isoladamente e em conjunto) nos experimentos.....	24
Tabela 5.1	Viabilidade celular das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentacao, em meios sem e com hidrolisado hemiceluloseico de bagaco de cana-de-acucar.....	35
Tabela 5.2	Produtividade e rendimento de biomassa para as 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentacao, em meios sem e com hidrolisado hemiceluloseico de bagaco de cana-de-acucar.....	36
Tabela 5.3	Produtividade e rendimento de etanol das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentacao, em meios sem e com hidrolisado hemiceluloseico.....	38
Tabela 5.4	Rendimento de co-produtos das 10 linhagens de <i>S. cerevisiae</i> , em 18 horas de fermentacao, em meios sem e com hidrolisado hemiceluloseico.....	40
Tabela 5.5	Produtividade e rendimento de biomassa para as 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentacao, em meio sem hidrolisado hemiceluloseico de bagaco de cana-de-acucar.....	42
Tabela 5.6	Produtividade e rendimento de etanol para as 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentacao, em meio sem hidrolisado hemiceluloseico de bagaco de cana-de-acucar.....	44
Tabela 5.7	Rendimento de acido acetico das 10 linhagens de <i>Z. mobilis</i> , em 18 horas de fermentacao, em meio sem hidrolisado hemiceluloseico.....	45

Tabela 5.8	Produtividade e rendimento de biomassa para a linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.....	56
Tabela 5.9	Produtividade e rendimento de etanol para a linhagem <i>S. cerevisiae</i> IA1238, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.....	57
Tabela 5.10	Produtividade e rendimento de biomassa para a linhagem <i>Z. mobilis</i> ZAP, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.....	61
Tabela 5.11	Produtividade e rendimento de etanol para a linhagens <i>Z. mobilis</i> ZAP, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.....	63

NOMENCLATURA

X	Concentração de biomassa (g L^{-1})
S	Concentração de substrato (g L^{-1})
P	Concentração de produto (g L^{-1})
CP	Concentração de co-produto (g L^{-1})
r_X	Velocidade de crescimento celular ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
r_S	Velocidade de consumo de substrato ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
r_P	Velocidade de formação de produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
r_{CP}	Velocidade de formação de co-produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
μ	Velocidade específica de crescimento (h^{-1})
q_S	Velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
q_P	Velocidade específica de formação de produto ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
q_{CP}	Velocidade específica de formação de co-produto ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
$Y_{X/S}$	Rendimento de biomassa em substrato (g g^{-1})
$Y_{P/S}$	Rendimento de produto em substrato (g g^{-1})
$Y_{CP/S}$	Rendimento de co-produto em substrato (g g^{-1})
Q_X	Produtividade volumétrica de biomassa ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Q_P	Produtividade volumétrica de produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Q_{CP}	Produtividade volumétrica de co-produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Subscritos

<i>F</i>	Final
<i>MÁX</i>	Máxima

Siglas

ANOVA	Analysis of variance
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Furfural	2-furaldeído
HMF	5-Hidroximetil- 2-furaldeído
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation
SHF	Separate Hydrolysis and Fermentation
IA	Instituto de Antibióticos
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco.
UFPEDA	Coleção de Culturas de Microorganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

1 INTRODUÇÃO

Para reduzir o consumo de combustíveis fósseis e a emissão de gases que provocam o efeito estufa, rumando para uma matriz energética mais sustentável, faz-se necessário a busca por fontes de energia alternativas e renováveis. Entre as várias possibilidades existentes, pode-se citar a utilização de etanol, um combustível produzido principalmente a partir de fontes renováveis, por meio da conversão de açúcares presentes em diversas culturas, como, por exemplo, cana-de-açúcar, beterraba e milho.

No Brasil, o etanol produzido é oriundo de processo fermentativo do caldo da cana-de-açúcar ou melaço, sendo denominado de etanol de primeira geração. Apesar de estar bem estabelecido, o aumento da eficiência deste processo permanece como um aprendizado constante, e novos desafios se apresentam para a utilização do bagaço como matéria-prima em processo de segunda geração (etanol celulósico). Em particular, ainda deve-se dedicar atenção à seleção e ao melhoramento dos microrganismos responsáveis pela fermentação, no que diz respeito à tolerância às condições de estresse industrial.

A fermentação alcoólica é um processo que pode ser realizado por leveduras e bactérias. A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais utilizado na produção de etanol de primeira geração, por ser bem adaptado às condições industriais e produzir etanol com alto rendimento. Este microrganismo pode fermentar algumas fontes de carbono como, por exemplo, glicose, frutose, maltose e sacarose. A principal desvantagem da utilização de *S. cerevisiae* para processos de segunda geração é a sua incapacidade de metabolizar as pentoses presentes na hemicelulose (WALKER, 1998). A bactéria Gram-negativa *Zymomonas mobilis* é uma alternativa considerada promissora para a produção de etanol a partir de glicose, no entanto, como *S. cerevisiae*, este microrganismo possui limitação para utilização em processo de segunda geração, pois metabolizam apenas glicose, frutose e sacarose (SWINGS, DE LEY, 1977; VIKARI, 1986).

A primeira etapa para a produção do etanol de segunda geração é o pré-tratamento, cuja função é remover barreiras estruturais e composicionais dos materiais lignocelulósicos, promovendo uma melhora na percentagem de hidrólise e aumento dos rendimentos de açúcares fermentescíveis a partir da celulose e hemicelulose (MOSIER et al., 2005). Porém, durante esse processo há a formação de compostos inibitórios, que podem tornar-se um entrave ao processo fermentativo. Na tentativa de evitar este obstáculo, faz-se necessário o desenvolvimento de processos para reduzir a produção desses compostos inibitórios, através

de pré-tratamento adequado da matéria-prima, e a seleção de linhagens de microrganismos tolerantes aos inibidores presentes nos hidrolisados.

A Coleção de Cultura de Microrganismo do Departamento de Antibióticos da UFPE (UFPEDA) possui um grande acervo de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, obtidas, em sua maioria, de destilarias da Região Nordeste do Brasil. A seleção de uma linhagem, com tolerância ao estresse industrial tradicional e a inibidores presentes em hidrolisados de biomassa de cana-de-açúcar, poderá ter aplicação nas destilarias de álcool já implantadas no país, onde hidrolisados sejam utilizados em misturas com melação, dentro da tecnologia atual de fermentação de hexoses, ou servir como plataforma para futuras modificações genéticas. Por outro lado, um grande número de linhagens de *Z. mobilis*, muitas isoladas e modificadas geneticamente por pesquisadores do Departamento, estão também conservadas nesta coleção. Embora este microrganismo etanologênico ainda não esteja vinculado à indústria, é, também, importante a investigação sobre a sua potencialidade para aplicação em processos de segunda geração.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*, pertencentes à Coleção UFPEDA, para aplicação na produção de etanol de segunda geração.

2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar a linhagem mais eficiente e robusta, entre linhagens de *S. cerevisiae* e entre linhagens de *Z. mobilis*, em meio a base de glicose, com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
- Determinar e comparar os parâmetros cinéticos das linhagens selecionadas, de *S. cerevisiae* e de *Z. mobilis*, em biorreator instrumentado.
- Investigar os efeitos individuais e sinérgico de compostos inibitórios, identificados no hidrolisado, sobre as linhagens selecionadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biocombustíveis

Renováveis, os biocombustíveis são fontes alternativas de energia que competem diretamente com os combustíveis derivados do petróleo, sendo considerados ambientalmente corretos, pois durante o desenvolvimento da planta há a utilização o dióxido de carbono produzido durante sua combustão, neutralizando emissões de CO₂ para a atmosfera (BRANCO; MURGEL, 2000).

Até os anos 70, o consumo dos combustíveis fósseis, considerados inesgotáveis para essa época, atingiu altos níveis, porém a sociedade desconhecia os impactos ambientais causados pelo uso desordenado. No entanto, no início dos anos 80, com o surgimento de alguns estudos, a sociedade ficou ciente das limitações quanto ao consumo de combustíveis fósseis e dos impactos ambientais derivado do seu uso, gerando, assim, uma tendência a redução do consumo e uma possível diminuição da contaminação ambiental (ROSEN, 2002; CABRERA et al., 2000).

A emissão de gases tóxicos, provenientes da reação de combustão, é considerada um dos principais responsáveis pelo aquecimento global e pela intensificação do efeito estufa (ROSEN, 2002). Harder et al. (2011) e Szwarc (2011) relatam a importância da utilização de biocombustíveis em substituição aos combustíveis fósseis, obtendo-se, assim, efeitos positivos na diminuição da emissão desses gases. A participação dos biocombustíveis na matriz energética global torna-se cada vez mais relevante, além da sua facilidade de obtenção, muitas vezes provenientes de conjunto de produtos e resíduos da agricultura, das florestas e de indústrias relacionadas, tendo como exemplos a madeira, o carvão de madeira, o álcool combustível e o biodiesel (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; BNDES/CGEE, 2008). No Brasil, atualmente, dois combustíveis, o etanol e o biodiesel, vêm sendo alvo de políticas para o setor energético, sendo que o etanol apresenta um melhor balanço energético, que significa uma alta relação entre a energia renovável produzida em comparação à energia fóssil utilizada na sua produção (URQUIAGA; ALVES; BOODEY, 2005).

O investimento em novos estudos para utilização da cana-de-açúcar para a produção do etanol deu-se após a crise do petróleo em 1973, iniciando-se, assim, na década de 1970, o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL). O PROÁLCOOL permitiu a implementação no Brasil de bioenergia em larga escala, através do investimento em tecnologia capaz de gerar

motores que se adequassem ao novo combustível. Esse programa caracterizou-se por desenvolver um combustível que colabora com a redução da poluição ambiental (ERNANDES; GARCIA-CRUZ, 2009). Apesar dos gargalos e do declínio do PROÁLCOOL no final da década de 80, o incentivo de sua produção, durante o auge do programa, geraram muitos estudos e avanços na área da produção do etanol, tanto no sentido de aumentar a quantidade como melhorar a qualidade do álcool produzido no país. Mesmo com o grande desenvolvimento científico alcançado na produção de etanol no Brasil, ainda existem possibilidades de melhoramentos no processo para garantir a competitividade em relação ao combustível de origem fóssil (GOLDENBERG, 2007; AMORIM et al., 2011).

O recente retorno aos aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas e os compromissos firmados com a questão ambiental, provenientes do Protocolo de Kyoto, fizeram renascer a atenção mundial às novas pesquisas para geração de fontes alternativas de energia, como o etanol, que passou a constar de forma definitiva nos mercados, graças aos novos veículos bicomustíveis (BASTOS, 2007; KIM et al., 2010). O etanol é hoje uma fonte de energia alternativa de uso corrente, podendo ser obtido mediante a fermentação de mostos açucarados e de hidrolisados de amido (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2007).

No Brasil, o etanol é produzido a partir de caldo de cana-de-açúcar, que, dentre as várias matérias-primas utilizadas para a sua produção, possui o maior balanço energético (MACEDO, 2007) (Tabela 3.1).

Tabela 3.1: Balanço de energia na produção de etanol, com diversas matérias-primas. Fonte: MACEDO (2007).

Matéria-prima	Energia renovável/Energia fóssil usada
Etanol de milho (USA)	1,3
Etanol de cana-de-açúcar (Brasil)	8,9
Etanol de beterraba	2,0
Etanol de sorgo sacarino (África)	4,0
Etanol de trigo (Europa)	2,0
Etanol de mandioca	1,0

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é um dos principais produtos agrícolas do Brasil, cultivada desde a época da colonização. É uma gramínea semiperene com parte aérea da planta composta pelos colmos, nos quais se concentra a sacarose, e pelas pontas e folhas, que

constituem a palha da cana. Absorvem o dióxido de carbono em moléculas de 4 carbonos, que ficam armazenadas em vacúolos para serem utilizadas durante o dia (ciclo fotossintético do tipo C4). Todos esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare. A cana-de-açúcar constitui um potencial reservatório de energia e a grande vantagem disso é que ela é completamente renovável (ANDREOLI, 2008)

O grande impasse na utilização da cana-de-açúcar para a produção de etanol seria a concorrência com os alimentos, porém esse argumento não se sustenta atualmente, pois 50% do caldo extraído da cana de açúcar é revertido para a produção de açúcar. Outro ponto que instabiliza esse argumento é que a produção de etanol no mundo, cerca de 50 bilhões de litros por ano, utiliza 15 milhões de hectares de área, ou seja, 1% da área em uso pela agricultura no mundo, equivalendo a 1,5 bilhões de hectares. No Brasil, 6 milhões de hectares são utilizados para a produção da cana-de-açúcar, sendo cerca de 90% do total na principal região produtora do País, a Centro-Sul, e 10% no Nordeste, produzindo 569 milhões de toneladas e obtendo uma produtividade de 72 (toneladas por hectare), dados da safra 2008/2009 (BASTOS, 2007; BNDES/CGEE, 2008; KIM et al., 2010; CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010; UNICA, 2011).

3.2 Etanol de Segunda Geração

Atualmente, o Brasil produz 25 bilhões de litros de etanol por ano a partir da cana-de-açúcar. O plantio dessa matéria-prima, realizado em terras aráveis de boa qualidade, deverá ser expandido devido à crescente demanda nacional e internacional de álcool (CONAB, 2012). Uma alternativa para evitar a expansão desmedida de áreas de cultivo, devido à necessidade de um aumento significativo na produção de etanol, é o desenvolvimento de processos de segunda geração, que permitam a utilização de biomassas residuais de composição lignocelulósica. Estas biomassas estão disponíveis nos resíduos de colheita, ou do processamento das principais culturas, como a cana-de-açúcar, milho e trigo. Dentre estas biomassas, os resíduos celulósicos provenientes da produção de etanol é uma das fontes mais promissoras de carboidratos para a produção de etanol de segunda geração (PEREIRA Jr.; COUTO; SANTA ANNA, 2008; BENEDETTI et al., 2009).

O Brasil, nos últimos anos, vem investindo em projeto de aproveitamento de resíduos provenientes da produção de álcool da cana-de-açúcar, na expectativa de que, futuramente, o álcool lignocelulósico possa ser produzido em escala comercial e a custos competitivos ao do

etanol de primeira geração, possibilitando, assim, um aumento substancial na produtividade (PEREIRA Jr. COUTO; SANTA ANNA, 2008; HARDER et al., 2011).

A CONAB (2012) estima para a safra de 2010/2011 uma produção de 625 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 168,8 milhões de toneladas de bagaço, sendo que, para cada tonelada de cana, obtêm-se em torno de 140 kg de bagaço seco, composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, na proporção aproximada de 40 a 50%, 20 a 30% e 25 a 30%, respectivamente, além de outros componentes em menores quantidades (APTA, 2011).

Os compostos presentes na parede celular das células vegetais são responsáveis pela sustentação e proteção da planta. Essa matriz é altamente ordenada e dinâmica, podendo tornar-se mais rígida ou mais frouxa conforme as necessidades ontogênicas e comportamentais da célula ou da planta. A estrutura da parede celular é formada por fibras de celulose que são cobertas pela hemicelulose, formando, assim, o chamado domínio celulose-hemicelulose, sendo este unido por outro componente da parede celular, a lignina (Figura 3.1) (BUCKERIDGE, 2010).

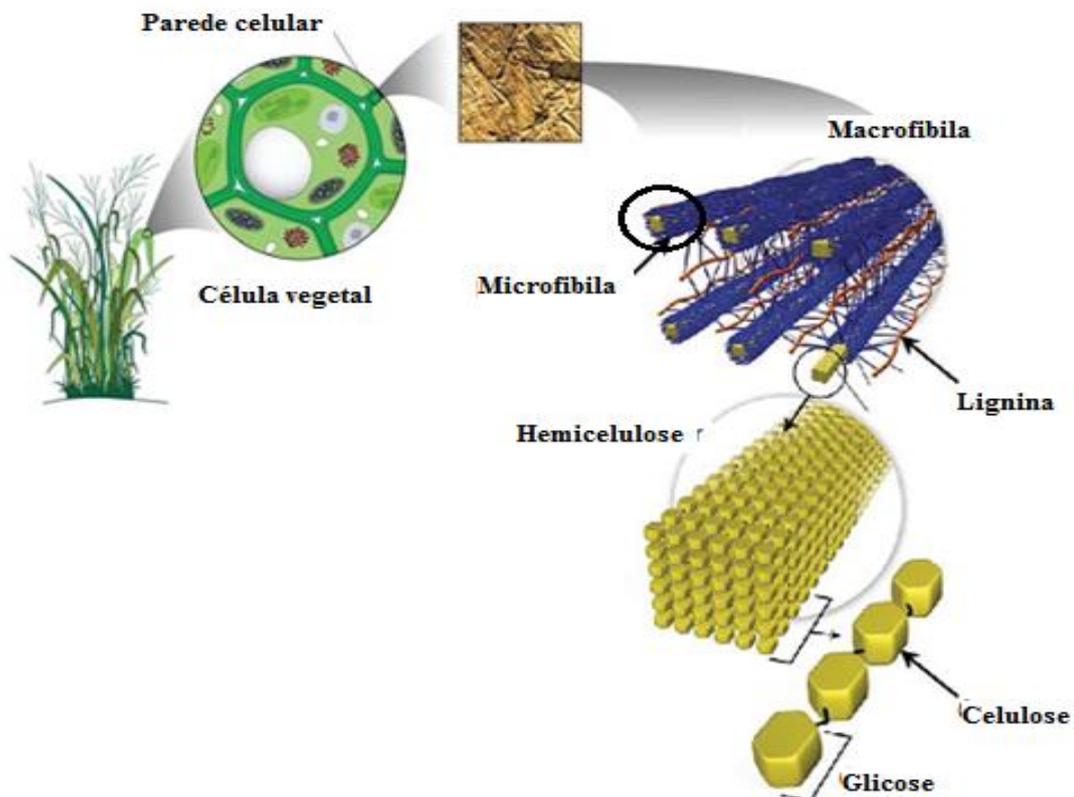


Figura 3.1: Estrutura recalcitrante dos materiais lignocelulósicos, os quais são constituídos de celulose, hemicelulose e lignina. Fonte: Adaptado de CANILHA et al. (2010).

Toda essa barreira dificulta a disponibilidade da glicose presente na celulose da parede celular, sendo necessárias quatro etapas para produção de etanol lignocelulósico: pré-tratamento da biomassa, hidrólise enzimática da celulose; fermentação dos açúcares liberados e recuperação do etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

O pré-tratamento pode ser físico, químico, biológico ou a combinação desses (SUN; CHENG, 2002). As técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, consideradas mais promissoras no processo de obtenção de etanol a partir da biomassa, são a de explosão a vapor, a hidrotérmica e de utilização de ácido diluído. No entanto, a escolha das condições de pré-tratamento dependerá de uma avaliação global do processo, rendimento e manutenção da integridade dos insumos de interesse (GALBE; ZACHI, 2002; MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008).

As próximas etapas para a obtenção de etanol, após o pré-tratamento, são a hidrólise enzimática e a fermentação, que podem ocorrer em separado (SHF - Separate Hydrolysis and Fermentation) ou simultaneamente (SSF - Simultaneous Saccharification and Fermentation) (Figura 3.2).

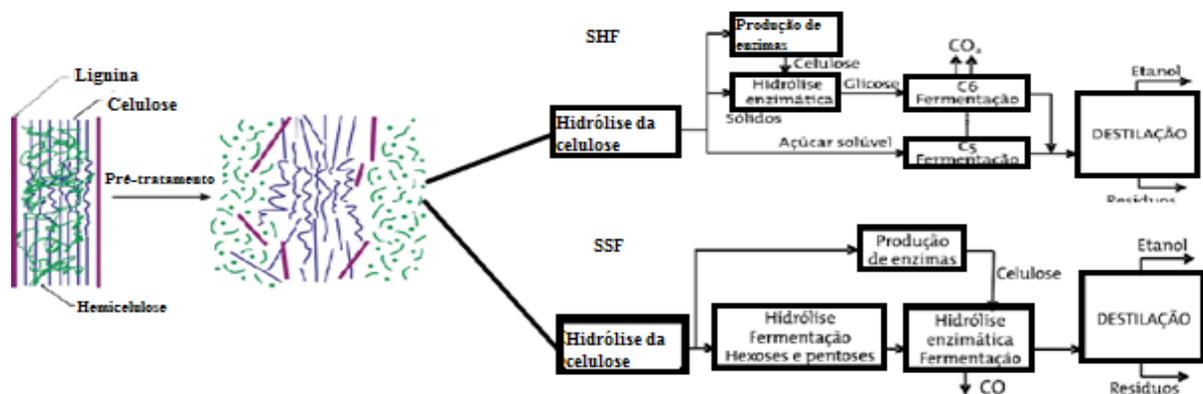


Figura 3.2: Alterações estruturais na microfibrila celulósica determinadas pelo pré-tratamento, seguidas pela hidrólise enzimática e fermentação. Fonte: Adaptado de CANILHA et al. (2010).

A hidrólise enzimática consiste no uso de enzimas capazes de converter o polímero de celulose, presente na fração celulósica, em unidades fermentáveis de glicose. Esse processo é realizado por celulasas (endoglucanase e exoglucanase), que quebram a celulose em celobiose, que, por fim, são convertidas em duas moléculas de glicose pela β -glucosidase. Esse processo apresenta especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas, ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

No processo SHF, o xarope obtido, após a hidrólise da celulose, é usado para a fermentação etanólica, utilizando-se culturas de microrganismos que convertem hexoses em etanol (RABELO et al., 2011). No processo SSF, a hidrólise enzimática e a fermentação, ocorrem em uma mesma etapa, para se evitar, assim, a inibição da celulase pela glicose resultante da hidrólise (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

3.2.1 Inibidores da fermentação

Uma consequência da utilização de altas temperaturas, empregadas em muitos pré-tratamentos, é a formação de inibidores originados dos açúcares, principalmente da hemicelulose: furfural, formado a partir da degradação das pentoses (xilose e arabinose); 5-hidroximetilfurfural (HMF), formado como consequência da degradação das hexoses (glicose, manose e galactose); ácido fórmico, proveniente da degradação do HMF; compostos fenólicos, gerados a partir da degradação da lignina; e ácido acético, formado pela desacetilação da hemicelulose. Esses compostos, quando presentes entre os componentes do meio de cultura, podem danificar a parede dos microrganismos, reduzir a absorção de aminoácidos aromáticos do meio, inibir enzimas (álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase), bem como prolongar a fase “lag” de crescimento (MUSSATO; SANTOS; ROBERTO, 2004; ALMEIDA et al., 2007; CHENG et al., 2008; ALPER; STEPHANOPOULOS, 2009; YANG et al., 2010).

Os compostos produzidos no pré-tratamento da biomassa podem ser divididos nas classes dos ácidos carboxílicos, furanos e dos fenóis (MCMILLAN, 1994). Os inibidores formados nesse processo, que apresentam baixo peso molecular, são capazes de penetrar na membrana celular, enquanto que os de elevado peso molecular não penetram na célula, porém influenciam na atividade de moléculas transportadoras na membrana da célula. Os mecanismos de ácidos fracos, furanos e fenóis na inibição do crescimento e produção de etanol foram avaliados por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

Linhagens de *S. cerevisiae* reagem à inibição do furfural, em condições de anaerobiose, reduzindo este composto a álcool fufurílico, sendo essa reação catalisada pela álcool desidrogenase, enzima dependente de NADH. A produção desse co-fator nessa reação faz com que haja uma menor produção de glicerol, já que a produção desse composto também libera um NADH que será utilizado na via metabólica desse microrganismo (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000 ; PALMQVIST et al., 1999).

Estudos tecnológicos, na área de fermentação, buscam o desenvolvimento de microrganismos robustos, além dos já conhecidos atualmente, que consigam produzir etanol a partir dessa biomassa residual com maior eficiência, sendo também resistentes aos inibidores industriais mais relevantes (ALMEIDA et al., 2007; ALMEIDA et al., 2009 PURWADI; BRANDBERG; TAHERZADEH, 2007).

Na pesquisa de desenvolvimento de novos microrganismos para utilização em processo de segunda geração, são utilizadas técnicas de mutação e seleção, engenharia metabólica e engenharia evolutiva para introdução de vias de assimilação de substratos, como a xilose e a arabinose; vias eficientes de produção de etanol e mecanismos de resistência a inibidores originados do pré-tratamento do bagaço (ALMEIDA et al., 2009).

S. cerevisiae e *Z. mobilis* são microrganismos etanologênicos e, portanto, candidatos naturais para desenvolvimento e utilização na produção de etanol. (DELGENES; MOLETTA NAVARRO, 1996; LAU et al., 2010).

3.3 Fermentação Alcoólica

Os microrganismos utilizados na fermentação são responsáveis pelas características do processo de obtenção do etanol. Nesse processo, há algumas características particulares importantes: alta conversão por unidade de substrato assimilado, alta capacidade de fermentação, termotolerância, estabilidade e tolerância a altas concentrações de etanol e de substrato e a baixos valores de pH. Algumas leveduras e bactérias são capazes de produzir etanol, entre as quais se destacam as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* e *Kluyveromyces* e as bactérias *Zymomonas mobilis*, *Clostridium sporogenes* e *Thermoanaerobacter athanolicus* (JONES; PAMMENT; GREENFIELD, 1981; KOSARIC; VARDAR-SUKAN, 2001).

Dentre as diversas opções citadas, *S. cerevisiae* é o microrganismo utilizado em nível industrial, pelas elevadas produtividade, eficiência de fermentação e resistência ao estresse industrial. Nas últimas três décadas, pesquisadores têm discutido a possibilidade da substituição da clássica levedura *S. cerevisiae* pela bactéria *Z. mobilis*, por apresentar um maior direcionamento de carbono para a produção de etanol, podendo fermentar glicose duas vezes mais rápido do que a levedura (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

3.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

S. cerevisiae é um fungo predominantemente unicelular de rápido crescimento e de fácil manipulação genética. Suas células podem ser esféricas, ovais ou elípticas, podendo ainda apresentar-se bastante alargadas. Suas dimensões variam consideravelmente em função da linhagem, nutrição, tempo de brotamento, entre outros fatores. Reproduzem-se sexuada e assexuadamente por brotamento, fissão ou cissiparidade, ou combinação desses dois mecanismos (BARNETT, 1992; TORTORA; FUNKE; CASE, 2002).

S. cerevisiae é capaz de crescer até uma temperatura máxima que se encontra na faixa de 35-43°C (WALKER, 1998). No que diz respeito ao pH, o melhor valor encontra-se entre 4,5-6,5. Quanto à concentração de etanol, as células simplesmente se adaptam às mudanças de concentração deste composto no sistema, sendo também instigadas a desenvolver uma termotolerância gradativa ao aumento da temperatura (PLESSET; PALM; McLAUGHLIN, 1982). Na indústria, as células de leveduras são expostas a estresses diversos, tais como alta temperatura, alto teor de etanol, baixo pH e compostos inibidores presente no caldo de cana ou melaço, como os ácidos orgânicos e os compostos fenólicos (TOSETTO, 2003). Na produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, a formação de substâncias inibidoras, durante a etapa de pré-tratamento da biomassa, é uma fonte adicional de estresse (LIN; TANAKA, 2006).

Os açúcares assimilados por este microrganismo incluem a glicose, frutose, sacarose, manose, galactose e maltose. O processo catabólico da glicose em *S. cerevisiae* ocorre pela via Embden-Meyerhof, que tem a função de decompor a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, situadas na parede celular e no interior da célula (Figura 3.3).

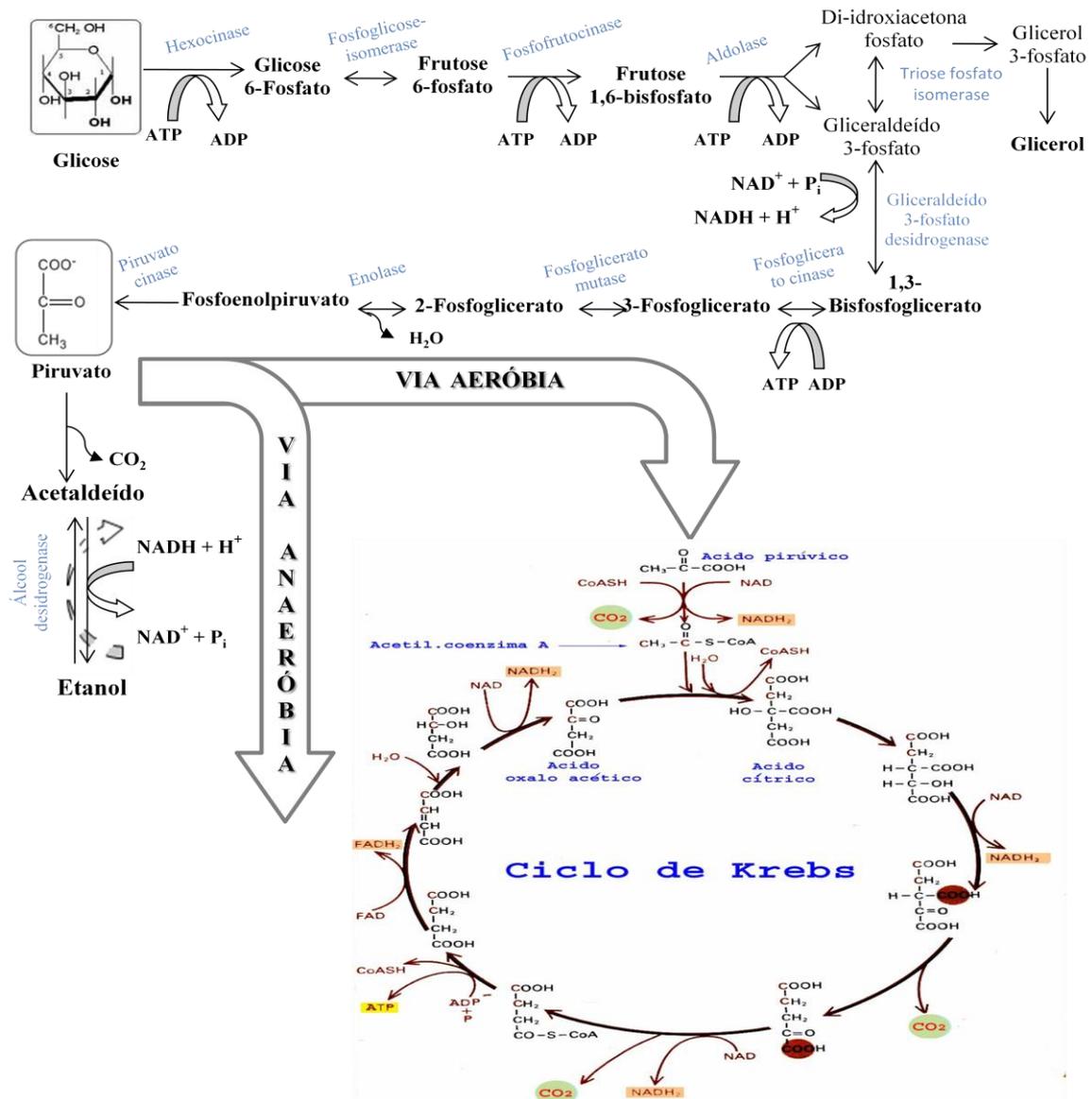


Figura 3.3: Via metabólica de formação de produtos da fermentação de carboidratos por *S. cerevisiae* (via Embden-Meyerhof). Fonte: Modificado de WALKER (1998).

Na presença de oxigênio, o ácido pirúvico é destinado, principalmente, ao Ciclo de Krebs, onde é oxidado a dióxido de carbono e água. Porém, na ausência de oxigênio, *S. cerevisiae* destina a fonte de carbono para produzir etanol e dióxido de carbono, sendo estes compostos equivalentes a 95% dos produtos formados a partir da degradação dos açúcares. Os outros 5% são desviados para a formação de glicerol, ácidos orgânicos (como ácido succínico, acético e pirúvico), alcoóis superiores e acetaldeído, entre outros (WALKER, 1998; LIMA et al., 2001; TOSSETO, 2002).

As linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas em processos industriais possuem, como principais características, a elevada produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância

ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares. A nova preocupação tem sido o desenvolvimento de linhagens capazes de assimilar, além das hexoses (glicose, manose e galactose), as pentoses (xilose e arabinose) presentes em hidrolisados lignocelulósicos, na presença de compostos inibitórios, como furfural, HMF, ácido acético, ácido fórmico e derivados fenólicos (ALMEIDA et al., 2007; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007a,b).

O furanos e fenóis são compostos aromáticos que podem inibir o crescimento e reduzir a produtividade de etanol, porém não alteram os rendimentos de etanol em linhagens de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). O desempenho das linhagens, em presença destes compostos, depende da composição do hidrolisado, uma vez que as concentrações dos inibidores irão variar de acordo com a matéria-prima e condições de pré-tratamento utilizados (ALMEIDA et al, 2007; GALBE; ZACCHI, 2007; HEER; SAUER, 2008).

Modig, Liden e Taherzadeh (2002) avaliaram a tolerância de linhagem de *S. cerevisiae* a inibidores, relatando que a inibição por furfural e por HFM, na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, acarretou em uma disfunção no crescimento de 90%, no caso do furfural, e 50% pelo HMF. Ainda neste trabalho, foi discutido que, durante o crescimento aeróbio e anaeróbio, a capacidade de *S. cerevisiae* em tolerar furfural parece estar diretamente acoplada à capacidade de converter furfural para compostos menos inibitórios como o álcool furfurílico. Misturas artificiais de inibidores também foram testadas para analisar o poder inibitório de cada composto (MARTIN; JONSSON, 2003). Ding et al. (2011) investigaram os efeitos, individual e sinérgico, do furfural, fenol e do ácido acético em *S. cerevisiae*, nas concentrações $1,3 \text{ g L}^{-1}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e $5,3 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Observou-se, nesse trabalho, que os três inibidores exibem efeito sinérgico significativo sobre o crescimento, fermentação e alguns metabólitos da levedura. Na análise individual, o ácido acético apresentou efeitos mais graves sobre a levedura.

Almeida et al. (2009) realizou uma seleção entre 12 linhagens de *S. cerevisiae*, em diferentes hidrolisados (pinheiro “Scrupe”, palha do trigo e da cevada), observando uma inibição de crescimentos em todos os casos, sendo o hidrolisado do pinheiro o que apresentou as maiores concentrações dos inibidores (ácido acético $6,2 \text{ g L}^{-1}$; HMF $3,6 \text{ g L}^{-1}$; furfural $2,1 \text{ g L}^{-1}$) e a maior inibição no crescimento das linhagens.

Tofghi (2010) testou a tolerância de *S. cerevisiae* Lalvin EC1118™, uma linhagem industrial, em meios com altas concentrações de furfural, e demonstrou que, na menor

concentração utilizada (4,0 g L⁻¹), o microrganismo já apresentou uma redução significativa no crescimento e na produção de etanol.

3.3.2 *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis é uma bactéria Gram-negativa, que apresenta-se em forma de bastonete com terminações arredondas, ocasionalmente elipsoidais, formando pares ou não, com comprimento de 2 a 6 µm e diâmetro de 1 a 1,4 µm (SWINGS; DE LEY, 1977). Não são esporulantes e se reproduzem, na maioria dos casos, por divisão binária simples. A posição taxonômica de *Zymomonas* não foi totalmente estabelecida, devido a incertezas sobre o metabolismo aeróbio ou anaeróbio destas bactérias. Porém, Swing e De Ley (1977), ao estudarem características fenotípicas de 38 linhagens de *Z. mobilis*, observou que não havia diferença significativa entre elas, sendo estas geneticamente estáveis (DOELLE et al, 1993; ALTERTHUM, 2001).

Segundo Swings e De Ley (1977), a faixa de pH que as linhagens de *Z. mobilis* são capazes de crescer é entre 3,85 a 7,55. Gunasekarn, Karunakaran e Kasthuriban (1986), realizaram análises em diferentes linhagens de *Z. mobilis*, provenientes de coleções de culturas mundiais, e confirmaram que rendimento da fermentação foi máxima em pH 7,0, mas baixa em pH 4,0. A melhor temperatura para *Z. mobilis* encontra-se entre 25°C e 35°C; em temperaturas mais altas, acima de 38°, o crescimento do microrganismo diminui cerca de 26%, e, em temperaturas próximas de 40°C, o crescimento é mínimo, dificultando ou inibindo a produção de etanol.

Esta bactéria tolera concentrações de etanol na faixa de 7,7 a 10% e de glicose entre 15 a 25% (v/v) (GONÇALVES DE LIMA et al., 1972; SWINGS; DE LEY, 1977; MICHEL; STARKA, 1986). Calazans, Rios e Falcão de Moraes (1990) estudaram a produção de etanol de uma linhagem de *Z. mobilis* (ZAP), utilizando diferentes concentrações de glicose, relatando o aumento da duração da fase “lag” e a diminuição do rendimento em etanol com a utilização de concentrações acima de 15,6% de glicose.

Em aerobiose, esse microrganismo reduz seu crescimento entre 25 a 40%, além de produzirem quantidade consideráveis de acetaldeído e ácido acético. Em sistemas onde há a adição de nitrogênio para efetivar a anaerobiose, ocorre uma redução das taxas de crescimento e rendimento. Quando há a adição direta de CO₂, há uma inibição das taxas metabólicas. (BRINGER; FINN; SAHM, 1984; VORE; TALBURT, 1993).

lactato e acetaldeído. A metabolização da sacarose produz, como principais subprodutos, a levana (CALAZANS et al., 1989; KANG et al., 2006) e o sorbitol (SHENE; BRAVO, 2001; CAZETTA et al., 2005; BARROS; CELLIGOI, 2006; VIGNOLI et al., 2006), reduzindo assim, significativamente, a produção de etanol. Outros subprodutos são frutooligossacarídeos (BEKERS et al., 1993), glutamato, ácido acético, acetaldeído (COTON et al., 2005) e ácido glicônico (SILVEIRA et al., 1999). Linhagens recombinantes foram desenvolvidas para ampliar o alcance de degradação de substratos, permitindo assim a fermentação de pentoses, como a xilose e arabinose (ZHANG et al., 1995; DEANDA et al., 1996; MOHAGHEGHI et al., 2002; SEO et al., 2005; YANG et al., 2009).

No Brasil, a pesquisa com *Z. mobilis* foi iniciada pelo cientista Gonçalves de Lima em 1952, quando trouxe do México a linhagem Ag11 e a depositou na Coleção UFPEDA. Posteriormente, em 1970, o pesquisador isolou linhagens de amostras de caldo de cana-de-açúcar ligeiramente degradado, nomeando-as de CP1, CP2, CP3 e CP4. Essas culturas foram consideradas distintas até 1982, quando Dally e colaboradores analisaram o perfil plasmidial destas linhagens e observaram a analogia entre elas. Por isso, todas as linhagens são hoje igualmente denominadas por CP4. Atualmente, estão catalogadas na Coleção UFPEDA 24 linhagens de *Z. mobilis*, sendo 19 destas consideradas distintas, por estudos do perfil plasmidial e análises cromossômica. (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993).

A linhagem CP4 (UFPEDA -202) possui muitas variantes, dentre elas a ZM4 (ATCC 31821), cuja diferença é de um plasmídio, em relação à linhagem de origem. A ZM4 foi a primeira linhagem desta espécie a ter seu genoma sequenciado (ROGERS et al., 1982; JOACHIMSTHAL et al., 2000; LAWFORD et al., 2001; SEO et al., 2005).

Z. mobilis é considerada uma alternativa para a produção de etanol em larga escala, com algumas vantagens em relação a *S. cerevisiae*, que inclui um melhor rendimento na conversão de açúcares a etanol, devido à utilização da via Entner-Doudoroff (BEAVEN et al., 1989). Segundo Ernandes e Garcia-Cruz (2009), vários países realizam estudos com o intuito de substituir a utilização de leveduras por bactérias para reduzir o tempo de fermentação alcoólica. Porém, *Z. mobilis* possui entraves quanto ao substrato utilizado, pois esses microrganismos, em presença de sacarose, sintetizam outros produtos secundários como levana e sorbitol, diminuindo, assim, o rendimento fermentativo. Programas de melhoramento vêm sendo desenvolvidos para a obtenção de linhagens mais tolerantes ao etanol e capazes de fermentar carboidratos lignocelulósicos (JOACHIMSTHAL et al., 1998).

A viabilidade de utilização de *Z. mobilis* para a produção de etanol a partir de fontes ricas em material lignocelulósicos, como resíduos agrícolas, vem sendo muito pesquisada e

relatada (ROGERS; JOACHIMSTHAL; HAGGETT, 1997; RUANGLEK; MANEEWATTHANA; TRIPETCHKUL, 2006; MOHAGHEGHI; SCHELL, 2009; ROGERS et al., 2007). O problema em utilizar este tipo de substrato encontra-se no fato da toxicidade natural dos hidrolisados de lignocelulose resultar em altos custos de processo de desintoxicação do meio reacional (ADEN; FOUST, 2009).

Gutierrez-Padilla e Karim (2005) investigaram o furfural, em concentrações baixas e elevadas, como inibidor do crescimento e produção de etanol em linhagem recombinante de *Z. mobilis* CP4 (pZB5), tendo como resultado uma diminuição de 30 e 60% (w/v) na produção de biomassa e de 19 e 76% (v/v) na produção de etanol, respectivamente. Yang et al. (2010) avaliaram a ação de inibidores (acetato, vanilina, furfural e HMF) em *Z. mobilis* ZM4. Os resultados mostraram que todos os inibidores testados têm efeito negativo na linhagem, sendo a vanilina o maior efeito inibitório, seguido do furfural e HMF.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram utilizadas linhagens de leveduras industriais da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e linhagens de bactérias da espécie *Zymomonas mobilis*, pertencentes à Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco - UFPEDA (Tabelas 4.1-4.2).

Todas as linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas foram isoladas de destilarias da região Nordeste do Brasil, sendo estas registradas na coleção da UFPEDA pelo nome da destilaria de onde foram isoladas. A origem das linhagens de *Z. mobilis* encontram-se descritas na tabela 4.2.

Tabela 4.1: Linhagens de *S. cerevisiae* investigadas neste trabalho.

Nº UFPEDA	Nome Registrado
1238	IA
1255	IA
1325	MONTE ALEGRE
1326	AGRISA (R)
1327	FERMENTO INEXPORT (R)
1329	OTA-PEMEL
1331	FERMENTO INEXPORT (S)
1333	AGRISA (S)
1337	JP-1
-	MARITUBA

Tabela 4.2: Linhagens de *Z. mobilis* investigadas neste trabalho.

N° UFPEDA	Nome Registrado	Origem
202	CP4	Caldo de cana fermentado (Recife/PE)
203	Z1-80	Caldo de cana e melação da Usina Massauassu (Escada/PE)
205	ZAP	Água residual açucarada (Refinaria de açúcar/PE)
238	ZAG4	Recombinante (AG11+ZAP)
241	ZAG12	Recombinante (AG11+ZAP)
354	Z1-86 B	Caldo de cana e melação da Usina Maravilhas (Goiana/PE)
356	Z1-88	Caldo de cana e melação da Usina Laranjeira (Vicência/PE)
362	Z1-97	Caldo de cana da Destilaria PEMEL (Marataca/PE)
388	ZAG6	Recombinante (AG11+ZAP)
633	ZM4	ATCC 31821

4.2 Meios de Cultura

4.2.1 Meio de conservação

Os microrganismos cedidos pela Coleção, liofilizados, foram reativados utilizando-se os meios descritos na Tabela 4.3, em estufa microbiológica a 30° C, por 24-48 h. Após a incubação, as culturas de *Z. mobilis* permaneceram em meio líquido e as de *S. cerevisiae* foram repicadas para tubos com meio sólido inclinado para a conservação (Tabela 4.3). O pH inicial de ambos os meios foi 7,0. As linhagens foram conservadas em geladeira a 4° C, sendo repicadas a cada três meses para o meio de conservação (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Composição dos meios de cultura utilizados nas etapas de ativação, conservação e reativação das linhagens de *S. cerevisiae* e de *Z. mobilis*.

Etapa	Microrganismo	Componente	Concentração (g L⁻¹)
Ativação	<i>S. cerevisiae</i>	Glicose	20,0
		Extrato de Levedura	5,00
		Peptona	3,00
	<i>Z. mobilis</i>	Glicose	20,0
		Extrato de Levedura	5,00
Conservação	<i>S. cerevisiae</i>	Glicose	20,0
		Extrato de Levedura	5,00
		Peptona	3,00
		Agar	12,0
	<i>Z. mobilis</i>	Glicose	20,0
		Extrato de Levedura	5,00
Reativação	<i>S. cerevisiae</i>	Glicose	20,0
		Extrato de Levedura	5,00
	<i>Z. mobilis</i>	Peptona	3,00

4.2.2 Meio de preparação de inóculo

Os microrganismos conservados foram reativados no meio descrito na Tabela 4.3. A composição dos meios de inóculo (Tabela 4.4), utilizados para todos os testes realizados, foi formulada a partir da composição elementar média, em base seca, de cada microrganismo (STANBURY et al., 1995). Após o crescimento, as culturas foram transferidas para frascos Erlenmeyer contendo o meio da preparação de inóculo (Tabela 4.4). O pH inicial deste meio foi 6,0.

Tabela 4.4: Composição do meio de cultura utilizado na preparação do inóculo nas linhagens de *S. cerevisiae* e de *Z. mobilis*.

Componente	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	100
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,6
KH ₂ PO ₄	1,2
Extrato de levedura	6,6
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,3

4.2.3 Meio de fermentação

O meio de fermentação, utilizado para a caracterização inicial das linhagens e para a caracterização cinética das duas linhagens selecionadas, está descrito na Tabela 4.5.

A composição dos meios de fermentação (Tabela 4.5), utilizados na seleção das linhagens e na caracterização cinética das duas linhagens selecionadas, foi formulada a partir da composição elementar, em base seca, de cada microrganismo (STANBURY et al., 1995), de forma que a glicose fosse o substrato limitante. Utilizaram-se diferentes concentrações de glicose, sendo os demais compostos proporcionalmente reduzidos, e, para a investigação do efeito dos inibidores, os componentes foram dissolvidos em hidrolisado hemicelulósico. O valor do pH inicial para todos os meios de fermentação foi 5,0.

Tabela 4.5: Composição do meio de fermentação (por litro de água ou hidrolisado hemicelulósico).

Componente	Concentração (g)
Glicose	150/ 200* ou 50**
Mg ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,81
KH ₂ PO ₄	2,46
Extrato de Levedura	18,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	18,0

* Meio sem inibidores: *Z. mobilis* (150 g L⁻¹); *S. cerevisiae* (200 g L⁻¹).

** Meio contendo hidrolisado: 50 g L⁻¹ para ambas os microrganismos.

4.2.4 Hidrolisado hemicelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi originado do resíduo da moagem e extração do caldo da cana-de-açúcar da Usina Central Olho D'água, localizada no município de Camutanga no Estado de Pernambuco. O bagaço foi tratado hidrotermicamente, à temperatura de 195 °C, por 16 minutos, em reator descontínuo com capacidade de 20 L (REGMED AU/E-20), com sistema de mistura por rotação completa (Figura 4.1). Foram utilizados 500 g de bagaço (massa seca) e 10 litros de água. Após o tratamento, duas frações foram formadas: uma sólida (celulignina) e uma líquida (hidrolisado hemicelulósico) (Figura 4.2). O hidrolisado foi separado dos resíduos sólidos, com auxílio de filtro de pano, e armazenado em garrafas em câmara fria até a sua utilização. A composição do hidrolisado hemicelulósico encontra-se descrita na Tabela 4.6.



Figura 4.1: Reator (REGMED AU/E-20) utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

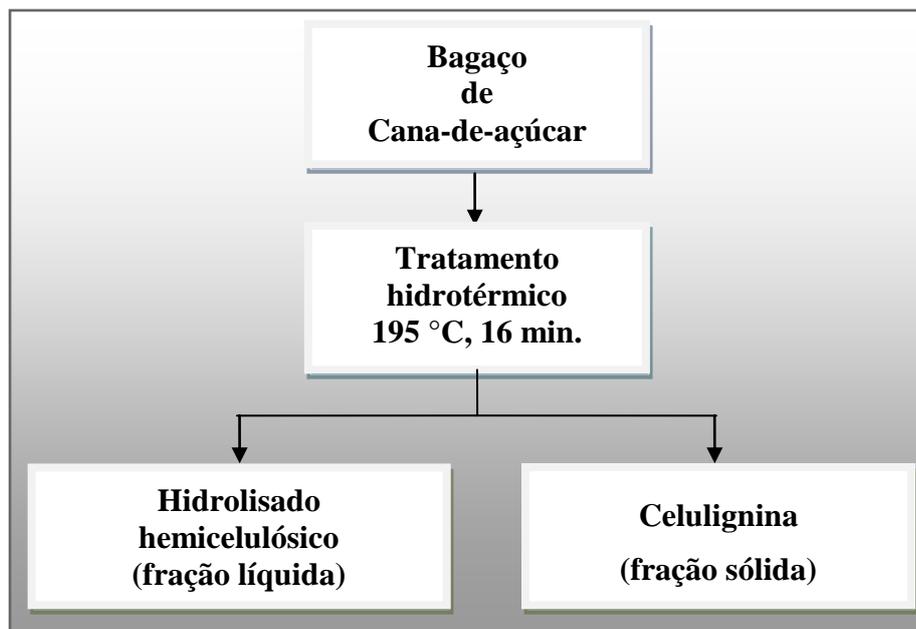


Figura 4.2: Fluxograma do tratamento hidrotérmico utilizado para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico.

Tabela 4.6: Concentração de açúcares e inibidores identificados por HPLC no hidrolisado hemicelulósico obtido e utilizado nas fermentações.

Composto	Concentração (g L ⁻¹)
Arabinose	0,61
Celobiose	0,93
Glicose	0,35
Xilose	8,69
Ácido Fórmico	0,59
Ácido Acético	3,22
Furfural	0,67
HMF	0,64
Fenóis	0,32

Para a avaliação dos efeitos individuais e sinérgico dos inibidores presentes no hidrolisado (ácido fórmico, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos), foram realizados experimentos no meio de fermentação (Tabela 4.5), adicionando-

se apenas um dos inibidores ou todos os inibidores. O composto fenólico utilizado para esse experimento foi o ácido gálico. As concentrações utilizadas, descritas na Tabela 4.7, foram baseadas nos valores encontrados no hidrolisado hemicelulósico.

Tabela 4.7: Concentrações dos inibidores utilizadas (isoladamente e em conjunto) nos experimentos.

Inibidores	Concentração (g L ⁻¹)
Ácido Fórmico	0,6
Ácido Acético	3,2
Furfural	0,7
HMF	0,6
Ácido Gálico	0,3

4.3 Procedimento Experimental

4.3.1 Caracterização inicial e seleção de linhagens

A caracterização inicial das leveduras e bactérias ocorreu através de fermentações em tubos de 50 mL (Falcon). Os experimentos foram realizados em duplicatas, em meios à base de glicose (Tabela 4.5).

Cada linhagem de *S. cerevisiae* foi repicada, com uma alça de platina, do meio de conservação para um tubo de 15 mL (Falcon) contendo 5 mL do meio de reativação (Tabela 4.3). O repique das linhagens de *Z. mobilis* foi realizado pela transferência, com pipeta automática, de 1 mL do meio de conservação para um tubo de 15 mL (Falcon) contendo 4 mL de meio de reativação. Todos os tubos, contendo ambas as linhagens, foram mantidas a 30°C em estufa microbiológica, durante 24 horas.

Após o crescimento, todo o volume do tubo, contendo o microrganismo crescido, foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 45 mL de meio da preparação de inóculo (Tabela 4.4). Cada frasco foi posto em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, C25KC – Figura 4.3), por 18 horas, a 35°C, com agitação de 250 rpm, para a levedura, e de 150 rpm para a bactéria.



Figura 4.3: Mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific, C25KC), contendo frascos Erlenmeyer de 500 mL com inóculos.

Depois do inóculo preparado, um volume de 4 mL foi transferido para tubos de 50 mL (Figura 4.4), contendo 36 mL do meio de fermentação (Tabela 4.5). As fermentações ocorreram a 35°C, pH inicial 5, por 18 horas, em meio de fermentação, com e sem hidrolisado, descrito na Tabela 4.5. Foram retiradas amostras no início e após 18 horas de fermentação, para análises de concentração celular, concentração de substrato e concentração de produto e co-produtos. O pH final de cada tubo também foi aferido.

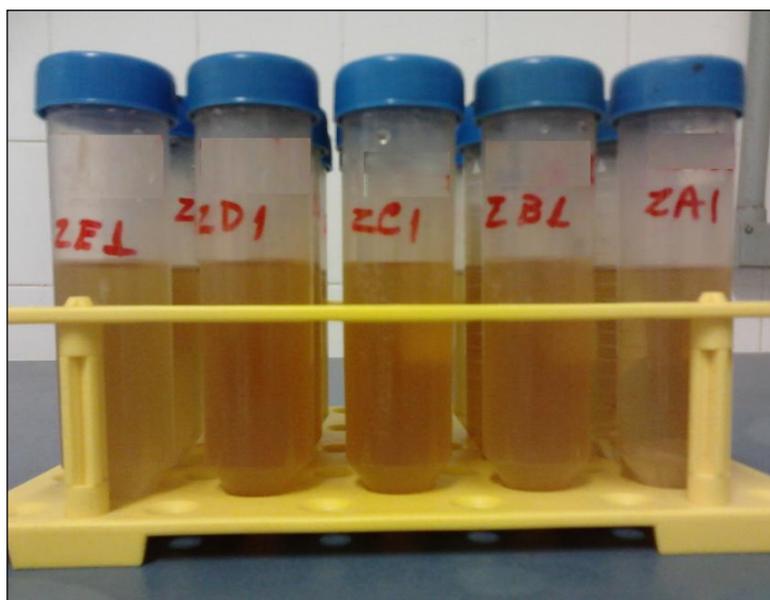


Figura 4.4: Tubos de 50 mL (Falcon) utilizados na seleção de linhagens.

4.3.2 Caracterização cinética das linhagens selecionadas

As linhagens de *S. cerevisiae* e de *Z. mobilis*, que demonstraram, estatisticamente, melhores características para a produção industrial de etanol, foram selecionadas para comparação, através de uma caracterização cinética mais detalhada, em biorreator instrumentado, em meio de fermentação (Tabela 4.5), sem e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana-de-açúcar.

O inóculo obtido para a caracterização cinética das linhagens selecionadas seguiu o mesmo procedimento da caracterização inicial, sendo obtido a partir da repicagem do microrganismo para quatro tubos de ensaio contendo meio de reativação (Tabela 4.3), que foi mantido a 30°C em estufa, durante 24 horas. Em seguida, toda a biomassa crescida nos tubos foi transferida para frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 45 mL de meio de preparação do inóculo (Tabela 4.4). O crescimento do inóculo foi realizado em mesa agitadora a 35°C, por 18 horas, a 250 rpm para *S. cerevisiae* e 150 rpm para *Z. mobilis*. O volume total de 200 mL do inóculo foi então transferido ao biorreator, o qual continha 1800 mL do meio de fermentação (Tabela 4.5).

Foi utilizado um biorreator de bancada instrumentado, com capacidade para 2 litros (New Brunswick Scientific, Bioflo 110 – Figura 4.5). As variáveis controladas foram pH 5,0, temperatura de 35°C e agitação de 500 rpm. O controle de pH foi realizado por sistema automático, com a adição de solução de NaOH 3 M ou H₂SO₄ 3 M. Nitrogênio foi adicionado ao reator para remoção de oxigênio, e a anaerobiose foi verificada por meio de eletrodo detector de oxigênio dissolvido.

Durante todo o processo, foram retiradas amostras para análises de concentração celular, concentração de substrato e concentração de produto e co-produtos

4.3.3 Caracterização do efeito de inibidores

Foram realizados experimentos adicionais para se investigar os efeitos individuais e interativo de cinco inibidores presentes no hidrolisado (ácido fórmico, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e ácido gálico) sobre as linhagens de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* selecionadas. Os efeitos foram investigados individualmente, ou seja, adicionando-se apenas um inibidor ao meio de fermentação, e em conjunto, adicionando-se todos os inibidores.



Figura 4.5: Biorreator de bancada instrumentado (New Brunswick Scientific, Bioflo 110) utilizado nos experimentos de caracterização cinética das linhagens.

Inicialmente as linhagem foram repicadas para um tubo de 15 mL (Falcon) contendo 5 mL de reativação (Tabela 4.3), sendo mantidos em estufa a 30°C por 24 horas. Após crescimento, todo o volume do tubo, contendo o microrganismo crescido, foi transferido para frasco Erlenmeyer de 500 mL, contendo 45 mL de meio da preparação de inóculo (Tabela 4.4). Cada frasco foi posto em mesa incubadora rotativa, por 18 horas, a 35 °C, com agitação de 250 rpm, para a levedura, e de 150 rpm para a bactéria.

Um volume de 4 mL do inóculo foi transferido para tubos de 50 mL, contendo 36 mL do meio de fermentação (Tabela 4.5), contendo cada inibidor (ou todos) na concentração descrita na Tabela 4.6, com exceção do controle que possuía apenas o meio de fermentação.

As fermentações ocorreram em estufa a 35°C, com pH inicial de 5, por um período 18 horas. Para análises de concentração celular, concentração de glicose e concentração de etanol e co-produtos foram retiradas amostras no início e após 18 horas de fermentação. O pH final de cada também tubo foi determinado.

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Determinação de concentração celular

Densidade ótica

A densidade ótica das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm, para *S. cerevisiae*, e em 660 nm para *Z. mobilis*.

Peso seco

Para a determinação da concentração celular por peso seco, uma amostra de 5 mL foi filtrada em membrana microporosa de 0,45 μm , para as leveduras, e de 0,2 μm , para as bactérias, em um sistema de filtração a vácuo (Millipore). Todas as membranas foram previamente pesadas (p_m) e, após filtração, foram secas em estufa a 80°C por 24 horas. Após a secagem, as membranas foram postas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente, sendo, em seguida, pesadas (p_t). O valor da biomassa seca foi calculado pela diferença entre o peso da membrana com a biomassa seca e o peso apenas da membrana ($p_l = p_t - p_m$). A concentração celular foi obtida dividindo-se o peso das membranas filtradas secas, em gramas, pelo volume filtrado, em litros ($X = p_l/0,005$).

Contagem por microscopia

O número de células viáveis e não-viáveis de *S. cerevisiae* foi determinado por contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se um microscópio óptico (Zeiss, modelo Axiolab Hbo). As células foram coradas com solução de azul de metileno, preparada com 0,025 g do corante, adicionado a 2 g de citrato de sódio, em 100 mL de água. A mistura da amostra com a solução de azul de metileno foi na proporção de 1:1. Em seguida, foi transferida uma alíquota da mistura para a câmara de Neubauer, procedendo-se a observação das células em objetiva de 40x. Foram contados o número de células totais e de células coradas em 5 campos quadrados distintos de 0,2 mm de largura (Figura 4.6). Nos casos em que o número de células era excessivo para ser contado (mais que 300 células por campo), as amostras foram diluídas nas proporções adequadas.

Como a câmara tem profundidade de 0,1 mm, o volume total dos campos contados foi de 2×10^{-5} mL. A concentração de células totais foi dada pela razão entre o número total de células e o volume total dos campos contados. Como apenas as células não-viáveis são coradas pela solução corante, a concentração de células viáveis foi calculada pela diferença

entre as células totais e corada, dividindo-as pelo volume total. A viabilidade celular foi determinada como o percentual de células não coradas presente na amostra.

A contagem de células de *Z. mobilis* não pode ser realizada devido à mobilidade das células na câmara de Neubauer.

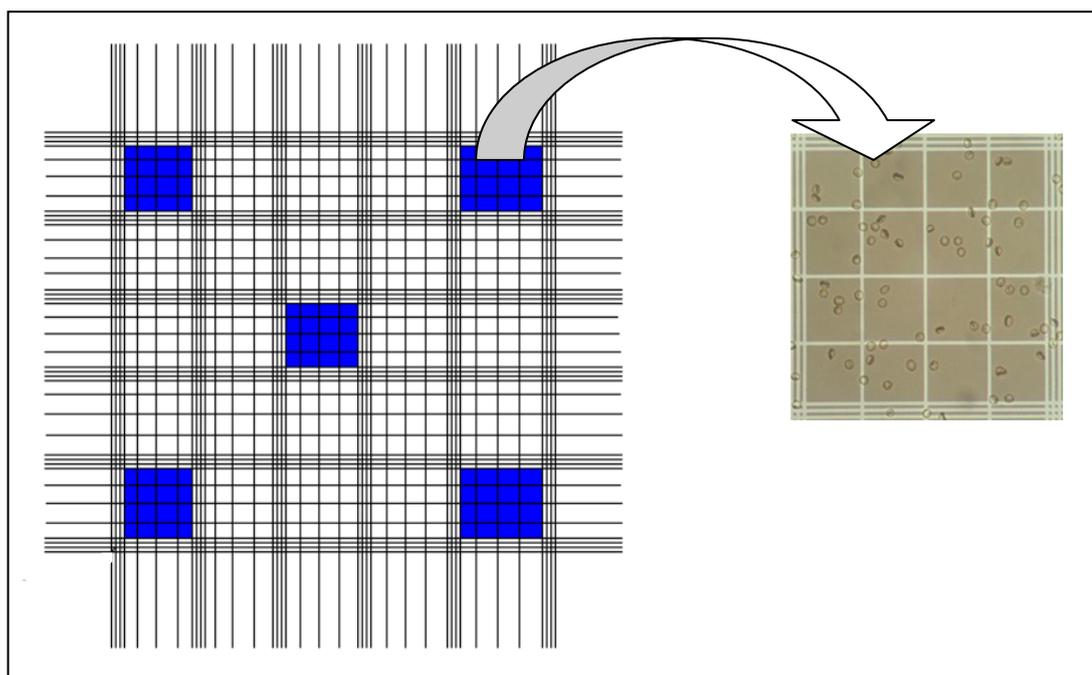


Figura 4.6: Esquema da Câmara de Neubauer e da microscopia em objetiva de 40X. Fonte: Adaptado de ALVES (2006).

4.4.2 Determinação das concentrações de substratos, produtos e inibidores.

A quantificação do substrato (glicose), do produto (etanol), co-produtos (ácido acético, glicerol, ácido succínico) e inibidores (HMF, furfural, ácido fórmico) foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, Série 1100 – Figura 4.8). Foi utilizada uma coluna Aminex HPX-87HX (Bio-Rad) de 300 x 7,8 mm, com ácido sulfúrico 5 μ molar como fase móvel, a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹, a 50°C; o detector utilizado foi o de índice de refração. A fase móvel foi preparada com água ultrapura e, posteriormente, filtrada em membrana microporosa de 0,2 μ m. O método do padrão externo foi utilizado para quantificar a concentração dos compostos. Todas as amostras e os padrões foram diluídos em fase móvel, filtrados em membrana 0,2 μ m e injetados automaticamente em um volume de 5 μ L.



Figura 4.7: Equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (Agilent, série 1100) utilizado para a determinação de concentrações de substrato, produtos e inibidores.

Os fenóis totais foram determinados pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Adicionaram-se 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (10% v/v) e 2,0 mL de carbonato de sódio (7,5% p/v), a 0,5 mL do hidrolisado diluído, incubando-se em banho termostatizado a 50° C, durante 5 minutos. Para a preparação do branco, o mesmo procedimento foi utilizado, sendo que no lugar da amostra foi utilizado 0,5 ml de água destilada. Foi construída uma curva de calibração com diferentes concentrações de ácido gálico, nas mesmas condições do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.

4.5 Métodos Matemáticos

4.5.1 Cálculo de parâmetros cinéticos

Considerou-se o biorreator perfeitamente agitado, de forma que, para o sistema descontínuo, o balanço material foi expresso como:

[Taxa de variação] = [Velocidade de reação]

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad \therefore \quad \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu \quad (1)$$

$$\frac{dS}{dt} = r_S \quad \therefore \quad \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} = q_S \quad (2)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad \therefore \quad \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = q_P \quad (3)$$

$$\frac{dCP}{dt} = r_{CP} \quad \therefore \quad \frac{1}{X} \frac{dCP}{dt} = q_{CP} \quad (4)$$

onde:

X = concentração de biomassa (g L^{-1})

S = concentração de substrato (g L^{-1})

P = concentração de produto (g L^{-1})

CP = concentração de co-produto (g L^{-1})

r_X = velocidade de crescimento celular ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

r_S = velocidade de consumo de substrato ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

r_P = velocidade de formação de etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

r_{CP} = velocidade de formação de co-produto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1})

q_S = velocidade específica de consumo de substrato ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

q_P = velocidade específica de formação de produto ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

q_{CP} = velocidade específica de formação de co-produto ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Fatores de conversão, Y , foram obtidos através das relações, considerada constantes, entre as velocidades específicas definidas acima (Eq. 1-4):

$$Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (5)$$

$$Y_{P/S} = \frac{q_P}{q_S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (6)$$

$$Y_{CP/S} = \frac{q_{CP}}{q_S} = \frac{\Delta CP}{\Delta S} \quad (7)$$

onde:

$Y_{X/S}$ = rendimento de biomassa em substrato (g g^{-1})

$Y_{P/S}$ = rendimento de produto em substrato (g g^{-1})

$Y_{CP/S}$ = rendimento de co-produto em substrato (g g^{-1})

A eficiência das fermentações foi calculada pela relação entre $Y_{P/S}$ e o rendimento máximo teórico ($0,511 \text{ g g}^{-1}$):

$$\text{Eficiência \%} = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100 \quad (8)$$

A produtividade de biomassa, Q_X , e as produtividades de produto, Q_P , e co-produto, Q_{CP} , foram calculadas como:

$$Q_X = \frac{X}{t} \quad (9)$$

$$Q_P = \frac{P}{t} \quad (10)$$

$$Q_{CP} = \frac{CP}{t} \quad (11)$$

4.5.2 Análise estatística

Os resultados experimentais obtidos na caracterização inicial, em duplicatas, foram analisados pelo método ANOVA seguido pelo teste de comparação múltipla de médias de Tukey a 5% de significância. Na caracterização do efeito de inibidores individuais, os resultados obtidos, em duplicatas, foram analisados pelo método ANOVA seguido pelo teste de Dunnett a 5% de significância. Os cálculos foram realizados no programa computacional EXCEL 2007 da Microsoft Corporation.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização e Seleção das Linhagens

A caracterização inicial foi realizada com o objetivo de selecionar linhagem de *S. cerevisiae* e linhagem de *Z. mobilis* que apresentassem resultados mais significativos de rendimento e produtividade de etanol, em meios de fermentação a base de glicose, na presença e na ausência de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.1.1 Linhagens de *S. cerevisiae*

Nas Figuras 5.1 e 5.2, encontram-se os resultados obtidos para as concentrações de biomassa (g L^{-1}) e de células viáveis (células mL^{-1}), em 18 horas de fermentação, para todas as linhagens de *S. cerevisiae* estudadas. As amostras coletadas no início e no final das fermentações geraram resultados com desvios padrão abaixo de 10 e coeficientes de variação inferiores a 30%. O pH inicial dos meios foi de 5,0, e, ao final das fermentações, os valores estavam em torno de 3,5, no meio sem hidrolisado, e de 4,0 no meio com hidrolisado.

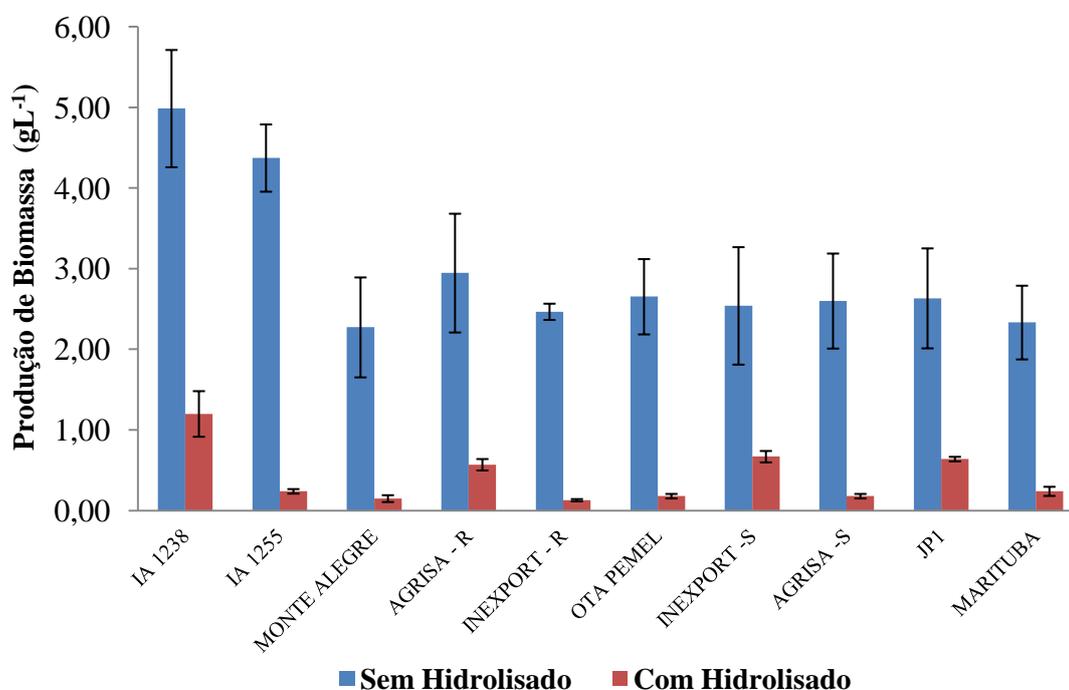


Figura 5.1: Concentração de biomassa das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

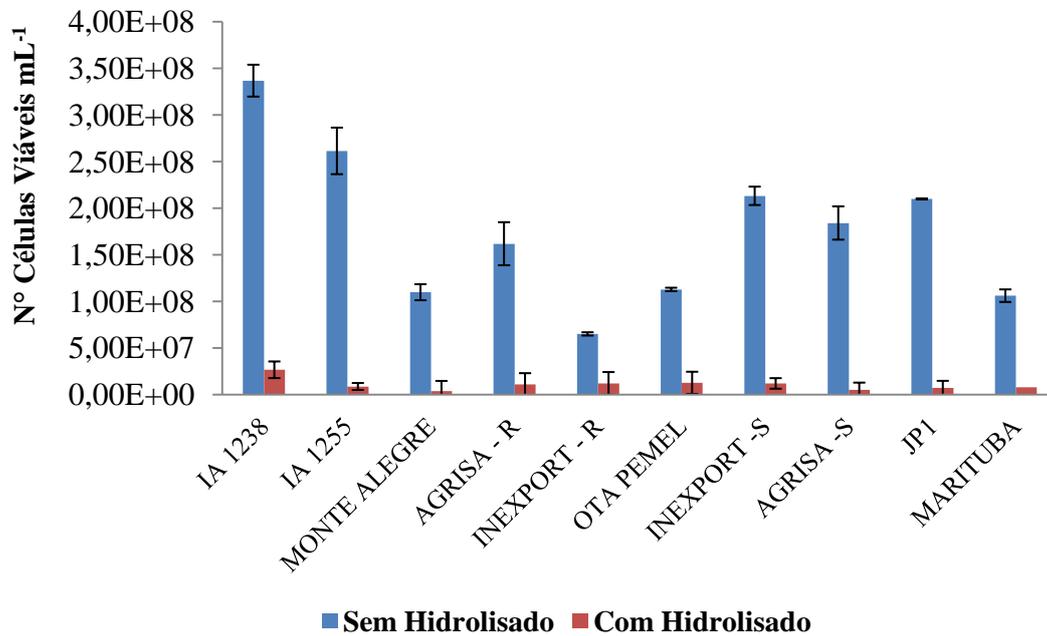


Figura 5.2: Concentração de células viáveis das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, no final das 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

As linhagens IA1238 e IA1255 atingiram as maiores concentrações celulares ao final de 18 horas de fermentação no meio sem hidrolisado. No meio contendo hidrolisado, todas as linhagens de *S. cerevisiae* apresentaram uma visível redução na concentração celular quando comparadas ao meio sem inibidores. Entre as linhagens investigadas, *S. cerevisiae* IA1238 apresentou o maior crescimento na presença dos inibidores com, no entanto, uma redução de 76% de biomassa em relação ao meio sem hidrolisado.

Em relação à viabilidade celular, ao final de 18 horas, observaram-se valores entre 96-99% para todas as linhagens, em ambos os meios de fermentação (Tabela 5.1). No meio sem hidrolisado, a menor viabilidade foi observada para a linhagem INEXPORT-R (96%), sendo esta diferença significativa quando comparada com as das linhagens IA1238, MARITUBA e INEXPORT-S, que apresentaram 99% de viabilidade.

Tabela 5.1: Viabilidade celular das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, no final das 18 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Linhagem	Viabilidade celular (%)*	
	<i>sem hidrolisado</i>	<i>com hidrolisado</i>
IA 1238	99,34 a	99,15 a
IA 1255	97,05 ab	96,45 d
MONTE ALEGRE	97,50 ab	97,04 bcd
AGRISA – R	98,75 ab	98,74 abc
INEXPORT - R	96,57 b	96,74 a
OTA PEMEL	98,21 ab	98,92 ab
INEXPORT -S	99,63 a	96,82 d
AGRISA –S	99,00 ab	97,74 abcd
JP1	98,90 ab	96,65 d
MARITUBA	99,44 a	98,37 abcd

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

As produtividades de biomassa, Q_x , calculadas para todas as linhagens, em meios sem e com hidrolisado, estão apresentadas na Tabela 5.2. Com os valores de concentração de glicose consumida nos dois meios de fermentação (Figura 5.3), foram, também, calculados os rendimentos de biomassa em glicose, $Y_{X/S}$, apresentados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Produtividade e rendimento de biomassa para as 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Linhagem	Q_x (g L ⁻¹ h ⁻¹) *		$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹) *	
	sem hidrolisado	com hidrolisado	sem hidrolisado	com hidrolisado
IA 1238	0,27 ^a	0,05 ^a	0,05 ^{ab}	0,05 ^{ab}
IA 1255	0,24 ^{ab}	0,03 ^a	0,09 ^a	0,01 ^c
MONTE ALEGRE	0,13 ^b	0,02 ^a	0,06 ^{ab}	0,01 ^c
AGRISA – R	0,16 ^{ab}	0,03 ^a	0,06 ^{ab}	0,01 ^c
INEXPORT – R	0,14 ^b	0,01 ^a	0,04 ^{ab}	0,06 ^a
OTA PEMEL	0,15 ^b	0,02 ^a	0,05 ^{ab}	0,01 ^c
INEXPORT –S	0,14 ^b	0,02 ^a	0,04 ^{ab}	0,03 ^{bc}
AGRISA –S	0,14 ^b	0,11 ^a	0,03 ^b	0,01 ^c
JP1	0,14 ^b	0,03 ^a	0,03 ^b	0,04 ^{ab}
MARITUBA	0,13 ^b	0,03 ^a	0,03 ^b	0,01 ^c

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

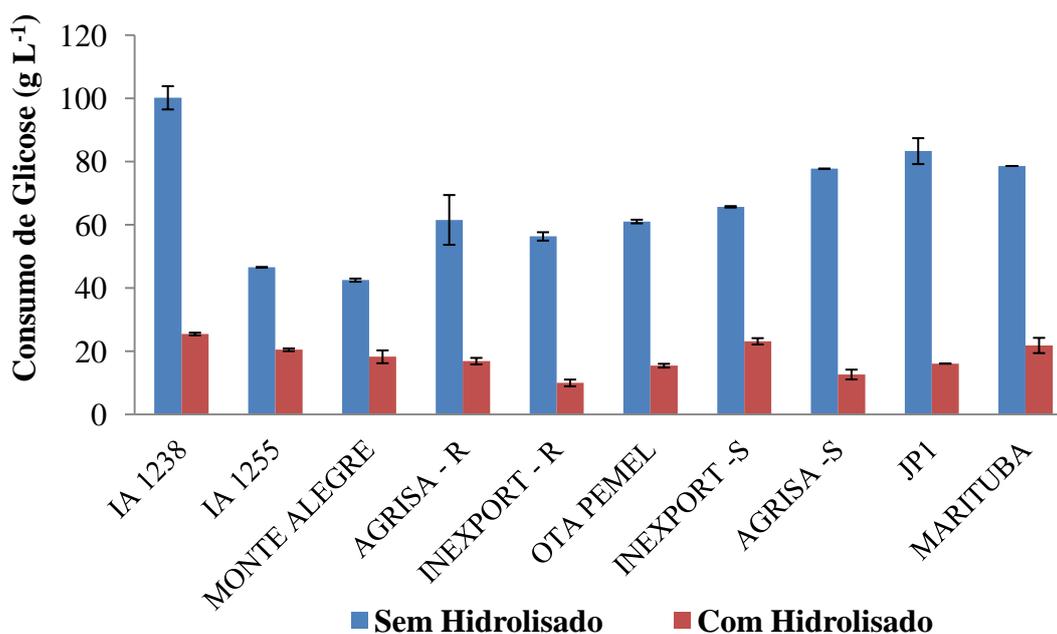


Figura 5.3: Consumo de glicose das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

No meio sem hidrolisado, a linhagem IA1238 apresentou a maior produtividade ($Q_X = 0,27 \text{ g g}^{-1}$), não apresentando diferença significativa entre as linhagens IA1255 e AGRISA-R, porém, diferiu das outras sete linhagens. No meio com hidrolisado, não houve diferença significativa na produtividade entre as linhagens estudadas.

Em relação ao rendimento de biomassa, Y_{XS} , a linhagem IA1238, no meio sem hidrolisado, não apresentou diferença significativa entre as outras linhagens. No meio com hidrolisado, o rendimento das linhagens IA1238, INEXPORT-R e JP1 diferiram das demais linhagens, com exceção da INEXPORT-S, que apresentou diferença somente da INEXPORT-R.

Quanto ao consumo de glicose, houve uma maior assimilação no meio sem hidrolisado, comparado ao meio com hidrolisado, para todas as linhagens. Dentre as linhagens, IA1238 assimilou mais glicose em ambos os meios. No meio com hidrolisado, a INEXPORT-R apresentou o menor consumo de glicose.

A produção de etanol pelas diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, nos meios sem e com hidrolisado, está apresentada na Figura 5.4. A linhagem IA1238 produziu a maior concentração de etanol nos dois meios de fermentação. A partir destes resultados e dos resultados apresentados na Figura 5.3, foram calculados os rendimento e produtividade de etanol das linhagens (Tabela 5.3)

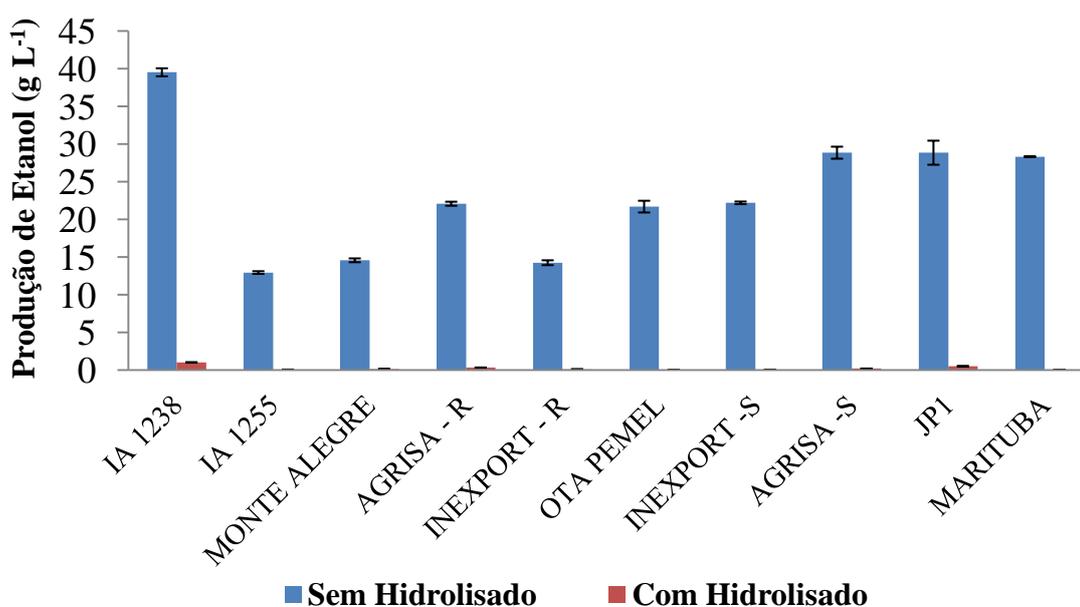


Figura 5.4: Produção de etanol pelas 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.3: Produtividade e rendimento de etanol das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico.

Linhagem	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹) *		$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹) *	
	sem hidrolisado	com hidrolisado	sem hidrolisado	com hidrolisado
IA 1238	2,20 ^a	0,057 ^a	0,39 ^a	0,040 ^a
IA 1255	0,72 ^d	0,004 ^{fg}	0,28 ^{bc}	0,003 ^f
MONTE ALEGRE	0,81 ^d	0,008 ^{de}	0,34 ^a	0,008 ^{ef}
AGRISA – R	1,23 ^c	0,019 ^c	0,36 ^a	0,020 ^c
INEXPORT – R	0,79 ^d	0,006 ^{ef}	0,25 ^c	0,011 ^{de}
OTA PEMEL	1,21 ^c	0,002 ^g	0,36 ^a	0,002 ^f
INEXPORT –S	1,23 ^c	0,004 ^{fg}	0,34 ^{ab}	0,003 ^f
AGRISA –S	1,60 ^b	0,011 ^d	0,37 ^a	0,016 ^{cd}
JP1	1,62 ^b	0,029 ^b	0,35 ^a	0,032 ^b
MARITUBA	1,57 ^b	0,003 ^{fg}	0,36 ^a	0,002 ^f

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

Em relação à produtividade, a linhagem IA1238 apresentou o maior valor, tanto no meio sem hidrolisado ($Q_P = 2,2$ g L⁻¹ h⁻¹) quanto no meio com hidrolisado ($Q_P = 0,057$ g L⁻¹ h⁻¹), com diferença estatisticamente significativa em relação às demais linhagens estudadas. No meio sem hidrolisado, as linhagens IA1255 e INEXPORT-R apresentaram menores rendimentos de etanol, sendo significativamente diferentes das linhagens IA1238, AGRISA-S, AGRISA-R, MARITUBA, OTA-PEMAL, JP1, MONTE ALEGRE e INEXPORT-S, que tiveram maiores conversões de glicose em etanol. No meio com hidrolisado, a IA1238 apresentou o maior rendimento ($Y_{P/S} = 0,04$ g g⁻¹), sendo estatisticamente diferente das demais linhagens estudadas.

As concentrações dos co-produtos, ácido succínico, ácido acético e glicerol, produzidas em meio sem hidrolisado, estão descritas na Figura 5.5. No meio com hidrolisado, não foi detectada a presença de ácido succínico e de glicerol, sendo quantificado apenas a concentração de ácido acético (Figura 5.6). A ausência do glicerol no meio sem hidrolisado

pode ter origem na presença do furfural no meio, pois linhagens de *S. cerevisiae* convertem esse composto a álcool fufurílico, liberando um NADH, função igualmente exercida na conversão de glicerol-3-fosfato a glicerol na via metabólica desse microrganismo (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HAGERDAL, 1999).

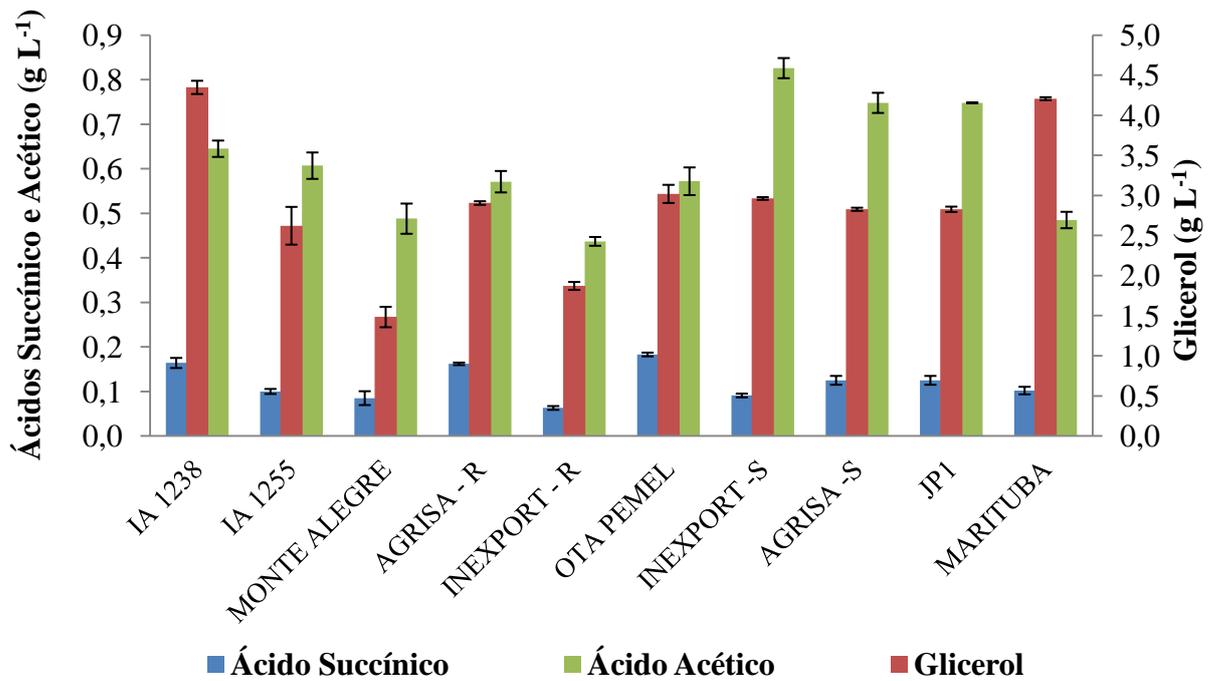


Figura 5.5: Produção de ácido succínico, ácido acético e glicerol pelas 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

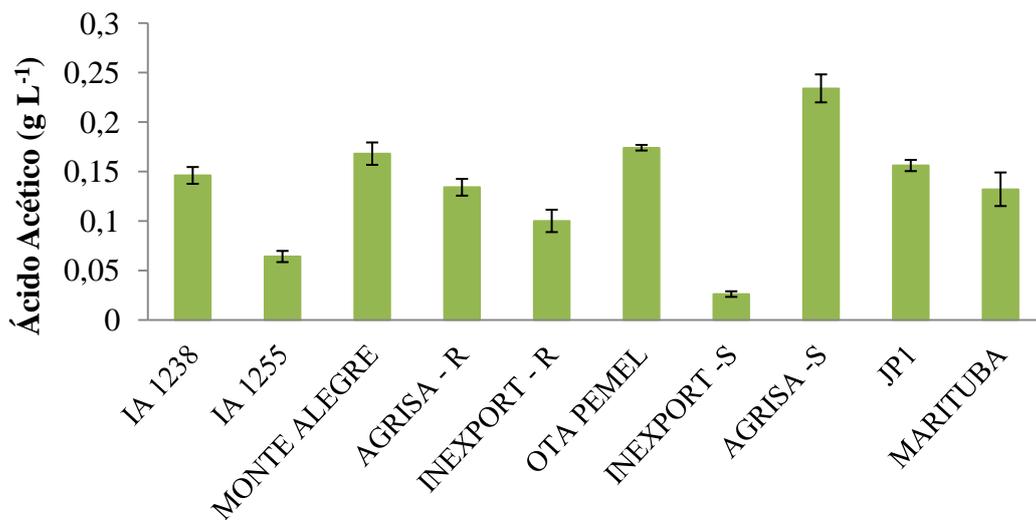


Figura 5.6: Produção de ácido acético pelas 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Todas as linhagens de *S. cerevisiae* investigadas produziram altas concentrações de glicerol no meio de fermentação sem hidrolisado. Os rendimentos deste co-produto (Tabela 5.4) não apresentaram diferença significativa entre as linhagens. No meio sem hidrolisado, as linhagens IA1238, MARITUBA e JP1 apresentaram os menores rendimentos de ácido acético, diferindo das linhagens IA1255, MONTE ALEGRE e INEXPORT-R.

A produção de glicerol é um fator que afeta o desempenho fermentativo, uma vez que parte do glicerol formado está acoplado à manutenção do equilíbrio redox intracelular. Diversos fatores interferem e designam a formação de glicerol, dentre elas a composição do meio (RANKINE; BRIDSON, 1971), pH do meio (NEISH; WOOD, 1950) e a pressão osmótica (PANCHAL; STEWART, 1980).

A linhagem AGRISA-S apresentou o maior rendimento de ácido acético, no meio com hidrolisado (Tabela 5.4), tendo diferença significativa das demais linhagens. A IA1238 apresentou um valor intermediário, não diferindo de outras seis linhagens.

Tabela 5.4: Rendimento de co-produtos das 10 linhagens de *S. cerevisiae*, em 18 horas de fermentação, em meios sem e com hidrolisado hemicelulósico.

Linhagem	$Y_{CP/S}$ (g g ⁻¹) *		
	Glicerol <i>sem</i> <i>hidrolisado</i>	Ácido acético <i>sem</i> <i>hidrolisado</i> <i>com</i> <i>hidrolisado</i>	
IA 1238	0,043 a	0,006 c	0,006 cd
IA 1255	0,053 a	0,013 a	0,002 de
MONTE ALEGRE	0,051 a	0,011 ab	0,009 bc
AGRISA – R	0,051 a	0,009 abc	0,008 bc
INEXPORT – R	0,040 a	0,011 ab	0,010 bc
OTA PEMEL	0,051 a	0,009 abc	0,011 b
INEXPORT –S	0,045 a	0,008 bc	0,0011 e
AGRISA –S	0,038 a	0,010 abc	0,019 a
JP1	0,047 a	0,006 c	0,010 bc
MARITUBA	0,054 a	0,006 c	0,010 bc

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

Analisando-se o conjunto de resultados acima, *S. cerevisiae* IA 1238 se apresentou como a linhagem com melhores características de fermentabilidade, com valores significativamente maiores de rendimento de etanol, em meio com hidrolisado ($Y_{P/S} = 0,04 \text{ g g}^{-1}$), e de produtividade em ambos os meios ($Q_P = 2,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$; sem hidrolisado; $Q_P = 0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com hidrolisado). Em estudo anterior (SANTOS; GUSMÃO; GOUVEIA, 2010), esta mesma linhagem apresentou um melhor desempenho fermentativo em condições adversas de temperatura e de agitação, visando à produção de etanol por sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), quando comparada com as linhagens industriais PEDRA, AGRISA-S e AGRISA-R.

5.1.2 Linhagens de *Z. mobilis*

Na Figura 5.7, encontram-se as concentrações de biomassa produzidas pelas dez linhagens de *Z. mobilis* no meio sem hidrolisado hemicelulósico. Os resultados apresentaram desvio padrão abaixo de 10% e o coeficiente de variação abaixo de 20%, com dispersão mediana e boa precisão. Em meio com hidrolisado, o crescimento dos microrganismos não ocorreu, portanto, não foram feitas as análises de crescimento e formação de produto e co-produtos. O pH inicial dos meios foi 5,0, e, ao final das 18 horas, os valores estavam em torno de 4,0.

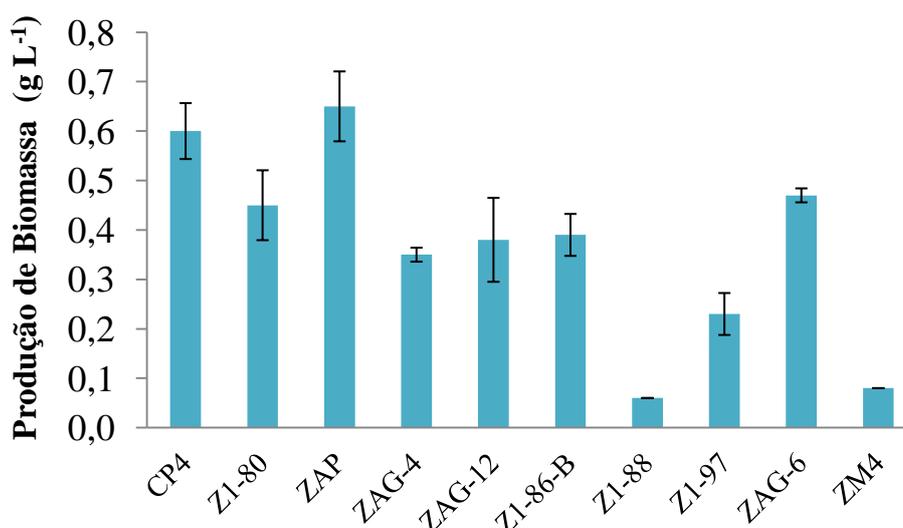


Figura 5.7: Concentração de biomassa formada pelas 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

As produtividades de biomassa, Q_x , calculadas para todas as linhagens, em meios sem hidrolisado, estão apresentadas na Tabela 5.5. Com os valores de concentração de glicose consumida (Figura 5.8), foram, também, calculados os rendimentos em biomassa, $Y_{x/s}$, apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Produtividade e rendimento de biomassa para as 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Linhagem	Q_x (g L⁻¹h⁻¹) *	$Y_{x/s}$ (g g⁻¹) *
CP4	0,003 d	0,003 cd
Z1-80	0,025 ab	0,011 a
ZAP	0,036 a	0,011 a
ZAG-4	0,019 abcd	0,008 ab
ZAG-12	0,021 abc	0,009 ab
Z1-86-B	0,022 abc	0,006 bc
Z1-88	0,006 cd	0,001 d
Z1-97	0,013 cd	0,004 cd
ZAG-6	0,026 ab	0,011 a
ZM4	0,004 d	0,002 d

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

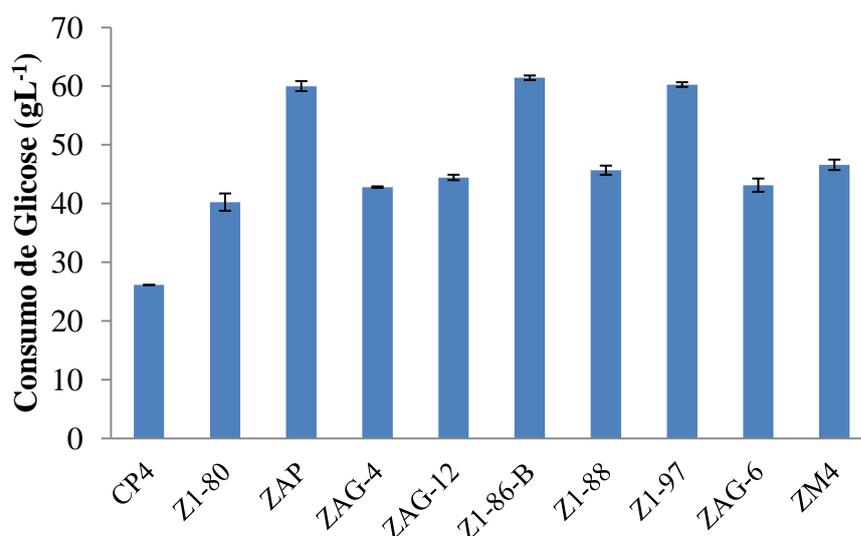


Figura 5.8: Consumo de glicose pelas 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A linhagem ZAP apresentou produtividade $Q_x = 0,036 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, diferindo significativamente das linhagens CP4, Z1-88, Z1-97 e ZM4, que apresentaram valores inferiores a $0,005 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Nos rendimentos de biomassa, as linhagens ZAP, Z1-80 e ZAG-6, apresentaram maiores valores, diferindo estatisticamente das linhagens CP4, Z1-86-B, Z1-88, Z1-97 e ZM4. Na Figura 5.9, está apresentada a produção de etanol pelas diferentes linhagens. Na Tabela 5.6, encontram-se os valores calculados de produtividade, Q_p , e de rendimento, $Y_{p/S}$.

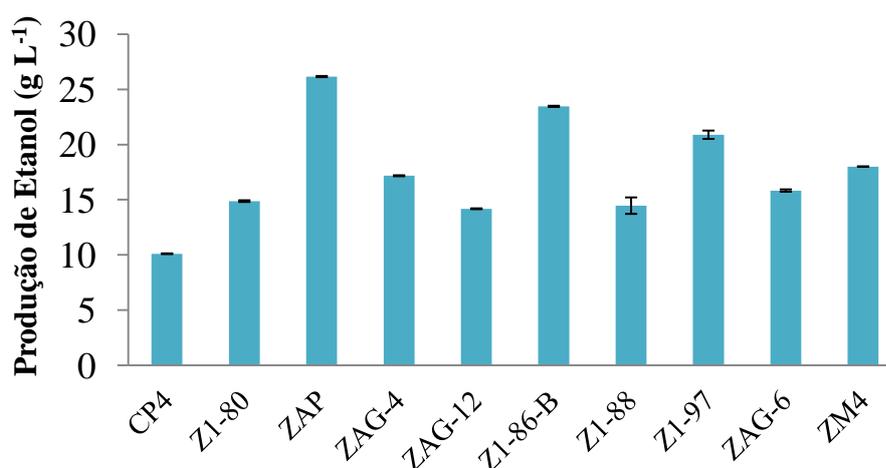


Figura 5.9: Produção de etanol pelas 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.6: Produtividade e rendimento de etanol para as 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Linhagem	Q_p (g L⁻¹h⁻¹) *	$Y_{p/s}$ (g g⁻¹) *
CP4	0,56 g	0,39 bc
Z1-80	0,83 ef	0,37 cd
ZAP	1,45 a	0,44 a
ZAG-4	0,95 d	0,40 bc
ZAG-12	0,79 f	0,32 e
Z1-86-B	1,30 b	0,38 bc
Z1-88	0,80 f	0,32 e
Z1-97	1,16 c	0,35 d
ZAG-6	0,88 e	0,37 cd
ZM4	1,00 d	0,39 bc

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

Em relação à produtividade, a linhagem ZAP apresentou o maior valor ($Q_p = 1,45$ g L⁻¹ h⁻¹), com diferença estatisticamente significativa em relação às demais linhagens estudadas. Na análise dos rendimentos de etanol, a linhagem ZAP apresentou maior conversão de glicose em etanol ($Y_{p/s} = 0,44$ g g⁻¹), sendo significativamente diferentes das demais linhagens.

As concentrações de ácido acético produzidas pelas linhagens estão apresentadas na Figura 5.10. Os rendimentos calculados encontram-se na Tabela 5.7.

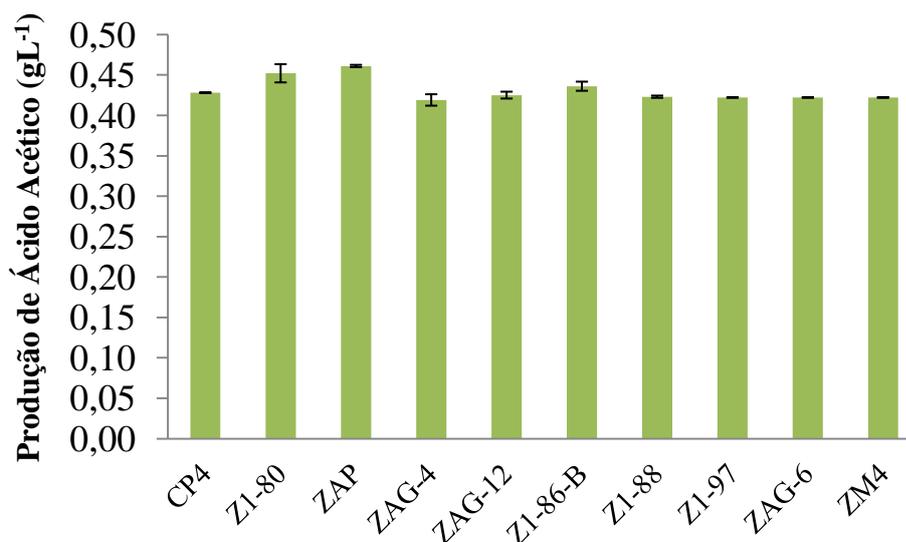


Figura 5.10: Produção de ácido acético pelas 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Tabela 5.7: Rendimento de ácido acético das 10 linhagens de *Z. mobilis*, em 18 horas de fermentação, em meio sem hidrolisado hemicelulósico.

Linagem	$Y_{CP/S}$ (g g ⁻¹) *
CP4	0,016 ^a
Z1-80	0,011 ^b
ZAP	0,008 ^d
ZAG-4	0,010 ^c
ZAG-12	0,010 ^c
Z1-86-B	0,008 ^d
Z1-88	0,009 ^c
Z1-97	0,007 ^d
ZAG-6	0,010 ^c
ZM4	0,009 ^c

* As médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não apresentaram diferença significativa, de acordo com Teste de Turkey a 5% de significância.

As linhagens ZAP, Z1-86-B e Z1-97 apresentaram menores rendimentos de ácido acético, diferindo das demais linhagens, que geraram rendimentos superiores.

Analisando-se o conjunto de resultados acima, *Z. mobilis* ZAP se apresentou como a linhagem com melhores características de fermentabilidade, com valores significativamente maiores de rendimento de etanol ($Y_{P/S} = 0,44 \text{ g g}^{-1}$) e de produtividade ($Q_P = 1,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

5.2 Caracterização Cinética das Linhagens Seleccionadas

As linhagens de *S. cerevisiae* IA1238 e *Z. mobilis* ZAP, que apresentaram as melhores características de fermentabilidade, entre os dois grupos, foram seleccionadas para caracterização das cinéticas de crescimento, consumo de substrato e formação de produto em biorreator descontínuo. Inicialmente, foram realizados cultivos em meio com alta concentração de glicose, para se avaliar o comportamento do microrganismo em alta pressão osmótica, e, posteriormente, as mesmas linhagens foram caracterizadas em meios contendo 50 g L^{-1} de glicose, na ausência e presença de hidrolisado de bagaço da cana-de-açúcar.

5.2.1 *S. cerevisiae* IA1238

Nas Figuras 5.11 e 5.12, estão apresentados os resultados das fermentações de *S. cerevisiae* IA1238, em meio com alta (200 g L^{-1}) e baixa (50 g L^{-1}) concentrações de glicose, sem hidrolisado hemicelulósico, respectivamente. Em alta concentração de glicose, a fermentação ocorreu em 21 horas, com $X_f = 9,72 \text{ g L}^{-1}$ e $P_f = 80,78 \text{ g L}^{-1}$. Em baixa concentração de glicose, a fermentação ocorreu em 8 horas, com $X_f = 5,25 \text{ g L}^{-1}$ e $P_f = 23,40 \text{ g L}^{-1}$. A relação entre a concentração de glicerol e etanol foi de 14,9%, no meio com baixa concentração de glicose, e de 18,5% em alta concentração.

Os rendimentos de biomassa calculados foram $Y_{X/S} = 0,09 \text{ g g}^{-1}$ e $Y_{X/S} = 0,05 \text{ g g}^{-1}$, para baixa e alta concentração de glicose, respectivamente. Os rendimentos de etanol em glicose foram de $Y_{P/S} = 0,39 \text{ g g}^{-1}$, no meio com baixa concentração, e $Y_{P/S} = 0,36 \text{ g g}^{-1}$ no meio com alta concentração de glicose. Este valor corresponde a uma eficiência de 76% e 71%, cujo baixo valor pode ser atribuído, em grande parte, à formação de biomassa e de glicerol em altas quantidades (Figuras 5.11-5.12).

As produtividades de etanol foram no meio com baixa concentração de glicose foi $Q_P = 2,57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e, em alta concentração, $Q_P = 3,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A baixa produtividade no

meio com baixa concentração de glicose pode ser atribuída à ocorrência de uma fase “lag” de duas horas, o que não foi observado no meio com alta concentração do substrato.

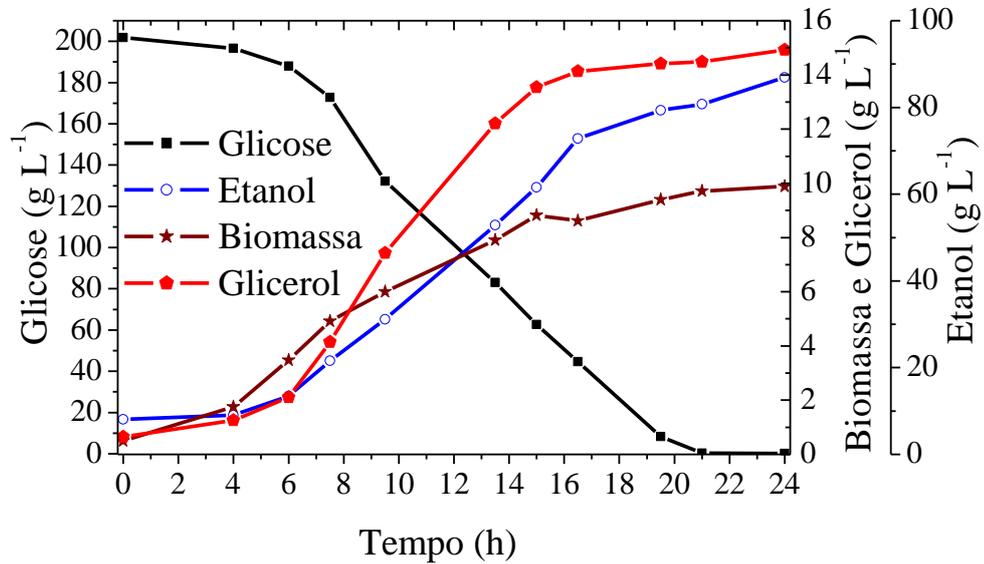


Figura 5.11: Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por *S. cerevisiae* IA 1238, durante fermentação em alta concentração de glicose (200 g L⁻¹), em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

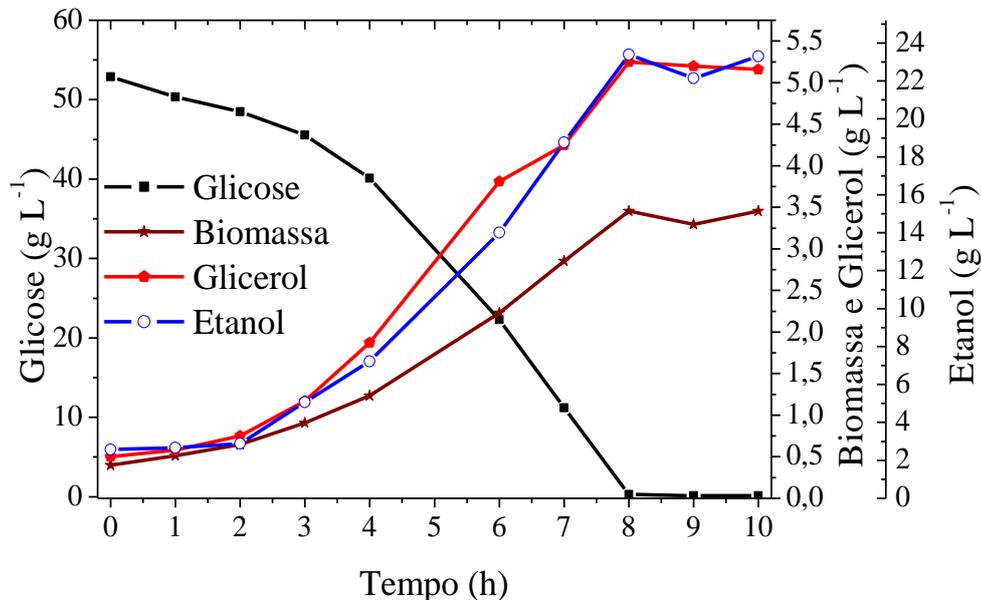


Figura 5.12: Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e glicerol por *S. cerevisiae* IA 1238, durante fermentação em baixa concentração de glicose (50 g L⁻¹), em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

As velocidades específicas máximas de crescimento de *S. cerevisiae* IA1238 nos meios com baixa e alta concentração de glicose foram $\mu_{MAX} = 0,46 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{MAX} = 0,32 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.13 e 5.14). A redução de μ_{MAX} , no meio com alta concentração pode ser atribuída a inibição pelo substrato.

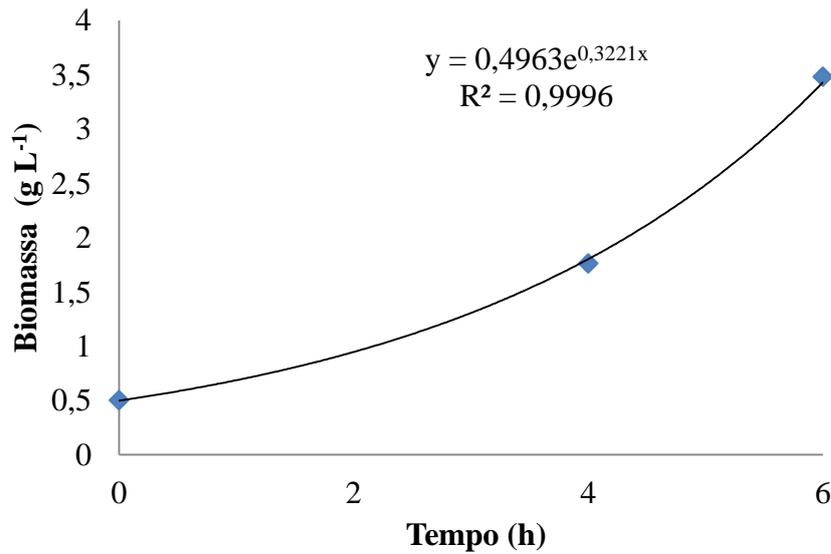


Figura 5.13: Velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae* IA1238, em meio de glicose (200 g L⁻¹) sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

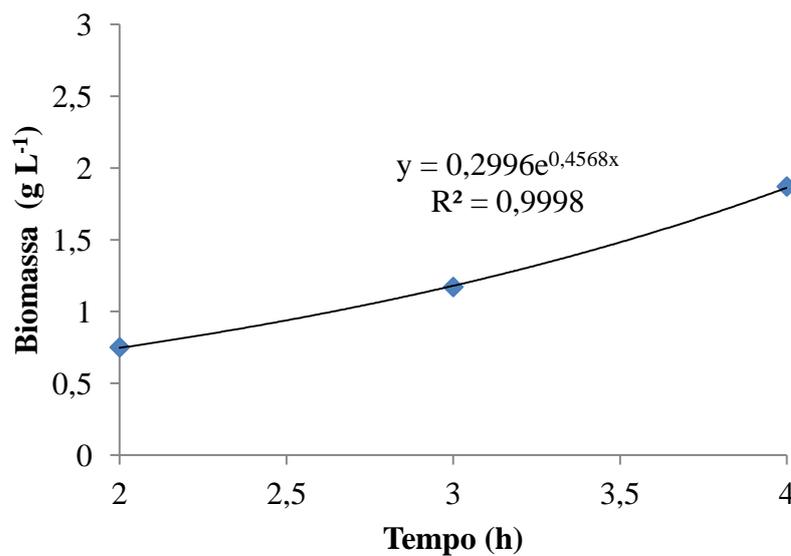


Figura 5.14: Velocidade específica máxima de crescimento de *S. cerevisiae* IA1238, em meio de glicose (50 g L⁻¹) sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Uma forte inibição foi observada quando experimento foi realizado utilizando-se baixa concentração de glicose na presença do hidrolisado hemicelulósico. As variações das concentrações de biomassa, glicose e etanol encontram-se descritas na Figura 5.15.

Após 22 horas de fermentação, houve pouca variação nas concentrações ($\Delta X = 0,26 \text{ g L}^{-1}$, $\Delta S = 14,5 \text{ g L}^{-1}$ e $\Delta P = 0,94 \text{ g L}^{-1}$). Conseqüentemente, as produtividades também foram baixas ($Q_X = 0,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $Q_P = 0,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). O rendimento de etanol em glicose foi $Y_{P/S} = 0,06 \text{ g g}^{-1}$, correspondendo apenas eficiência de 11%.

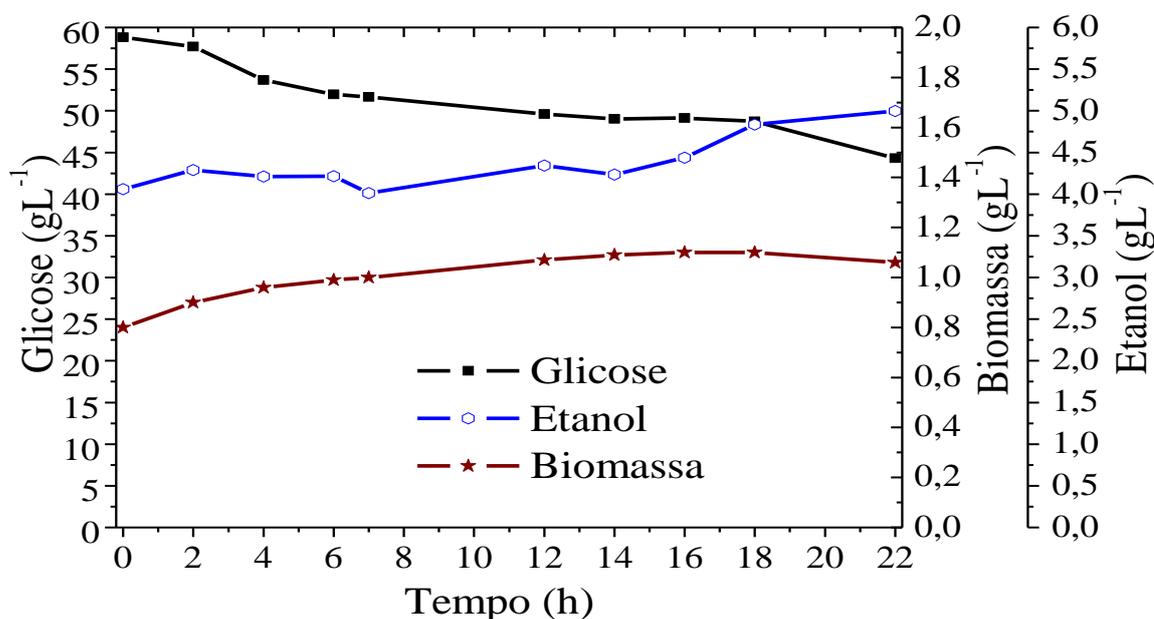


Figura 5.15: Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol e glicerol por *S. cerevisiae* IA1238, durante fermentação em baixa concentração de glicose (50 g L^{-1}), em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Na Figura 5.16, estão apresentadas as variações de concentração de inibidores encontrados no hidrolisado. Pode-se observar que o ácido fórmico, ácido acético e HMF permaneceram com as concentrações constantes durante 22 horas de fermentação. Porém, o furfural apresentou um declínio na concentração durante a fermentação, estando totalmente degradado às 16 horas. A capacidade de conversão do furfural a álcool furfurílico foi observada em *S. cerevisiae* por Taherzadeh et al. (1999).

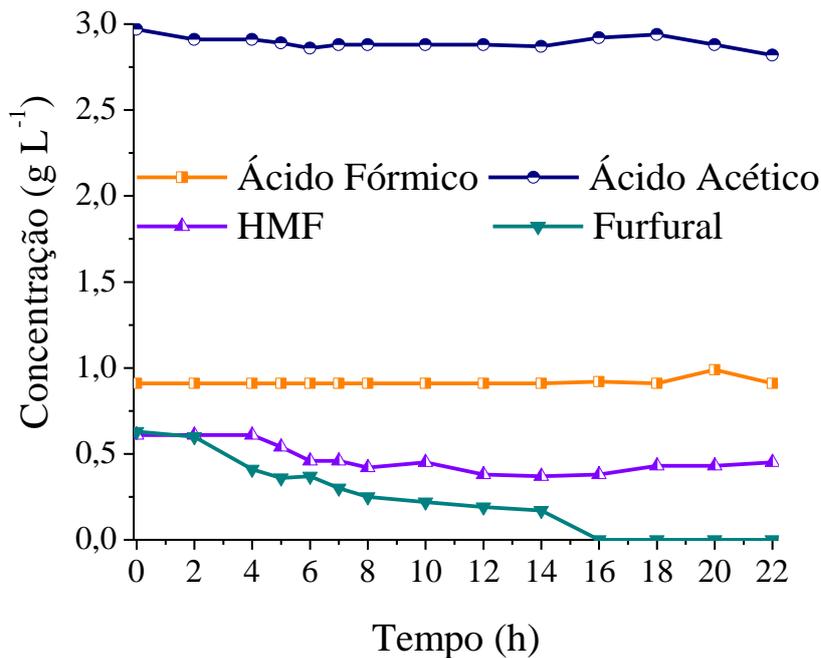


Figura 5.16: Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de *S. cerevisiae* IA1238 em baixa concentração de glicose (50 g L^{-1}), em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.2.2 *Z. mobilis* ZAP

Nas Figuras 5.17 e 5.18, estão apresentados os resultados das fermentações de *Z. mobilis* ZAP, em meio com alta (150 g L^{-1}) e baixa (50 g L^{-1}) concentrações de glicose, sem hidrolisado hemicelulósico, respectivamente.

Em alta concentração de glicose, a fermentação ocorreu em 18 horas, com $X_f = 4,36 \text{ g L}^{-1}$ e $P_f = 69,11 \text{ g L}^{-1}$. Em baixa concentração de glicose, a fermentação ocorreu em 10 horas, com $X_f = 1,48 \text{ g L}^{-1}$ e $P_f = 25,42 \text{ g L}^{-1}$.

Os rendimentos de biomassa em glicose calculados foram $Y_{XS} = 0,02 \text{ g g}^{-1}$, para ambos os meios. Os rendimentos de etanol em glicose em meio com baixa e alta, $Y_{PS} = 0,39 \text{ g g}^{-1}$ e $Y_{PS} = 0,41 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente. Este valor corresponde a uma eficiência de aproximadamente 82%.

As produtividades de etanol foram no meio com baixa concentração de glicose foi $Q_P = 2,04 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e, em alta concentração, $Q_P = 3,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

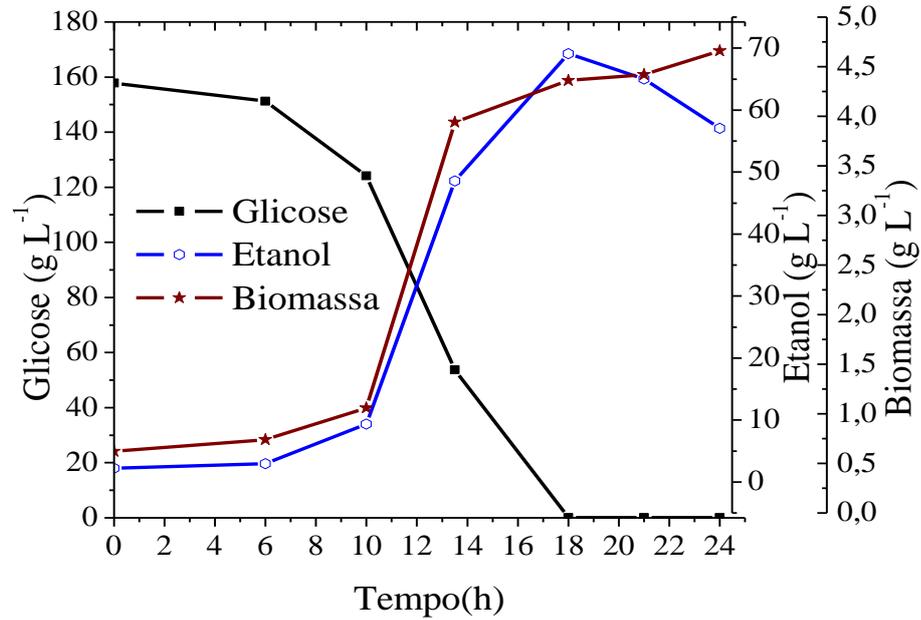


Figura 5.17: Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por *Z. mobilis* ZAP, durante fermentação em alta concentração de glicose, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

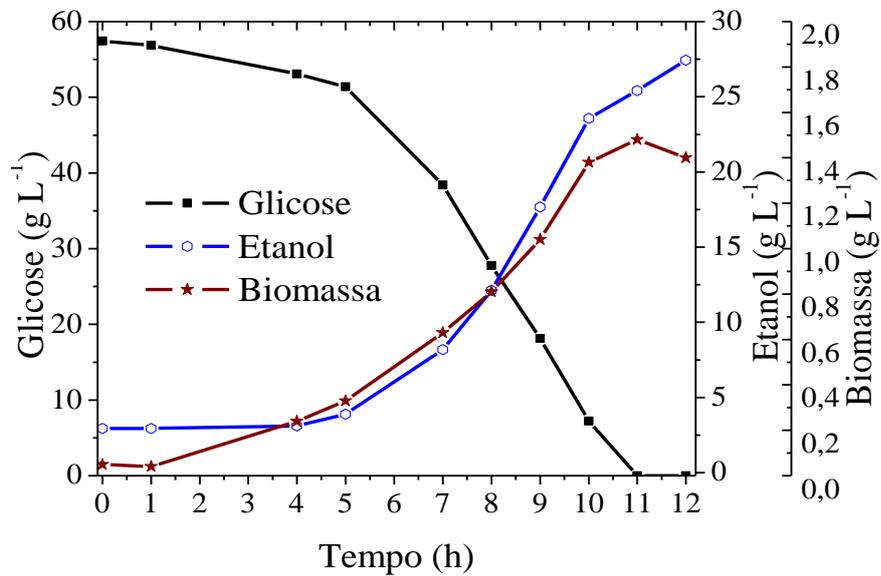


Figura 5.18: Curvas de crescimento, consumo de substrato e produção de etanol por *Z. mobilis* ZAP, durante fermentação em baixa concentração de glicose, em meio sem hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

As velocidades específicas máximas de crescimento de *Z. mobilis* ZAP nos meios com baixa e alta concentração de glicose foram $\mu_{MAX} = 0,31 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{MAX} = 0,37 \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.19 e 5.20). Neste caso não foi observado um efeito de inibição pelo substrato, porém, estudos realizados por Calazans et al. (1990) demonstram que, em concentrações de glicose superiores a 150 g L^{-1} , a linhagem ZAP sofre inibição de crescimento.

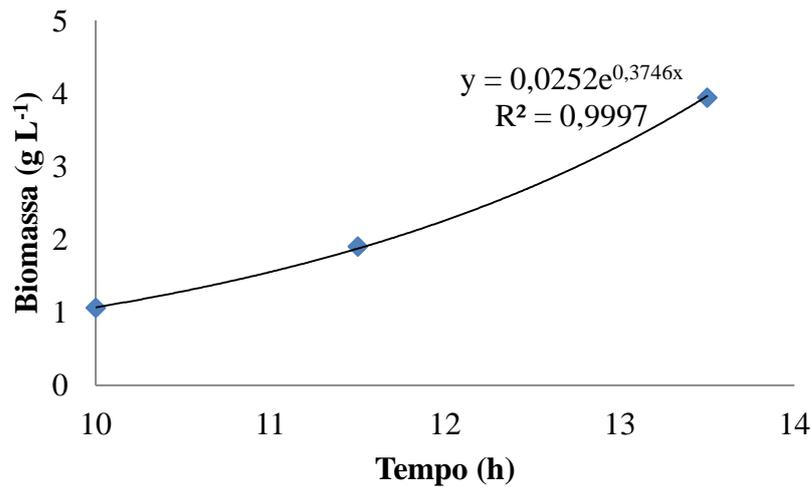


Figura 5.19: Velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial da curva de crescimento, durante fermentação de glicose por *Z. mobilis* ZAP, em meio sem hidrolisado hemicelulósico, com alta concentração de glicose (150 g L^{-1}).

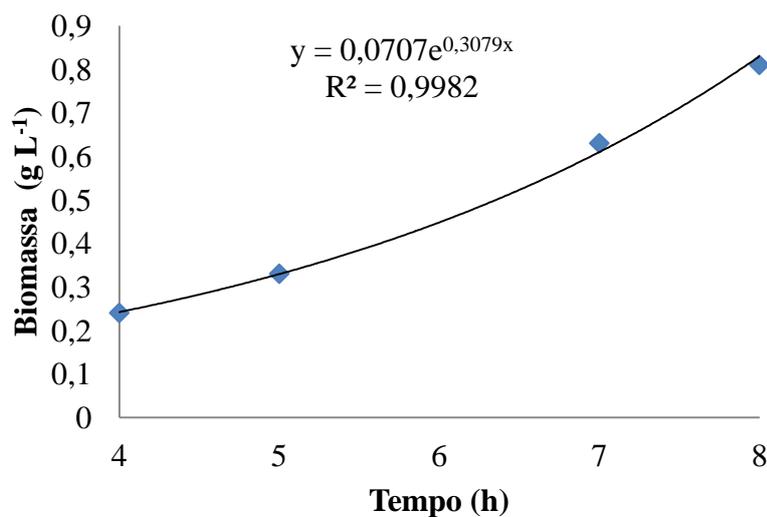


Figura 5.20: Velocidade específica máxima de crescimento, calculada na fase exponencial da curva de crescimento, durante fermentação de glicose por *Z. mobilis* ZAP, em meio sem hidrolisado hemicelulósico, com baixa concentração de glicose (50 g L^{-1}).

Na fermentação de *Z. mobilis* ZAP utilizando o meio com hidrolisado hemicelulósico não houve crescimento celular (Figura 5.21), como foi demonstrado durante a seleção das linhagem na caracterização inicial. A partir de 20 horas, observa-se um declínio na concentração celular. Não foi detectada, também, a degradação de nenhum composto, nem a formação de nenhum produto (Figura 5.22). Gutierrez-Padilla e Karim (2005) investigaram o efeito do furfural, adicionado ao meio de fermentação, em linhagem recombinante de *Z. mobilis*, nas concentrações de $0,475 \text{ g L}^{-1}$ e $1,9 \text{ g L}^{-1}$.

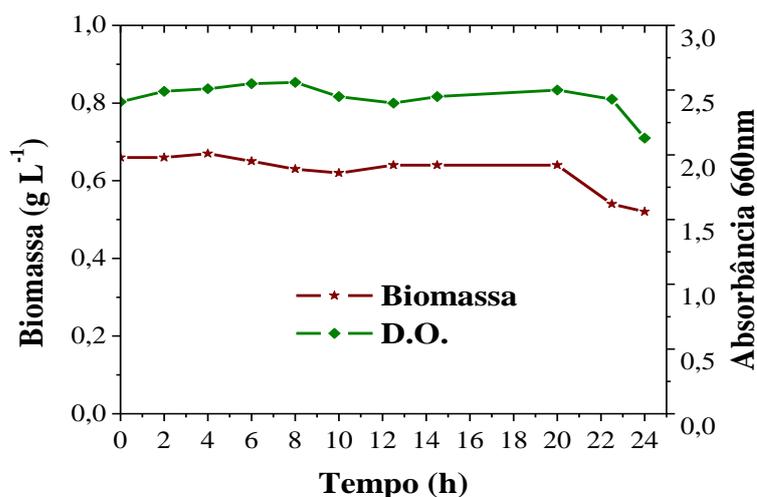


Figura 5.21: Densidade óptica e concentração de biomassa durante fermentação de glicose por *Z. mobilis* ZAP, em meio com hidrolisado hemicelulósico, com baixa concentração de glicose (50 g L^{-1}).

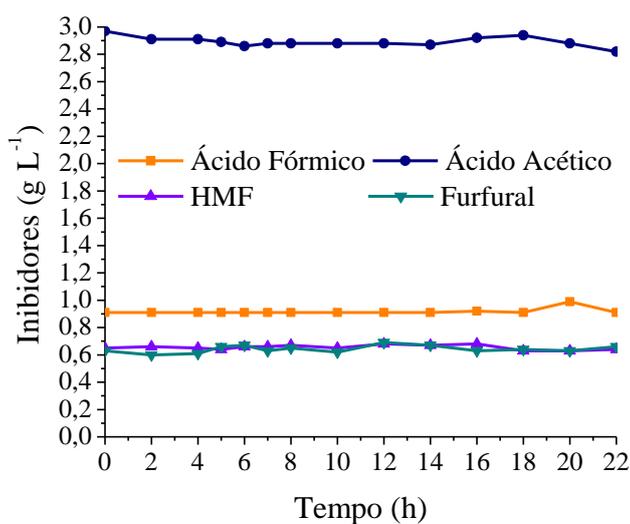


Figura 5.22: Variação das concentrações dos inibidores durante a fermentação de *Z. mobilis* ZAP em baixa concentração de glicose (50 g L^{-1}), em meio com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.3 Efeito de Inibidores sobre os microrganismos selecionados

Foram realizados experimentos adicionais para se investigar os efeitos individuais e interativo de cinco inibidores identificados no hidrolisado (ácido fórmico, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e ácido gálico) sobre as linhagens de *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* selecionadas.

5.3.1 *S. cerevisiae* IA1238

Na Figura 5.23, encontram-se os resultados obtidos para biomassa (g L^{-1}) e percentual de inibição e, na Figura 5.24, os resultados de células viáveis (células mL^{-1}) e viabilidade celular, no meio de fermentação com adição dos cinco compostos inibitórios individualmente e como coquetel. O pH inicial em todos os meios foi 5,0 e, no final das 18 horas, estava em aproximadamente 3,5, com exceção do coquetel, onde não houve metabolismo, permanecendo 5,0.

As amostras coletadas no início e no final das fermentações geraram resultados com desvios padrão abaixo de 10 e coeficientes de variação inferiores a 30%.

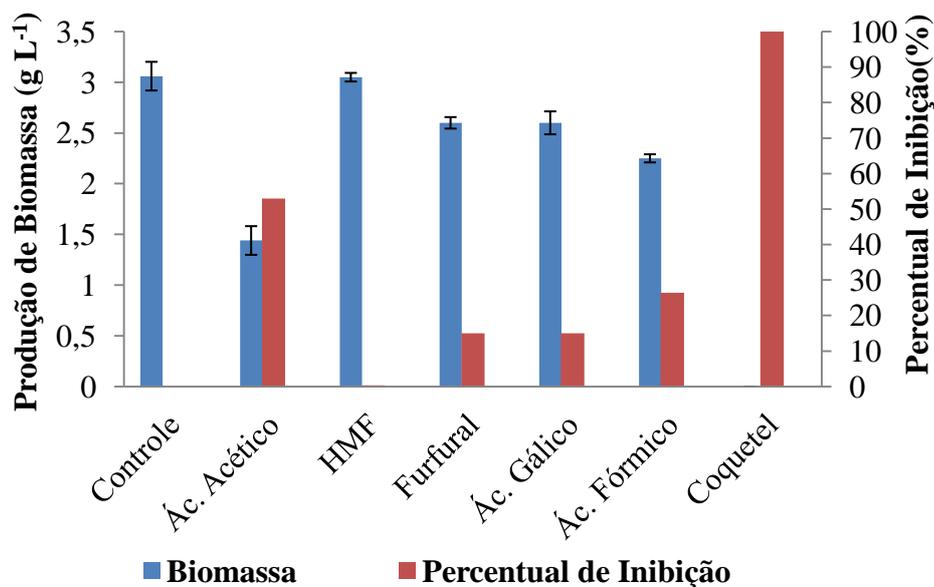


Figura 5.23: Concentração de biomassa formada pela linhagem *S. cerevisiae* IA1238 e percentual de inibição do crescimento, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

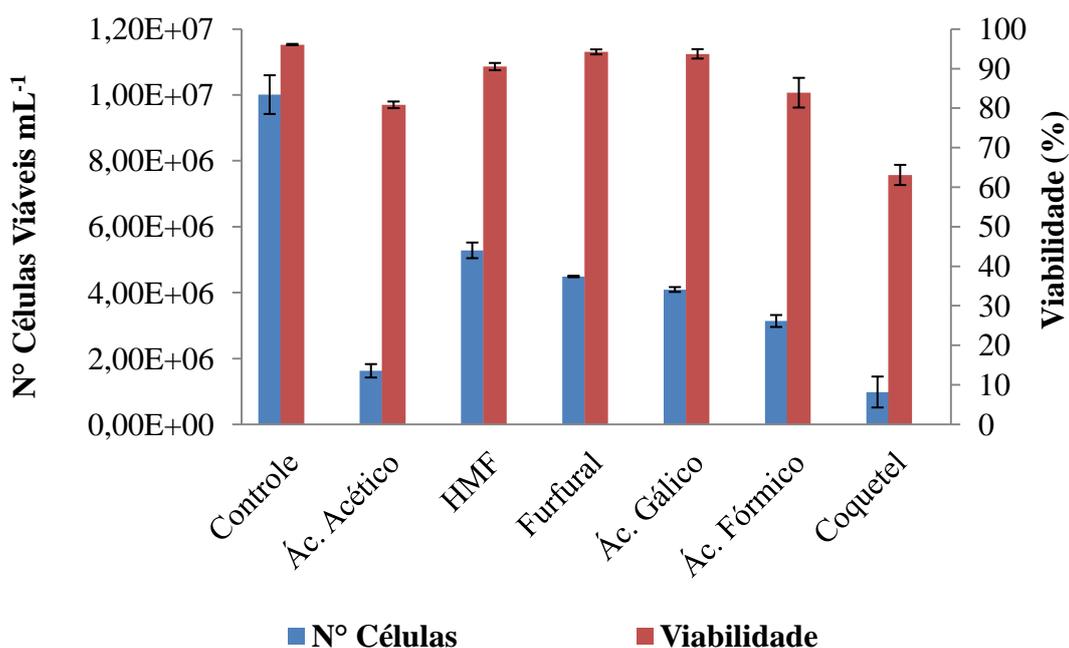


Figura 5.24: Concentração de células viáveis e a viabilidade de *S. cerevisiae* IA1238, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A *S. cerevisiae* IA1238 teve o maior percentual de inibição, ao final de 18 horas de fermentação, na presença do coquetel seguido pelo ácido acético (Figura 5.23). A viabilidade celular no coquetel foi de 63%, após as 18 horas.

As produtividades, Q_x , calculadas para cada inibidor, estão apresentadas na Tabela 5.8. Com os valores de concentração de glicose consumida nos meios de fermentação (Figura 5.25), foram calculados os rendimentos em biomassa, $Y_{x/s}$, apresentados na Tabela 5.8.

Em todos os meios houve consumo completo da glicose, com exceção do meio com coquetel, cujo consumo foi de apenas 3,5 g L⁻¹ (Figura 5.25). Em relação a produtividade e rendimento de biomassa (Tabela 5.8), pode-se observar que apenas os meios com ácido acético, ácido fórmico e o coquetel diferiram estatisticamente do controle, apresentando valores inferiores.

Tabela 5.8: Produtividade e rendimento de biomassa para a linhagem *S. cerevisiae* IA1238, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.

Inibidores	Q_x (g L ⁻¹ h)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)
CONTROLE	0,17	0,06
ÁCIDO ACÉTICO	0,08 *	0,03 *
HMF	0,17	0,06
FURFURAL	0,14	0,05
ÁCIDO GÁLICO	0,14	0,05
ÁCIDO FÓRMICO	0,13 *	0,04 *
COQUETEL	0,00 *	0,00 *

* As médias seguidas por asteriscos apresentaram diferença significativa do controle, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de significância.

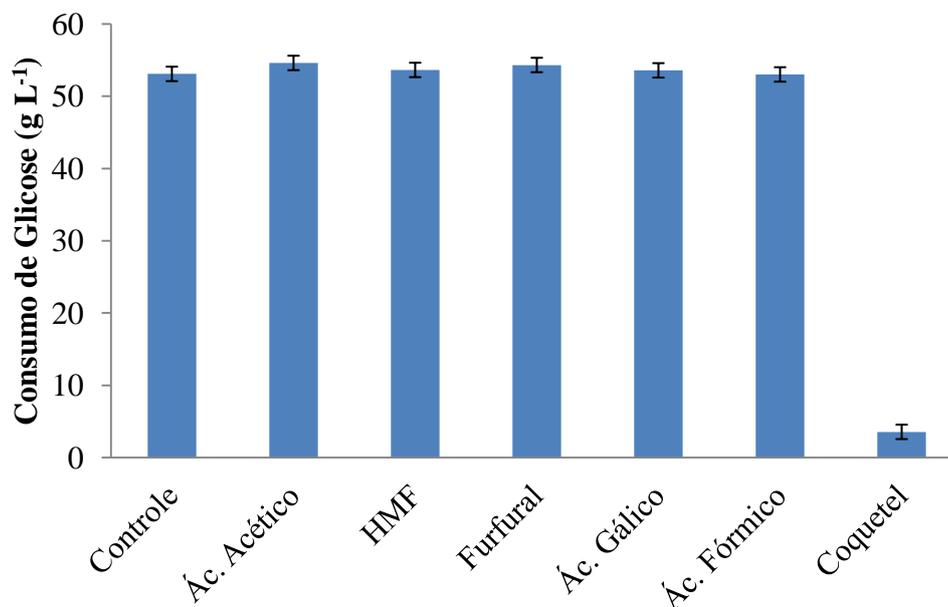


Figura 5.25: Consumo de glicose pela linhagem *S. cerevisiae* IA1238, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A produção de etanol por *S. cerevisiae* IA1238, exposta aos diferentes inibidores, está apresentada na Figura 5.26. A partir destes resultados e dos resultados apresentados na Figura 5.24, foram calculados o rendimento e a produtividade de etanol da linhagem nos diferentes meios (Tabela 5.9).

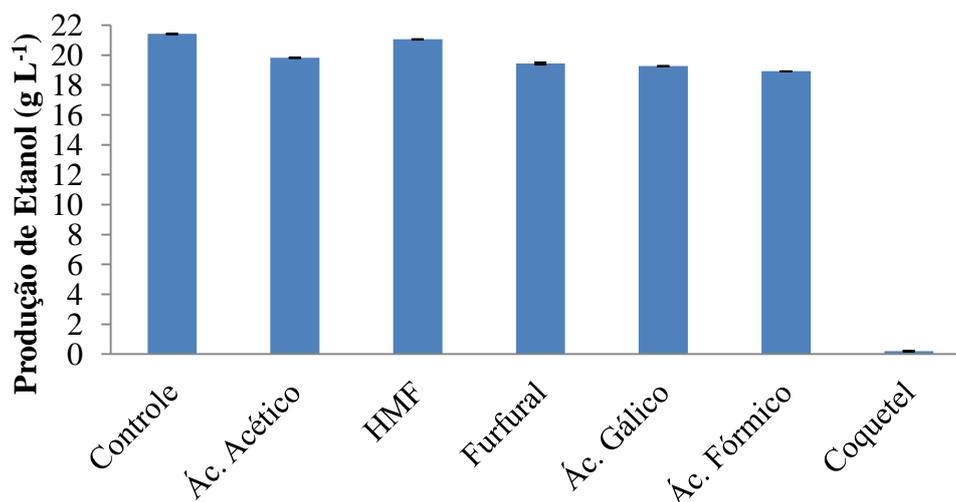


Figura 5.26: Produção de etanol pela linhagem *S. cerevisiae* IA1238, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.9: Produtividade e rendimento de etanol para a linhagem *S. cerevisiae* IA1238, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.

Inibidores	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
CONTROLE	1,19	0,40
ÁCIDO ACÉTICO	1,10 *	0,36 *
HMF	1,17 *	0,39
FURFURAL	1,08 *	0,36 *
ÁCIDO GÁLICO	1,07 *	0,36 *
ÁCIDO FÓRMICO	1,05 *	0,36 *
COQUETEL	0,01 *	0,06 *

* As médias seguidas por asteriscos apresentaram diferença significativa do controle, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de significância.

Em relação ao rendimento e à produtividade de etanol, todos os inibidores diferiram estatisticamente do controle, apresentando valores menores, com exceção do rendimento no meio com HMF.

As concentrações de glicerol, produzidas em todos os meios com inibidores, estão descritas na Figura 5.27.

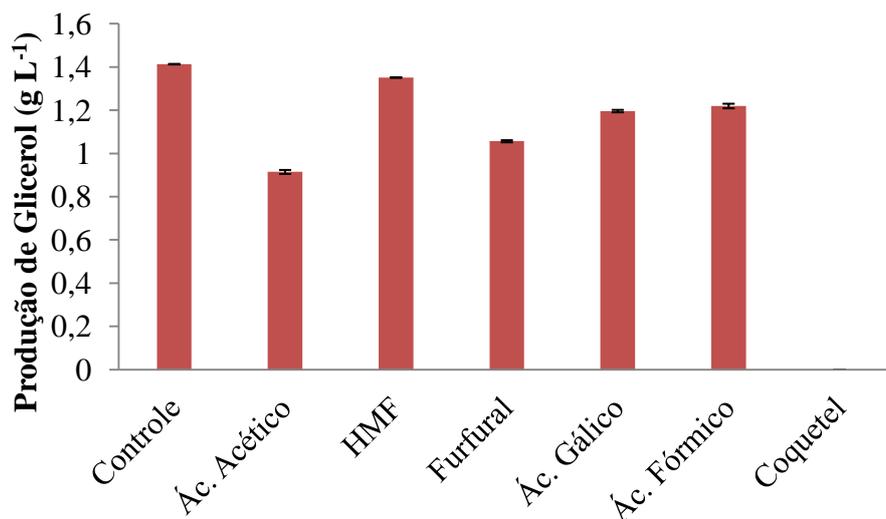


Figura 5.27: Produção de glicerol pela linhagem *S. cerevisiae* IA1238 após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

S. cerevisiae IA1238 produziu glicerol na presença de todos os inibidores investigados individualmente. As concentrações de glicerol variaram de 5 a 7% em relação ao etanol produzido, exceto no meio com coquetel, no qual não ocorreu produção de glicerol.

A análise do percentual remanescente dos inibidores utilizados, descrito na Figura 5.28, pode-se observar que apenas o furfural foi totalmente degradado durante as 18 horas de fermentação. O HMF também foi degradado, porém em menor quantidade, apenas 10%. Os demais inibidores (ácido acético, ácido fórmico e ácido gálico) não tiveram alteração com relação as concentrações iniciais.

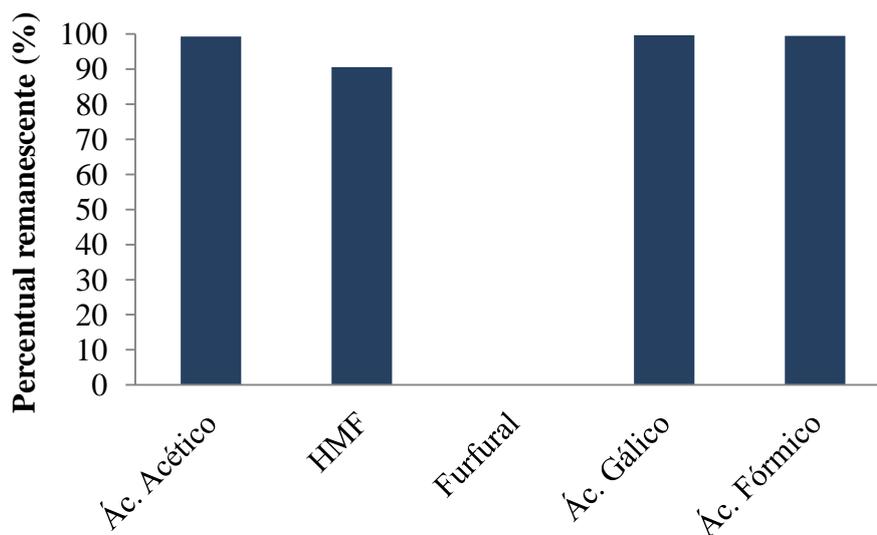


Figura 5.28: Variação das concentrações dos inibidores, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ding et al. (2011) investigaram os efeitos, individual e sinérgico, do furfural, do fenol e do ácido acético em linhagem termotolerante de *S. cerevisiae*, nas concentrações $1,3 \text{ g L}^{-1}$, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ e $5,3 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente. Foi observado que os três inibidores exibem efeito sinérgico significativo sobre o crescimento, fermentação e produção de alguns metabólitos pela levedura. Na análise individual dos inibidores, o ácido acético apresentou efeitos mais graves no crescimento sobre essa linhagem de levedura. Neste trabalho, para *S. cerevisiae* IA1238, o ácido acético, assim como o ácido fórmico (não investigado por Ding), também apresentaram efeito inibidor pronunciado.

5.3.2 *Z. mobilis* ZAP

Nas Figuras 5.29, encontram-se os resultados obtidos para a biomassa (g L^{-1}) e percentual de inibição para a linhagem *Z. mobilis* ZAP no meio de fermentação com adição dos cinco compostos inibitórios individualmente e como coquetel. As amostras coletadas no início e no final das fermentações geraram resultados com desvios padrão abaixo de 10% e coeficientes de variação inferiores a 30%. . O pH inicial em todos os meios foi 5,0 e, no final das 18 horas, estava em aproximadamente 4,0, com exceção dos meios com ácido acético, ácido fórmico e coquetel, no quais o pH permaneceu inalterado devido à forte inibição.

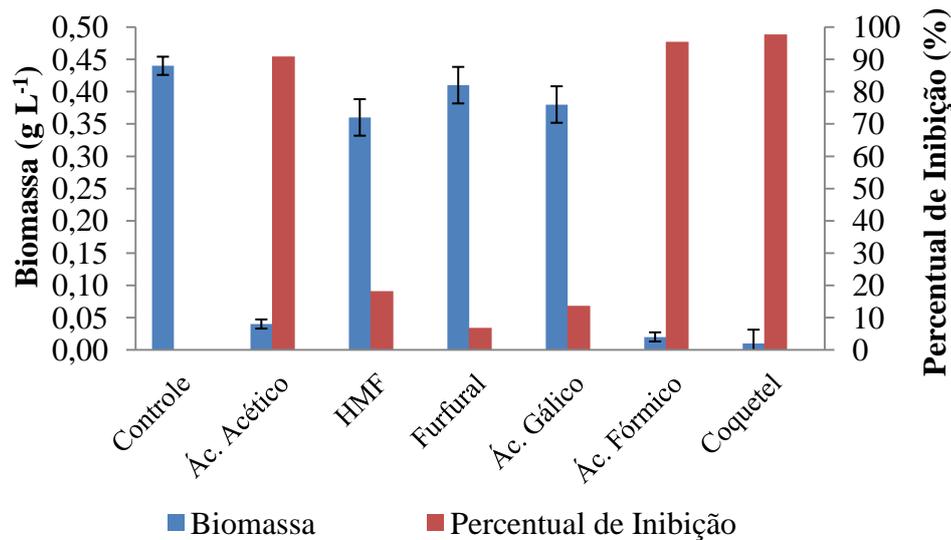


Figura 5.29: Concentração de biomassa formada pela linhagem *Z. mobilis* ZAP e percentual de inibição do crescimento, após 18 horas de fermentação em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ao final de 18 horas de fermentação, a linhagem ZAP apresentou altos índices de inibição nos meios com ácido acético, ácido fórmico e coquetel. Nestes mesmos meios, a linhagem apresentou baixa assimilação da glicose (Figura 5.30).

Ranatunga et al. (1997), analisando a inibição do furfural em linhagens de *Z. mobilis*, observaram inibição de 40% na concentração de 0,95 g L⁻¹ e de 76% com 1,9 g L⁻¹. Outro composto inibitório é o ácido acético, que em concentrações de 8,3 g L⁻¹ inibiu 50% do crescimento de *Z. mobilis* ATCC 29191, em pH 5,0, e com 11 g L⁻¹ a inibição foi completa (100%) (LAWFORD et al., 2001). Yang et al.(2010) reportou que concentrações acima de 0,75 g L⁻¹ de HMF causam inibição em *Z. mobilis*.

As produtividades, Q_X , calculadas para cada meio, estão apresentadas na Tabela 5.10. Com os valores de concentração de glicose consumida nos meios de fermentação (Figura 5.30), foram calculados os rendimentos em biomassa, $Y_{X/S}$, apresentados na Tabela 5.10.

Tabela 5.10: Produtividade e rendimento de biomassa para a linhagem *Z. mobilis* ZAP, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.

Inibidores	Q_x (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g g ⁻¹)
CONTROLE	0,024	0,008
ÁCIDO ACÉTICO	0,002 *	0,003 *
HMF	0,019	0,007
FURFURAL	0,023	0,008
ÁCIDO GÁLICO	0,021	0,007
ÁCIDO FÓRMICO	0,001 *	0,003 *
COQUETEL	0,000 *	0,000 *

* As médias seguidas por asteriscos apresentaram diferença significativa do controle, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de significância.

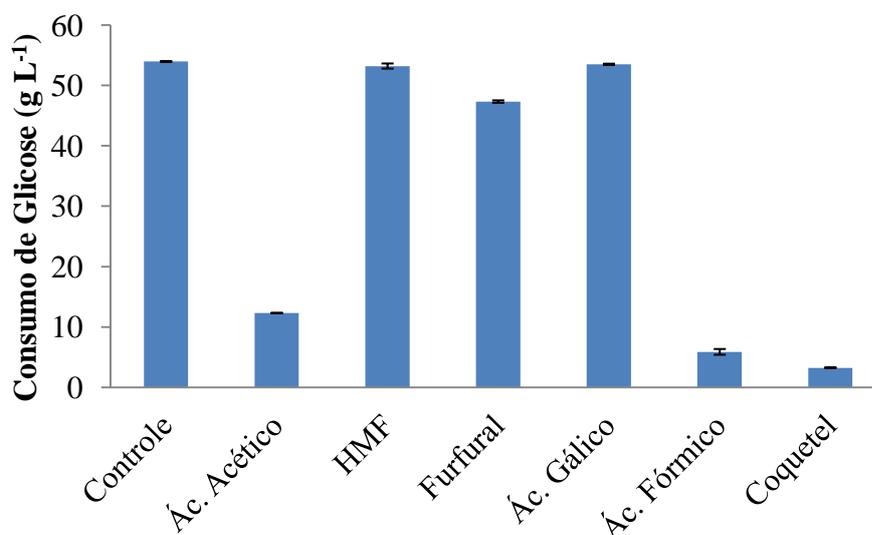


Figura 5.30: Consumo de glicose pela linhagem *Z. mobilis* ZAP, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Apenas os meios com ácido acético, fórmico e o coquetel diferiram estatisticamente do controle, em relação à produtividade e rendimentos de biomassa..

A produção de etanol de *Z. mobilis* ZAP está apresentada na Figura 5.31. A partir destes resultados e dos apresentados na Figura 5.28, foram calculados os rendimento e produtividade de etanol nos meios (Tabela 5.11).

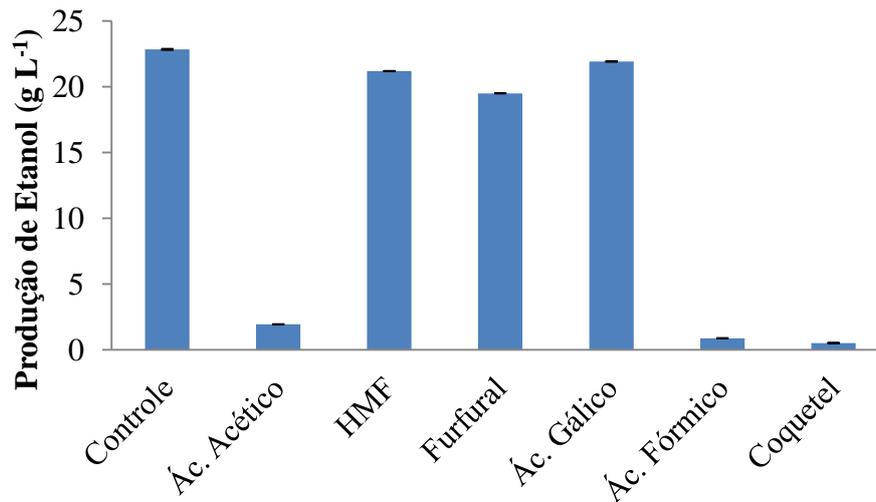


Figura 5.31: Produção de etanol pela linhagem *Z. mobilis* ZAP, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Todos os meios com inibidores diferiram estatisticamente do meio controle, apresentando valores inferiores para a produtividade e rendimento de etanol, com exceção do meio com HMF para o rendimento.

Na análise do percentual remanescente dos inibidores utilizados na fermentação de *Z. mobilis* ZAP, descrito na Figura 5.32, pode-se observar que inibidores utilizados (ácido acético, HMF, furfural, ácido fórmico e ácido gálico) não tiveram alteração com relação às concentrações iniciais encontrada.

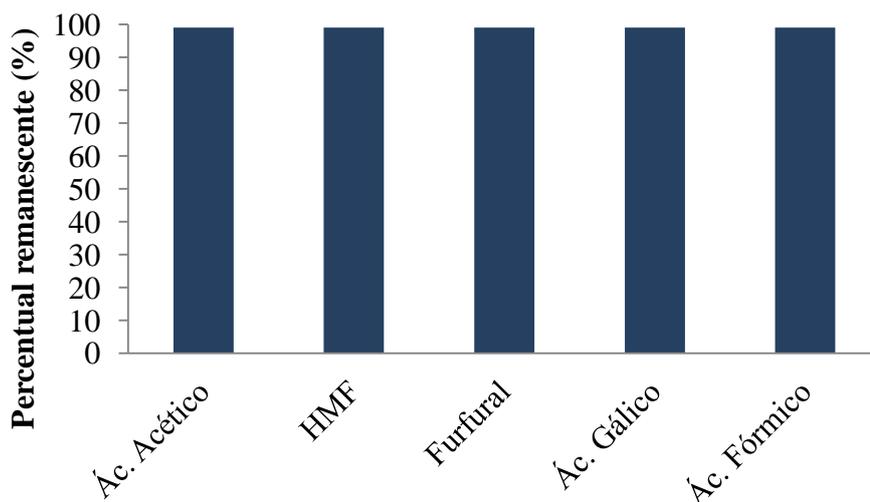


Figura 5.32: Variação das concentrações dos inibidores, após 18 horas de fermentação, em meio contendo ácido gálico e inibidores identificados no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Dentre os compostos inibidores individuais, os ácidos acético e fórmico apresentaram poder inibitório mais pronunciado sobre a bactéria *Z. mobilis* ZAP (93% e 73%, respectivamente). O mesmo foi observado para a levedura *S. cerevisiae* IA1238, com valores de 53% e 26%, respectivamente. Logo, a levedura se mostrou mais robusta que a bactéria.

Tabela 5.11: Produtividade e rendimento de etanol para a linhagem *Z. mobilis* ZAP, em meio contendo inibidores, ao final de 18 horas de fermentação.

Inibidores	Q_P (g L ⁻¹ h)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
CONTROLE	1,26	0,42
ÁCIDO ACÉTICO	0,11 *	0,16 *
HMF	1,18 *	0,40
FURFURAL	0,97 *	0,37
ÁCIDO GÁLICO	1,21 *	0,40
ÁCIDO FÓRMICO	0,05 *	0,15 *
COQUETEL	0,03 *	0,13 *

* As médias seguidas por asteriscos apresentaram diferença significativa do controle, de acordo com o teste de Dunnett a 5% de significância.

6 CONCLUSÃO

Entre as linhagens da levedura *S. cerevisiae* e da bactéria *Z. mobilis*, investigadas neste trabalho, foi possível se selecionar duas linhagens, uma de cada grupo, que se destacaram por suas características de fermentabilidade em meio de glicose, na presença e/ou na ausência de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Dentro do grupo de linhagens industriais de *S. cerevisiae*, a linhagem IA1238 apresentou, no geral, as melhores características para utilização industrial, com valores significativamente maiores de produtividade de etanol, em meios com e sem hidrolisado hemicelulósico, e de rendimento de etanol em meio com hidrolisado.

Dentro do grupo das linhagens de *Z. mobilis*, a linhagem ZAP apresentou as melhores características de fermentabilidade em meio sem hidrolisado hemicelulósico: maior produtividade e maior rendimento de etanol. No meio com hidrolisado, *Z. mobilis* ZAP não cresceu, assim como todas as outras linhagens de *Z. mobilis*.

Na caracterização cinética de *S. cerevisiae* IA 1238, foi observado um efeito de inibição pelo substrato, na ausência de hidrolisado hemicelulósico. Em meio com baixa concentração de glicose, contendo hidrolisado hemicelulósico, o crescimento do microrganismo foi inibido. A linhagem, no entanto, é capaz de metabolizar glicose, lentamente, e de degradar, totalmente, o furfural presente no hidrolisado.

Na caracterização de *Z. mobilis* ZAP, não se observou efeito de inibição pelo substrato. Em baixa concentração de glicose, na presença de hidrolisado, o crescimento da linhagem foi inibido.

Entre os compostos inibidores, analisados individualmente, o ácido acético e o ácido fórmico apresentam maior poder de inibição, tanto para *S. cerevisiae* IA1238 como para *Z. mobilis* ZAP. A levedura, no entanto, mostrou ser mais resistente a estes inibidores do que a bactéria.

Embora *Z. mobilis* apresente vantagem metabólica em meio de glicose (*i.e.* maior rendimento de etanol), *S. cerevisiae* se mostrou, em geral, mais robusta para aplicação industrial. A linhagem IA1238, utilizada atualmente em processos industriais de primeira geração, é uma boa plataforma para modificações genéticas futuras, para aplicação em processos de segunda geração.

7 REFERÊNCIAS

- ADEN, A.; FOUST, T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol. *Celulose*, v. 16, p. 535 – 545, 2009.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HAGERDAL, B.; LINDER, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, p. 340-349, 2007.
- ALMEIDA, J. R. M.; KARHUMAA, K.; BENGTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* strains with respect to anaerobic growth in non-detoxified lignocellulose hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 3674–3677, 2009.
- ALPER, H.; STEPHANOPOULOS, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 715-723, 2009.
- ALTERTHUM, F. Elementos em Microbiologia. In: Almeida lima, U.; Aquarone, E.; Borzani, W.; Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial*, v.1, p. 01-32. *Edgar Blücher*, Brasil, 2001.
- ALVES, A. F. Separação de leveduras de fermentação alcoólica em hidrociclones. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Uberlândia, 2006.
- AMORIM H. V.; LOPES M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA; J. V., BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 5, n. 91, p. 1267-75, 2011.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol – 30 years of Proálcool, *International Sugar Journal*, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007.
- ANDREOLI, C. Convergência de agricultura e energia: I. Produção de biomassa celulósica para biocombustíveis e eletricidade. *Economia e Energia*, v. 66, 2008.
- APTA – Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br>. Acesso em: 17 de Junho, 2011.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 89-105, 2008.
- BARNETT, J. A. The taxonomy of genus *Saccharomyces* Meyen ex Press: a short review for non taxonomists. *Yeast*, v. 8, p.1-23, 1992.
- BARROS, M.; CELLIGOI, M. A. P. C. Synthesis of sorbitol by *Zymomonas mobilis* under high osmotic pressure, *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 37, p. 324-328, 2006.
- BASTOS, V. D. Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. *BNDES Setorial*, Rio de Janeiro, v.1, n. 25, p. 5-38, 2007.

- BEAVEN, M. J.; ZAWADZKI, B.; BRONIUK, R.; LAWFORD, H.; FEIN, J., Comparative performance trials with yeast and *Zymomonas* for ethanol production from corn. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.20/21, p. 219-326, 1989.
- BENEDETTI, O. I. S.; CHAVES, R. Q.; MAGALHÃES, A. M.; BLOS, A. L. F.; SILVA, T. N. Análise preliminar da produção de etanol a partir de celulose: caminhos e desafios para a produção de álcool no Rio Grande do Sul. *Engenharia Ambiental*, v. 6, n. 2, p. 272-284, 2009.
- BEKERS, M.; SHVINKA, J.; RAIPULIS, J.; LAIVENIEKS, M.; PANKOVA, L.; MEZBARDE, I. Strain *Zymomonas mobilis* – The producer of levan. *Latvian Patent*, n. 5909, 1993.
- BNDES/CGEE. Bioetanol da Cana-de-Açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. *Centro de gestão e estudos estratégicos*. Rio de Janeiro, 2008.
- BRANCO, S. M.; MURGEL, E. Poluição do ar. São Paulo: *Moderna*, 2000.
- BRINGER, S.; FINN, R. K.; SAHM, H. Effect of oxygen on the metabolism of *Zymomonas mobilis*. *Archives of Microbiology*, v. 139, p. 376–381, 1984.
- BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, W. D.; SOUZA, A. P. As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: Cortez, L.A.B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. *Editora Blucher*, 2010.
- CABRERA, S. L.; GÓMES, A. A.; MARTÍNEZ, A.; QUINTERO, R. Biocombustibles a partir de recursos lignocelulósicos: estudio del caso, bagazo de caña em México, Centro de Investigación en Biotecnología - UAEM, Instituto Mexicano del Petróleo, *Instituto de Biotecnología-UNAM*. p. 21, 2000. Disponível em: www.unam.mx/pue/cuartaindex.htm. Acesso em 23 janeiro de 2011.
- CALAZANS, G. M. T. Fermentação etanólica por *Zymomonas mobilis* (Cepa ZAP). *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pernambuco, 1987.
- CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O.; SOUZA, M. F. V. Q.; MARÇAL, S. F.; LOPES, C. E. Produção de etanol e levana por *Zymomonas mobilis* amostra ZAP, em meio de sacarose. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*, v. 32, n.4, p. 631-636, 1989.
- CALAZANS, G. M. T.; RIOS, E. M.; FALCÃO DE MORAIS, J. O. Efeito da concentração de glicose, pH inicial e da temperatura na fermentação alcoólica por *Z. mobilis* ZAP. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.33, p. 439-455, 1990.
- CANILHA, L.; MILAGRES, A. M. F.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; ROCHA, G. J. M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. *Analytica*, v. 44, p.1-6, 2010.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugar cane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.
- CAZETTA, M. L.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S.; SILVA, R. S. F. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 747- 751, 2005.

CHENG, K.; CAI, B.; ZHANG, J.; LING, H.; ZHOU, Y.; GE, J.; XU, J. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate - for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 105-109, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf. Acesso em 17 de janeiro de 2012.

DALLY, E. L.; STOKES, H. W.; EVELEIGH, D. E.; A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. *Biotechnology Letters*, v. 4, p. 91-96, 1982.

DEANDA, K., ZHANG, M., EDDY, C.; PICATAGGIO, S. Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 62, p. 4465–4470, 1996.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 19, p. 220-225, 1996.

DING, M. Z.; WANG, X.; YANG Y.; YANN Y. J. Metabolomic Study of interactive effects of phenol, furfural, and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae*. *A Journal of Integrative Biology*, v. 15, n. 10, 2011.

DOELLE, H. W.; KIRK, L.; CRITTENDEN, R.; TOH, H. *Zymomonas mobilis* – Science an industrial application. *Critical Reviews in Biotechnology*, London, v. 13, p. 57-98, 1993.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C. H. *Zymomonas mobilis*: a promising microorganism for alcoholic fermentation. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 30, n. 2, p. 361-380, 2009.

ERNANDES, F. M. P. G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Análise dos parâmetros cinéticos para produção de levana por *Zymomonas mobilis* utilizando fermentação submersa. *Acta Scientiarum. Technology*, v. 31, n. 1, p. 35-41, 2009.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. *Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 75-91, 1993.

GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n.6, p. 618-628, 2002.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. v. 108, p. 41–65, 2007.

GUTEIRREZ-PADILLA, M. G. D.; KARIM, M. N. Influence of furfural on the recombinant *Zymomonas mobilis* strain CP4 (pZB5) for ethanol production, *The Journal of American Science*, v.1, n.1, p. 24-27, 2005.

GUNASEKARN, P.; KARUNAKARAN, T.; KASTHURIBAI, M. Fermentation pattern of *Zymomonas mobilis* strains on different substrates – a comparative study. *Journal Bioscience, India*, v. 10, p. 181-186, 1986.

- HARDER, M. N. C.; ROCHA, A. A.; CAMPOS, A. G.; SHIROMA, D. R.; SHIROMA, S. Contributions of cane sugar ethanol in mitigation of greenhouse gases. *Bioenergia em revista: diálogos*, p. 84-92, 2011.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.
- HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., FONSECA, C., SPENCER-MARTINS, I., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 937-953, 2007a.
- HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., JEPPSSON, M., GORWA-GRAUSLUND, M.F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, v. 108, p. 147–177, 2007b.
- HEER, D., SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. *Microbial Biotechnology*, v.1, p. 497-506, 2008.
- JOACHIMSTHAL, E.; HAGGETT, K. D.; JANG J. H.; ROGERS, P. L. A mutant of *Zymomonas mobilis* ZM4 capable of ethanol production from glucose in the presence of high acetate concentrations. *Biotechnology Letters*, v. 20, p. 137–142, 1998.
- JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts – the effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*. v. April/May, p. 42-49, 1981.
- KANG, A. S.; HONG, K.; JANG, K.; KIM, Y. Y.; CHOUE, R.; LIM, Y. Altered m-RNA expression of hepatic lipogenic enzyme and PPAR α in rats fed dietary levan from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.17, p. 419-426, 2006.
- KIM, J. S.; PARK, S. C.; KIM, J. W.; PARK J. C.; PARK, S. M.; LEE, J. S. Production of bioethanol from lignocellulose: Status and perspectives in Korea. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4801-4805, 2010.
- KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.66, p. 10-26, 2004.
- KOSARIC, N.; VARDAR-SUKAN, F. Potential source of energy and chemical products. In: The biotechnology of ethanol: classical and future applications. WILEY, V.C. H.; VERLAG, G. M. B. H ; CO, K.G.A.A, *Editors Roehr*, 2001.
- LAU, M. W.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E. Comparing the fermentation performance of *Escherichia coli* KO11, *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Zymomonas mobilis* AX101 for cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, v.3, p.11, 2010.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D.; TOLAN, J. S. Comparative ethanol productivities of different *Zymomonas* recombinants fermenting oat hull hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.91, p. 133-146, 2001.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Processos Enzimáticos e Fermentativos. *Edgard Blucher Ltda*, v. 3, 2001.

- LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current states and prospects. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 69, p. 627-642, 2006.
- MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. *Estudos Avançados*, v. 21, n. 59, p.157-165, 2007.
- MARTIN, C., JONSSON, L. J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocelluloses derived fermentation inhibitors. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 32, p. 386–396, 2003.
- MCMILLAN, J. D. Conversion of hemicellulose hydrolyzates to ethanol. *ACS Symposium Series*, v. 566, n. 21, p. 411-437, 1994.
- MICHEL, G. P. F.; STARKA, J. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 165, n.3, p. 1040-42, 1986.
- MODIG T, LIDEN G, TAHERZADEH MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal* n. 363, p. 769–776, 2002.
- MOHAGHEGHI, A., EVANS, K., CHOU, Y. C.; ZHANG, M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101 *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 98, n. 100, p.885–898, 2002.
- MOHAGHEGHI, A.; SCHELL, D. J. Impact of recycling stillage on conversion of dilute sulfuric acid pretreated corn stover to ethanol. *Biotechnology Bioenergy*, v.105, n. 5, p. 992-996, 2009.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.
- NEISH, A. C.; WOOD, A. C. B. Dissimilation of glucose by yeast at poised hydrogenion concentrations. *Canadian Journal of Technology*, v. 29, p. 123-9, 1950.
- PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; B. HAHN-HAGERDAL. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *S. cerevisiae* in bath culture. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 62, p. 447-454, 1999.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 17-24, 2000.
- PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. The effect osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *Journal of Institute of Brewing*, v. 8, n. 6, p 207 - 10, 1980.
- PEREIRA Jr., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. In Series on Biotechnology, *Ed. Amiga Digital UFRJ*, v. 2, p. 45, 2008.
- PLESSET, J.; PALM, C.; MCLAUGHLIN C. S. Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 108, p. 340-1345, 1982.

- PURWADI, R.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M. J. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 8, p.920-932, 2007.
- RABELO, S. C.; AMEZQUITA FONSECA, N. A.; ANDRADE, R. R.; MACIEL FILHO, R.; COSTA, A.C. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. *Biomass & Bioenergy*, p. 2600-2607, 2011.
- RANATUNGA, T. D.; JERVIS J.; HELM, R. F.; MCMILLAN, J. D.; HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) xylose fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 67, p. 185-98, 1997.
- RANKINE, B. C.; BRIDSON, D.A. Glycerol in Australian wine and factors influencing its formation. *America Journal of Enology and Viticulture*, v. 22, p. 6-12, 1971.
- ROGERS, P. L.; JOACHIMSTHAL, E. L.; HAGGETT, K. D. Ethanol from lignocellulosics: potential for a *Zymomonas*-based process. *Australasian Biotechnology*, v. 7, n. 4, p. 304-309, 1997.
- ROGERS, P. L.; JEON, Y. J.; LEE, K. J.; LAWFORD, H. G. *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.*, v. 108, p. 263-288, 2007.
- ROGERS, P. L.; LEE, K. L.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E. Ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Advances in Biochemical Engineering*, n. 23, p. 37-84, 1982.
- ROSEN, M. A. Assessing energy technologies and environmental impacts with the principles of thermodynamics. *Applied Energy*, v. 72, p. 427-441, 2002.
- RUANGLEK, V.; MANEEWATTHANA, G.; TRIPETCHKUL, S. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by *Zymomonas mobilis*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 1432-1437, 2006.
- SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270-5295, 2008.
- SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B., GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e de agitação. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2010.
- SEO, J. S.; CHONG, H.; PARK, H. S.; YOON, K.O, JUNG, C.; KIM, J. J.; HONG, J. H.; KIM, H.; KIM J. H.; KIL, J. I.; PARK, C. J.; OH, H. M.; LEE, J. S.; JIN, S. J.; UM, H. W.; LEE, H. J., OH, S. J., KIM, J. Y.; KANG, H. L.; LEE, S. Y.; LEE, K. J.; KANG, H. S. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nature Biotechnol.*, v. 23, p.63-68.18, 2005.
- SHENE, C.; BRAVO, S. *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 323-328, 2001.

SILVEIRA, M.M.; WISBECK, E.; LEMMEL, C.M.; ERZINGER, G.S.; LOPES DA COSTA, J.P.; BERTASSO, M.; JONAS, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal Biotechnology*, v. 75, p 99-103, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p. 152-177, 1999.

STANBURY, P.F.; WHITAKER A.; HALL, S.J. Principles of Fermentation Technology, p. 93-121. *Oxford*, 1995.

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

SWINGS, J; DE LEY. The biology of *Zymomonas*. *Bacteriological Reviews*, v. 41, p. 1-46, 1977.

SZWARC, A. O Etanol e o Controle de Emissões de Gases de Efeito Estufa. Disponível no site: < http://felix.ib.usp.br/bib138/etanol_controle_gases.pdf. Acesso em 06 de março 2011.

TOFIGHI, A.; AZIN, M.; MAZAHARI ASSADI, M.; ASSADI-RAD, M. H. A.; NEJADSATTARI, T. E FALLAHIAN, M. R. Inhibitory effect of high concentrations of furfural on industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Environmental Research*, v. 4, n. 1, p. 137-142, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. Microbiology. *Art Méd*, 6 ed, 2002.

TOSSETO, G. M., Influência da matéria-prima no comportamento cinético de leveduras na produção de etanol. *Dissertação de mestrado* – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Brasil, 2002.

ÚNICA. União da indústria da cana-de-açúcar. <<http://www.unica.com.br/FAQ/>> Acesso em 04 de outubro de 2011.

URQUIAGA, S.; ALVES, B. J. R.; BOODEY, R. M. Produção de biocombustíveis, a questão do balanço energético. *Revista de Política Agrícola*, v.14, n. 5, p. 42-46, 2005.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loof a sponge *Luffa Cylindrica*. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 240-243, 2006.

VIIKARI, L.; GISLER, R. By-products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 23, p. 240-244, 1986.

VORE, R. D.; TALBURT, D. E. The effects of gas sparging on growth and glucose utilization of *Zymomonas mobilis* at low glucose concentrations. *Biotechnology Letters*, v. 15, n.10, p.1067-1070, 1993.

WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology. *Jonh Wiley and Sons Ltd. England*, ed. 1, 1998.

YANG, S.; LAND, M. L.; KLINGEMAN, D. M.; PELLETIER, D. A.; LU, T. Y.; MARTIN, S. L.; GUO, H. B.; SMITH, J. C.; BROWN, S. D. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 23, p. 10395-400, 2010.

YANG, S., PAPPAS, K. M., HAUSER, L. J., LAND, M. L., CHEN, G.-L., HURST, G. B., PAN, C.; KOUVELIS, V. N.; TYPAS, M. A.; PELLETIER, D. A.; KLINGEMAN, D. M.; CHANG, Y. J.; SAMATOVA, N. F.; BROWN, S. D. Improved genome annotation for *Zymomonas mobilis*. *Nature Biotechnology*, v. 27, p. 893–894, 2009.

ZHANG, M., EDDY, C., DEANDA, K., FINKESTEIN, M.; PICATAGGIO, S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanogenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, v. 267, p. 240–243, 1995.