UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS

Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* a partir da Fração Hemicelulósica de Sorgo Sacarino Aplicando Sistemas de Células Imobilizadas

ANA PAULA DA SILVA

Orientadores: Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)
Ivaldo Itabaiana Junior, *DSc*

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2019

Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* a partir da Fração Hemicelulósica de Sorgo Sacarino Aplicando Sistemas de Células Imobilizadas

ANA PAULA DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Processo Bioquímicos (*MSc*).

ORIENTADORES

Nei Pereira Junior, *PhD* (EQ/UFRJ)

Ivaldo Itabaiana Junior, *DSc* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Silva, Ana paula da
Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por
587 Propionibacterium acidipropionici a partir da Fração
Hemicelulósica de Sorgo Sacarino Aplicando Sistemas
Silvea de Células Imobilizadas / Ana paula da Silva. --
Rio de Janeiro, 2019.
99 f.

Orientador: Nei Pereira Junior.
Coorientador: Ivaldo Itabaiana Junior.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2019.

1. Ácido propiônico. 2. Imobilização de células. 3. Hidrolisado hemicelulósico. 4. Propionibacterium acidipropionici. 5. Lignocelulósicos. I. Pereira Junior, Nei, orient. II. Itabaiana Junior, Ivaldo, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici* a partir da Fração Hemicelulósica de Sorgo Sacarino Aplicando Sistemas de Células Imobilizadas

ANA PAULA DA SILVA

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química da Universidade Federaldo Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências (*MSc*), sob orientação dos professores Nei Pereira Jr. e Ivaldo Itabaiana Jr.

Banca examinadora:

Prof. Nei Pereira Jr., *PhD* (EQ/UFRJ)
(Orientador-Presidente)

Prof. Ivaldo Itabaiana Jr., *DSc*(EQ/UFRJ)
(Coorientador)

Profª Andréa Medeiros Salgado, *DSc* (EQ/UFRJ)

Profª Eliana Mosse Alhadeff, *DSc* (EQ/UFRJ)

Rio de Janeiro, RJ – Brasil
2019

À minha família, que sempre foi minha base e motivação para alçar voos em busca dos meus sonhos, aos amigos que direta ou indiretamente me incentivaram nos momentos difíceis e de incertezas. Sem vocês não teria sentido toda essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que eu pudesse realizar este trabalho, me dando bom ânimo para seguir em frente, sem me deixar abater por todos obstáculos enfrentados.

Ao professor e amigo Nei Pereira Jr, por acreditar no meu potencial, me acolher nas dependências do seu laboratório e a mim confiar a capacidade de realizar este trabalho e acima de tudo, pela sua orientação e imensa contribuição na minha formação, tanto profissional como pessoal.

Ao professor Ivaldo Itabaiana Jr, pela sua coorientação e contribuição neste nesta pesquisa.

À minha mãe Neuza Maria e ao meu Pai, Paulo Idalino, por me apoiarem e me conduzirem no caminho correto e seguir sempre em busca dos meus sonhos.

À minha irmã, Daniele Cristina da Silva, por me apoiar e entender os momentos que tive que me dedicar somente aos estudos. Ao meu irmão Rafael da Silva, a minha cunhada Sivana Macedo e meus lindos sobrinhos Daniel e Julia pelo incentivo e amor a mim dedicados. Aos meus amigos de farda, que me apoiaram e ajudaram de alguma forma.

Ao meu ao namorado, Everson Vasconcelos por todo apoio e incentivo por me acompanhar nas incansáveis idas ao laboratório aos finais de semana, muito obrigada, seu apoio foi fundamental.

À minha irmã e amiga linda e maravilhosa, Daiane Suffredini. Você é muito querida e especial em minha vida.

À amiga Daiana Wischral, pela paciência ao me ensinar e ajudar no início desse trabalho. Ao amigo Fabio Andrade por toda contribuição e ajuda indispensáveis.

A todos os amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), pela amizade e contribuição que cada um pode dar durante o tempo que aqui estive.

Ao meu amigo e parceiro de pesquisa Rafael Cavalcanti, juntos podemos realizar a troca de conhecimentos ao longo dessa pesquisa.

Ao grande amigo Luiz Cláudio, por todo incentivo e amizade a mim dispensadas ao longo de todos os anos de que nos conhecemos.

Ao amigo Douglas França pela troca de conhecimento e pela amizade e carinho a mim dispensados ao longo dos meus dias no laboratório.

Aos, Mariana Mello, Rodrigo Fernandes, Manuela Temtemplates, Cláudia Giannini, Teresa Cristina, Maria Ângela, Isis Mendes, Marcos Salvino, Ruan Stevan e todos amigos que de alguma forma contribuíram para que meus dias fossem melhores e mais felizes dentro desses dois anos que estive nas dependências do Laboratório de desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO).

“*O universo sempre nos ajuda a lutar por nossos sonhos. Porque são nossos sonhos, e só nós sabemos o quanto nos custa sonhá-los*...”

Paulo Coelho

RESUMO

SILVA, Ana Paula. **Avaliação da Produção de Ácido Propiônico por *Propionibacterium acidipropionici*a partir da Fração Hemicelulósica de Sorgo sacarino Aplicando Sistemas de Células Imobilizadas.**Dissertação de Mestrado Acadêmico. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Orientadores: Nei Pereira Jr., *PhD* e Ivaldo Itabaiana Jr., *DSc*

A finitude e a dependência de fontes fósseis de energia e de matérias-primas por diversos setores da economia têm se mostrado ambientalmente insustentáveis, o que tem despertado a academia e as indústrias para desenvolvimento de novos processos que incorporem a renovabilidade. A diversificação da obtenção de novos produtos a partir da biomassa lignocelulósica aliada a processos bioquímicos com a geração de energia integra o conceito de biorrefinaria. Nesse contexto, a produção de ácido propiônico, substância largamente aplicada nas indústrias alimentícia e química, tem se destacado. Nesse estudo, avaliou-se o desempenho de células de *Propionibacterium acidipropionici* livres e imobilizadas em esferas de alginato de sódio na produção de ácido propiônico a partir de xilose comercial e hidrolisado hemicelulósico, sendo também determinadas as propriedades físicas e físico-químicos das esferas obtidas na ausência e presença de células. Os resultados dessas medidas forneceram os seguintes valores para os beads carregados com células: densidade (0.99 ± 0.04 $g.cm^{-3}$); circularidade (0.94 ± 0.04); porosidade (0.39 ± 0.02). Adicionalmente, ensaios de absorção de cálcio durante o processo de imobilização e difusão de xilose e ácido propiônico em esferas na ausência de células foram realizados, permitindo uma avaliação preliminar do tempo necessária à gelificação, os valores foram de 50 min, 7,1 g/L.h e 33,7 g./L.h. A característica da linhagem utilizada em fermentar xilose foi demonstrada em sistemas com células livres e imobilizadas. Os resultados apontam um aumento de aproximadamente 52% da concentração do ácido da primeira batelada (14,3 g/L) quando comparado a segunda (21,8 g/L) usando meio contendo xilose e uma redução (22%) da concentração do mesmo quando utilizado meio hidrolisado (11,1 g/L). Os percentuais de redução de substrato foram 98%; 99,1% e 34%, respectivamente. A produtividade volumétrica assumiu os seguintes valores: 0,061 g/L.h ; 0,343 g/L.h e 0,053 g/L.h, respectivamente, com fator de rendimento de 0,378 g/g quando utilizado meio hidrolisado. As células foram capazes de fermentar eficientemente o hidrolisado hemicelulósico, após duas fermentações em meio quimicamente definido, contendo xilose e também seu desempenho foi observado quando utilizado meio hidrolisado. Em que pese o caráter inicial do presente trabalho de pesquisa (produção de ácido propiônico com células imobilizadas em alginato de cálcio), os resultados sinalizam para estudos adicionais visando otimizar o processo de produção deste importante ácido orgânico, que se presta a bloco de construção para a síntese de uma série de moléculas de interesse comercial.

Abstract

SILVA, Ana Paula. **Evaluation of the Production of Propionic Acid by *Propionibacterium acidipropionicii* from the Hemicellulosic Fraction of Saccharin Sorghum Applying Immobilized Cell Systems.** Dissertation of Academic Master. School of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Advisors: Nei Pereira Jr. and Ivaldo Itabaiana Jr.

The finitude and dependence of fossil sources of energy and raw materials across various sectors of the economy have proved to be environmentally unsustainable, which has awakened academia and industries to develop new processes that incorporate renewability. The diversification of the acquisition of new products from the lignocellulosic biomass allied to biochemical processes with the generation of energy integrates the concept of biorefinery.In this context, the production of propionic acid, a substance widely applied in the food and chemical industries, has been outstanding. In this study, the performance of free and immobilized *Propionibacterium acidipropionici* cells in sodium alginate spheres in the production of propionic acid from commercial xylose and hemicellulosic hydrolyzate was evaluated, and the physical and physicochemical properties of the spheres obtained in the absence and presence of cells. The results of these measurements provided the following values for beads loaded with cells: density (0.99 ± 0.04 $g.cm^{-3}$), circularity (0.94 ± 0.04), porosity (0.39 ± 0.02).Additionally, calcium absorption assays during the immobilization and diffusion of xylose and propionic acid in spheres in the absence of cells were performed, allowing a preliminary evaluation of the time required for gelation, the values were 50 min, 7.1 g / Land 33.7 g / L. The characteristic of the strain used in xylose fermentation was demonstrated in systems with free and immobilized cells. The results indicate an increase of approximately 52% in the acid concentration of the first batch (14.3 g / L) when compared to the second (21.8 g / L) and a reduction 22% hydrolyzed (11.1 g / L). The percentages of substrate reduction were 98%; 99.1% and 34%, respectively. The volumetric productivity assumed the following values: 0.061 g / L.h; 0.343 g / L.h and 0.053 g / L.h, respectively, with yield factor of 0.378 g / g. The cells were able to efficiently ferment the hemicellulosic hydrolyzate after two fermentations in a chemically defined medium containing xylose and their performance was observed when using hydrolyzed medium. Despite the initial character of the present research (production of propionic acid with cells immobilized in calcium alginate), the results signal to additional studies to optimize the production process of this important organic acid, which lends itself to a building block for the synthesis of a series of molecules of commercial interest.

LISTA DE FIGURAS

Figura1. Estrutura do Ácido Propiônico (AP) 5
Figura 2. Via metabólica das *Propionibacteium sp*. utilizando xilose e Glicose 12
Figura 3. Rota metabólica do glicerol 13
Figura 4. Estrutura fibrosa do material lignocelulósico composto por lignina hemicelulose e celulose 17
Figura 5. Representação das ligações de hidrogênio das ligações intra e intermoleculares, e cristalinidade da estrutura 18
Figura 6. Esquema representando a Estrutura da hemicelulose 19
Figura 7. Alcoóis precursores na formação da estrutura da lignina 20
Figura 8. Ação do pré- tratamento em materiais lignocelulósicos 22
Figura 9. Aspecto das biomassas *in natura* e após pré- tratamento 23
Figura 10. Ação das enzimas na desconstrução das cadeias poliméricas de celulose com geração de glicose 24
Figura 11. Divisões da estrutura da vegetal do sorgo 26
Figura 12. Esquema de Biorrefinaria baseada em rotas renováveis 28
Figura 13. Formação de rede polimérica de gel alginato de cálcio 34
Figura 14. Micrografia das células *P. acidipropionici* CIP53164 39
Figura 15. Cultura estoque reativada 39
Figura 16 . Curva padão para *propionibacterium acidipropionici* 40
Figura 17. Fracos com pré-inóculo e inóculo respectivamente 42
Figura 18. Esquema experimental para preparação dos beads de alginato pela técnica de gelificação inotrópica 44
Figura 19. Fracos cônicos onde eram realizadas as fermentações 50
Figura 20. Hidrolisado hemicelulósico após ajuste de pH 51
Figura 21. Cromatograma para ácidos orgânicos analisados Ácidos analisados: succínico, fórmico, acético e propiônico 52
Figura 22. Curvas de assimilação de susbstrato, onde (A) representa a curva de crescimento em Glicose e curva (B) representa crescimento em Xilose 55
Figura 23. Distribuições de diâmetros e arredondamento para as esferas de alginato carregadas com células de *P. acidipropionici* e não carregadas 57
Figura 24. Efeito da presença de células *P. acidipropionici* imobilizadas em esferas de alginato. 60

Figura 25. Curva de captação de cálcio para o processo de gelificação de esferas de alginato 61
Figura 26. Curva de absorção de ácido propiônico (A) e xilose (B) por esferas de alginato de cálcio 64
Figura 27. Perfil da fermentação com células imobilizadas utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial 66
Figura 28. Perfil da fermentação com células livres (desprendidas dos *beads*) utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial 67
Figura 29. Perfil cinético de fermentação com células imobilizadas utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial 68
Figura 30. Reutilização de *beads* de alginato utilizando hidrolisado hemicelulósico (FCIMH) e meio quimicamente definido contendo xilose comercial (FCIMS) 69
Figura 31. Reutilização dos *beads* na fermentação propiônica 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais propriedades físicas do ácido propiônico 6

Tabela 2: Novas nomeclaturas de espécies do gênero *Propionibacterium* 10

Tabela 3: Diferenças estruturais entre celulose e hemicelulose 19

Tabela 4: Percentual químico das matérias primas lignocelulósicas 21

Tabela 5: Tipos de sorgo e suas aplicações 27

Tabela 6: Vantagens e desvantagens da imobilização celular 30

Tabela 7: Composição do meio de ativação 38

Tabela 8: Meio RCB (Reinforced Clostridial Broth da Difco) 42

Tabela 9: Composição do meio de fermentação (TSB) 50

Tabela 10: Composição do bagaço de sorgo sacarino 53

Tabela 11: Composição do hidrolisado hemicelulósico 54

Tabela 12: Caracterização física dos beads na prença e ausencia de células *P. acidipropionici* CIP53164 58

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÂO.....1
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRAFICA 5
2.1 Ácidopropiônico: propriedades e aplicações.....5
2.1.1 Produção de Ácido Propiônico.....7
2.1.2 Via Química 7
2.3 A fermentação Propiônica.....11
2.4 A biomassa lignocelulósica.....16
2.4.1 Estrutura dos materiais lignocelulósicos 17
2.4.1.1Celulose.....17
2.4.1.2 Hemicelulose.....18
2.4.1.3 Lignina 19
2.4.1.4 Compostos extrativos 20
2.5Pré-tratamentos materiais lignocelulósicos 21
2.5.1Pré-Tratamento Físico 22
2.5.2 Pré-Tratamento Químico 22
2.5.3 Tratamentos Biológicos 24
2.6Sorgo Sacarino como insumo para produçãode Ácido Propiônico 25
2.7 Conceito de Biorrefinaria 27
2.8.1 Tipos de imobilização.....31
2.9 Aprisionamento com Alginato de Cálcio 32
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....35
3.1 Caracterizaçõesda matéria prima 35
3.2 Pré- tratamento Ácido.....37
3.3Microrganismos, manutenção e ativação 37
3.3.1 Ativação do estoque e manutenção das células.....38
3.3.2Curva Padrão para *P. Acidipropionici CIP 53164*.....40
3.4 Meios de Cultivo.....41
3.4.1 Pré-Inóculo e Inóculo 41
3.4.2 Propagação e concentração de biomassa de células 43
3.5 Sistema de Imobilização de células e caracterização das esferas 43
3.5.1Sistema de Imobilização de Células.....43
3.5.2 Caracterizações físicas do suporte de imobilização 44
3.5.3 Diâmetros das esferas e circularidade 44
3.5.4 Densidade do leito e porosidade das esferas 45

3.5.5 Densidade das esferas de alginato 45
3.5.6 Análise das esferas de alginato por Microscopia de varredura eletrônica 45
3.5.7 Curva de absorção de Cálcio.....46
3.5.8 Curvas de absorção de xilose e ácido propionico.....46
3.6 Determinaçõesdonúmerode células aprisionadas e quantiade de esferas 48
3.7 Meio e condições de Fermentação 49
3.7.1 Meio comercial (MQD) 49
3.7.2Meio com Hidrolisado Hemicelulósico (MHH).....50
3.7.3 Determinação da concentração de substratos e produtos 51
3.7.4Cálculos dos parâmetros avaliados na fermentação 52
***CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO*.....53**
4.1 Caracterizações da matéria-prima.....53
4.1.1 Caracterização do bagaço de sorgo 53
4.1.2 Pré-tratamento com ácido diluído.....54
4.1.3 Capacidade do microrganismo de assimilar diferentes substratos54
4.2 Caracterização física dos esferas de alginato 56
4.2.1 Forma, tamanho e propriedades físicas das esfers de alginato de cálcio.....56
4.2.3 Curva de absorção de Ca^{+2} na gelificação de *beads* de alginato....61
4.2.4 Curvas de absorção de ácido propiônico e xilose pelas esferas de alginato 62
4.2.5 Fermentações com células imobilizadas utilizando como substrato xilose comercial e hidrolisado hemicelulósico 65
***CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES e SUGESTÕES* 73**
Referências.....76

CAPÍTULO 1- INTRODUÇÂO

Os avanços tecnológicos e a globalização impulsionam uma grande demanda por produtos estratégicos, principalmente os que são oriundos de fontes fósseis. Todavia há uma preocupação mundial pela substituição da dependência de petróleo que gira em torno tanto do ponto de vista ambiental quanto econômico (PARAJULI *et al.,* 2015).

Acordos internacionais como o Protocolo de Kyoto (1997) e recentemente o Acordo de Paris (2016) indicam o caminho para redução das emissões de gases do efeito estufa (GEE) e consequente redução da dependência de petróleo, o que tem gerado efeitos significativos. No Brasil segundo dados do Sistemas de Estimativas de Gases do Efeito estufa (SEEG 2018), no ano de 2017 houve um saldo positivo em relação à emissão desses gases, quando comparado ao ano anterior, mostrando que os esforços estão surtindo efeitos.

Segundo um estudo realizado pela Empresa de Pesquisa Energética (EPE) em 2018, a matriz energética mundial é composta na sua totalidade por fontes não renováveis. Em contrapartida o Brasil tem utilizado mais fontes renováveis que o resto do mundo, de acordo com o estudo supracitado, cerca de 17% da matriz energética é composta por fontes renováveis. Isso se deve principalmente aos derivados da cana-de-açúcar, evidenciando que o Brasil tem grande potencial de reduzir a dependência das fontes não renováveis como o petróleo, migrando para uma matriz energética mais ambientalmente favorável.

Estudos mostram que a biomassa é uma importante alternativa para produção de energia limpa, por ser oriundo de matéria-prima orgânica o que demanda um baixo valor agregado para a indústria, e por possuir grande disponibilidade (PARAJULI *et al*., 2015).

Abrangendo o conceito de biomassa, encontram-se as matérias-primas lignocelulósicas, cuja estrutura vegetal é basicamente composta pelas frações (lignina, celulose e hemicelulose). Do ponto de vista industrial e biotecnológico a biomassa lignocelulósica, cujo substrato é de origem natural é grande candidata a (bio)-transformação de alto valor e relevância industrial (AREVALO-GALLEGOS et al., 2017).

As matérias-primas lignocelulósicas para a produção de bioenergia e outros materiais advindos das fontes renováveis incluem o uso de resíduos agrícolas e hortaliças; resíduos florestais; sólidos urbanos; esterco; gramíneas; culturas energéticas; plantas aquáticas e resíduos de papel e de algodão (FAHDet al.,2012).Para que a matéria prima possa ser utilizada em biorrefinarias, esta tem que atender alguns critérios estabelecidos, como a adaptação climática, o seu potencial por hectare, sazonalidade, característica da biomassa, alta disponibilidade, e principalmente possuir o substrato.

O ácido propiônico (AP) é um ácido orgânico de grande importância para indústria química, onde é utilizado como bloco de construção, além de precursor de inúmeras moléculas estratégicas. De acordo com o Departamento de Energia dos EUA, este ácido foi eleito entre os dez ácidos orgânicos com maior potencial para serem produzidos a partir de matéria prima de origem vegetal. (WERPY *et al*., 2004).

Um grupo de origem européia também lançou um estudo onde selecionava 21 compostos em sua maioria ácidos orgânicos, entre eles o ácido propiônico, com potencial de produção a partir de matéria prima renovável (WERPY & PETERSEN, 2004; PATEL, 2006). Além disso, o ácido propiônico tem aplicação como conservantes em alimentos e sementes, como precursor de termoplásticos, aromas, perfumes, drogas e solventes (BOYAVAL & CORRE, 1995). Atualmente a produção do ácido propiônico é majoritariamente conduzida pela rota petroquímica, em 2013 a capacidade de produção atingiu aproximadamente 400 milhões de libras nos EUA (WANG et al., 2013). A variação do preço do barril de petróleo, tem impulsionado o interesse em produzir ácido propiônico a partir de fontes renováveis (FENG et al.,2010; *apud* WANG & YANG, 2013). A partir de rotas bioquímicas é possível transformar biomassa vegetal (oriunda de fontes renováveis) em biomoléculas de grande valor agregado para o mercado, empregando o conceito de biorrefinaria (EKMAN & BORJESSON, 2011). Sendo está uma alternativa de contornar a dependência de rotas petroquímicas para produção do ácido em questão.

Pesquisas recentes mostraram que diferentes biomassas podem ser empregadas nos processos fermentativos, contudo alguns inconvenientes são acarretados em decorrência do processo, tais como, baixo rendimento e produtividade, devido a inibição do crescimento celular por altas concentrações de produto, e além das variações de pH que ocorrem durante o processo de fermentação.

Para amenizar os problemas e melhorar o rendimento e produtividade no processo de bioprodução do AP, várias estratégias têm sido adotadas; como a imobilização celular,o emprego de bactérias tolerantes ao ácido propiônico, e aplicação de bioreatores com reciclo (HUANG et al., 2002, apud CASTRO, 2014). Nesse contexto, as matérias-primas lignocelulósicas estabelecem um papel importante na busca por fontes alternativas de energia.

Santos (2014) relata que a biomassa lignocelulósica é o recurso renovável mais abundante e mais empregada em biorrefinaria, por possuírem substratos essenciais ao metabolismo dos microrganismos nos processos fermentativos, além do baixo valor agregado. Contudo, o emprego de biomassa lignocelulósica requer a aplicação de pré-tratamentos, os quais promovem

seletivamente a desconstrução do complexo lignocelulósico, visando fracionar a estrutura primária, de maneira a promover melhores condições para os microrganismos específicos atuarem (MOOD et al.,2013)

Em seu estudo Mood (2013), relata que dentre os pré-tratamentos empregados para se acessar as frações de interesse da matéria-prima lignocelulósica, a aplicação com ácido diluído e o mais reportado na literatura, provocando a hidrólise da fração hemicelulósica, onde se encontra a maior concentração de xilose disponível. No atual cenário da produção de ácido propiônico estão disponíveis dois processos, são eles: a rota química, que já se encontra bem definida, e a rota fermentativa, na qual inúmeros estudos estão sendo realizados para o aprimoramento de obtenção deste produto oriundo de matéria-prima renovável.

Diante do exposto, este trabalho visa estudar a avaliação da rota fermentativa para produção de ácido propiônico por células imobilizadas de *P. acidipropionici* em alginato de cálcio. Também foi avaliada a reutilização dos esferas nos processos fermentativos, onde foi empregada a fração hemicelulósica de sorgo sacarino. Os microrganismos imobilizados são mais resistentes, mais estáveis a variações de pH, de agitação e de esterilidade, a imobilização celular torna também o microrganismo mais potente, por estarem confinados dentro de uma matriz tornando possível a reutilização dos mesmos em processos sequenciais.

CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 Ácidopropiônico: propriedades e aplicações

O ácido propiônico (AP) é um ácido monocarboxílico em cuja sua estrutura é composta por três átomos de carbono. Pela nomenclatura da IUPAC (*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*) o ácido é denominado como propanóico, mas usualmente é conhecido como propílico ou propiônico. Caracterizado pelo odor característico forte, é responsável pelo aroma do queijo suíço, também sendo utilizado como aromatizante de alimentos (DALMASSO *et al*., 2011). A **Figura 1** representa a fórmula estrutural deste ácido.

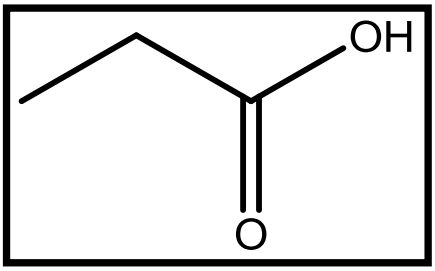


Figura 1: Fórmula estrutural do Ácido Propiônico (AP).

A palavra grega *protos* que significa primeiro e *pion* = gordura, dão origem ao nome ácido propiônico. Este é considerado o ácido de menor cadeia que possui propriedades de ácidos graxos, líquido e miscível em água em qualquer proporção. Quando no estado líquido, é transparente e apresenta considerável corrosividade e odor ligeiramente forte PLAYNE (1985). Entretanto este ácido é sólido em temperatura ambiente, com massa molar a 74g/mol, fórmula molecular ($C_3H_6O_2$) (MCMURRY, 2010). As características físicas e químicas podem ser observadas na **Tabela 1**.

Tabela 1: Principais propriedades físicas do ácido propiônico. Fonte: CASTRO (2014)

Propriedades	Valores
Massa Molar	74,08 g/mol
Ponto de Fusão	-21ºC
Ponto de Ebulição	141ºC
Densidade Relativa	0,99g/cm^3
Ponto de inflamação	54 a 57ºC
Viscosidade	10 mPa.s

O ácido propiônico é considerado um importante intermediário químico (HSU e YANG, 1991). Recentemente vem sendo estudada a aplicação desta molécula na fabricação de poliésteres biodegradáveis FU *et al*., (2014).A globalização de uma infinidade de produtos e a demanda por alimentos com maiores prazos de validade vem impulsionando a produção por ácido propiônico, uma vez que este pode ser aplicado como conservante alimentício, como também em diversos setores da indústria química. Atualmente, o ácido propiônico tem a produção majoritariamente baseada na via química, oriunda de matérias primas derivadas de fontes não renováveis. Todavia, o ácido também pode ser produzido pelas propionibactérias, através da via do ácido dicarboxílico, que tem como subprodutos os ácidos acético e succínico (CORAL *et al*., 2008; GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2000; SUWANNAKHAM e YANG, 2005; ZHANG e YANG,2009; *apud* ZHU, 2010).

A crise do petróleo e consequentemente a busca por fontes sustentáveis e alternativas de energia tem impulsionado pesquisas e investimentos relacionados

a novas rotas de obtenção de produtos que antes eram oriundos e dependentes somente do petróleo. Assim, estudos para bioprodução de AP a partir de fontes renováveis aplicando tecnologia de bioprocessos tem sido incansavelmente explorado (BARBIRATO *et al*., 1997; HUANG *et al*., 2011; ZHU *et al*.; 2010).

2.1.1 Produção de Ácido Propiônico

Em escala industrial, para atender a maior de manda de ácido propiônico, a produção deste ácido é majoritariamente de origem petroquímica, as vias de produção são a oxo-síntese, que utiliza etileno e monóxido de carbono, seguidas por oxidação em fase líquida do aldeído resultante, também da oxidação de propano ou propionitrila (ROGERS *et al.*,2006).Segundo citado por ZHANG e YANG (2009), em 2006 a produção anual de ácido propiônico por rotas petroquímicas atingiu 770 milhões de libras em todo o mundo e uma taxa de crescimento anual de 2,5%. A reação de oxidação da produção deste ácido por via petroquímica pode ser avaliada a seguir.

2.1.2 Via Química

Pela rota química, a produção de ácido propiônico contempla três maneiras de obtenção:

1. **Oxidação do propanal**:

$$C_3H_6O + [O]\ (KMnO_4 / H_2SO_4) \rightarrow CH_3 - CH_2 - COOH$$

2. **Oxidação do propanol:**

$$CH_3 - CH_2 - CH_2 - OH + O_2 \rightarrow CH_3 - CH_2 - COOH$$

3. **Hidrólise de ésteres propiônicos**

$$CH_3 - CH_2 - COO - R + H_2O \rightarrow CH_3 - CH_2 - COOH + R - OH$$

Segundo Castro (2014), os processos oxidativos são catalisados a partir de sais de bases fracas e com temperaturas brandas, com variações de temperatura que ficam na faixa de 40 a 50ºC.

2.1.3 Via fermentativa

Apesar da tecnologia de produção de ácido propiônico ser bem definida, os custos do processo são diretamente influenciados pelo preço do petróleo bruto, que sofre constantes reajustes, diminuindo as diferenças nos custos de produção dentre a via petroquímica e a biotecnológica. Além disso, devido ao risco de esgotamento de petróleo, mais atenção sido dadapara obtenção de biocombustíveis e bioprodutos oriundos de fontes renováveis. (BANKAR *et al.,*2012; SURVASE *et al*.,2011).

Desta forma a produção de ácido propiônico por via fermentativa torna-se uma alternativa robusta e interessante, através da fermentação propiônica. Do ponto de vista ambiental é uma tecnologia limpa, pois além de fazer uso de matérias primas de origem renovável, também são caracterizadas por um baixo custo, o que torna essa rota um atrativo econômico para escala industrial.

As bactérias do gênero *P.acidipropionici,* têm como produto principal a formação de ácido propiônico e como produtos secundários o ácido acético, succínico e CO_2 . Esses subprodutos são formados de maneira simultânea à formação do ácido de interesse, uma vez que é característica do metabolismo do microrganismo a formação destes. Esforço vem sendo feitos para eliminar tais dificuldades e melhorar o rendimento do processo, o que tem gerado resultados interessantes frente a esse novo desafio. Cepas tolerantes a ácido propiônico, reatores com células imobilizadas e reatores com reciclo são exemplos do que têm sido desenvolvido para melhorar o rendimento e a produtividade da fermentação. (HUANG *et al*.,2002)

A fermentação propiônica pode ser conduzida a partir da utilização de uma gama de substratos, que são extraídos da biomassa lignocelulósica. Dentre as cepas mais estudadas na última década para produção de ácido propiônico, encontram-se *Propionibacterium freudenreichii (*FENG *et al*., 2011; XU *et al*.,

2011).*Propionibacterium acidipropionici* (GOSWAMI e SRIVASTAVA, 2000; LIU et al.; 2012; SRIVASTAVA, 2011; LIU *et al*., 2011, 2012; ZHU *et al*., 2012). *Propionibacterium jensenii (*ZHUGE *et al*., 2013). Estudos apontam que a produção microbiana de ácido propiônico utilizando resíduos agrícolas industriais torna a produção desse ácido economicamente viável. Todavia a rota fermentativa exige estudos e aprimoramento e melhoramento de alguns inconvenientes que ocorrem como a inibição pela formação de produtos e as variações de pH. A baixa produtividade volumétrica, rendimento e concentração final de ácido obtido também requerem estudos de otimização, segundo CHANG (2011) *apud* DISHISHA (2012), esses são as principais barreiras, e que necessitam de aprimoramento para serem aplicados em escala industrial.

2.2 Microrganismos - Bactérias Produtoras de Ácido Propiônico

Uma variedade razoável de bactérias capazes de produzir ácido propiônico tem sido reportada na literatura. Dentre estas, destacam-se as propionibactérias (ZHU, 2010 *apud* AHMADI, 2017) contemplou a produção de ácido pelas bactérias do gênero *Propionibacterium acidipropionici, e FENG* (2011), pelas bactérias Propionibacterium *freudenreichii.* Existem ainda estudos que utilizam diferentes gêneros para obtenção de ácido propiônico, como o *Clostridium propionicum*, algumas bactérias do gênero *Bacteriodes, Fusobacterium, Megasphaera, Selenomonas* e *Veillonella. Contudo são pouco reportadas na literatura devido* à baixa produção, pouco crescimento e as dificuldades relacionadas ao cultivo que tornam essas bactérias menos interessantes para obtenção de ácido propiônico (YANG, EL-ENSASHY & THONGCHUL, 2013; HARADA, 2012).

Os principais microrganismos do gênero *Propionibacterium* têm a habilidade de produzir naturalmente ácido propiônico por meio da via do ácido dicarboxílico (THIERRY *et al*., 2011). Sendo por este motivo um dos principais gêneros estudados atualmente Harada e colaboradores. As bactérias desse gênero são Gram positivas, mesofílicas, aerotolerantes, não possuem uma forma bastão, não formam esporos e são imóveis (SUWANNAKHAM *et al*., 2005).

Bactérias do gênero *Propionibacterium* podem ser divididas em dois grupos: as lácteas e as cutâneas. As lácteas não apresentam patogenicidade e

podem ser isoladas do leite e derivados lácteos. Segundo THIERRY *et al.* (2011), asprincipais espécies capazes de prozudir ácido propiônico e derivadas de laticínios são *P. acidipropionici, P. freudenreichii, P. freudenreichi subsp, shermanii, P. jensenii e P. thoenii,* destacando ainda que as bactérias desse gênero podem ocorrer de maneira natural na pele de humanos e animais, como as espécies *P. acnes* e *P.acidifaciens*.

VOROBJEVA (1999) destaca as principais espécies de bactérias cutâneas: *Propionibacterium avidum, Propionibacterium granulosum, Propionibacterium lymphophilum, Propionibacterium propionicu.* Na **Tabela 2**, podem ser observadas algumas espécies do gênero *Propionibacterium* spp com as nomenclaturas atuais.

Tabela 2. Novas nomeclaturas de espécies do gênero *Propionibacterium*. Fonte: VOROBJEVA *et al.*, (1999)

Nomes de espécies aprovadas desde 1998	**Nomes originais das espécies**
	Clássicas
P. freudenreichii	*Propioniferaxinnocua*
P.jensenii	*P. petersonii, P.rafJinosaceum, P. technicum, P. zeae*
P. thoenii	*P. thoenii, P. rubrum*
P. acidipropionici	*P. arabinosum, P. pentosaceum*
*P. coccoides**	*P. eoccoides*
P. cyclohexanicum	*P. cyclohexanicum*
	Cutâneas
P. acnes	*Corynebacteriumaenes*
P. avidum	*C. avidum*
P. granulosum	*C. granulosum*
P. lymphophilum	*C. lymphophilum*
P. propionicum	*Arachniapropionica*
Propioniferaxinnocua	*P. innocuum*

2.3 A fermentação Propiônica

A fermentação propiônica é a principal via de obtenção de energia pelas bactérias propiônicas, onde os principais produtos são os ácidos propiônico, ácido acético, succínico, além de CO_2. Esta fermentação possui os maiores rendimentos sem termos de ATP em comparação com outros tipos de fermentação, gerando 6 moles de ATP por cada 1,5 moles de glicose consumido. Como é a única forma de obtenção de energia, no caso das propionibactérias, o processo é concebido em um ciclo, no qual equivalentes redutores podem ser regenerados, e mais de um tipo de enzima é capaz de catalisar as reações (VOROBJEVA, 1999).

As bactérias propiônicas produzem ácido propiônico a partir da via heterofermentativa, também conhecida como ciclo dos ácidos dicarboxílicos. A principal rota de utilização de glicose para produção de ácido propiônico é a glicólise, responsável por oxidar a glicose em fosfoenolpiruvato (PEP), um intermediário da via glicolítica, pelo ciclo *Embden-Meyerhof-Parnas* (EMP), as enzimas do ciclo das hexoses são as principais responsáveis pela conversão da glicose a piruvato. A partir do piruvato, o fluxo de carbono se divide em duas ramificações, uma compõe a sequência de reações que levam a produção de ácido acético e a outra leva a produção de ácido propiônico, conforme mostrado na **Figura 2** (VOROBJEVA, 1999).

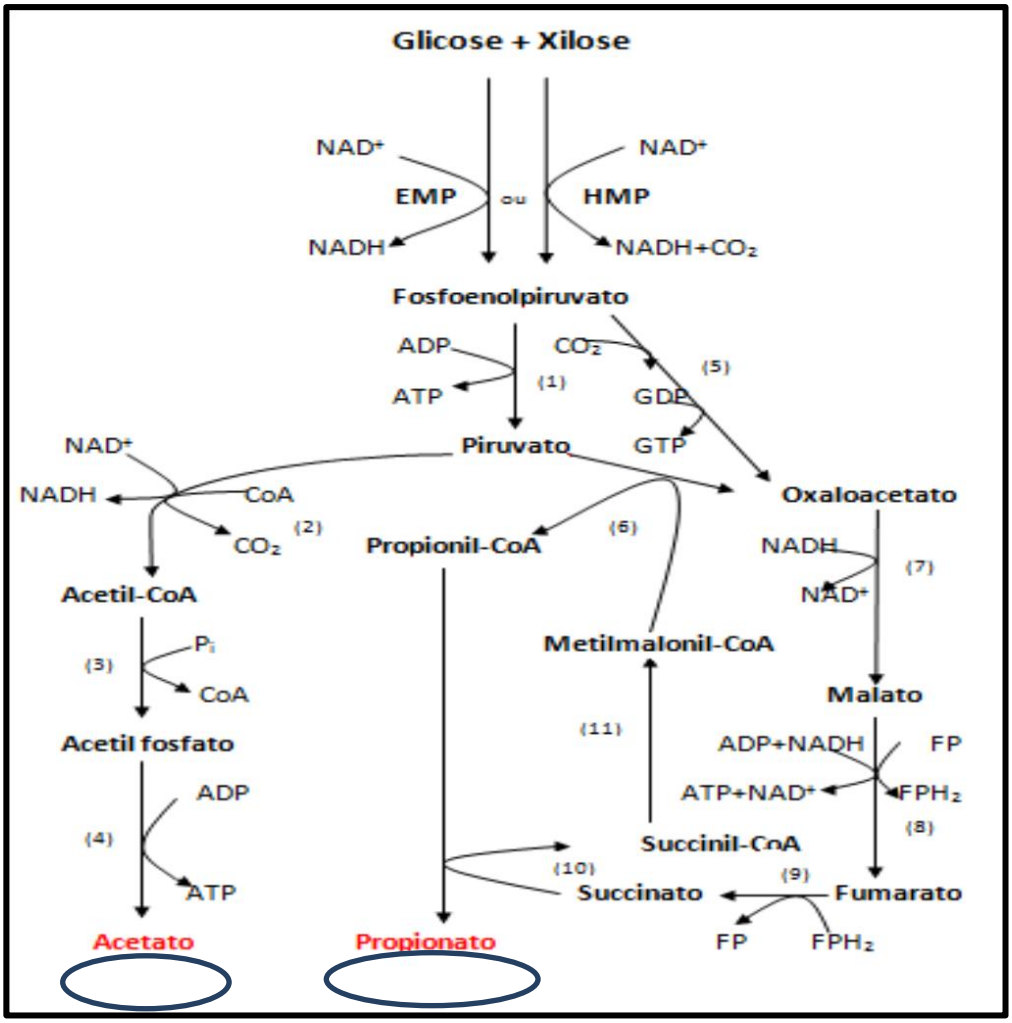


Figura 2: Via metabólica das *Propionibacteium sp*. As enzimas chave estão representadas pelos números (1) piruvato quinase, (2) complexo piruvato desidrogenase, (3), (4) acetato quinase, (5) PEP carboxilase, (6) oxaloacetato transcarboxilase, (7) malato desidrogenase, (8) fumarase, (9) succinato desidrogenase, (10) propionil CoA: succinil CoA transferase e, (11) metil malonil isomerase. Fonte: SUWANNAKHAM, 2005 *apud* CASTRO, 2014.

De acordo com o metabolismo apresentado**,** a via que leva à formação de ácido propiônico supre a célula com NAD^+, necessário na via produtora de ácido acético, na qual o ATP é produzido. As enzimas chave da via de produção do ácido propiônico são a oxalacetatotranscarboxilase e a Propionil-CoA:Succinato-CoAtransferase. Tais enzimas são responsáveis pelo reciclo de CoAe de grupos carboxila nesta via. A enzima oxalacetato transcarboxilase, também nomeada por metilmalonil-CoA carboxitransferase, utiliza biotina para catalisar a reação e, em algumas espécies de bactérias propiônicas, é responsável por gerar gradientes de Na+, os quais fornecem a força motriz necessária para produção de ATP por ATP-

sintases Na+ ou H+ dependentes (VOROBJEVA, 1999; YANG, EL-ENSASHY & THONGCHUL, 2013).

Bactérias propiônicas também podem produzir oxalacetato a partir de uma reação de fixação de CO_2, na qual CO_2 e piruvato são reagidos com auxílio da enzima piruvatocarboxilase, o oxalacetato é então processado para obtenção de ácido propiônico. Essa reação é particularmente importante quando a fonte de carbono é o glicerol. Na **Figura 3**, é exposto a rota de produção a partir de glicerol.

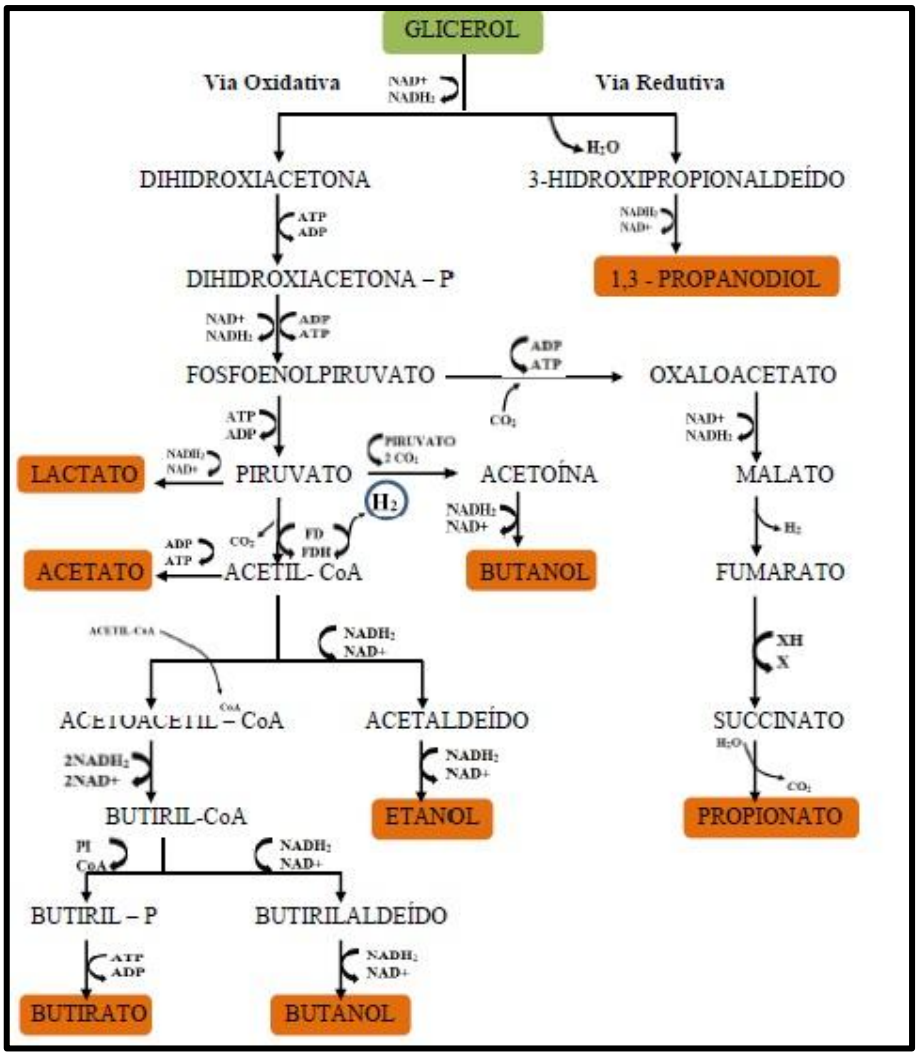


Figura 3: Rota metabólica do glicerol. Fonte: NAZARETH (2015)

O ácido propiônico tem despertado a atenção por ser um importante bloco de construção para indústria química. Este foi eleito pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos entre os 30 melhores produtos químicos com potencial para escala industrial por vias biotecnológicas (WERPEY e PETERSEN, 2004). Podendo também ser convertido em produtos e derivados, como propanoatos ou propionatos.

Segundo relatório global, a desaceleração econômica mundial fez com que o mercado de AP sofresse certo impacto, mas seu crescimento manteve-se otimista, nos últimos quatro anos, a taxa média anual de crescimento de 1,81% crescendo de 722 milhões de dólares em 2014 para 762 milhões de dólares em 2017. Acredita-se que nos próximos anos o mercado de ácido propiônico seja ainda mais expressivo.

Vale ressaltar que esses números são relativos ao ácido propiônico produzidos a partir de rota petroquímica, cujas empresas que dominam o mercado de AP são as alemãs BASF e *Chemisnche Werke Huls*, além da empresa britânica *Distillers Company*, e as americanas *Celanese Chemical Company e Eastmam Chemical* (LIU *et al*.,2012). O Brasil tem seu mercado de ácido propiônico e suas derivações baseadas na importação, onde no ano de 2014 esse número atingiu cerca de 10 mil toneladas na sua totalidade, sendo 4 mil toneladas na forma de ácido e 6,8 mil toneladas na forma de propionato e 580 toneladas sob forma de ésteres propionato (AliceWeb, *apud* BELGRANO, 2018). Esses dados mostram que o mercado deste ácido é bastante promissor, e apesar de ainda não ter uma tecnologia em escala industrial consolidada, a produção de AP via rota bioquímica pode ser uma alternativa interessante do ponto de vista econômico.

Além da glicose, o ácido propiônico pode ser produzido tendo-se glicerol como fonte de carbono. (CHOOKAEW *et al*., 2012; LIU *et al*., 2012). Em outro estudo BOENIGK *et al*.,1993 realizaram experimentos em reatores em batelada utilizando glicerol como substrato. Além de ser facilmente assimilável por muitas espécies de propionibactérias esse substrato tem o mesmo grau de redução que o ácido propiônico o que, em termos do metabolismo, torna desnecessária a produção de outras moléculas para equilibrar o balanço redox, reduzindo a proporção de subprodutos gerada (HARADA, 2012).

Em geral uma razão PA/AA (ácido propiônico/ácido acético) variando de 10/ 20, pode ser obtida com a fermentação do meio contendo glicerol. Uma altíssima produção de ácido propiônico, de 106,0 g/L, foi obtida pela fermentação de glicerol em reator fibroso com células imobilizadas (ZHANG e YANG, 2009; YANG, El-ENSASHY; THONGCHUL, 2013). No estudo de ZHANG e YANG, foi utilizada glicerina como fonte de carbono e, segundo os autores, aparentemente, não houve inibição do microrganismo pelas impurezas presentes neste resíduo, como metanol, ácidos graxos, etc. Isso pode estar relacionado ao fato de a matriz fibrosa utilizada como meio de imobilização, ser capaz de adsorver as impurezas reduzindo o teor das mesmas na corrente fluida (YANG, El-ENSASHY, THONGCHUL, 2013).

DINISHA *et al.* (2012), produziram ácido propiônico em regime de batelada sequencial com reciclo de células, a partir da fermentação de glicerol e extrato de batata, obtendo uma concentração de 25 a 50,8 g/L de ácido, um rendimento em termos de substrato de 0,60 e uma produtividade de 0,29 a 1,42 g/L.h. No mesmo estudo, os autores utilizaram células imobilizadas em esferas de vidro e fibra de bucha (*Luffa* cilíndrica) tratadas com polietilenimina, onde o glicerol foi à única fonte de carbono utilizada, sendo obtidas uma produção de 20,1 e 21,7 g/L de ácido propiônico e uma produtividade de 0,86 e 0,3 g/L.h para o sistema contendo esferas de vidro e fibra de luffa, respectivamente. Os autores observaram que a produtividade em termos de ácido propiônico foi maior para o sistema imobilizado do que para sistemas contendo células livres. Em (1997), Barbirato e colaboradores atingiram a concentração de 42 g/L de ácido propiônico ao utilizar cepa de *P.acidipropionici* (ATCC 25562) com 0,36 g/L.h de produtividade. Neste trabalho a composição do meio indica que a fonte de carbono (20 g/L de glicerol) está em proporção maior que a fonte de nitrogênio (10 g/L de extrato de levedura).

Com metodologia similar, CORAL (2008) testou a produção em *P. zeae* com concentração inicial de 15 g/L de glicerol e 10 g/L de extrato de levedura, obtendo 8,98 g/L de ácido propiônico com 0,02 g/L.h de produtividade. HARADA (2012) obteve concentrações finais de ácido propiônico e produtividade de 1,13 g/L e 0,018 g/L.h. A concentração de produto foi considerada baixa pela autora e foi apontada como um resultado relacionado a baixa razão C/N (10 g/L de glicerol e 30 g/L de extrato de levedura).

De forma geral, independentemente do substrato ou método de produção (batelada, batelada alimentada, contínuo, etc.) as produtividades em relação ao ácido propiônico que figuram frequentemente entre os dados da literatura atual são inferiores a 1 g/L.h. Os coeficientes de rendimento costumam ser iguais ou superiores a 0,43 g de ácido propiônico/g de substrato enquanto que a concentração final de ácido varia grandemente entre 1 a 100 g/L (YANG, EL-ENSASHY, THONGCHUL, 2013).

Verifica-se uma tendência à maiores valores de produtividades de ácido propiônico ao se realizar a fermentação em reator com células imobilizadas quando comparado a células livres, sendo esse fato possivelmente relacionado ao fenômeno de *quorum sensing* ou a diminuição da concentração de substância inibidoras, advindas tanto do substrato quanto dos produtos de fermentação (adsorção ao meio de imobilização).

2.4 A biomassa lignocelulósica

As matérias-primas lignocelulósicas são aquelas que não possuem o substrato disponível para ação dos microrganismos.

Segundo CASTRO *et al.* (2010) as matérias-primas deste tipo são as fontes renováveis abundantemente encontradas na natureza, sendo concebida, majoritariamente, pelos materiais agroindustriais, pelos resíduos urbanos e pelas madeiras de angiospermas e gimnospermas. Esses materiais compreendem a bagaço, lixo e outros resíduos agrícolas que podem ser utilizados, através de tratamentos químicos, termoquímicos ou rotas bioquímicas, para obter o produto-alvo, melhorando o processo de eficiência, bem como reduzir os impactos ambientais (MARTIN *et al*., 2006; SOCCOL *et al*., 2010)

Segundo FERREIRA-LEITÃO *et al*., (2010), o aproveitamento de resíduos agroindustriais e florestais destaca-se na produção de combustíveis renováveis, produtos químicos e de energia, uma vez que sua disponibilidade acaba por solucionar o problema do acúmulo de resíduos e evita a contaminação de solos e rios.

O termo lignocelulósico, usado para identificar esse tipo de matéria-prima disponível como fonte de carbono, refere-se à estrutura do vegetal, que se divide em paredes primárias, secundárias e mela-lamela composta por estruturas fibrosas que são constituídas de polissacarídeos (ZAMPIERI, 2015). Na **Figura 4**, é apresentada a estrutura fribrosa do vegetal, onde é composta de (40 - 60%) celulose, (20 - 40%) hemicelulose e (10- 25%) lignina.

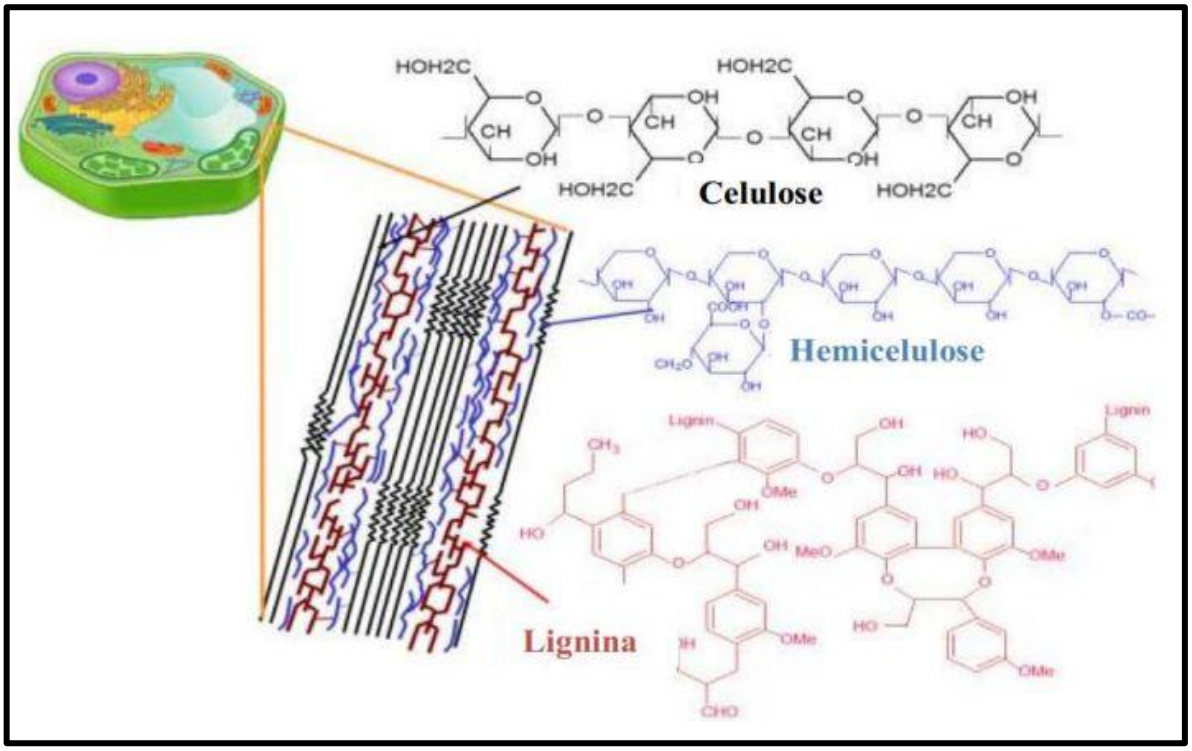


Figura 4: Estrutura esquemática do material lignocelulósico composto por lignina hemicelulose e celulose. Fonte: ZAMPIERI (2015).

2.4.1 Estrutura dos materiais lignocelulósicos

2.4.1.1 Celulose

A celulose, cuja fórmula molecular segundo a IUPAC é $(C_6H_{10}O_5)n$, é um polímero linear associada por ligações glicosídicas β(1-4), em que a unidade de repetição é a molécula de glicose, podendo sua cadeia linear chegar até15.000 unidades, as ligações existentes são do tipo carbono-carbono, já as ligações de hidrogênio são do tipo intermoleculares e intramoleculares.

As cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares (**Figura 5**), que são insolúveis em água e apresentam regiões cristalinas e amorfas (MOHAN *et al*., 2006). As regiões cristalinas são àquelas cujas moléculas estão organizadas de forma mais compacta, sendo de difícil acesso à degradação por meio de enzimas. Estas estão separadas por regiões que possuem um grau de organização menor, e são chamadas de amorfas, sendo essas mais vulneráveis ao ataque químicos e biológicos, representa a estrutura da celulose, destacando a regiões cristalinas e amorfas.

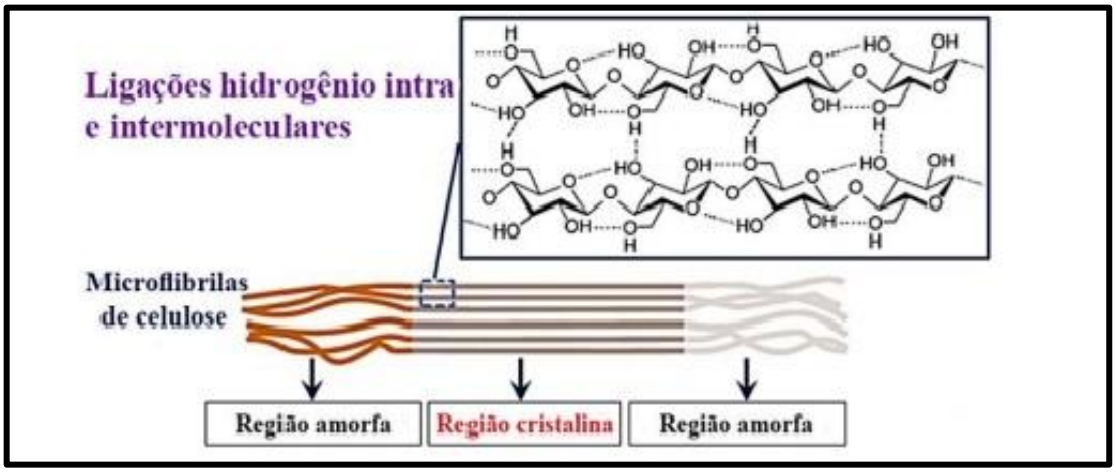


Figura 5: Representação das ligações de hidrogênio das ligações intra e intermoleculares, e cristalinidade da estrutura. Fonte: WU *et al.*, (2012).

2.4.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero, que difere da celulose principalmente por sua constituição em diferentes unidades de açúcares formando cadeias moleculares curtas e bastante modificadas (BARCELOS, 2012), sua composição estrutural (**Figura 6**), apresenta grau de polimerização entre 100 e 200 unidades de açúcares. A ramificação agregada à estrutura principal pode conter diferentes carboidratos como a xilose, manose, arabinose, galactose, glicose, e ácidos urônicos.

As ligações que compõem sua estrutura são glicosídicas do tipo β 1-3, β1-4,β1-6, na maioria das vezes essas ligações são acetiladas, o que confere uma estrutura fraca e hidrofílica, que proporciona uma conexão entre a lignina e as fibras

de celulose e uma rigidez no complexo da estrutura dos componentes da parede do vegetal, celulose-hemicelulose-lignina. Na **Tabela 3** são apresentadas diferenças entre a hemicelulose e celulose.

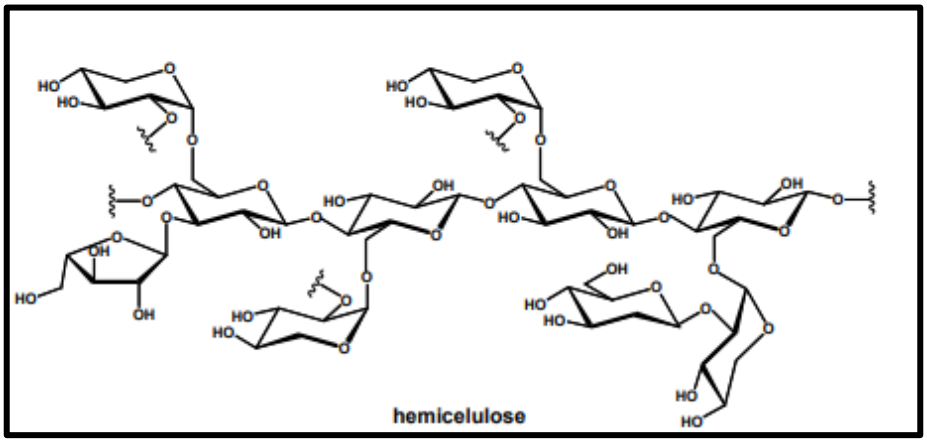


Figura 6: Esquema representando a Estrutura da hemicelulose. Fonte: DONATE (2014).

Tabela 3: Diferenças estruturais entre celulose e hemicelulose. Fonte: PEREIRA JR. *et al*., (2008).

Celulose	Hemicelulose
Homopolímero com ligação glicose-glicose	Heteropolímero e unidades de açúcar variadas
Grau de polimerização acima de 15.000 unidades	Baixo grau de polimerização, entre 100 e 200 unidades
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Possui caráter amorfo e cristalino	Possui somente caráter amorfo
Diluído a quente	Diluído a quente
Insolúvel em solução alcalina	Solúvel em solução alcalina

2.4.1.3 Lignina

A lignina é outro constituinte de extrema importância na estrutura dos materiais lignicelulósicos, ela que fornece a sustentação rígida da estrutura da parede celular do vegetal, a fração polimérica é composta principalmente por polímeros aromáticos de fenilpropano de natureza amorfa, os polímeros que formam sua estrutura são constituídos pela polimerização desidrogenativa de três álcoois

cumarílico, coniferílico e sinapílico, resultando em uma molécula heterogênea, com atividade óptica ativa, hidrofóbica e com ligações cruzadas. Na **Figura 7**, é possível identificar a estrutura dos alcoóis precursores na formação dos polímeros que constituem a estrutura da lignina.

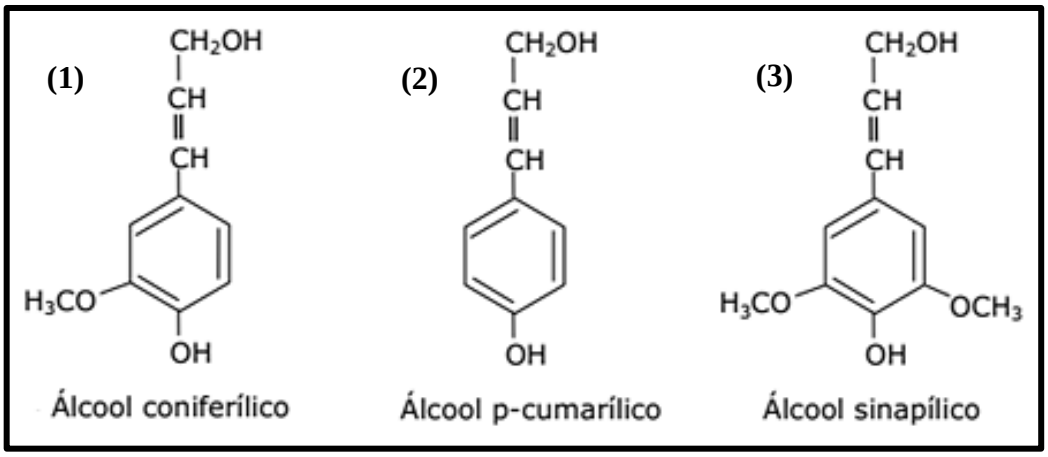


Figura 7: Alcoóis precursores na formação da estrutura da lignina:álcool coniferílico (1), álcool cumarílico (2),álcool sinapílico (3). Fonte: PEREIRA JR et al., (2008).

2.4.1.4 Compostos extrativos

Além destes compostos já citados, a biomassa lignocelulósica pode conter uma variedade de compostos orgânicos, que são facilmente extraídos por solventes tanto polares como apolares. São exemplos desses extrativos ácidos graxos, ceras, resinas, terpenos, amido, glicosídeos e alguns óleos essenciais (PEREIRA JR *et al*., 2008).

A composição da estrutura fibrosa e da quantidade de açúcares presentes depende de cada tipo de resíduo, visto que cada um apresenta estrutura diferente, sendo necessária uma o conhecimento prévio das características do material para uma melhor empregabilidade do insumo. Na Tabela 4, pode ser observada a composição química percentual das matérias-primas lignocelulósicas com grande potencial para emprego em processos biotecnológicos.

Tabela 4: Percentual químico das matérias primas lignocelulósicas. Fonte: NUNES *et al*., (2014).

Biomassa	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina(%)
Palha de trigo	35	24	25
Palha de arroz	38	27	8
Palha de cana-de-açúcar	39	30	25
Bagaço de cana-de-açúcar	43	26	22
Bagaço de sorgo	25	25	10

Além desses componentes supracitados, são observados também alguns extrativos, em menor quantidade. Contudo estes se apresentam em menor quantidade. A composição de todos os componentes varia de acordo com a espécie do vegetal, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES e JIN, 2000).

2.5 Pré-tratamentos materiais lignocelulósicos

Sabe-se que a biomassa lignocelulósica possui três componentes em maior abundância, divididas entre as frações, celulose, hemicelulose e lignina. Cuja configuração estrutural é bastante coesa e organizada, formando matrizes poliméricas de grandes extensões, também chamadas de biopolímeros (PHITSUWAN *et al.*, 2013). Os pré-tratamentos tem como principal objetivo promover a separação das frações, reduzindo assim o grau de polimerização entre elas. Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos são comumente classificados em físicos, químicos e biológicos, podendo envolver mais de uma etapa ou a combinação de mais de um tipo. A heterogeneidade do material lignocelulósico faz com que não exista um pré-tratamento universal uma vez que diversos fatores devem ser considerados. Assim, a escolha do método deverá levar em consideração o tipo de material a ser tratado, o produto que se deseja alcançar, além do custo e praticidade do método (PEREIRA JR., *et al*, 2008). A **Figura 8** apresenta esquematicamente a estrutura do material lignocelulósico após pré-tratamento.

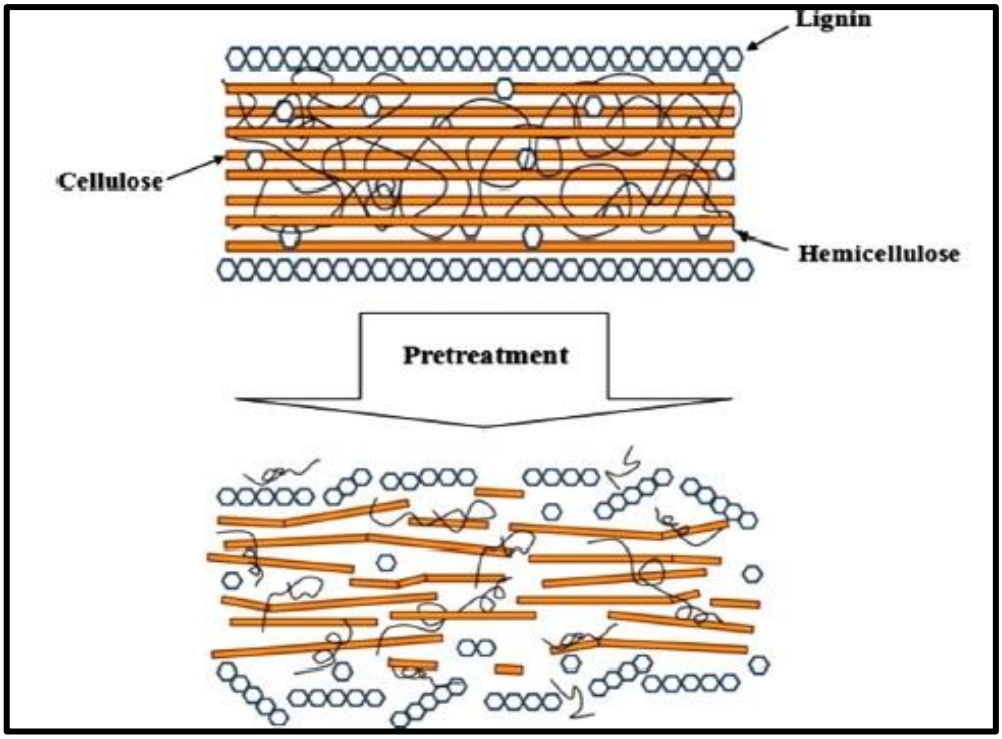


Figura 8: Ação do pré- tratamento em materiais lignocelulósicos. Fonte: MOOD (2013).

2.5.1Pré-Tratamento Físico

O tratamento físico tem como objetivo reduzir o tamanho das partículas dos materiais lignocelulósicos. As técnicas mais empregadas são a trituração mecânica e a pirólise. No primeiro a biomassa é cominuída, esfarelada ou moída. Na pirólise a biomassa é submetida a altas temperaturas com o objetivo de formação de gás de síntese (SUN & CHENG,2002; HENDRIKS & ZEEMAN, 2009). Este tipo de tratamento leva a uma desorganização gradual do complexo da biomassa.

2.5.2 Pré-Tratamento Químico

Nos tratamentos químicos são empregados agentes químicos como ácidos, álcalis, solventes orgânicos e processos oxidativos (ZHANG *et al*., 2009). Dentre os tratamentos que utilizam ácido, o mais usual é o com ácido sulfúrico em concentrações aproximadas de 0,5-1%, e temperaturas brandas controladas entre (120-190ºC). Os pré-tratamentos químicos promovem a solubilização da fração

hemicelulósica, causando uma desorganização na estrutura cristalina da celulose. Desta forma, os polissacarídeos hemicelulósicos são reduzidos a monossacarídeos, tornando a celulose mais acessível para as ações enzimáticas (TAHERZADEH & KARIMI, 2008, GÍRIO, 2010). Uma desvantagem do método é a formação de inibidores no hidrolisado, que podem dificultar a fermentabilidade do mesmo (ZHANG & SHAHBAZI, 2011).

O pré-tratamento com álcalis requer o uso de bases como hidróxido de sódio, hidróxido de cálcio, amônia, entre outros. Seu emprego está particularmente relacionado à remoção da lignina do material lignocelulósico. Geralmente a deslignificação é realizada após remoção da hemicelulose, uma vez que o ácido acético geralmente interfere na ação do álcali (DE OLIVEIRA, 2007). O aspecto de diferentes biomassas após serem submetidas a algum tipo de tratamentos pode ser observada na Figura 9.

Figura 9: Aspecto das biomassas lignocelulósica *in natura* e após pré- tratamento. Da esquerda para direita, palha de cevada, canola, aveia e trigo. Fonte: TABIL *et al*., (2011)

Embora a utilização de agentes químicos seja economicamente viável, as condições de alta temperatura e acidez usuais desse processo propiciam a formação de compostos indesejáveis para etapas posteriores, tais como furfural e hidroximetilfurfural.

2.5.3 Tratamentos Biológicos

O pré-tratamemento biológico consiste na utilização de microrganismos como fungos e bactérias na degradação do material lignocelulósico. Este pré-tratamento atua na degradação da lignina e hemicelulose, assim como na formação da celulose amorfa (ARIAS, 2016).

SINGH (2014), afirma que os tratamentos químicos são eficientes, contudo estes promovem a formação de um certo grau de inibidores, o que é prejudicial nos tratamentos biologicos, em especial àqueles utilizandoenzimas. Nos tratamentos enzimáticos, as enzimas atuam sinergicamente de forma a promover a clivagem das ligações polisacarídeas, onde cada enzima é responsável por uma ação.

Conforme o esquema (**Figura 10**), as enzimas endoglucanases promovem a quebra de ligações glicosídicas dando origem a novos terminais, estes são tomados pelas celobiohidrolases, que atuam formado as celobioses, que por sua vez são catalisadas e levadas a unidades monoméricas de glicose pela ação das glicosidases (OGEGA, 2010).

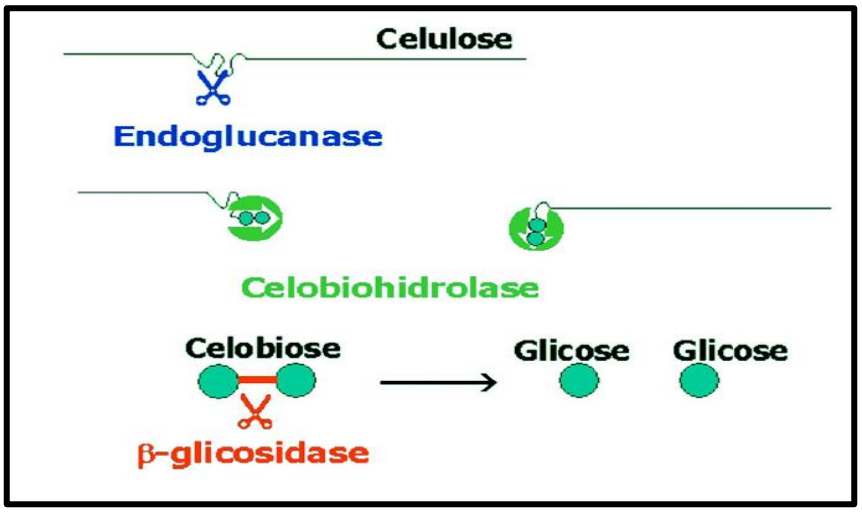


Figura 10: Ação das enzimas na desconstrução das cadeias poliméricas de celulose com geração de glicose. Fonte: TÉBÉKA apud OGEGA (2010).

2.6 Sorgo Sacarino como insumo para produção de Ácido Propiônico

Originário do continente africano, o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor L. Moench*), é um vegetal do grupo das angiospermas pertencenteà família *Poaceae.*Apresenta ciclo vegetativo que varia de 3 a 4 meses, o que significa que as colheitas podem ser realizadas em períodos mais curtos, possibilitando que o cultivo do vegetal seja realizado como opção nas entre safras da cana-de-açúcar (TEIXEIRA *et al*., 1986). O que ajuda na renovação do solo considerando os diferentes consumos de nutrientes.

O sorgo sacarino foi considerado o quinto cereal mais plantado no mundo, ficando atrás somente do milho, trigo, arroz e cevada (FORNASIERI FILHO, 2009). No Brasil a introdução do cultivo do sorgo sacarino se deu na década de 1950. Através dos centros de estudos e pesquisas das universidades, a pesquisa em torno desse cereal foi alavancada principalmente pela aplicabilidade para produção de etanol em situações ou regiões do país onde a cana-de-açúcar pode não apresentar altas produtividades, ou não está disponível para processamento em determinada época do ano (PEREIRA FILHO *et al*., 2013). A Embrapa Milho e sorgo, retomou em 2011 o programa de melhoramento do sorgo sacarino, que durante o período da década de 80 havia sido interrompido. A estratégias adotadas visam o desenvolvimento de variedades elevadas de produtividade de colmos, onde se encontra disponível a maior parte dos açúcares (CORSINO,2011).

O sorgo, independentemente do tipo tem sua estrutura vegetal dividida em grãos, colmos, raízes e folhagem, conforme **Figura 11**.

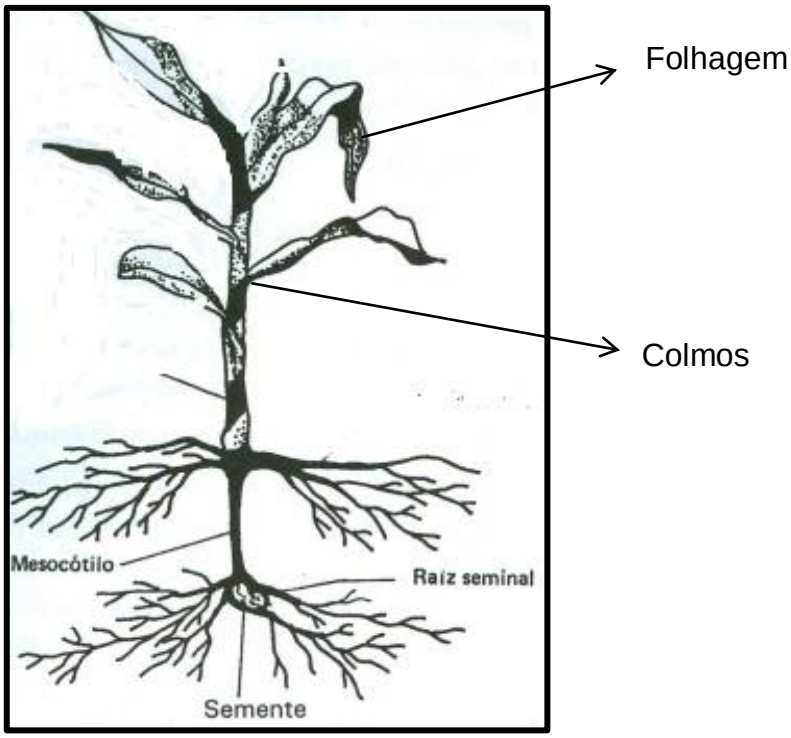


Figura 11: Divisões da estrutura da vegetal do sorgo. Fonte: Embrapa milho e sorgo (2008)

Podemos encontrar nos grãos uma fração rica em açucares, também conhecida como fração amilácea, detentora de grande reserva de energia, sendo bastante empregada em processos fermentativos. Dos colmos, extrai-se um caldo também rico em açúcares, sendo também possível aproveitar o bagaço lignocelulósico submetendo-o a processos de pré-tratamentos, cujo objetivo é desorganizar a matriz celular, desobstruindo o acesso às camadas que são ricas em carboidratos. Os tipos de sorgo podem ser classificados como granífero, forrageiro, sacarino, vassoura e energia, suas características e aplicações são apresentadas na **Tabela 5**.

Tabela 5: Tipos de sorgo e suas aplicações. Fonte: OLIVETTI e CAMARGO (1997) apud FERREIRA (2015).

Tipos de sorgo	Caracteristicas	Produto	Utilização
Granífero	Baixo porte	Grão	Substituto do milho na ração animal e utilização do restolho. Alimentação humana (farinha), etc
Sacarino	Porte alto acumula sacarose nos colmos	Colmo e Grão	Produção de xaropessubstituem o açúcar como adoçante na indústria, produção de etanol e ração animal
Forrageiro	Variedades de campim sudão ou híbridos inter específicos de *Sorghumbicolo* x *Sorghumsudanense*	Biomassa	Confecção de silagem, pastejo, corte verde, fenação e cobertura morta.
Energia	Porte alto (até seis metros), rápido crescimento e alto potencial produtivo	Biomassa (Fribosa)	Cogeração de energia

Dentre os tipos de sorgo apresentados, o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor L.Moench*) tem desperto grande interesse no setor sucroalcooleiro e energético por armazenar grande quantidade de açúcar nos colmos. O presente estudo propõe a utilização do bagaço de sorgo sacarino, oriundo da moagem do colmo, o bagaço é parte da estrutura lignocelulósica rica em carboidratos os quais podem ser em biorrefinarias, convertendo os carboidratos em insumos para as indústrias.

2.7 Conceito de Biorrefinaria

Segundo PEREIRA JR (2008), a palavra Biorrefinaria sugere uma integração de processos de conversão de biomassa em biocombustíveis, insumos químicos, biomateriais, alimentos e energia. Nesse conceito uma variedade de materiais podem ser empregadas em biorrefinarias, dentre estes encontra-se o

sorgo sacarino, cujas frações são integralmente aproveitadas, esse tipo de matéria prima todavia não apresenta o substrato prontamente disponível, sendo necessário submetê-los a alguns processos cujo substrato, avaliar os tipos de pré-tratamentos existentes e a importância dos microrganismos nos processos fermentativos para conversão do substrato em produto, podemos definir o conceito de biorrefinaria. Esse conceito é dinâmico e está em constante desenvolvimento, não tendo, portanto, modelos consagrados (PEREIRA JR *et al*., 2008).

Atualmente o conceito de biorrefinaria vendo sendo difundido, com algumas metodologias bem aplicadas e que estão em funcionamento, como é o caso das usinas de cana-de-açúcar, cujo reaproveitamento é integral. Na **Figura 12** é mostrado que a biorrefinaria integra processos cujo objetivo é adotar rotas promissoras para uma nova indústria com fontes renováveis.

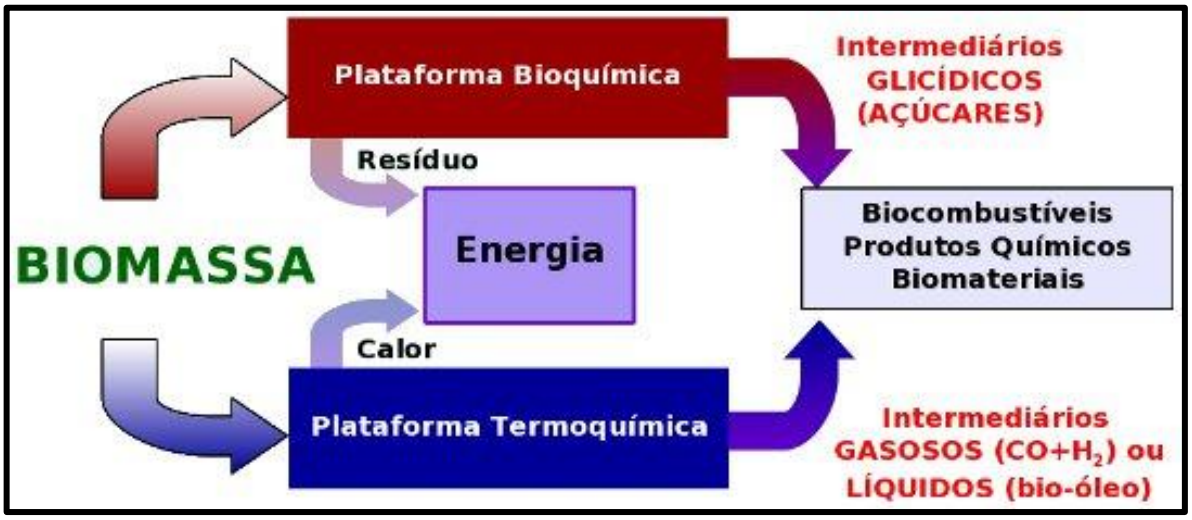


Figura 12: Esquema simplificado da estrutura de uma Biorrefinaria. Fonte: PEREIRA JR (2019).

2.8 Imobilização de Células

Os microrganismos desempenham papel fundamental quando se trata de bioprocessos**.** Por serem bastante versáteis podem originar uma infinidade de moléculas industrialmente interessantes, que podem ser aplicadas em diversas áreas. Em geral, em bioprocessos utilizam-se os microrganismos na forma livre,

onde alguns limitantes estão agregados nas etapas de separação (célula / meio), o que exige o uso de centrífugas ou até mesmo membranas, aumentando o custo do processo. Além disso, outro fator limitante são as variáveis que atingem diretamente as células quando livres no meio de fermentação, como pH, temperatura, a presença de compostos inibidores, e acúmulo de produto no meio, que podem ser prejudiciais à integridade e atividade celular.

A metodologia de imobilização celular consiste em um processo de associação de células animais ou microbianas vivas, dentro ou sobre a superfície de um agente imobilizador, de maneira que seja mantida sua atividade catalítica (TAMPION; TAMPION, 1988; GASHTASBI; AHMADIAN; NOGHABI,2014). Algumas espécies de bactérias promovem imobilização de forma natural, com a formação de biofilmes ocasionada pela liberação de exopolisacarídeos (BICKERSTAFF,1997).

A imobilização celular permite que seja preservada a atividade catalítica dos microrganismos, pois sua estrutura morfológica não sofre alteração. (KOURKOUTAS *et al*.,2004; PRASAD *et al*.,2005). É possível também a reutilização das células por mais de um ciclo, o que torna possível a aplicação em diversos processos (COVIZZI *et al*.,2007). Contudo para que este processo seja efetivo, é necessário que o suporte atenda a requisitos como a estabilidade, ou seja, deverá ser resistente a diversos ciclos de fermentação, ser reutilizável, não possuir toxicidade para as células, não ser metabolizado e ser economicamente viável (ZHU, 2007). A imobilização é apresentada como uma alternativa interessante, pois não requer etapas de extração, isolamento e purificação, por isso apresenta um menor custo.

Atualmente no desenvolvimento de bioprocessos nota-se um crescente interesse comercial em imobilização de células que sejam economicamente competitivos. Isso acontece devido pelas diversas vantagens que esse tipo de processo oferece (BELGRANO, 2018). Na **Tabela 6** podem ser observadas as vantagens e desvantagens da imobilização de células.

Tabela 6: Vantagens e desvantagens da imobilização celular. Fonte: KOURKOUTAS (2004).

Vantagens	Desvantagens
Operação do biorreator com altas densidades celulares	Aplicação em escala industrial ainda em baixa.
Facilidade de separação de células do meio	Possibilidade da matriz ser tóxica à célula ou degradada
Maior resistência às forças de cisalhamento	Problemas associados à transferência de massa
Menor risco de contaminação microbiana	Custo da matriz de imobilização
Maior tolerância celular ao produto e ao substrato	Dificuldade de quantificação de biomassa celular
Possibilidade de reutilização de células em bateladas sequenciais	Rompimento da matriz devido ao crescimento celular e formação de gases.

ZHU (2007) afirma que para o processo de imobilização seja eficiente, é de extrema importância a escolha do suporte adequado. Este deve ser resistente às variáveis que serão submetidas, resistente a ciclos fermentativos (capacidade de reutilização / integridade dos *beads*), não deverão ser tóxicas, e deverão ser inertes para o metabolismo do microrganismo. Além disso, a escolha do suporte também deve levar em consideração os custos do processo. É importante que escolha da técnica atenda aos requisitos citados acima, e, além disso, deverá ser facilmente reproduzida.

Alguns autores usam maneiras diferentes quando se trata da divisão dos tipos de imobilização, ZHU (2007) identifica dois tipos principais: o aprisionamento e a ligação em suporte. Outros autores apresentam além desses, o método de ligação cruzada (CHIBATA *et al*.,1986; NAJAFPOUR,2007; BICKERSTAFF, 1997), divide em cinco métodos, sendo eles: adsorção, ligação covalente em suporte, aprisionamento, encapsulação e ligação cruzada.

Vale ressaltar que não existe um método ideal para imobilização de células, a seleção do método depende do objetivo de cada trabalho (BICKERSTAFF, 1997). O Brasil tem se destacado mundialmente em pesquisas que focam no

aproveitamento de recursos naturais e renováveis. Utilizando as metodologias da biotecnologia dentre essas podemos citar a imobilização que vem ganhando destaque por suas vantagens na aplicação em processos fermentativos, uma vez que tornam o processo mais eficiente e economicamente viável. A seguir serão citados os métodos de imobilização mais comuns na literatura, enfatizando a técnica de aprisionamento que foi adotada para este trabalho.

2.8.1 Tipos de imobilização

2.8.1.1 Ligação cruzada (Floculação)

Conhecido como ligação cruzada ou *crosslink*, neste tipo de imobilização as células são capazes de aderirem entre si de forma natural, formando agregados maiores, também conhecidos como floculação. Este fenômeno natural de floculação, pode ser induzido adicionando alguns agentes floculantes que aumentam a interação entre as células como a como a quitosana e outros polieletrólitos (CHIBATA e TOSA, 1981; CHIBATA *et al*., 1986; VORLOP e KLEIN, 1987).

2.8.1.2 Adsorção

No método de adsorção os microrganismos se ligam nas superfícies de suportes inertes e insolúveis. Neste as interações químicas do tipo van derem Walls ou de Hidrogênio são responsáveis pela aderência na superfície do material, além de interações por hidrofobicidade, pela rugosidade da superfície e por polissacarídeos excretados pelas células (ZHU, 2007). A interação (célula/suporte) pode ser potencializada ativando o suporte, por agentes químicos como α-minopropiltrietoxisilano, isocianato, acrilato de hidroxietil, periodato desódio e cloreto cianúrico (ZHU, 2007).

2.8.1.3 Encapsulação

Neste método a contenção das células é realizada por microcápsulas ou pelo uso de membranas. A contenção das células dentro do suporte é uma técnica similar à do aprisionamento de células, porém as células são misturadas com o

agente gelificante (solução de $CaCl_2$) e posteriormente gotejada em solução de alginato misturada com Tween 80, as células ficam retidas nas membranas semipermeáveis, a difusão de substratos e produtos é facilitada devido as características do material utilizado na membrana. (DEMBCZYNSKI e JANKOWSKI, 2002).

2.8.1.4 Aprisionamento

Este método baseia-se no confinamento das células em matriz gelificada, as células são retidas dentro de uma rede rígida de poros do suporte que impedem que as células se difundam para o meio, contudo permitem a passagem de nutrientes e produtos pelo fenômeno de transferência de massa (KOURKOUTAS *et al*., 2004). O processo consiste em gotejar a mistura em uma solução de cloreto de cálcio, de modo a promover a formação de uma matriz de alginato firme o suficiente para garantir coesão e resistência às esferas formadas.

A matriz mais utilizada para este tipo de imobilização é composta por géis hidrofóbicos com alta massa molar. Sendo as mais utilizadas o alginato de cálcio, resina, polipropileno (PP) polivinil álcoois, poliacrilamida, pectina, agar, carragenato, colágeno e gelatina de origem animal e vegetal (TOMASKA *et al*., 1995).

Mesmo apresentando uma alta resistênciamecânica, a imobilização por aprisionamento apresenta desafios, problemas com transferências de massa e as limitações que ocorrem devido às condições ambientais dentro e fora dos poros da matriz (MARTINS *et al.*, 2013). As limitações implicam em prejuízos a células durante o processo de fermentação como resistência mecânica da matriz ao crescimento celular, formação de gases, presença de agentes quelantes de cálcio no meio, como fosfato e citrato, problemas de transferência de massa (com menor disponibilidade de oxigênio e nutrientes), acúmulo de substâncias tóxicas na matriz, variações das condições físico-químicas do meio, como pH e temperatura e o custo adicional (NAJAPFOUR, 2007; RAO *et al*., 2008).

2.9 Aprisionamento com Alginato de Cálcio

Conforme afirmou Alhadeff(1984), o suporte pode ser de origem orgânica ou inorgânica, sendo inerte às degradações químicas, físicas e, principalmente,

biológicas, possuindo boa resistência mecânica e à abrasão, que pode ocorrer quando o suporte é exposto a um fluxo contínuo ou a uma agitação constante.

Na literatura são reportados diversos materiais inertes que podem ser empregados na imobilização celular, conforme a natureza física de cada um, estes estarão sujeitos a sofrer mudanças desde aspectos geliformes, como o alginato de sódio e a carragenana, até superfícies sólidas, como o vidro poroso e a alumina (CANILHA *et al*., 2006).

O alginato de sódio é derivado de algas marrons, este polímero é composto por diferentes proporções de ácidos pancrônicos e ácido glucurônico (MARTINS *et al.*, 2013). Os géis derivados desse tipo de alga tem a capacidade de incorporar enzimas ou células vivas inteiras (GARCIA-CRUZ *et al*., 2008), os géis de alginato ainda apresentam vantagens quanto ao custo e a forma de preparo das esferas.

Quando o alginato de sódio é associado a íons divalentes como, por exemplo, íons de cálcio, bário e estroncio, formam géis cuja estrutura, não é revertida facilmente, por formar uma espécie de gel com cadeias homopoliméricas unidas através desses íons. Quando usado o $CaCl_2$ como agente gelificante, o íon de Na^+ é descolocado pelo íon Ca^+ gerando uma copolimerização que ocorrem devido as atrações iônicas dos compostos. Na **Figura 13**, é possível observar como ocorre a formação das redes poliméricas. Polímeros de ácidos gulurônicos em solução, (b) ligação entre as cadeias poliméricas através de íons de cálcio situados entre os grupos de carga negativa, (c) formação do gel com cadeias homopoliméricas unidas através de íons de cálcio.

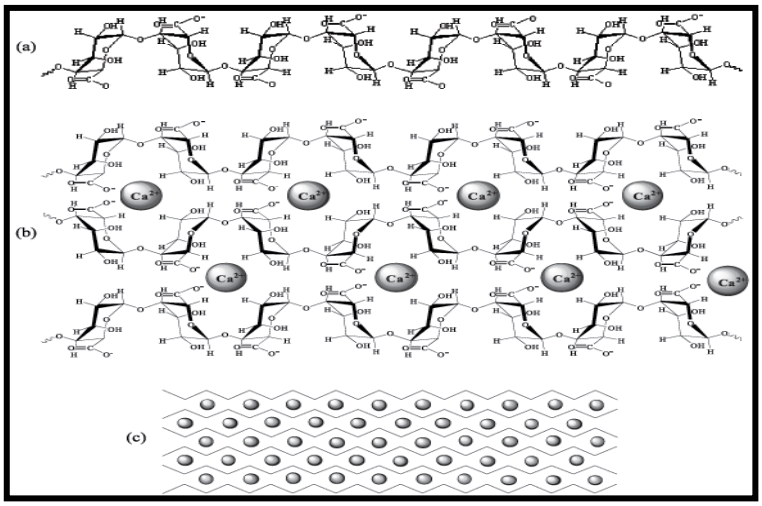


Figura 13: Formação de rede polimérica de gel alginato de cálcio. Fonte: KAWAGUTI *et al*., (2008).

Alguns estudos reportam que a estabilidade do gel é crescente à medida que são utilizadas soluções de $Ba^{2+,}$ $Sr^{2+,}$ $Ca^{2++,}$ por outro lado torna-se menos efetiva como, por exemplo, exposta à presença de Mg^{2+}(MORRIS, et al, 1980 apud PAMIES et al., 2010). Outros íons como Cu^{2}+ e Zn^{2+} também podem ser usados como agentes gelificantes (WANG e SPENCER, 1998).

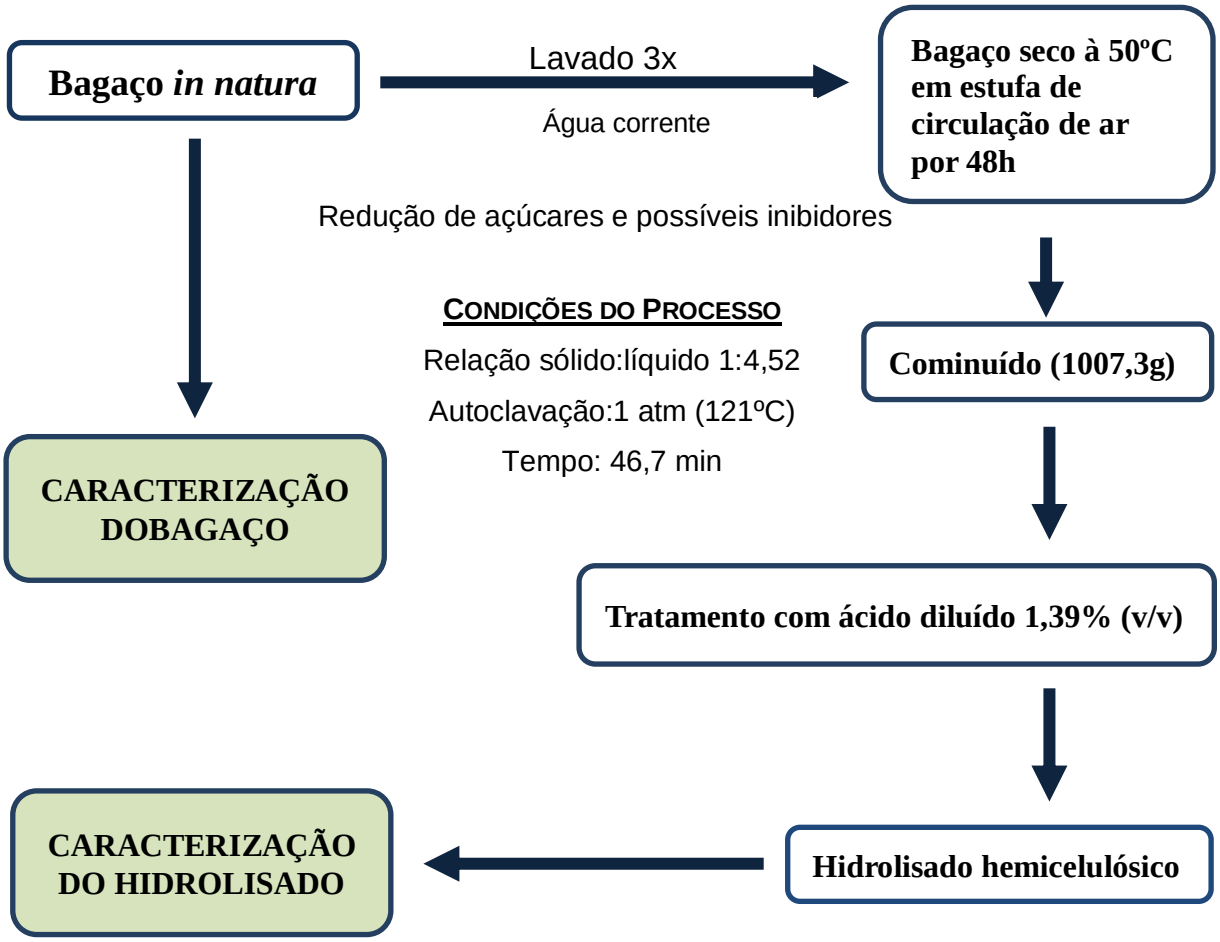
A estrutura do gel de alginato possui um grau de porosidade o que torna possível a difusão de substratos, produtos e co-produtos durante os processos fermentativos. O tamanho do poro formado é extremamente relevante quando se discute esse tipo de imobilização, onde a porosidade do gel formado é função da concentração de alginato de sódio e da concentração da solução de $CaCl_2$, ressaltando que a porosidade decresce quando se produz géis com um maior grau de polimerização obtidos ao utilizar soluções de $CaCl_2$ e/ou suspensões de alginato de sódio mais concentradas (ALHADEF, 1984).

Apesar de apresentar problemas relevantes de transferência de massa, a imobilização empregando alginato de sódio é uma técnica viável para emprego em bioprocessos, por ser de fonte renovável, possuir alta disponibilidade e biocompatibilidade, o que permite que seja utilizado com uma gama de microrganismos, é também uma técnica simples e de baixo custo.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterizações da matéria prima

O bagaço de sorgo utilizado neste trabalho foi concedido pela Monsanto do Brasil Ltda, que fica situado no município de Uberlândia-MG. As etapas pelas quais o bagaço foi submetido estão esquematizados no diagrama de blocos apresentado a seguir:



A caracterização do bagaço quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina foi realizada à luz dos estudos anteriormente descritos na literatura por (SLUITER *et al*. 2008; VERVERIS *et al*.,2007) e também por BARCELOS (2012), tendo este último otimizado as etapas do processo.

Na metodologia adotada, foram pesados cerca de 300mg do bagaço cominuído, sendo submetidos em seguida a hidrolise química, utilizando 3mL de ácido sulfúrico 72%(m/m) em tubos de ensaio, estes foram submetidos a agitação branda e temperatura de 30ºC durante1 hora, após este período a concentração final de ácido foi ajustada para 4% adicionando 84mL de água desmineralizada, em seguida o bagaço em solução ácida foi submetido a autoclave a 1 atm durante 1 hora. O hidrolisado passou por um processo de filtragem em cadinhos de vidro do tipo Gooch que haviam sido previamente calcinados a (575ºC/24 h) e pesados.

Os resíduos foram lavados com água desmineralizada para total recuperação do hidrolisado. Os cadinhos que continham a fração sólida foram secos em estufa a temperatura de 105ºC até o peso permanecer constante, em seguida calcinados em mufla a 575ºC pelo período de 5h, essas etapas foram necessárias para determinar o teor dos sólidos orgânicos (celulose e lignina) e inorgânicos (cinzas), respectivamente. A fração líquida teve seu pH ajustado com hidróxido de cálcio até estabilizar entre 5,5 e 6,0. Posteriormente o material foi filtrado sob vácuo constante em funil de *Buchner,* para remover os sais de cálcio que foram formados. Ao analisar o líquido filtrado foi possível determinar as concentrações de açúcares redutores totais (ART) pelo método do ácido dinitrosalicílico (MILLER, 1959). As concentrações de glicose e xilose foram obtidas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), efetuadas com a utilização do equipamento HPLC da marca Shimadzu, coluna Hi-Plex H. Os teores de hemicelulose, celulose e cinzas foram determinados utilizando-se as **equações 1** a **4**.

Celulose$\left(\%\frac{m}{m}\right) = \left(\frac{0,9}{0,96}\right).G.\left(\frac{v}{m}\right).\alpha.100$ **(1)**

Hemicelulose$(\%\frac{m}{m}) = (\frac{0,88}{0,93}).\ (\text{ART-G}).\ (\frac{V}{M}).\alpha.100$ **(2)**

Lignina $(\%\frac{m}{m})=\frac{W1-W2}{M}.100$ **(3)**

Cinzas$(\%\frac{m}{m})= (\frac{W2}{M}).100$ **(4)**

Onde:

0,88: coeficiente resultande da relação entre massa molecular do polímero e monômero de glicose;
0,93: rendimento da transformação de xilana em xilose;
0,90: coeficiente resultante da relação entre do polímero e do monômero de glicose;
0,96:rendimento de transformação da celulose em glicose;
ART: açúcares redutores totais g/L;
G: glicose (g/L);
M: massa seca inicial (g);
V: volume total da solução de açúcar (L);
W1: massa seca após filtragem e secagem (g);
W2: massa seca após calcinação;
α : fator de diluição.

3.2 Pré- tratamento Ácido

O pré-tratamento ácido foi empregado a fim de realizar aclivagem das ligações do complexo lignocelulósico, promovendo a solubilização da fração hemicelulósica, e tornando possível sua separação dos demais componentes. Para isso o bagaço seco e cominuí do foi submetido ao pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, cujas condições de ensaio foram anteriormente otimizadas por BARCELOS (2012). No protocolo adotado a concentração de H_2SO_4 foi 1,39% v/v, a relação sólido /líquido foi de 1/4,52 (m/v), e o tempo foi 47min em autoclave nas condições de 1atm e 121ºC. Após retirado da autoclave, o bagaço foi prensado ainda quente utilizando prensa hidráulica SKAY, e a fração líquida (hemicelulose) foi congelada para ser utilizada posteriormente nas futuras fermentações.

3.3 Microrganismos, manutenção e ativação

Neste estudo, foi utilizada a linhagem da bactéria *Propionibacterium acidipropionic* CIP 53164, obtida através do banco de cepas francês "*Institut Pasteur Collection* – CIP", sendo mantida sob a forma liofilizada, e armazenadas em ampolas sob o abrigo de luz. Para o uso nos ensaios a linhagem foi reativada segundo recomendações do próprio banco de cepas.

3.3.1 Ativação do estoque e manutenção das células

A bactéria proveniente do banco de cepas foi ativada em trabalhos anteriores no LADEBIO e reativada para este estudo a partir da cultura estoque do laboratório. Foi conduzido um experimento preliminar da viabilidade das células, onde se observou que a mesma após um longo período de armazenagem, tinha seu metabolismo desacelerado em comparação aos estudos anteriores. Optou-se então por utilizar o meio BHI (*Brain Heart Infusion),* o mesmo indicado pela CIP na etapa de ativação, cuja composição pode ser observada na **Tabela 7**, este foi empregado para uma aclimatação das células e manutenção do estoque.

Tabela 7: Composição do meio de ativação

Componentes	Concentração(g/L)
Hemina	0,1
Hidrolisado péptico de tecido animal	5,0
Hidrolisado pancreático de caseína	16,0
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	2,0
Fosfato dissódico de hidrogênio	2,5
Ágar	13,5
Infusão de sólidos (cérebro de animais)	8,0

Na **Figura 14** é apresentada a micrografia da linhagem *Propionibacterium Acidipropionici* CIP *53164.* Aumentada 100x em microscópio ótico.

Em geral, as propionibactérias são caracterizadas como bactérias gram positivas, não formadoras de esporos, não móveis, facultativamente anaeróbias ou aerotolerantes (VOROBJEVA, 2013).

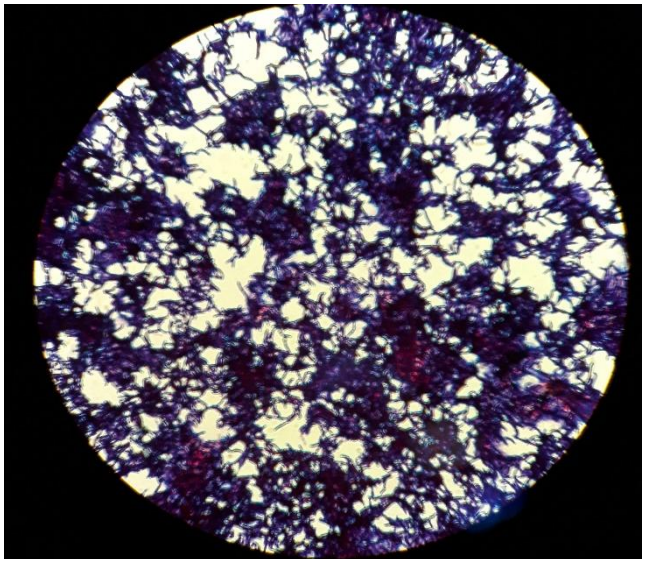


Figura 14: Micrografia das células *P. acidipropionici* CIP53164. Ampliação de 100x em microscopia ótica.

Na metodologia adotada pra reativar a cultura de *P.acidipropionici,* foram utilizados frascos de penicilina com volume útil de 20mL, o volume de meio BHI foi de 10mL, os frascos foram devidamente selados e esterilizados em autoclave, sob as condições de 0,5 atm ,20 minutos e temperatura de 121ºC. Para cada frasco contendo 10mL de meio, 1ml da cultura estoque foi adicionada, e toda manipulação foi realizada em fluxo laminar, sob condições de assepsia. A incubação foi realizada em estufa à 30ºC por 48h. A **Figura 15** mostra o aspecto do meio após a reativação. A turbidez e o acúmulo de células no fundo mostraram a eficiência do método adotado.

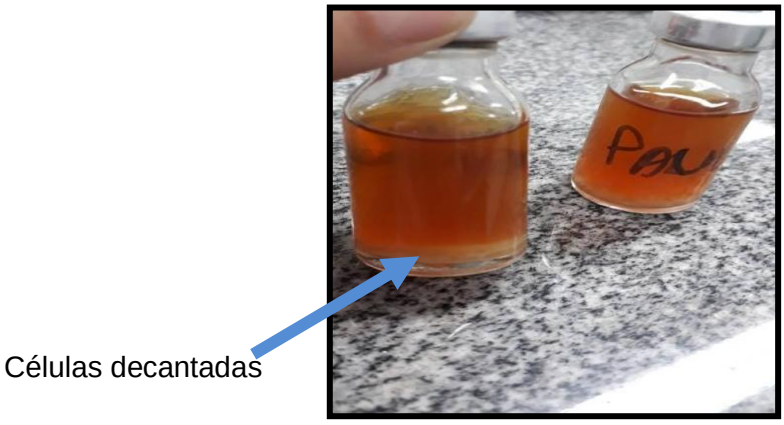


Figura 15: Cultura estoque reativada.

3.3.2 Curva Padrão para *P. Acidipropionici CIP 53164*

Após o período de incubação de 48horas, o crescimento foi interrompido e as células centrifugadas em centrífuga (Thermo Scientific MEGAFUGE 16R), a 8000 rpm. *O* sobrenadante foi descartado e foram realizadas duas lavagens das células, sendo as células ressuspendidas em água destilada. Foram utilizados frascos cônicos tipo eppendorfs com volume de 2mL, previamente secos em estufa e pesados. Os frascos cônicos contendo as células foram centrifugados durante 20min à 8000rpm, o sobrenadante descartado e os frascos contendo as células levados à estufa mantida à 60ºC. As pesagens foram realizadas em balança analítica até peso constante, para se determinar o peso seco da massa celular contida no referido volume da solução, a partir da diferença do peso dos frascos antes e depois. Dessa forma foi possível determinar a curva padrão, por meio da correlação entre as leituras de absorvância a 600nm, e a densidade celular do respectivo ponto, dando origem à equação da reta (**Figura 16**), que será usada para calcular a concentração celular em g/L, a partir dos valores de absorvância observados durante os ensaios.

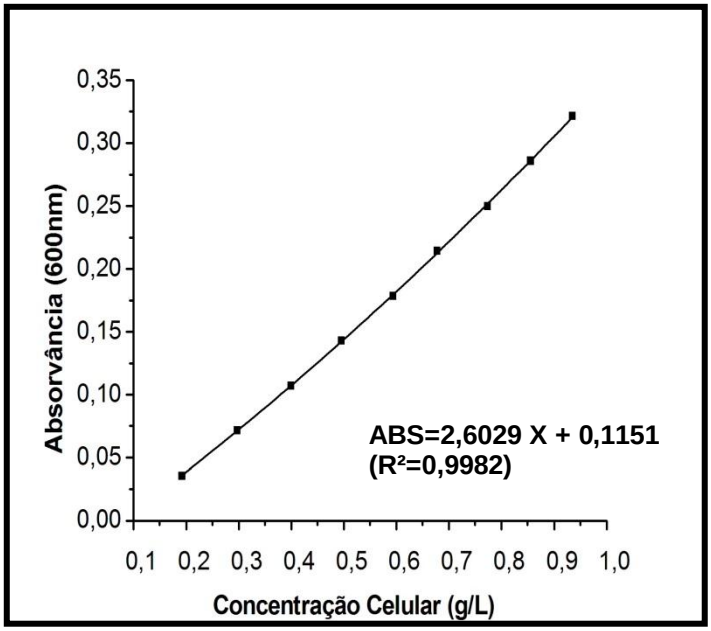


Figura 16: Curva padão para *propionibacterium acidipropionici.*

A curva padrão é uma correlação entre absorvância a 600nm e a concentração de células. Essa medida é específica para cada tipo e espécie de microrganismo, pelo valor do (R^2) pode ser observado que existe uma coerência entre as duas variáveis. Como observado na **Figura 16**, a concentração de células pode ser obtida pela **Equação 5**.

$$X = \left(\frac{Y}{2{,}6029} - 0{,}1151\right).d \qquad \textbf{(5)}$$

Onde Y é o valor da absorvância medidas 600 nm em espectrofotômetro (UV-1800 SHIMADZU) e d, o valor da diluição feita para leitura da amostra.

3.4 Meios de Cultivo

3.4.1 Pré-Inóculo e Inóculo

Para ativação e propagação do microrganismo, que seriam respectivamente o pré-inóculo e o inóculo dos ensaios, foi utilizado o meio sintético RCB (Reinforced Clostridial Broth da Difco) cuja composição é apresentada na **Tabela 8**. Ao pré-inóculo foi acrescentado 10 % (v/v), do meio BHI contendo o microrganismo reativado, conforme visto na sessão (3.3.1), este foi incubado em estufa por 24 h. para o inóculo utilizou-se 10% (v/v) do volume de pré-inóculo e acrescentou-se 30 g/L de xilose. As etapas foram realizadas usando fracos de penicilina com volume útil de 100 mL, contendo 70 mL de meio para pré-inóculo, e frascos do tipo *schott* com volume útil de (1,5 L) que continha 1 L de meio para o inóculo, os meios foram previamente esterilizados em autoclave sob as condições a 0,5 atm, por 20 minutos, a incubação foi promovida em estufa a 30 ºC por 48 h, mesmas condições empregadas na ativação. As etapas pré-inóculo e inóculo estão apresentadas na **Figura 17**.

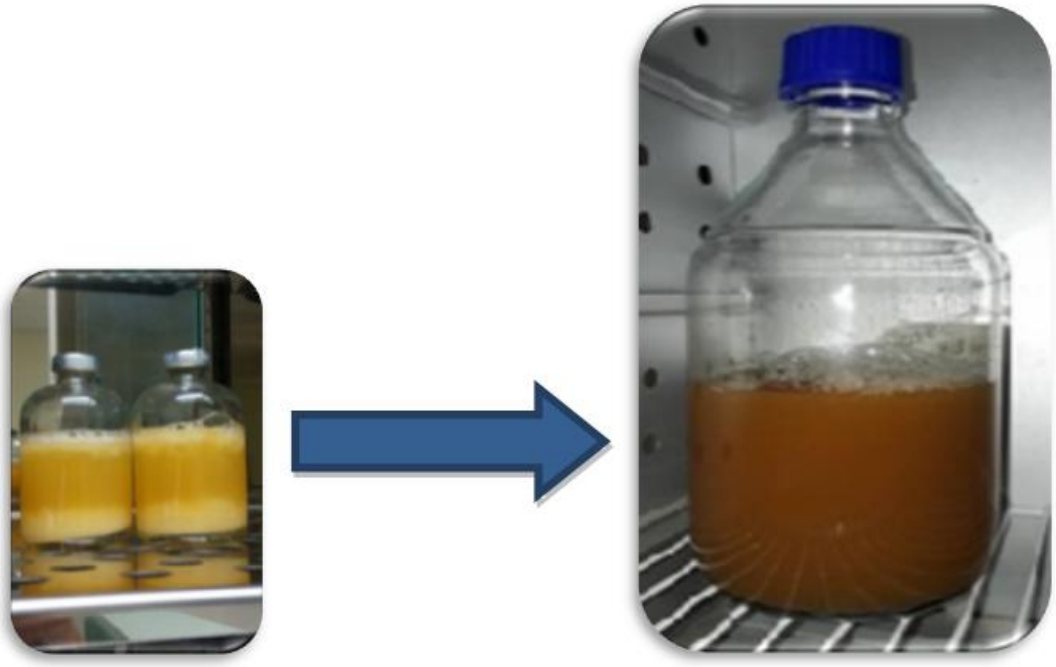


Figura 17: Fracos com pré-inóculo e inóculo respectivamente.

Tabela 8: Meio RCB (Reinforced Clostridial Broth da Difco).

Componente	Concentração (g/L)
Peptona	10
Extrato de Carne	10
Extrato de Levedura	3,0
Substrato	5,0
Cloreto de Sódio	5,0
Cisteína	0,5
Acetato de Sódio	3,0
Ágar	0,5

Inicialmente, a fim deverificar a habilidade do microrganismo em assimilar xilose e glicose, foi realizado um experimento conduzido em diferentes frascos de penicilina cada um contendo 70 mL de meio RCM e 10 g/L de xilose e glicose, respectivamente. O crescimento celular foi acompanhado pela medida da absorvância a 600 nm, o tempo de fermentação foi de 60horas.

3.4.2 Propagação e concentração de biomassa de células

Maiores quantidades de biomassa celular eram atingidas aumentando o volume de inóculo na fase de propagação. A fim de concentrar a biomassa para fins de imobilização, após 48 h de incubação o inóculo foi centrifugado nas condições de 20 min e 8000 rpm em centrifuga Thermo Scientific MEGAFUGE 16R. O sobrenadante foi descartado e a biomassa reservada para imobilização.

3.5 Sistema de Imobilização de células e caracterização das esferas

3.5.1Sistema de Imobilização de Células

As esferas de alginato de cálcio para imobilização celular foram preparadas por meio da técnica de gelificação inotrópica. (BICKERSTAFF, 1997; GUISAN e CARVALHO, 2006). O método consistiu em gotejar solução aquosa de alginato de sódio 2,0% em solução de $CaCl_2$ 0,1 mol.L^{-1} sob agitação branda e temperatura ambiente.

O alginato de sódio foi pesado e solubilizado em água desmineralizada, formando uma solução a 2,0 %. A dissolução foi acelerada por agitação com a ajuda de um agitador magnético e aquecimento moderado até desaparecerem os grumos formados e as bolhas provenientes da agitação. Após essa etapa, a solução de alginato foi esterilizada em autoclave a 0,5 atm durante 30 min e resfriada à temperatura ambiente.

As células de *P. acidipropionicii* reservadas previamente, foram suspensas em solução de alginato, com auxílio de bomba peristáltica cuja vazão utilizada foi de 20,45 mL/min, a suspensão alginato/células foi gotejada, com auxílio de uma pipeta de vidro com volume de 2 mL em um erlenmeyer contendo 500 mL de solução de $CaCl_2$ a 0,1 mol.L-1. Agitação branda foi necessária para evitar aglutinação das esferas de alginato. Após esta etapa o frasco contendo as esferas foram mantidos refrigerados entre 4 a 5 ºC por um período correspondido entre 24 e 48 horas. A **Figura 18** mostra o esquema adotado na etapa descrita acima.

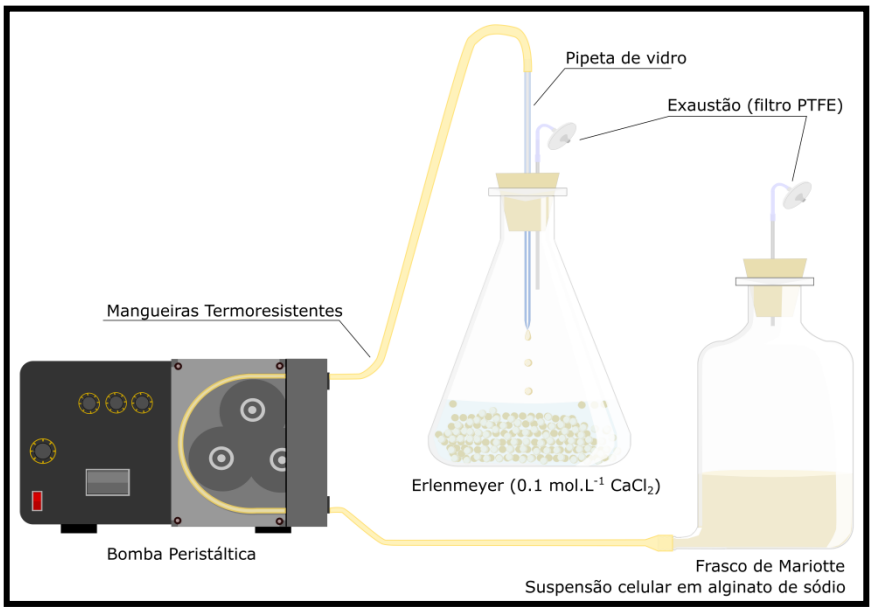


Figura 18: Esquema experimental para preparação das esferas de alginato de cálcio pela técnica de gelificação inotrópica.

3.5.2 Caracterizações físicas do suporte de imobilização

Os experimentos para caracterização de propriedades físicas e morfológicas foram realizados com o objetivo de fornecer dados bastante básicos preliminares e sistemáticos sobre o suporte de imobilização. As propriedades físicas avaliadas foram: média e distribuição dos diâmetros, média e distribuição das circulares, densidade do leito da coluna, porosidade do leito da coluna, densidade das esferas, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), curva de absorção de cálcio e curvas de absorção de ácido xilose e ácido propiônico.

3.5.3 Diâmetros das esferas e circularidade

Os valores de diâmetro médio ($\overline{d_b}$) e circularidade ($\overline{O_b}$), bem como as respectivas distribuições, foram avaliados por meio de técnicas de processamento de imagens. O arredondamento é definida como um indicador de semelhança entre a forma de um objeto analisado e a forma de uma esfera perfeita (BROOEKE, 2015).

Esferas de alginato (contendo ou não células) foram espalhadas sobre uma superfície escura e plana e as fotos foram tiradas com o auxílio da câmera do

smartphone. O software ImageJ 1.51 foi usado no processamento de imagens para análise de tamanho e forma dos *beads* em questão.

3.5.4 Densidade do leito e porosidade das esferas

A densidade do leito da coluna (ρ_b) foi avaliada medindo a massa de esferas (w_{bead}) que ocupam um certo volume (V_p) em uma proveta graduada (**Equação 6**). A porosidade do leito da coluna (ε_b) foi medida pelo volume de água desmineralizada (V_w) que preenche o espaço vazio em uma proveta com grânulos de alginato (**Equação. 7**). Os cálculos apresentados foram baseados em (SARTORIUS, 2016).

$$\rho_b = \frac{w_{bead}}{V_p} \quad \textbf{(6)}$$

$$\varepsilon_b = \frac{V_w}{V_P} \quad \textbf{(7)}$$

3.5.5 Densidade das esferas de alginato

As densidades experimentais das esferas (ρ^{e}_{bead}) foram medidas com auxílio de um picnômetro de vidro cujo volume era de 25,0 mL. As medidas de densidade foram realizadas seguindo o procedimento descrito em SARTORIUS (2016), aplicando a (**Equação. 8**). Onde ($\rho_{água}$) é a densidade da água,(w_w) é amassa de água que preenche o picnômetro, (w_{bead}), peso da esfera (w_{bead+w}) representa a massa das esferas e água adicionada ao picnômetro.

$$\rho_{bead} = \rho_{água} \cdot \frac{w_{bead}}{w_w + w_{bead} - w_{bead+w}} \quad \textbf{(8)}$$

3.5.6 Análise das esferas de alginato por Microscopia de varredura eletrônica

A estrutura superficial de grânulos de alginato (contendo ou não células) foi analisada pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), seguindo

um método adaptado de (ANNADURAIA; JUANGB & LEEA 2002). A microscopia eletrônica foi executada com a ajuda de um TM 3030 Plus (Hitachi), localizado no Laboratório de Tecnologias de Hidrogênio da UFRJ (LABTECH), usando feixe de elétrons focado de 15,0 KV de aceleração e ampliação de 1000x. As esferas carregadas e não carregadas com células foram previamente secas a 40ºC em estufa com circulação de ar, em seguida submetidos a análise.

3.5.7 Curva de absorção de Cálcio

A curva de absorção de cálcio foi construída para caracterizar o tempo de repouso necessário para a completa gelificação de esferas de alginato. A captação de cálcio foi monitorada durante a etapa de repouso, no procedimento de preparação de grânulos de alginato. 100,0 mL de solução aquosa de alginato a 2,0 % (sem células) foram transferidos gota a gota para 200,0 mL de solução de $CaCl_2$ 0,12 mol.L^{-1} (BICKERSTAFF,1997). Depois disso, o balão contendo as esferas foi armazenado a 4,0 ºC e 1,0 mL de amostras foram tiradas ao longo de 4,0 horas em duplicatas.

As amostras foram coletadas após 24, 48 e 72 horas para avaliação de longo prazo. O teor de cálcio livre foi medido por volumetria de complexação, descrito em (VOGEL, 1981), usando etilenodiaminotetracetato de sódio padronizado (ededato de sódio - ETDA) a 0,002 mol.L^{-1}, como agente titulante. A padronização da solução de ededato foi executada usando uma solução padrão primária de $CaCl_2$ 0,01 mol.L^{-1}. Eriocromo Preto T foi usado como indicador de cor. Com base nos cálculos a seguir foi possivel definir a concentração de cálcio na solução (**Equação 9**).

$$M_1 = \frac{M_2.V_2}{V_1} = \frac{0{,}01\ x\ 2}{Volume\ de\ titulante\ gasto\ (ml)} \qquad \textbf{(9)}$$

3.5.8 Curvas de absorção de xilose e ácido propionico

Curvas de absorção foram construídas para a absorção de ácido propiônico e D - (+) - xilose pelas esferas de alginato, aplicando o método descrito

por OYASS *et al*., (1995). Essa avaliação foi realizada com o objetivo de obter uma estimativa do tempo necessário para a migração dos componentes ao longo do meio de imobilização 20,0 g de esferas de alginato de cálcio, sem células, foram preparadas seguindo a metodologia detalhada naquele capítulo.

As esferas foram rapidamente transferidas para um grande becker previamente preenchido com 200,0 mL de solução aquosa de ácido propiônico, 37,0 $g.L^{-1}$ (21º C). A suspensão foi agitada com o auxílio de um impulsor de hélice a 200,0 rpm. Ao longo de 2,0 horas, amostras de 100,0 µL da solução foram coletadas e armazenadas em eppendorfs de 1,0 mL. 900,0 µL de água desminerilizada foram adicionados para diluir as amostras antes da análise do conteúdo ácido.

O mesmo experimento foi realizado para avaliação da absorção de xilose. Foram utilizados 200,0 mL de solução aquosa de xilose a 8,0 g.L-1 (21,0 ºC) nas experiências. 500,0 µL de amostras de solução de xilose foram coletadas ao longo de 2,0 horas e diluídas com 500,0 µL de água desminerilizada.

O conteúdo de ácido propiônico foi determinado por meio de análise cromatográfica conforme meodologia descrita por Wischral (2018). As análises foram realizadas no Laboratório de Combustíveis da UFRJ(LABCOM). A análise consistiu em utilizar a solução de H_2SO_4 5,0 mmol.L-1 desgaseificada como fase móvel a 1,0 $mL.min^{-1}$. Foram injetados 20,0 µL de volume de amostra em coluna cromatográfica C18 Fortis (5 µm, 4,6 mm x 250 mm) a aproximadamente 30,0 ºC. O ácido propiônico foi analisado utilizando um detector UV-VIS a 210,0 nm. O equipamento utilizado foi um Dionex Ultimate 3000 semi-prep de HPLC (ThermoScientific, USA).

O teor de xilose foi determinado por meio do mesmo método de análise descrito para o ácido propiônico. Um detector de índice de refração (Shodex-ThermoScientific, EUA) foi usado para detecção de xilose. Curvas analíticas foram construídas para ambos os componentes de 0,5 a 5,0 g.L-1, a partir dos cálculos inseridos na **equação 10**, foi possivel determinar a quantidade de ácido propiônico e na **equação 11**, de xilose absorvidas pelas esferas usando as concentrações finais estabelecidas anteriormente.

$$m_{Prop} = 200\,mL\,.\frac{1\,L}{1000\,mL}.\,33{,}74\,g.L^{-1} \qquad \textbf{(10)}$$

Para expressarmos a massa que 200mL de solução de alginato 2% possui, foi inferido um cálculo, tomando como base a densidade do previamente calculada através da **Equação 8**, vale ressaltar que os cálculos foram realizados com beads ausentes de células. O seguinte cálculo foi realizado:

$$m_{beads} = 200\ mL\ .1{,}030\ g.mL^{-1} = 206\ g\ de\ beads$$

$$\frac{x\ (g\ de\ AP)}{206\ g\ de\ beads} = \frac{(g\ de\ AP)}{g\ de\ beads\ úmidos} \qquad \textbf{(10.1)}$$

Dividindo o valor da massa de ácido propiônico absorvida pelos 206g de beads pela massa de beads é possível calcular os valores de massa de ácido absorvido por 206g de beads úmidos.

$$m_{xilo} = 200\ mL\ .\frac{1\ L}{1000\ mL}.7{,}1\ g.L^{-1} \qquad \textbf{(11)}$$

Os mesmos cálculos utilizados anteriormente para determinar a massa de ácido, foram aplicados para se conhecer os valores de massa de xilose absorvida em gramas, assim como a determinação da quantidade de xilose por gramas de alginato.

3.6 Determinaçõesdonúmerode células aprisionadas e quantiade de esferas

Para determinar o número de células por unidade de esferas, adotou-se uma forma adaptação do método descrito por ALHADEFF (1984), nesta metodologia foram recolhidas 10 gotas da suspensão (células / alginato) em uma proveta de graduação conhecida, as gotas oriundas da suspensão era diluídas adicionando água destilada até o volume de 10mL, da mesma maneira foi preparado uma amostra sem a presença de células, que foi usado como padrão. As leituras foram realizadas no aparelho de espectrofotômetro SHIMADZU UV mini 240 utilizando comprimento de onda de 600nm, os valores foram relacionados com a curva padrão do microrganismo.

Para realizar a contagem da quantidade de esferas produzidas foi empregado um método simples de contagem. A solução de alginato foi gotejada em uma proveta com volume conhecido de $CaCl_2$, com o deslocamento do líquido, provocado pela formação de beads o volume foi deslocado, e assim possivel estimar através de regra de três simples a quantidade de esferas formadas.

$$X\ unidades = \frac{A.B}{C} \quad \textbf{(12)}$$

Onde :

X= quantidade de esferas formados expressa em unidades(un)

A= unidade de gotas de algitato (pré-estabelecida)

B= volume da solução de alginato

C= volume de solução de cloreto de cálcio (pré-estabelecida

3.7 Meio e condições de Fermentação

3.7.1 Meio comercial (MQD)

As fermentações foram conduzidas em frascos cônicos com 300mL de meio quimicamente definido TSB (Triptic Soya Broth) da marca Neogen, cuja composição pode ser observada na Tabela 9, alguns componentes foram adicionados para enriquecer o meio,5.0 $g.L^{-1}$, 10.0 $g.L^{-1}$de extrato de levedura, 0.25 $g.L^{-1}$ K_2HPO_4 e 0.25 $g.L^{-1}$ de $MnSO_4$. A concentração de xilose comercial (Sigma Aldrich) foi adicionada ao meio de acordo com cada experimento, as concentrações adotadas foram de 20, 30 e 40 $g.L^{-1}$.Na **Figura19** é demonstrado o aparato do frasco cônico com meio de fermentação e esferas dispostos no meio, aproximadamente duas mil esferas, com a distribuição de massa celular de 5,25 mg/L por esfera. As amostras eram coletadas no intervalo de 24h com pipetas estéreis, e armazenada em *eppendorfs* de 2mL, em seguida foram diluídas e direcionadas a análises cromatográficas.

Figura 19: Fracos cônicos onde foram realizadas as fermentações.

Tabela 9: Composição do meio fermentação (TSB).

Componentes	Concentração (g/L)
TSB*(Neogem)	5
Extrato de Levedura	10
K_2HPO_4	0,25
$MnSO_4$	0,05

TSB*: peptona de caseína (5g/L), peptona de soja (2g/l), cloreto de sódio (4g/L),dextrose (2,5g/L) e fosfato de potássio dibásico (2,5g/L).

3.7.2 Meio com Hidrolisado Hemicelulósico (MHH)

O hidrolisado hemicelulósico (**Figura 20**), teve seu pH ajustado utilizando hidróxido de cálcio, com auxílio de uma espátula o hidróxido de cálcio era adicionado no hidrolisado para posteriormente ser utilizado no meio de fermentação, onde este também era acrescido dos componentes anteriormente citados. As fermentações eram conduzidas em frascos cônicos de 500mL contendo meio previamente esterilizado em autoclave nas condições, de 0,5 atm e 20min.

Figura 20: Hidrolisado hemicelulósico após ajuste de pH.

3.7.3 Determinação da concentração de substratos e produtos

A fim de estabelecer um acompanhamento prévio fermentação estabelecida, a quantidade de açúcares redutores totais foi realizado pelo emprego do método DNS (MILLER,1959). O Método consiste em adicionar 100 µl da amostra conhecida e 300µl de reagente DNS, a mistura foi submetida a banho com temperatura de 100 ºC durante 5min. Após esse tempo determinado as amostras foram resfriadas e foi adicionado 1,5 mL de água destilada, as medidas eram feitas por absorvância com comprimento de onda definido em 540 nm e os valores relacionados com a curva de calibração de açúcares.

Para uma análise mais precisa, foi realizada a quantificação do substrato e produto por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), os cromatógrafos da marca SHIMADZU foram acoplados a uma coluna Hi-Plex a 60ºC, com fase móvel de H_2SO_4 5mM e fluxo 0,6 mL/min. Os açúcares foram detectados por índice de refração (RID), enquanto os ácidos orgânicos foram detectados por ultra-violeta (UV-210 nm). Para os cálculos de concentração foram utilizados os cromatogramas típicos do aparelho, como mostrado na **Figura 21**.

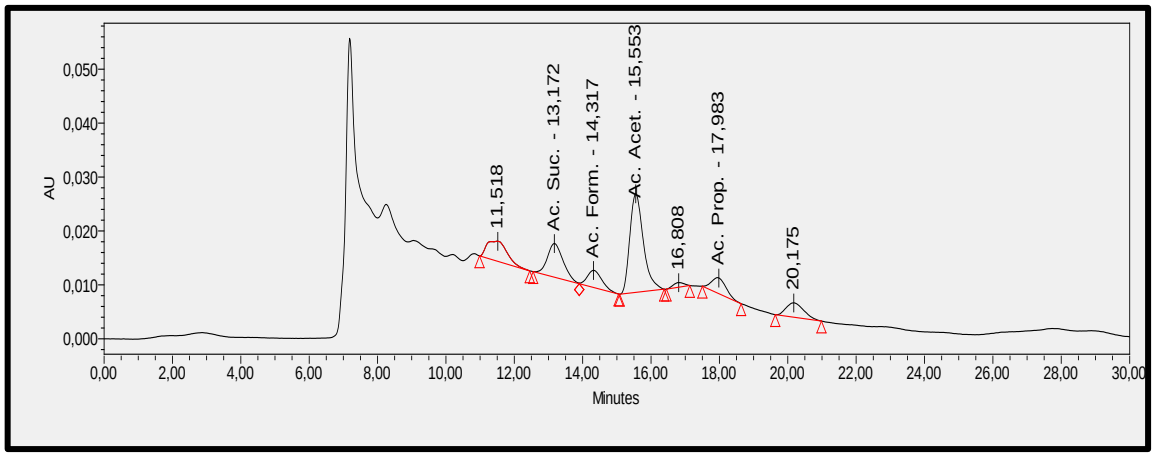


Figura 21: Cromatograma para ácidos orgânicos analisados. Ácidos analisados: succínico, fórmico, acético e propiônico.

3.7.4 Cálculos dos parâmetros avaliados na fermentação

3.7.4.1 Varáveis de resposta

Para as fermentações com células imobilizadas com xilose comercial ou com hidrolisado hemicelulósico, foram consideradas o rendimento (g/g) de produção de ácidos orgânicos ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica Q_P (g/L.h) conforme equações a seguir:

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} \quad \textbf{(13)}$$

$$Q_P = \frac{(P - P_0)}{(T)} \quad \textbf{(14)}$$

Onde: P: Concentração final de ácido (g/L)

P_0: Concentração inicial de ácido (g/L)

S: concentração final de substrato (g/L)

S0: concentração inicial de substrato (g/L)

T: tempo de fermentação (h)

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterizações da matéria-prima

4.1.1 Caracterização do bagaço de sorgo

Conforme descrito no capítulo de Materiais e Métodos, o bagaço de sorgo foi caracterizado quanto ao teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. A composição química obtida deste resíduo lignocelulósico está apresentada na tabela 10.

Tabela 10: Composição do bagaço de sorgo sacarino

Componentes	Bagaço Pré-Tratado% Base Seca (M/M)
Celulose	47,92 ± 0,33
Hemicelulose	15,52 ± 0,33
Lignina	25,61 ± 0,5
Cinzas	0,68 ±, 0,2

Os resultados obtidos estão de acordo com os reportados por BARCELOS (2012). Vale ressaltar que a lavagem do bagaço em água corrente é importante para eliminar alteração que pode ocorrer com a composição química do material.

4.1.2 Pré-tratamento com ácido diluído

O pré-tratamento com ácido diluído foi o escolhido tendo em vista ser o procedimento que resulta em um meio rico em xilose, decorrente da associação do fracionamento da hemicelulose com a sua hidrólise em condições moderadas. Além disso, é um processo largamente utilizado no LADEBIO, que tem estudos com a produção de uma série de moléculas a partir desta fração, denominada de "fração C5". Portanto, é um pré-tratamento consolidado no grupo, pela sua eficiência e pronta fermentabilidade. A composição do hidrolisado hemicelulósico está apresentado na **Tabela 11**.

Tabela 11: Composição do hidrolisado hemicelulósico

Componentes	Concentração (g/L)
Xilose	42,03
Glicose	4,01
Celobiose	1,79
HMF	0,09
Furfural	0,30

Desta tabela, pode-se verificar o material pré-tratado com ácido sulfúrico diluído possui expressiva quantidade de xilose, principal componente da fração hemicelulósica do bagaço de sorgo. Isto sinaliza para o aproveitamento desta fração para a produção de ácido propiônico.

4.1.3 Capacidade do microrganismo de assimilar diferentes substratos

Foi avaliada a capacidade do microrganismo de assimilar glicose e xilose. A **Figura 22** exibe as curvas de crescimento bacteriano em ambas fontes de carbono.

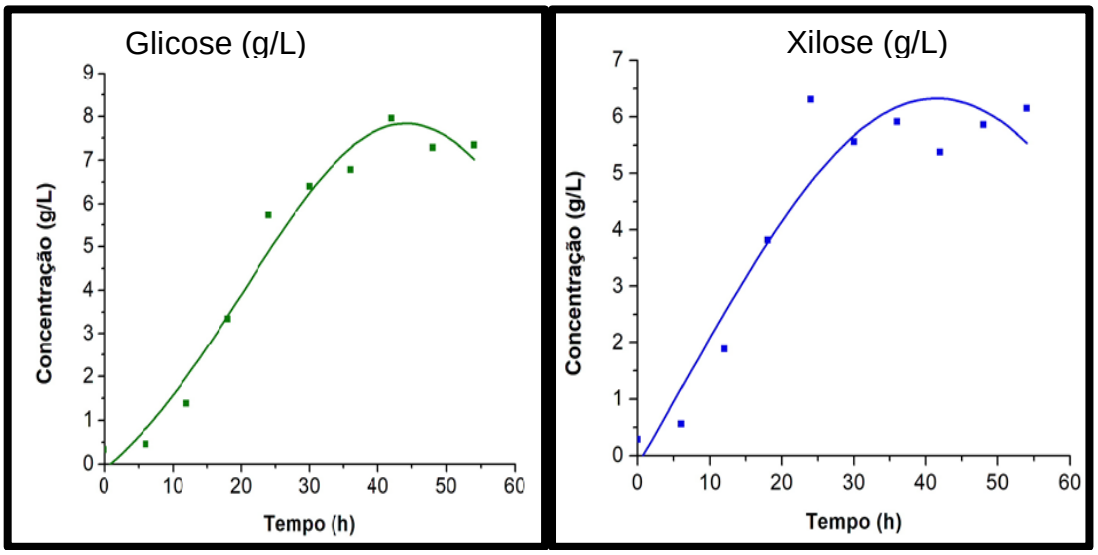


Figura 22: Curvas de assimilação de susbstrato, onde a esquerda está representada a curva de crescimento em glicose e à direita representada a curva de crescimento em xilose.

A taxa específica de crescimento (μ_x) quando a fonte de carbono utilizada foi glicose, correspondeu a 0,076 h^{-1} com um tempo de duplicação correspontente 9,1 horas, resultando numa concentração celular máxima de aproximadamente 8 g/L, após 42 horas de cultivo. Por outro lado, quando a fonte de carbono utilizada foi xilose, a taxa específica de crescimento assumiu o valor de 0,089 h^{-1}, correspondendo a umtempo de duplicação celular de 7,8 horas. A concentração celular final foi menor em relação ao crescimento em glicose, cerca de 6,0 g/L de células, ao final de 42 horas. Embora a glicose tenha apresentado um valor de concentração celular maior, as diferenças não foram significativas, o que torna a utilização da xilose como substrato para a fermentação propiônica uma alternativa que apresenta elevado potencial de viabilidade técnica.

4.2 Caracterização física dos esferas de alginato

4.2.1 Forma, tamanho e propriedades físicas das esfers de alginato de cálcio

As medidas físicas foram realizadas com o objetivo de caracterizar e padronizar o procedimento de preparação das esferas de alginato. Dados sobre propriedades físicas simples de meios de imobilização não são frequentemente publicados na literatura.

Verificou-se que os diâmetros das esferas foram de 4,7 ± 0,2 mm e 4,2 ± 0,1 mm para aquelas carregadas e não carregadas com células, respectivamente. Os valores de circularidade foram de 0,93 ± 0,04 e 0,94 ± 0,04 para ambas as esferas carregadas e não carregadas com células, respectivamente. O teste estatístico indicou que existem diferenças significativas entre os diâmetros e o arrendodamento das esferas não carregadas e carregadas (valor de $p < 0,05$). Valores de arredondamento próximos a 1,0 denotam que a forma das esferas está muito próxima da geometria de uma esfera perfeita. Pérolas esféricas são bastante desejáveis uma vez que, mais unidades, e por sua vez, mais células, poderiam ser facilmente acondicionadas em um biorreator ao longo de uma fermentação.

A distribuição dos valores relacionados aos diâmetros (medidas de tamanho) e circularidade (medidas de forma) é mostrada na **Figura 23**, para ambas as esferas de alginato carregadas com células e não carregadas. A tendência de normalidade foi verificada sobre os valores residuais, através da realização do cálculo do valor de *p* teste estatístico de *Shapiro-Wilk* (Sh-Wilk). De acordo com o teste, adotou-se um valor de normalidade ($\alpha = 0,05$). Quando valores de p calulados são menores que o valor da normalidade, ou seja, (*p-valor* < α=0,05), pode-se afirmar com nível de significância de 5% , que as amostras analisadas não possuem uma distribuição normal.

No estudo realizado os valores de *p* calculados foram todos menores que 0,009, denotando que os resíduos não são normalmente distribuídos dentro da faixa de valores para diâmetros e arredondamento. Isso mostra que o procedimento para preparação de grânulos, principalmente o aparato experimental usado, produz esferas de alginato com razoável variância em tamanho e forma.

Entretanto, essa variação ocorre dentro de um pequeno intervalo de desvio padrão, tanto para o diâmetro quanto para o arredondamento, nos dois tipos de esferas de alginato (carregadas e não carregadas), como pode ser observado na **Tabela 12**. Assim, o procedimento de imobilização adotado é suficientemente robusto e produz *esferas* de alginato com valores de tamanho e forma razoavelmente reprodutíveis.

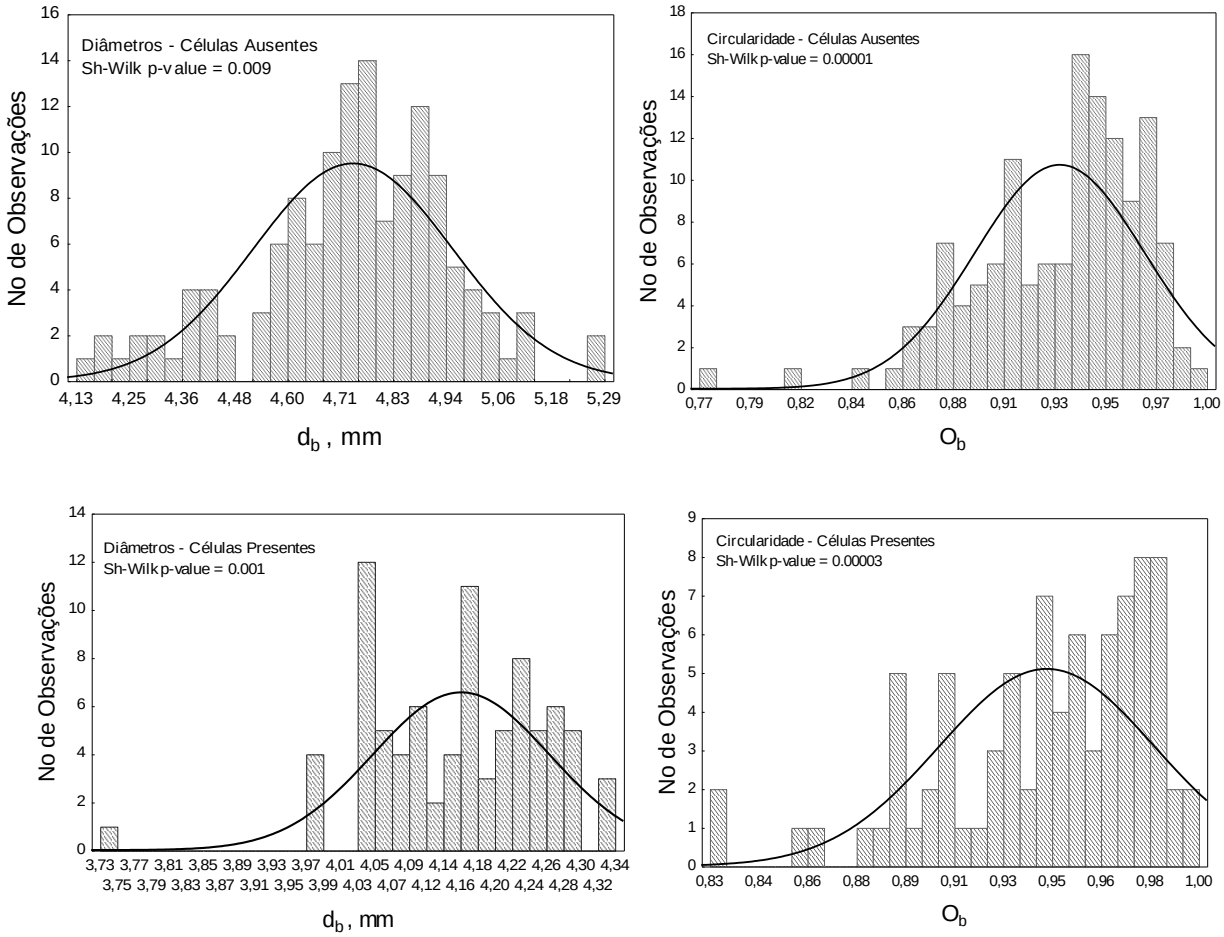


Figura 23: Distribuições de diâmetros e arredondamento para as esferasde alginato carregadas com células de *P. acidipropionici* e não carregadas. Cerca de 130 esferas foram amostradas para descrição estatística dos diâmetros e circularidade. Sh-Wilk representa o teste paramétrico de *Shapiro-Wilk* para normalidade (α = 0,05).

Esferas com diâmetros e formatos bem definidos são preferidos para imobilizar células, uma vez que garantiria uma migração mais homogênea dos nutrientes para os microrganismos, além disso, espera-se o aumento da reprodutibilidade do desempenho no processo de fermentação.

Tabela 12: Caracterização física das esferas na prença e ausencia de células *P. acidipropionicii* CIP53164.

Propriedades Físicas	Ausência de células (D_P médio)	DPR%	Presença de Células (DP médio)	DPR %
$\overline{w_{bead}}$, g	0.047 ± 0.001	1.9108	0.048 ± 0.003	6.94
$\overline{d_b}$, mm	4.7 ± 0.2	4.6	4.2 ± 0.1	2.5
O_b	0.93 ± 0.04	4.30	0.94 ± 0.04	4.04
ρ^e_{bead} , g.mL^{-1}	1.030 ± 0.001	0.0874	0.99 ± 0.04	3.88
ρ_b , g.mL^{-1}	0.59 ± 0.01	1.69	0.62 ± 0.02	2.62
ε_b	0.41 ± 0.03	7.32	0.39 ± 0.02	4.61

D_P, Desvio padrão do método; DPR%, Desvio padrão relativo; $\overline{w_{bead}}$, unidade de peso do *bead*; $\overline{d_b}$, diâmetro médio do bead; O_b, circularidade média; ρ^e_{bead}, densidade experimental das esferas relativa à **equação 8**; ρ_b, densidade do leito das esferas calculado a partir da **equação 6** ; ε_b, porosidade das esferas calculada pela **equação 7**.

Os valores respectivos das esferas carregadas e não carregadas com células foram bem próximos, o peso unitário para esferas carregados foi de 0,048 ± 0,003 enquanto que para os não carregados, os valores foram 0,047 ± 00,1. Quando aplicado o *t-teste*, este não mostrou diferenças significativas do peso unitário entre ambas as medidas (*p*-valor = 0,597).

Os pesos unitários são semelhantes, ainda assim as esferas carregadas com células apresentavam um valor de diâmetro médio inferior às esferas que não continham células, o que pode ter sido causado pelo efeito da diluição do alginato. A biomassa celular carrega consigo uma quantidade residual de meio de crescimento, que é o suficiente para causar a diluição do meio de alginato. A diluição diminui a viscosidade da mistura (biomassa celular + solução de alginato), e por sua vez o diâmetro médio das esferas, a circularidade também são ligeiramente afetadas. Isso pode ser confirmado na **Figura 17**, onde as amostras de esferas carregadas com células apresentaram diâmetro menor do que as que não estavam carregadas.

Para os valores relativos à densidade das esferas, medidos pelo método de picnometria foram encontrados 1,030 ± 0,001 $g.mL^{-1}$ e 0,99 ± 0,04 $g.mL^{-1}$ para as esferas não carregadas e carregadas. O (*t-teste*) não indicou diferenças estatisticamente significativas entre os valores de densidade das esferas (*p-valor* = 0,311). Os valores de densidade estão muito próximos da densidade da água o que é razoável uma vez que a solução contém apenas 2% de alginato de sódio e as esferas elevada porosidade. É importante que a densidade das esferas seja próxima da densidade média, isso pode garantir que as esferas se mantivessem suspensas quando submetidas a agitação constante durante o processo de fermentação. Além disso, o ambiente aquoso dentro das esferas facilita a transferência de massa dos nutrientes e produtos para dentro do núcleo das esferas e para as suas superfícies.

A densidade do leito e a porosidade são propriedades correlacionadas que indicam uma medida do espaço ocupado por certa quantidade de esferas. Esses parâmetros são úteis para fins de cálculo, como da fração de meio de cultura que pode fluir no espaço intersticial do leito, as perdas no topo do leito, o volume útil total em um biorreator e outros parâmetros de engenharia. Os valores para ambas as propriedades foram bem próximos um do outros 0,59 ± 0,01 $g.mL^{-1}$ e 0,62 ± 0,02 $g.mL^{-1}$ para os valores de densidade das esferas (ρ_b) não carregadas e carregadas com células. O valor encontrado para porosidade dos esferas (ε_b) foi 0,41 ± 0,03 e 0,39 ± 0,02, para as esferas não carregadas e carregadas com células, respectivamente. Os resultados mantiveram coerência com as medidas de tamanho, uma vez que as esferas não carregadas, cujo diâmentro médio é de 4,7 ± 0,2 mm, ocupam um espaço menor no leito (alta fração de espaço não ocupado no leito) do que quando carregados, cuja média do diâmetro é de 4,2 ± 0,1 mm. No entanto, aplicando o *t–teste*, os valores de *p* calculados para a diferença entre os valores médio foram de 0,084, para a densidade, e 0,384, para porosidade do leito. Todavia, não foram identificadas diferenças relevantes para estes parâmetros, quando se comparam as esferas carregadas e não caregadas. Isso indica que as pequenas diferenças encontradas na forma e tamanho das esferas, não sejam transmitidas de forma relevante aos parâmetros de volume que são relacionados às propriedades do leito.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de esferas de alginato contendo ou não células *P. acidipropionici* foram submetidas à microscopia de varredura eletrônica, a aparência física macroscópica das esferas imobilizados pode ser vista nas **Figuras 24.A.1** e **24.B.1**. Foi observado um encolhimento das esferas de alginato carregadas e não carregadas com células durante o processo de secagem e preparação para análise, o que indica perda total de água.

As esferas de alginato não carregadas (**Figura 24.A.1**) apresentaram uma superfície quase lisa coberta por poros muito pequenos espalhados sobre ela. Algumas protuberâncias, associadas às cadeias de alginato de cálcio também podem ser vistas, mesmo a água sendo evaporada durante o processo de secagem, a esfera manteve sua forma esférica com leves distorções.

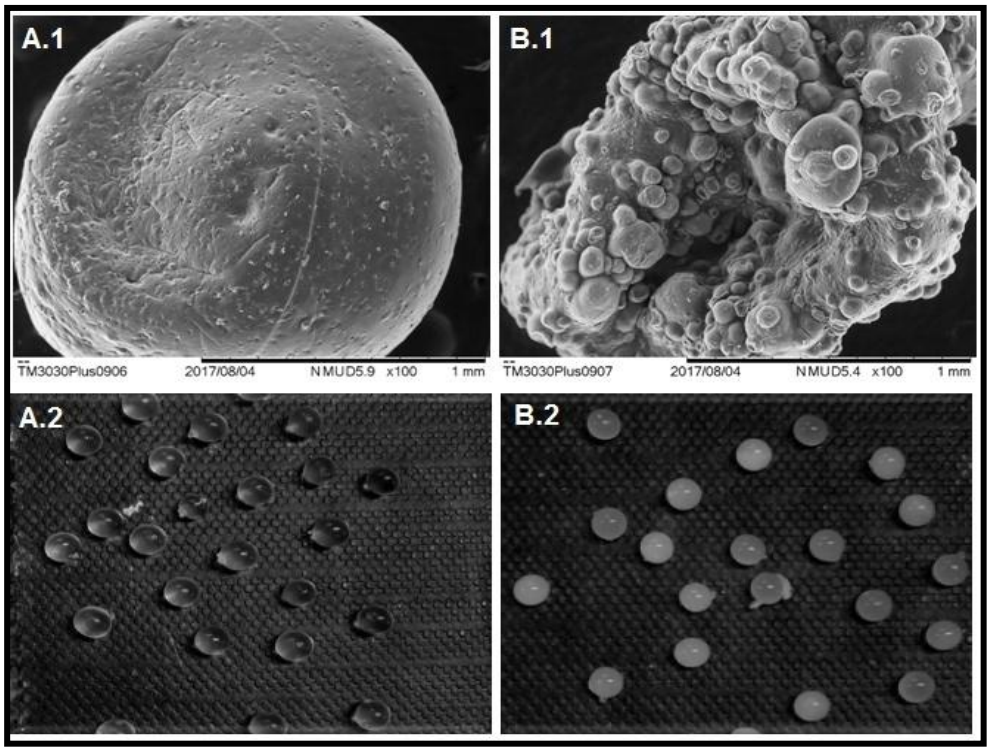


Figura 24: Efeito da presença de células *P. acidipropionici* imobilizadas em esferas de alginato. Imagens SEM de beads não carregados com células (**A.1**) e esferas contendo células, após aplicação de um ciclo de fermentação (**B.1**). Aparência geral de esferas de alginato sem células (**A.2**) e com células presentes (**B.2**)

As esferas apresentadas na (**Figura 24.B.1**) apresentam aspecto leitoso, indicando que existe biomassa celular no imobilizadas no interior das esferas, quando comparadas com as esferas da (**Figura 24.A.1**), pode se observar melhor o resultados da imobilização celular.

4.2.3 Curva de absorção de Ca^{+2} na gelificação de *beads* de alginato

A curva de absorção de cálcio é mostrada na **Figura 25**. Os pontos no gráfico referem-se ao cálcio livre remanescente em solução aquosa durante a etapa de gelificação das esferas de alginato à 4ºC.

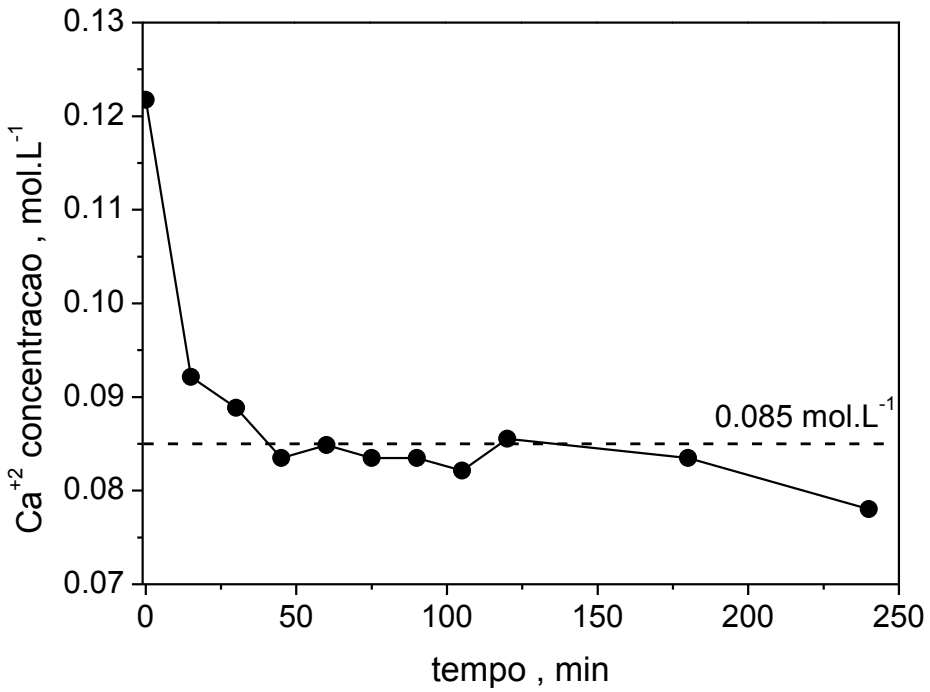


Figura 25: Curva de captação de cálcio para o processo de gelificação de esferas de alginato.

A captação de cálcio ocorre devido à migração desse íon (Ca^{+2}) para matriz de alginato. O íon divalente associa-se, por meio de fortes intereções eletrostáticas com grupos carboxíla com monômeros de manurato e guluronato que compõem as cadeias de alginato,originando uma estrutura de gel de alginato capaz de reter células e enzimas para várias aplicações práticas.

A estrutura do gel de alginato é formada quase que imediantamente após o contato com a solução de $CaCl_2$, então o tempo para formação do gel pode ser inferido pelo monitoramento da depleção de cálcio da solução mãe.Esta informação foi gerada em vista da falta de concordância na literatura sobre uma relação sistemática entre as condições experimentais e o tempo para o acúmulo de gel.

De acordo com os resultados, a concentração de cálcio livre estabilizou após 50 min a um valor de 0,085 $mol.L^{-1}$. O mesmo valor médio foi obtido para amostras tomadas após 24, 48 e 72 h. Esferas de alginato com 4,7 mm de diâmetro, na proporção de 1:2 de *esferas:*solução mãe foram usadas nesse ensaio. A concentração inicial da solução mãe de cloreto de cálcio foi de cerca de 0,12 $mol.L^{-1}$.

Esse resultado é uma medida indireta e aproximada do tempo necessário para o acúmulo de gel de alginato. A fim de garantir a formação do gel, definimos o procedimento experimental com um tempo de cerca de 60 a 90 minutos para esse passo específico.

4.2.4 Curvas de absorção de ácido propiônico e xilose pelas esferas de alginato

As curvas de absorção para ácido propiônico e xilose são apresentadas na **Figura 26.A** e **26.B**, respectivamente. Os dados apresentados referem-se as esferas sem a presença de células. Os resultados sobre o suporte de imobilização são importantes para estimar os efeitos do gel de alginato na absorção desses componentes do meio de fermentação. Ambas as curvas apresentaram um padrão esperado de absorção em massa. As concentrações estabilizaram em aproximadamente 40 minutos, após o início do ensaio. Após 24 h, as concentrações finais foram de 33,7 g./L.h e 7,1 g/L.h, para ácido propiônico e xilose, respectivamente..

Pode-se inferir que há resistência relevante ao transporte de massa de ácido propiônico e xilose no núcleo das esferas, uma vez que a concentração evoluiu ao longo do tempo e demorou a atingir um valor estável. Comportamento semelhante é esperado para outros componentes do meio de cultura. É importante

salientar que este efeito foi observado para as esferas de gel com 2,0% de alginato de sódio com e sem a presença de microrganismos.

Recalculando as concentrações finais, considerando que o volume final da solução é composto pelo volume inicial (200 mL), mais o volume da fase aquosa da massa total de esferas adicionados à mistura, pode-se encontrar 33,86 g/L.h e 7,25 g/L.h para ácido propiónico e xilose. Esses valores são estimativas teóricas baseadas no pressuposto de que as esferas de gel de alginato contêm 98,0% de água livre e são bastante próximas dos valores médios experimentais encontrados após a estabilização da concentração.

Os resultados mostraram que não há adsorção relevante dos componentes-alvo nas esferas de alginato. Existe apenas uma distribuição simples dos componentes do meio de cultura em massa para a fase aquosa interna das esferas. Para aplicações tecnológicas, alguns efeitos de adsorção seriam desejáveis, uma vez que a fase sólida das esferas (cadeias de alginato) poderia eliminar alguns dos produtos inibitórios formados durante a fermentação, diminuindo sua concentração efetiva dentro das esferas. Por outro lado, a adsorção de substratos, como os açúcares, reduziria sua disponibilidade para consumo pelo microrganismo, levando a um pior desempenho da fermentação.

Uma estimativa da quantidade de massa em gramas absorvida pelas esferas de alginato, pode ser feita usando as concentrações finais obtidas a apatir dos cálculos realizados com dados obtidos na análise de HPLC. Para ácido propiônico, cerca de 0,033 g são absorvidos por 1,0 g de esferas úmidas, para os calculados,foram utilizadas algumas equações que podem ser analizadas na sessão 3 do referido trabalho.No caso da xilose, 0,0071 g foram absorvidos por 1,0 g de esferas úmidas. A quantidade de massa absorvida é bastante significativa e dependerá da concentração do componente, antes e depois da adição das esferas de alginato. Os cálculos prévios precisam ser considerados para avaliação correta do desempenho de um processo de fermentação executado com células imobilizadas, uma vez que certa quantidade dos produtos será confinada dentro do suporte de imobilização.

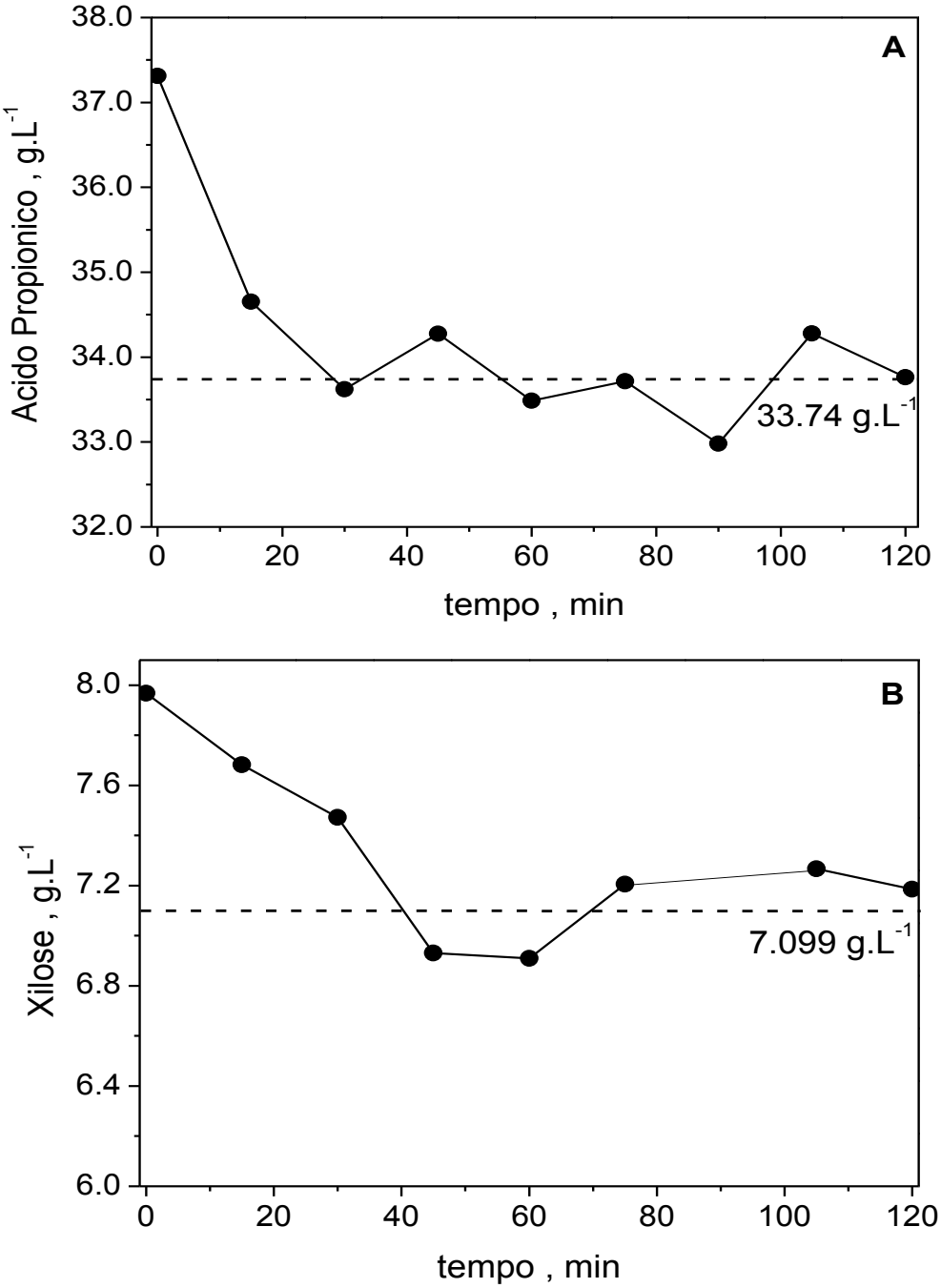


Figura 26.B: Curva de absorção de ácido propiônico (**A**) e xilose (**B**) por esferas de alginato de cálcio.

4.2.5 Fermentações com células imobilizadas utilizando como substrato xilose comercial e hidrolisado hemicelulósico

Conforme descrito em materiais e métodos, partindo-se do inóculo, as células foram concentradas utilizando uma centrifuga com rotação de 8.000 rpm, pelo tempo de 10min. Na sequência, as células foram homogeneizadas em solução de alginato de sódio para em seguida serem submetidas a etapa de imobilização.

Em experimento realizado, em 1 L de meio de cultivo foi possível obter ao final, uma concentração de 8,3 g/L de células, que foram suspensas em 100mL de solução de alginato de sódio, seguida do processo de formação das esferas com as células imobilizadas. Após o processo de gelificação, cujo tempo ideal foi definido como 50 mim, as esferas foram transferidas para o meio de fermentação e o experimento conduzido em *shaker* agitado a 150 rpm, com retirada de alíquotas a cada 24 horas. Quando utilizado meio quimicamente definido com xilose comercial como substrato, foram consumidos 58,2% de substrato, resultando numa concentração de ácido propiônico (AP) total equivalente a 10,3 g/L. Por outro lado, a concentração de ácido acético e ácido succínico foram bem reduzidas, o que é interessante, visto que a formação de subprodutos diminui o rendimento no produto principal propriamente dito, assim como mais acentuada alteração do pH do meio.

A relação ácido propiônico, ácido acético e ácido succínico obtida ao final da fermentação foi de AP: AA:AS 1,00:0,23:0,05 respectivamente.

De acordo com os experimentos, foi possível observar que a formação de ácidos orgânicos pode baixar o pH para 3 numa concentração de 8 a 12 g/L de AP formado. Apesar do tempo de fermentação total ter sido elevado, aproximadamente 288 h, observa-se que a produção máxima de AP foi alcançada no tempo de aproximadamente 120 h. Neste tempo foi calculada a produtividade volumétrica (Q_p) que foi de 0,086 g/L.h. Mesmo não estando o processo otimizado, provou-se o conceito da produção de AP utilizando células imobilizadas em matriz de alginato de cálcio.

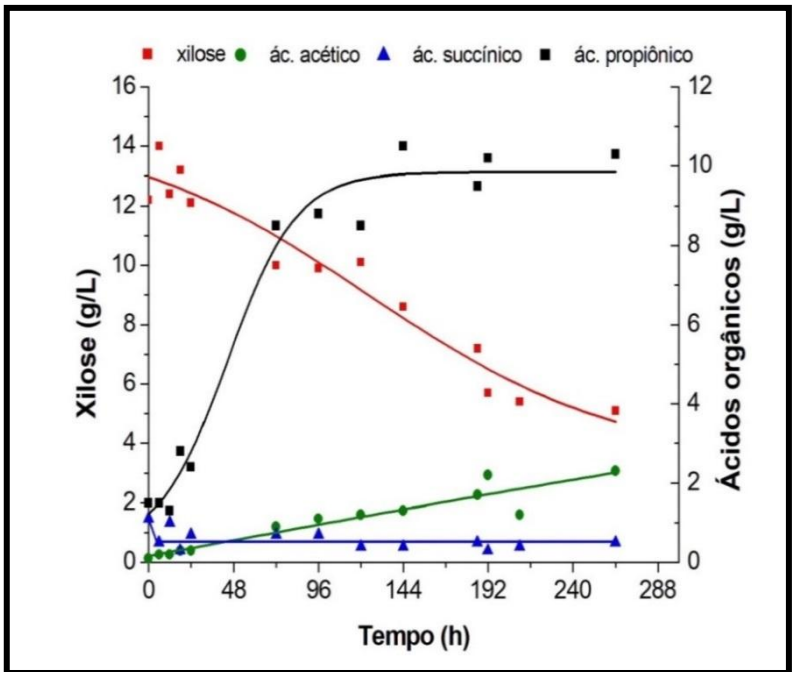


Figura 27: Perfil da fermentação com células imobilizadas utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial. Concentração celular 3,5 g/L aproximadamente 2000 esferas.

Durante o período de fermentação do experimento, observou-se desprendimento de células da matriz de alginato. Com objetivo de observar a viabilidade/atividade das células desprendidas da matriz, ao final da fermentação, foi promovida uma centrifugação do meio para concentrar as células desprendidas, e em seguida, estas foram ressuspensas em um novo meio contendo os nutrientes e substratos necessários para manutenção celular e nova fermentação. Na **Figura 28**, é apresentado o perfil cinético da produção de ácidos orgânicos com células livres, desprendidas das esferas.

Uma suposta explicação para o desprendimento celular pode ter sido decorrente da formação de CO_2, o que causou rompimento das esferas, particularmente pela não distribuição uniforme das células imobilizadas, como observado na microscopia eletrônica de varredura, causando uma configuração física distorcida das esferas.

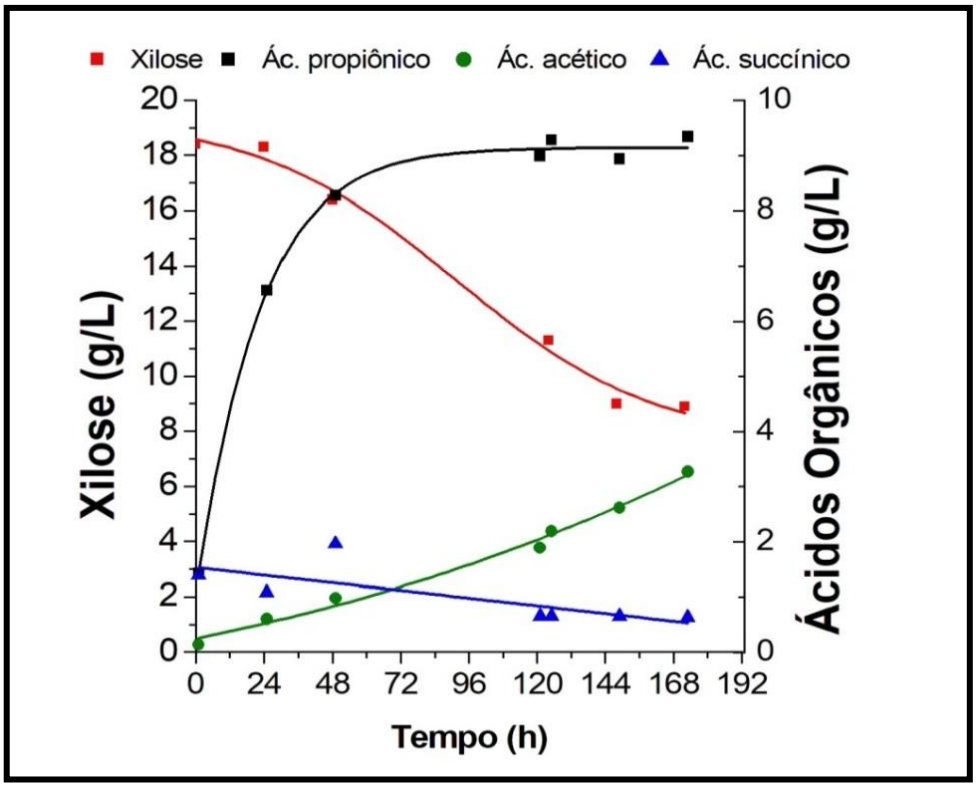


Figura 28: Perfil da fermentação com células livres (desprendidas das esferas) utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial. Concentração celular 2,7g/L.

Quando submetidas a novo meio de fermentação, as células desprendidas se mantiveram viáveis e ativas, tendo consumido 51,6% da xilose disponível. A produção de ácido propiônico foi de 9,4 g/L e a de ácido acético de 3,2 g/L, correspondendo a um aumento de 1,4 vezes, quando comparado à fermentação anterior. A relação AP: AA:AS, obtida ao final da fermentação, foi de 1,00:0,34:0,07.

O valor de produtividade volumétrica neste caso foi de 0,130 g/L.h, o que é razoável, tendo em vista que fermentações com células livres não encontram as barreiras relacionadas à transferência de massa encontradas em sistemas com células imobilizadas.

Com o objetivo de eliminar os inconvenientes de desprendimento celular ocorridos na fermentação anterior, foi produzida uma nova batelada de esferas, onde 10,4 g/L de biomassa de células foram adicionadas em 100 mL de solução de alginato de sódio, homogeneizados até que não se observasse a formação de aglomerados celulares, seguido de imobilização. Através de medidas de

absorvância, foi possível avaliar a quantidade de células por esferas, que equivaleu a aproximadamente 0,00525 g de células por esfera, a quantidade de esferas formadas foi de aproximadamente 2040 unidades para 100 mL de solução de alginato.

Na **Figura 29**, pode ser avaliado o perfil cinético desta fermentação, tendo sido verificado um aumento no consumo percentual de substrato (70,9%) quando comparado às fermentações anteriores; no entanto a concentração de ácido propiônico (8,9 g/L) e a produtividade volumétrica (0,09 g/L.h) assumiram valores similares aos casos anteriores. Um aspecto interessante que mostra a importância da distribuição de células mais uniforme durante o processo de imobilização foi a negligenciável produção de ácido acético e ácido succínico.

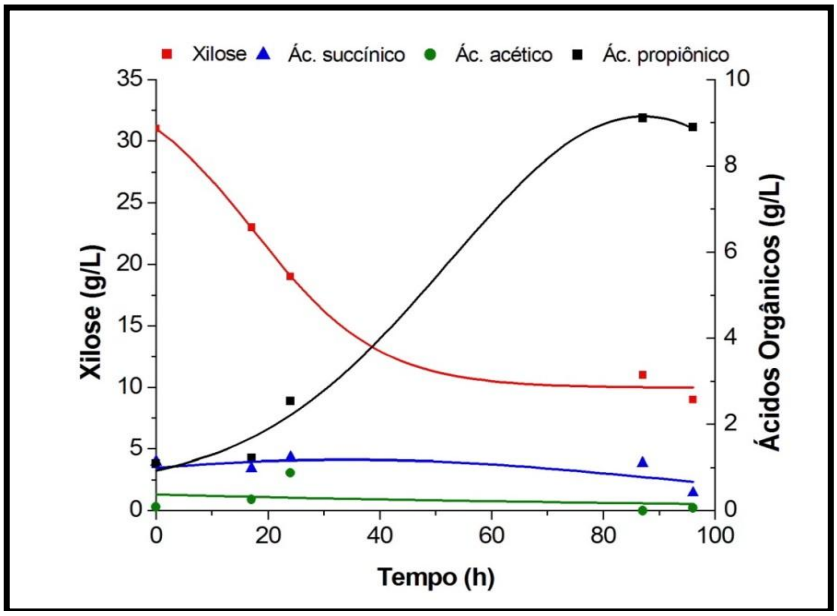


Figura 29: Perfil cinético de fermentação com células imobilizadas utilizando meio quimicamente definido contendo xilose comercial. Concentração de células 10,4g/L, aproximadamente 2040 unidades de esferas.

Em estudo anterior, ZHUNG *et al*. (2014) mostraram que na produção de ácido propiônico em fermentação com pH não controlado, ocorre a formação de subprodutos mais rapidamente. Nestes estudos, foi mostrado que quando o pH era menor que 5,4, as células *P.acidipropionici* desviam a produção para a formação

dos subprodutos, já a produção de ácido propiônico era mais favorecida quando o pH era superior a 5,9.

Quando as células imobilizadas foram submetidas à reutilização (**Figura 30**), utilizando como meio o hidrolisado hemicelulósico foi observado que houve um acréscimo na concentração dos subprodutos, como ácido acético (AA) e ácido succínico (AS). Observou-se que a concentração de ácido propiônico em meio hidrolisado (MH) teve um pequeno aumento (9,9 g/L) em relação àquela obtida em meio quimicamente definido (8,7 g/L). Verifica-se, ainda, maior valor para o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) quando utilizado o meio com hidrolisado (0,561 g/g), quando comparado ao meio quimicamente definido (0,359 g/g). Já a produtividade volumétrica (Q_P) foi similar em ambos os meios, com valor médio de 0,085 g/L.h.$^{-1}$

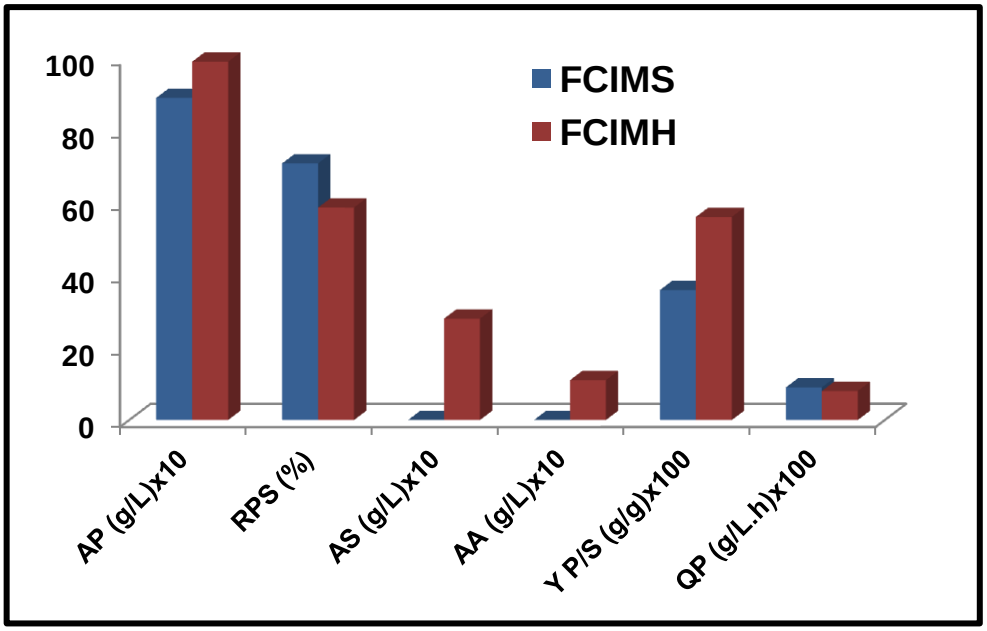


Figura 30: Reutilização das esferas de alginato utilizando hidrolisado hemicelulósico (FCIMH) e meio quimicamente definido contendo xilose comercial (FCIMS).

Por fim, foi realizado um experimento contemplando duas etapas de reutilização sucessivas com as células imobilizadas, como prova de conceito do método de imobilização adotado para a fermentação em tela. As duas primeiras fermentações foram em meio quimicamente definido e a última em meio hidrolisado.

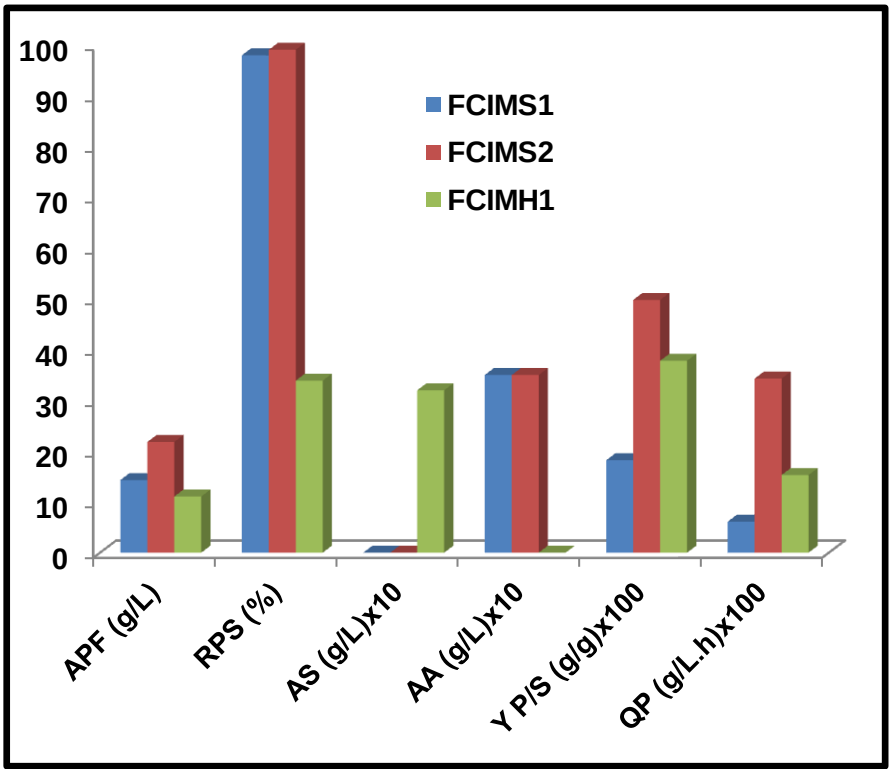


Figura 31: Reutilização das esferas na fermentação propiônica. APF: ácido propiônico final (g/L); RPS: redução percentual de substrato (%); AS: ácido succínico (10*g/L); AA: ácido acético (10*g/L); $Y_{P/S}$: fator de rendimento (100*g/g); Q_P: produtividade volumétrica (100*g/L.h). FCIMS1: primeira batelada com células imobilizadas em meio quimicamente definido; FCIMS2: segunda batelada com células imobilizadas em meio quimicamente definido; FCIMH: terceira batelada em meio hidrolisado hemicelulósico.

Inicialmente, observa-se que nas duas bateladas iniciais (FCIMS1 e FCIMS2) com meio quimicamente definido houve consumo praticamente integral da xilose originalmente disponível, atingindo os valores de 98% e 99,1%, respectivamente. O consumo se reduz para 34% na terceira batelada sequencial com meio hidrolisado (FCIMH1), o que muito provavelmente se deve à toxicidade do meio. Muito embora o meio hidrolisado tenha sido produzido com a técnica de pré-tratamento consolidada no LADEBIO, substâncias tóxicas, como compostos furânicos, decorrentes da desidratação ácida dos açúcares da hemicelulose e aromáticos da degradação parcial da lignina são formados, e mesmo que em pequenas concentrações são inibidoras do metabolismo celular. Ressalta-se que o impacto dessa inibição é dependente do microrganismo agente do processo, mas é

conhecido que as bactérias são mais sensíveis à ação desses compostos inibidores do que os fungos filamentosos ou não.

No que se refere à produção de ácido propiônico, observa-se um aumento na sua concentração da primeira batelada (14,3 g/L) para a segunda (21,8 g/L), com redução quando as células foram transferidas para a terceira batelada (11,1 g/L), em meio hidrolisado.

A concentração final de ácido acético foi apreciável nas duas bateladas em meio quimicamente definido (ca. 3,5 g/L), sendo negligenciável em meio hidrolisado. Por outro lado, a concentração de ácido succínico foi desprezível nas duas bateladas iniciais e foi considerável no meio hidrolisado (3,2 g/L). Isto pode estar associado ao papel importante do ácido succínico, que tem a sua síntese estimulada em condições de estresse ambiental, anóxico em especial (Stephanopoulos *et al*., 1998).

Os seres vivos, em particular microrganismos têm que lidar com fatores climáticos e desenvolver estratégias para adaptar seu metabolismo, que pode ser afetado adversamente, para se aclimatar e sobreviver sob essas condições desfavoráveis ao seu crescimento. Mecanismos de tolerância ao estresse envolvem algumas mudanças na expressão gênica, modificação de proteínas e vias metabólicas. Particularmente, a composição de aminoácidos, nessas condições de estresse causadas pelo meio ambiente, é modificada e caracterizada pelo acúmulo desses intermédiários do metabolismo, que desempenham um importante papel regulatório e sinalizador, bem como são precursores associados à produção de energia (PLANCHET *et al*., 2015). Em resumo, o acúmulo de aminoácidos, bem como de seus ácidos precursores (*bulding blocks*), como o ácido succínico, importante na síntese de metionina, isolelucina e valina é uma resposta adaptativa a vários estresses, incluíndo a presença de substâncias tóxicas, como os compostos furânicos e os aromáticos, como mencionado anteriomente (Stephanopoulos *et al*., 1998).

Em que pese essas questões sobre as respostas ao estresse ambiental, a célula foi capaz de converter xilose e, em menor extensão, glicose, com um fator de rendimento expressivo (0,378 g/g), valor maior do que o obtido na primeira batelada

em meio quimicamente definido (0,182 g/g). A produtividade volumétrica assumiu os seguintes valores: 0,061 g/L.h (FCIMS1), 0,343 g/L.h (FCIMS2) e 0,053 g/L.h (FCIMH1).

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES e SUGESTÕES

Neste capítulo serão apresentadas as principais conclusões desse trabalho.

- ✓ A caracterização da biomassa residual do processamento do sorgo sacarino foi realizada com sucesso, resultando nos seguintes valores de seus principais componentes: 47,9% de celulose, 15,5% de hemicelulose e 25,6% de lignina, indicando a existência suficiente de glicídios para a obtenção do produto-alvo do presente trabalho de pesquisa - ácido propiônico - com células imobilizadas.

- ✓ O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído aplicado ao bagaço de sorgo gerou um hidrolisado hemicelulósico com concentrações de glicídios próximas aos resultados reportados na literatura, destacando a concentração de xilose que foi de aproximadamente 42 g/L.

- ✓ A linhagem de *P. acidipropionici* CIP 53164 mostrou-se capaz de assimilar glicose e xilose, principais componentes das porções polissacarídicas de bagaço de sorgo sacarino, gerando para ambos os glicídios elevadas densidades celulares, cerca de 8 g/L quando cultivada em glicose e, aproximadamente, 6 g/L

quando cultivada em xilose, denotando a versatilidade dessa bactéria para consumir os principais açúcares da fração hemicelulósica de resíduos agroindustriais.

- ✓ A técnica de imobilização de células com alginato de sódio foi, realizada com êxito, resultando na produção de esferas, que foram caracterizadas de acordo com os seguintes parâmetros: peso (0,048 ± 0,003g), circularidade (0,94 ± 0,04), diâmetro (4,2 ± 0,1 mm), densidade (0,99 ± 0,04 g/mL), porosidade (0,39 ± 0,02).Outras propriedades relacionadas à absorção de cálcio, de ácido propiônico e xilose, foram também determinadas, para que, em primeiro momento, se estimasse a difusão de cálcio, xilose e ácido propiônico para o interior das esferas. As cinco primeiras medidas foram suportadas estatisticamente.

- ✓ Os resultados de fermentação mostraram que os microrganismos imobilizados em matriz de alginato foram capazes de fermentar tanto em meio quimicamente definido quanto em meio contendo o hidrolisado hemicelulósico. Apesar dos problemas de transferência de massa e inibição pelo produto formado, em experimentos de reutilização das células imobilizadas foi possível obter uma concentração máxima de 21,8g/L de ácido propiônico utilizando meio sintético, e em sequência, com meio contendo hidrolisado uma concentração final de 11,6g/L desse ácido orgânico.

- ✓ Em que pese o caráter inicial do presente trabalho de pesquisa (produção de ácido propiônico com células imobilizadas em alginato de cálcio), os resultados sinalizam para estudos adicionais visando otimizar o processo de produção deste importante ácido orgânico, que se presta a bloco de construção para a síntese de uma série de moléculas de interesse comercial.

É fato que vários processos em desenvolvimento devem ter a sua tecnologia melhorada, através de incorporação de inovação incremental, antes de serem comercializados ao nível industrial. Neste sentido, algumas sugestões para a melhoria deste trabalho são listadas a seguir.

- ✓ Desenvolver protocolos de aclimatação das células bacterianas ao hidrolisado hemicelulósico, por meio de transferências sucessivas e sistemáticas a fim de dotar as células de aquisição de resistência/tolerância à toxicidade do meio;

- ✓ Construir microrganismos geneticamente modificados que miniminizem a geração de subprodutos e que potencializem a produção de ácido propiônico, através da deleção de caminhos metabólicos indesejáveis, tendo em vista que o processo aqui estudado ser heterofermentativo;

- ✓ Realizar estudos relacionados à transferência de massa das esferas de alginato de cálcio, quando utilizada a bactéria *P. acidipropionici,* em particular na determinação dos coeficientes de difusão de substrato e produto;

- ✓ Avaliação a reutilização das células imobilizadas por um número de sequência maior, bem como investigar a viabilidade de utilização das células imobilizadas em biorreator de leito fixo por fermentações contínuas.

Referências

AHMADI, Negin; KHOSRAVI-DARANI, Kianoush; MORTAZAVIAN, Amir Mohammad. **An overview of biotechnological production of propionic acid: From upstream to downstream processes**. Electronic Journal of Biotechnology, v. 28, p. 67-75, 2017.

ALHADEFF, E. M. **Fermentação alcoólica com células de leveduras imobilizadas em alginato de cálcio**. 1984. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ANNADURAI, Gurusamy; JUANG, Ruey-Shin; LEE, Duu-Jong. **Factorial design analysis for adsorption of dye on activated carbon beads incorporated with calcium alginate.** Advances in Environmental Research, v. 6, n. 2, p. 191-198, 2002.

AREVALO-GALLEGOS, Alejandra et al. **Lignocellulose: a sustainable material to produce value-added products with a zero waste approach**—a review. International journal of biological macromolecules, v. 99, p. 308-318, 2017.

ARIAS,J. M . **Desenvolvimento de produto enzimático e avaliação do sinergismo de proteínas acessórias para eficiente hidrólise da celulose** .Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologias de processos Químicos e Bioquímicos da Universadade Federal do Rio de Janeiro (2016).

BANKAR, Sandip B. et al. **Continuous two-stage acetone–butanol–ethanol fermentation with integrated solvent removal using Clostridium acetobutylicum B 5313**. Bioresource technology, v. 106, p. 110-116, 2012.

BARBIRATO, F.; CHEDALLE, D.; BORIES, A. **Propionic acid fermentation from glycerol: comparison with conventional substrates**. *Appl Microbiol Biotechnol* v.47, p.441-446,1997.

BARCELOS, C. A. **Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (l.) Moench] para a produção de bioetanol**. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (2012).

BELGRANO, FABRICIO DOS SANTOS **Modelo de Imobilização celular para produção de ácido propiônico**: **Tecnologia de impressão em 3D e o papel dos exopolissacarídeos na interação célula-matriz**. Tese de Doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Tecnologias de processos Químicos e Bioquímicos da Universadade Federal do Rio de Janeiro (2018).

BICKERSTAFF, Gordon F. **Immobilization of enzymes and cells**. In: Immobilization of enzymes and cells. Humana press, 1997. p. 1-11.

BOENIGK, Rainer; BOWIEN, Susanne; GOTTSCHALK, Gerhard. Fermentation of glycerol to 1, 3-propanediol in continuous cultures of Citrobacter freundii. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 4, p. 453-457, 1993.

BOYAVAL, P.; CORRE, C. **Production of propionic aci**d. **Le Lait**, v. 75, n. 4-5, p. 453-461, 1995.

BROOEKE, **Roger .Jung and Phenomenology**. Routledge,2015

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, JB de A. **Biocatalisadores Imobilizados: Uso de enzimas e células imobilizadas em processos biotecnológicos**. Revista Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, ano, v. 9, p. 48-57. 2006.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, SS da. **Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos**. Revista Analytica, v. 23, n. 2, p. 60-70, 2006.

CASTRO, Aline Machado de; PEREIRA JR, Nei. **Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.

CASTRO, PATRYCIA GARCIA DE MELO. **Desenvolvimento de processo fermentativo para a produção de ácido propiônico a partir da fração hemicelulósica de bagaço de sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench**. Dissertação apresentada ao programa Mestrado Profissional em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, (2014).

CHIBATA, Ichiro; TOSA, Tetsuya. **Use of immobilized cells.** Annual review of biophysics and bioengineering, v. 10, n. 1, p. 197-216, 1981.

CHIBATA, Ichiro; TOSA, Tetsuya; SATO, Tadashi. Biocatalysis: **immobilized cells and enzymes. Journal of molecular catalysis**, v. 37, n. 1, p. 1-24, 1986.

CHOOKAEW, Teera et al. **Fermentative production of hydrogen and soluble metabolites from crude glycerol of biodiesel plant by the newly isolated thermotolerant Klebsiella pneumoniae TR17**. International journal of hydrogen energy, v. 37, n. 18, p. 13314-13322, 2012.

COONEY, C. L.; HUMPHREY, A. E. **Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. Vol. 2. Pergamon, Michigan, 1985.

CORAL, Jefferson et al. **Batch fermentation model of propionic acid production by *Propionibacterium acidipropionici* in different carbon sources.**Applied Biochemistry and Biotechnology, v.151,n.2-3,p.333-341,2008

CORDEIRO, MARCIO DE ANDRADE - **Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (euterpe oleraceae mart) para a produção de etanol**. Dissertação

Mestrado apresentada ao Instituto de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Pará, (2016).

CORSINO, M. C. Embrapa retoma produção de sorgo sacarino: **cultivar é uma opção na entressafra da cana-de-açúcar**. Disponível em www.cpt.com.br /notícias/embrapa-retoma-produção-de-sorgo-sacarino (2011) Acesso em 06 abr.2019.

COUGHLAN, Michael P.; MCHALE, Anthony. **Purification of β-d-glucoside glucohydrolases of Talaromyces emersonii. In: Methods in enzymology. Academic** Press, 1988. p. 437-443.

COVIZZI,Luiz Gustavo et al.**Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas.**Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas,v.28,n.2,2.143-160,2007

DALMASSO, Guillaume et al. **Microbiota modulate host gene expression via microRNAs.** PLoS One, v. 6, n. 4, p. e19293, 2011

DE OLIVEIRA, Mauro Dal Secco et al. **Digestibilidade da cana-de-açúcar hidrolisada, in natura e ensilada para bovinos**. Ciência Animal Brasileira, v. 8, n. 1, p. 41-50, 2007.

DEMBCZYNSKI, R.; JANKOWSKI, T. **Growth characteristics and acidifying activity of Lactobacillus rhamnosus in alginate/starch liquid-core capsules**. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, n. 1-2, p. 111-115, 2002.

DISHISHA, Tarek; ALVAREZ, Maria Teresa; HATTI-KAUL, Rajni. **Batch-and continuous propionic acid production from glycerol using free and immobilized cells of Propionibacterium acidipropionici**. Bioresource technology, v. 118, p. 553-562, 2012.

DONATE, Paulo Marcos. **Síntese ambientalmente correta a partir de biomassa.** Orbital: The Electronic Journal of Chemistry, v. 6, n. 2, p. 101-117, 2014.

EATON, D. C.; GABELMAN, **A. Fed-batch and continuous fermentation ofSelenomonas ruminantium for natural propionic, acetic and succinic acids**. Journal of industrial microbiology, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1995.

EKMAN, Anna; BÖRJESSON, Pål. **Environmental assessment** of propionic acid produced in an agricultural biomass-based biorefinery system. Journal of Cleaner **Production**, v. 19, n. 11, p. 1257-1265, 2011.

EPE (2018). **Balanço Energético Nacional**. Disponível em epe.gov.br Acesso em fevereiro, 2019.

Estudo da hidrólise enzimática do caroço de açaí (Euterpe oleraceae Mart) PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Figura-6-Estrutura-dos-alcoois-a-alcool-cumarilico-b-alcool-coniferilico-e-c_fig6_320430846 [accessed 16 Mar, 2019].

FAHD,S.et al. **Cropping bioenergy and biomaterials in marginal land: the added value of the biorefinery concept**. Energy, v.37, n.1,p79-93,2012

FENG, Xiaohai et al. **Green and economical production of propionic acid by Propionibacterium freudenreichii CCTCC M207015 in plant fibrous-bed bioreactor**. Bioresource technology, v. 102, n. 10, p. 6141-6146, 2011.

FERREIRA, Osania Emerenciano. **Produção de etanol a partir de sorgo sacarino com tratamento enzimático**. 2015.

FERREIRA-LEITAO, Viridiana et al. **Biomass residues in Brazil: availability and potential uses.** Waste and Biomass Valorization, v. 1, n. 1, p. 65-76, 2010.

FORNASIER FILHO, D.; FORNASIER, J.L.**Manual da cultura do sorgo Jaboticabal**: Funep:2009.

FU, Xiao-Zhi et al. **Development of Halomonas TD01 as a host for open production of chemicals. Metabolic engineering**, v. 23, p. 78-91, 2014.

GARCÍA CRUZ, Dunia Mercedes et al. **Chitosan microparticles as injectable scaffolds for tissue engineering. Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 6, p. 378-380, 2008.

GASHTASBI, Fatemeh; AHMADIAN, Gholamreza; NOGHABI, Kambiz Akbari. **New insights into the effectiveness of alpha-amylase enzyme presentation on the Bacillus subtilis spore surface by adsorption and covalent immobilization.** Enzyme and microbial technology, v. 64, p. 17-23, 2014.

GÍRIO, Francisco M. et al. **Hemicelluloses for fuel ethanol: a review.** Bioresource technology, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GÍRIO, Francisco M. et al. **Hemicelluloses for fuel ethanol: a review**. Bioresource technology, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOSWAMI, Vandana; SRIVASTAVA, A. K. **Fed-batch propionic acid production by Propionibacterium acidipropionici.** Biochemical Engineering Journal, v. 4, n. 2, p. 121-128, 2000.

GUISAN, Jose M. (Ed.). **Immobilization of enzymes and cells**. Springer Science & Business Media, 2006.

GUISAN, Jose M. **New opportunities for immobilization of enzymes. In: Immobilization of Enzymes and Cells**. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. p. 1-13.

Harada, P. K., **Produção de ácido propiônico por fermentação submersa utilizando glicerol e melaço de cana como fontes de carbono**, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2012.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G**. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass.** Bioresource technology, v. 100, n. 1, p. 10-18, 2009.

HSU, SHENG-TSIUNG; YANG, SHANG-TIAN. **Propionic acid fermentation of lactose by Propionibacterium acidipropionici: effects of pH**. Biotechnology and bioengineering, v. 38, n. 6, p. 571-578, 1991.

HUANG, Yu Liang et al. **Production of carboxylic acids from hydrolyzed corn meal by immobilized cell fermentation in a fibrous-bed bioreactor**. Bioresource technology, v. 82, n. 1, p. 51-59, 2002.

JEFFRIES, Thomas W.; JIN, Yong-Su. **Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts**. 2000.

KAWAGUTI HY, sato HH (2008). **Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbioana**. Quim Nova,31: 134-143..

KOURKOUTAS, Y. et al**. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production**: a review. Food Microbiology, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004.

LIU, He et al. **Acidogenic fermentation of proteinaceous sewage sludge: effect of pH.** Water research, v. 46, n. 3, p. 799-807, 2012.

LIU, Yin et al. **Glycerol/glucose co-fermentation: one more proficient process to produce propionic acid by Propionibacterium acidipropionici.** Current microbiology, v. 62, n. 1, p. 152-158, 2011.

MARKETRESEARCHSTORE(2019) www.marketresearchstore.com. Acessado em março. 2019).

MARTÍNEZ-CAMPOS, Roberto; DE LA TORRE, Mayra. **Production of propionate by fed-batch fermentation of Propionibacterium acidipropionici using mixed feed of lactate and glucose**. **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 6, p. 427-431, 2002.

MARTINS, Suzana Cláudia Silveira et al. **Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater**. African Journal of Biotechnology, v. 12, n. 28, 2013.

MAY, ANDRE et al. **Variedades de sorgo sacarino em diferentes espaçamentos e população de plantas**. Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 11, n. 3, p. 278-290, 2013.

MILLER, Gail Lorenz. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. Analytical chemistry, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOHAN, Dinesh; PITTMAN, Charles U.; STEELE, Philip H. **Pyrolysis of wood/biomass for bio-oil: a critical review.** Energy & fuels, v. 20, n. 3, p. 848-889, 2006.

MONSATO., **Implementação gestão eficiente de água em lavouras de milho e sorgo no Brasil.** Disponível em www.monsatoglobal.com. Acessado em 05 de abr. de 2019.

MOOD, Sohrab Haghighi et al. **Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 27, p. 77-93, 2013.

MOO-YOUNG, Murray. comprehensive biotechnology: **the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine**. **FEBS Letters**, v. 220, n. 2, p. 387-389, 1987.

NAJAFPOUR, G. D. **Immobilization of microbial cells for the production of organic acid and ethanol**. Biochemical engineering and Biotechnology, v.8, p.199-227,2006.

Nazareth, Talita Corrêa **Produção microbiológica de ácido propiônico, 1,3-propanodiol e hidrogênio a partir de glicerol bruto em reator anaeróbio de leito fluidizado**. Dissertação de Mestrado. Apresentada ao programa de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, 2015.

NUNES, L. J. R.; MATIAS, J. C. O.; CATALÃO, J. P. S. **A review on torrefied biomass pellets as a sustainable alternative to coal in power generation**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 40, p. 153-160, 2014.

OGEDA, Thais Lucy; PETRI, Denise FS. **Biomass enzymatic hydrolysis**. Quimica Nova, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

ØYAAS, Jorun et al. **The effective diffusion coefficient and the distribution constant for small molecules in calcium-alginate gel beads**. Biotechnology and bioengineering, v. 47, n. 4, p. 492-500, 1995.Ogeda, T. L., & Petri, D. F. S. (2010). Hidrólise enzimática de biomassa.

PAMIES, Ramón et al. **The influence of mono and divalent cations on dilute and non-dilute aqueous solutions of sodium alginates**. Carbohydrate Polymers, v. 80, n. 1, p. 248-253, 2010.

PARAJULI, Ranjan et al. **Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathways for biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies**. Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 43, p. 244-263, 2015.

PATEL, Martin et al. **Medium and long-term opportunities and risk of the biotechnological production of bulk chemicals from renewable resources-The potential of white biotechnology.** Utrecht University, Department of Science, Technology and Society (STS)/Copernicus Institute, 2006.

PEREIRA FILHO, ISRAEL ALEXANDRE et al. **Avaliação de cultivares de sorgo sacarino [Sorghum bicolor (L.) Moench] em diferentes densidades de semeadura visando a características importantes na produção de etanol.** Revista Brasileira de Milho e Sorgo, v. 12, n. 2, p. 118-127, 2013.

PEREIRA JR, N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, LM Melo.**Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery**. Series on Biotechnology, v. 2, p. 2-45, 2008.

PHITSUWAN, Paripok; SAKKA, Kazuo; RATANAKHANOKCHAI, Khanok. Improvement of lignocellulosic biomass in planta**: a review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability**. Biomass and bioenergy, v. 58, p. 390-405, 2013.

PILKINGTON,P.H.et al.**Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation:** a review.Journal of the institute of Brewing,v.104,n.1,p.19-31,1998.

PIMENTEL, S. S. **Produção Contínua de Etanol a Partir do Hidrolisado Enzimático de Grãos de Sorgo Sacarino. (*Sorghum bicolor (L) Moench)* com células imobilizadas de Saccharomyces Cerevisiae em Reatores de Leito Fixo**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (2014).

PLANCHET,E.;LIMAMI,A.M.;D'MELLO, JP. **Amino acid synthesis under abiotic stress.In Amino acids in higher plants,** capítulo 15. E-books, CAB International, pp.262-276, 2015

PLAYNE, M. J. **Propionic and butyric acids**. Comprehensive biotechnology, v. 3, p. 731-759, 1985.

POORTINGA, Albert T. Et al. **Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces**. Surface science reports, v. 47, n. 1, p. 1-32, 2002.

PRASAD, K. Krishna et al. **Laccase production using Pleurotus ostreatus 1804 immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: influence of culture conditions.** The Journal of Microbiology, v. 43, n. 3, p. 301-307, 2005.

RAO, K. Hanumantha; VILINSKA, Annamaria. **Surface thermodynamics and extended DLVO theory of Acidithiobacillus ferroxidans cells on pyrite and chalcopyrite.** Open Colloid Science Journal, v. 2, p. 1-14, 2009.

ROGERS, P.; CHEN, J. S.; ZIDWICK, M. J. **Organic acid and solvent production. Part II: propionic and butyric acids and ethanol**, p 611–671. The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria,, v. 1, 2006.

Santos, D.S., Camelo, A.C., Rodrigues, K.C.P., Carlos,L.C. E Pereira Jr.,Nei,. **Ethanol Production from Sugarcane Bagasse by *Zymomonas mobilis* Using Simulaneous Saccharification and Fermentation (SSF) Process**. *Applied Biochemistry Biotechnology*. V.121, n. 1-8,p.93-105, 2009

SANTOS, Fernando A. et al. **Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico**. Química nova, v. 37, n. 1, p. 56-62, 2014.

SARTORIUS, **Mannual of Weighting Applications**, Sartorius Training Manual,2016

SINGH, Renu et al. **A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential**. Renewable and Sustainable Energy, v .32, p713-728,2014.

SLUITER, Amie et al. **Determinations os structural carbohydrates and lignin in biomass. Laboratory analytical procedure**, v.1617, p.1-6,2008

SOCCOL, Carlos Ricardo et al. **Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil**. Bioresource technology, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOLOMON, N. A. In **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**. American Society for Microbiology. Washington, 1986.

STEPHANOPOULOS, George; ARISTIDOU, Aristos A.; NIELSEN, Jens. **Metabolic engineering: principles and methodologies**. Elsevier, 1998.

SUN, Ye; CHENG, Jiayang. **Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production**: a review. Bioresource technology, v. 83, n. 1, p. 1-11, 2002.

SURVASE, Shrikant A. et al**. Continuous acetone–butanol–ethanol fermentation using SO2–ethanol–water spent liquor from spruce**. Bioresource technology, v. 102, n. 23, p. 10996-11002, 2011.

SUWANNAKHAM, Supaporn; YANG, Shang-Tian. **Enhanced propionic acid fermentation by Propionibacterium acidipropionici mutant obtained by adaptation in a fibrous-bed bioreactor.** Biotechnology and bioengineering, v. 91, n. 3, p. 325-337, 2005

TABIL, L. G.; ADAPA, P. K.; KASHANINEJAD, M. **Biomass Feedstock Pre-Processing–Part 1: Pre-Treatment, Biofuel's Engineering Process Technology**, Dr. Marco Aurelio Dos Santos Bernardes editors. ISBN: 978-953-307-480-1, InTech 2011. 2011.

TAHERZADEH, Mohammad; KARIMI, Keikhosro. **Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production**: a review. International journal of molecular sciences, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TAMPION, John; TAMPION, M. D. **Immobilized cells: principles and applications**. Cambridge University Press, 1987.

TEIXEIRA, C. G. et al. Produção de álcool etílico de colmos de sorgo sacarino em microdestilaria. In: **Embrapa Milho e Sorgo-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 16., 1986, Belo Horizonte. Anais... Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS, 1986. p. 128-149., 1986.

THIERRY, A., DEUTSCH, SM., FALENTIN, H., DALMASSO, M., COUSIN, FJ, JAN, G. (2011). **Novos insights sobre fisiologia e metabolismo de Propionibacterium freudenreichii**. Int J Microbiol Alimentar. 1 de set; 149 (1): 19-27.

TOMASKA, M. et al. **Calcium pectate gel beads for cell entrapment: a study on the stability of Kluyeromyces marxianus whole-cell lactase entrapped in**

hardened calcium pectate and calcium alginate gels. Biotechnology and applied biochemistry, 1995.

VERBELEN, Pieter J. Et al. **Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications**. Biotechnology letters, v. 28, n. 19, p. 1515-1525, 2006.

VERVERIS,C.et al., **Cellulose, hemicelluloses, lignin and ash contente of some organic materials and theirsuitability for use as paper pulp supplements**. Bioresource Technology, v.98, n.2, p296-301,2007

Vogel, A.I. **Química Analítica Qualitativa**. 5ª rev. São Paulo: Editora Mestre Jou, 1981.

VORLOP, K.D.; KLEIN, J. **Entrapment of microbial cellsin chitosan.In: Methods in enzymology.Academic Press**, 1987.p259-268

VORLOP, Klaus –Dieter,KLEIN, Joachim. **New Developments in the field of cell immobilization-formation of biocatalysts by ionotropic gelation.** In: Enzyme technology.Springer, Berlin Heidelberg,1983.p.2019-235

VOROBJEVA, Leha**. Propionibacteria**. Springer Science & Business Media, 1999.

WANG, Xingwu; SPENCER, H. Garth. **Calcium alginate gels: formation and stability in the presence of an inert electrolyte**. Polymer, v. 39, n. 13, p. 2759-2764, 1998.

WANG, Zhongqiang; YANG, Shang-Tian. **Propionic acid production in glycerol/glucose co-fermentation by Propionibacterium freudenreichii subsp. shermani**i. Bioresource technology, v. 137, p. 116-123, 2013.

WERPY, Tood; PETERSEN,Gene .**Top value Adeed Chemicals From Biomass: volume I—results of screening for potential candidates from sugars and synthesis. National renewable** Energy Lab., Golden,CO(US),2004.

WILLAERT, Ronnie; NEDOVIC, Viktor A. **Primary beer fermentation by immobilised yeast—a review on flavour formation and control strategies. Journal of Chemical Technology & Biotechnology**: International Research in Process, Environmental & Clean Technology, v. 81, n. 8, p. 1353-1367, 2006.

WU, Qinghai; ZHANG, T.; LIU, Y. **Thermal state of the active layer and permafrost along the Qinghai-Xizang (Tibet) Railway from 2006 to 2010**. The Cryosphere, v. 6, n. 3, p. 607-612, 2012.

YANG, Shang Tian; WHITE, Scott A.; HSU, Sheng Tsiung. **Extraction of carboxylic acids with tertiary and quaternary amines: effect of pH**. Industrial & engineering chemistry research, v. 30, n. 6, p. 1335-1342, 1991.

YANG, Shang-Tian; EL-ENSASHY, Hesham; THONGCHUL, Nuttha (Ed.). **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. John Wiley & Sons, 2013.

ZAMPIERI, Denise. **Expressão do complexo celulolítico em Penicillium echinulatum.** 2015.

ZHANG, An; YANG, Shang-Tian. **Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered Propionibacterium acidipropionici**. Process Biochemistry, v. 44, n. 12, p. 1346-1351, 2009.

ZHANG, Bo et al. **Dilute-sulfuric acid pretreatment of cattails for cellulose conversion.** Bioresource Technology, v. 102, n. 19, p. 9308-9312, 2011.

ZHANG, Junshe; YEDLAPALLI, Prasad; LEE, Jae W. **Thermodynamic analysis of hydrate-based pre-combustion capture of CO2.** Chemical engineering science, v. 64, n. 22, p. 4732-4736, 2009.

ZHU, Linqi et al. **Improving the productivity of propionic acid with FBB-immobilized cells of an adapted acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici**. Bioresource technology, v. 112, p. 248-253, 2012.

ZHU, Y. **Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels**. In YANG, S-T. Bioprocessing for value-added products from renewable resources. Elsevier, 2007. p. 373- 396.

ZHU, Yunfeng et al. **Optimization and scale-up of propionic acid production by propionic acid-tolerant Propionibacterium acidipropionici with glycerol as the carbon source.** Bioresource technology, v. 101, n. 22, p. 8902-8906, 2010.

ZHUGE, Xin et al. **Improved propionic acid production from glycerol with metabolically engineered Propionibacterium jensenii by integrating fed-batch culture with a pH-shift control strategy**. Bioresource technology, v. 152, p. 519-525, 2014.