UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO

CELIANE GOMES MAIA DA SILVA

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA CONVERSÃO DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) EM ETANOL

RECIFE – PE
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

CELIANE GOMES MAIA DA SILVA

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA CONVERSÃO DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) EM ETANOL

RECIFE – PE

2007

CELIANE GOMES MAIA DA SILVA

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA CONVERSÃO DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) EM ETANOL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Nutrição, área de concentração Ciência dos Alimentos

Orientador (a): Profª. Drª. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

RECIFE – PE

2007

Silva, Celiane Gomes Maia da
Processo biotecnológico para conversão de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) em etanol / Celiane Gomes Maia da Silva. – Recife: O Autor, 2007.
104 folhas; il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Nutrição, 2007.

Inclui bibliografia.

1. Algaroba - Bioetanol. 2. *Prosopis juliflora* - Fermentação. 3. *Zymomonas mobilis* – Etanol. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. I. Título.

579.67	CDU (2.ed.)	UFPE
664.024	CDD (20.ed.)	CCS2007-129

CELIANE GOMES MAIA DA SILVA

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA CONVERSÃO DE ALGAROBA (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.) EM ETANOL

Tese aprovada em 27 de abril de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Samara Cardoso Alvachian Andrade - Presidente

Profª. Drª. Silvana Magalhães Salgado

Profª. Drª. Thayza Christina Montenegro Stamford

Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

Profª. Drª. Janete Magali de Araújo

Dedicatória

Ao meu amado esposo, **Cleverson Demetrius Gomes da Silva**, dádiva de Deus em minha vida, meu companheiro, que me encoraja em todos os momentos e sempre me incentivou a crescer profissionalmente.

Aos nossos queridos filhos, **Lucas Rafael**, que ingressou junto comigo neste curso ainda em meu ventre e mesmo tão pequenino tem sido tão compreensivo quando não posso estar sempre ao seu lado, e a **Sarah Evelyn**, que ainda em desenvolvimento já é muito amada e está chegando como um presente de Deus para marcar este período de lutas e de vitórias em minha vida.

Agradecimento Especial

Ao meu amado **DEUS**, que com seu incondicional amor e sua imensa graça tem me sustentado durante toda minha vida, realizando todos os meus sonhos.

À minha querida **Profª. Tânia Stamford** pelo seu imenso carinho, sua amizade, seu apoio e por ter me acolhido como uma mãe durante todos esses anos, me orientando na iniciação científica, no mestrado e pela orientação neste trabalho de tese de doutorado.

AGRADECIMENTOS

- ✓ Aos meus queridos pais, Cedílio e Eliane, pelo imenso amor, pelo apoio e por me darem a oportunidade de estudar e ingressar na carreira profissional.

- ✓ Ao meu sogro e minha sogra, Gomes e Eliete, que me acolheram em sua família como uma filha e nunca mediram esforços em me ajudar, sempre orando por mim e se alegrando pelas conquistas alcançadas.

- ✓ Ao meu irmão Sérgio e minha cunhada Lívia pela amizade, carinho e companheirismo, especialmente pela ajuda na elaboração da apresentação desta tese.

- ✓ À minha querida amiga Samara Andrade, que com extrema dedicação e carinho me auxiliou no tratamento estatístico deste trabalho;

- ✓ Às alunas de iniciação científica Luciana Camêlo e Marina Nunes pela amizade e ajuda durante a execução da parte experimental deste trabalho;

- ✓ A Melina Albuquerque, que mesmo durante pouco tempo, me auxiliou neste estudo;

- ✓ A todos os técnicos do LEAAL que nunca mediram esforços em me ajudar sempre que precisei. Em especial a Artur, Moisés, Laércio e Vivaldo;

- ✓ A todos os professores da área de Ciência dos Alimentos do Depto. de Nutrição da UFPE pelo carinho, apoio e ensinamentos durante todo o período de estudante de graduação e pós-graduação.

- ✓ Ao Profº. Alexandre Schuller e seu estagiário André Lucena do Depto. de Engenharia Química da UFPE pelo apoio na execução das análises de cromatografia;

- À Profª. Janete Magali de Araújo do Depto. de Antibióticos pelo fornecimento das cepas utilizadas neste estudo;

- A Neci dos Santos que se tornou durante esses anos mais do que uma simples secretária da Pós-Graduação, tornou-se uma amiga e que sempre me ajudou em tudo que precisei;

- Ao Profº. Dr. Raul Manhães de Castro, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, pelo apoio e dedicação aos alunos para crescimento do Programa.

- À amiga Erilane Machado pelo carinho e pelo apoio durante todos esses anos que estivemos juntas trabalhando no laboratório em nossos experimentos;

- À Profª. Silvana Magalhães Salgado pela amizade e incentivo a minha carreira profissional;

- Aos colegas da turma de doutorado pela amizade e pelos momentos juntos em sala de aula.

- À CAPES pela bolsa de estudos concedida durante parte da vigência do doutorado.

Resumo

Resumo

A fim de reduzir o impacto dos gases que provocam o efeito estufa torna-se necessária a utilização de derivados de biomassa como combustíveis alternativos a partir de substratos renováveis. A Algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.] é uma leguminosa arbórea tropical comum no semi-árido brasileiro e que se desenvolve em lugares secos. Este trabalho teve por objetivo produzir etanol a partir do extrato aquoso obtido da farinha da algaroba fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*. Foram realizadas as seguintes etapas: caracterização da farinha da algaroba quanto à composição química e microbiológica; determinação da concentração ideal de farinha da algaroba para elaboração do substrato fermentativo; curvas de crescimento dos microrganismos; fermentações segundo o planejamento fatorial 2^3. Foi realizado o processo fermentativo até 72h com o ensaio do planejamento fatorial que obteve a máxima produção de etanol (g/L), analisada através da análise de regressão linear e dos cálculos dos parâmetros de fermentação. Verificou-se que a farinha de algaroba apresenta elevados níveis de nutrientes, principalmente em açúcares, e minerais como fósforo cálcio, além de ser considerada própria quanto à qualidade higiênico-sanitária. Foi escolhida a concentração de 30% de farinha da algaroba para elaboração do substrato por apresentar estabilidade quanto à solubilização de glicose e de proteínas totais no meio. *Zymomonas mobilis* apresentou maior crescimento em meio padrão sob condição estática e *Saccharomyces cerevisiae* no substrato sob agitação. De acordo com o planejamento fatorial, a maior produção de etanol foi obtida utilizando extrato aquoso da algaroba fermentado por *Z. mobilis* sob condição estática. A análise de regressão linear apresentou um bom ajuste dos dados aos modelos quanto ao crescimento da bactéria de 0 a 36 horas e produção de etanol de 2 a 36 horas. A maior produtividade de etanol, maior conversão do substrato em etanol, e, portanto, maior eficiência de fermentação foi observada até 30h. Conclui-se, que a algaroba apresenta-se como matéria-prima viável em processos biotecnológicos, visando seu aproveitamento e conferindo maior valor agregado ao produto.

Palavras-chave: Fermentação, etanol, algaroba, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, biotecnologia.

Abstract

Abstract

In order to reduce the impact caused by gases in the greenhouse effect it is becoming necessary the utilization of biomass derivatives as alternative biofuels originated from renewable substrates. Mesquite [*Prosopis juliflora* (Sw.) D.C.] is a tropical arboreous leguminous plant fairly common in the semi-arid region of Brazil that thrives well in dry environments. The main aim of the present work was to produce ethanol from an aqueous extract obtained from mesquite flour fermented by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. The following steps were performed in order to validate this work: chemical and microbiological characterization of the mesquite flour; quantification of flour concentration necessary to obtain the substrate; microorganisms growth curves; fermentations following factorial planning at 2^3. The fermentative process was conducted up to 72h using the factorial planning which obtained the higher ethanol production (g/L), and analyzed using the linear regression analysis and by calculating the fermentation parameters. It was verified that mesquite flour presented high levels of nutrients, especially sugars and minerals, such as phosphorous and calcium, and was considered appropriated regarding its sanitary conditions. The concentration of 30% was chosen for substrate production due to its stability regarding glucose and total protein solubilization in the medium. *Zymomonas mobilis* demonstrated better growth in standard medium without agitation, and *Saccharomyces cerevisiae* showed better growth in substrate under agitation. Based on the factorial planning results, the higher ethanol production was obtained using the aqueous extract from mesquite fermented by *Z. mobilis* without agitation. Linear regression analysis promoted a good data adjustment regarding the bacterial growth of 0 at 36 hours and ethanol production of 2 at 36 hours. The higher ethanol production, higher substrate conversion into ethanol, and therefore, higher fermentation efficiency was observed at 30h. In conclusion, mesquite represents a viable raw product for biotechnological processes, prompting its usage and conferring aggregated value to the product.

Keywords: Fermentation, ethanol, mesquite, *Zymomonas mobilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, biotechnology.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES **15**
LISTA DE TABELAS **17**
1 INTRODUÇÃO **20**
2 OBJETIVOS **25**
2.1 OBJETIVO GERAL 25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 25
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA **27**
3.1 Produção Biotecnológica do Etanol 27
3.1.1 Metabolismo microbiano para produção de etanol 29
3.1.2 Importância tecnológica do etanol 38
3.2 Algaroba [*Prosopis juliflora* (Sw) DC] 43
3.2.1 Considerações Gerais 43
3.2.2 Valor Nutritivo 46
3.2.3 Utilizações 49
4 MATERIAL E MÉTODOS **55**
4.1 Material 55
4.1.1 Matéria-Prima 55
4.2 Métodos 55
4.2.1 Caracterização da Farinha de Algaroba 55
4.2.1.1 Produção da Farinha 55
4.2.1.2 Composição Físico-Química da farinha 56
4.2.1.3 Análise Microbiológica da farinha 56
4.2.2 Elaboração do Substrato 57
4.2.3 Microrganismos e condições de cultivo..... 58
4.2.4 Pré-inóculo 58
4.2.5 Curvas de Crescimento dos Microrganismos 59
4.2.6 Condições de Fermentação 61
4.2.7 Métodos Analíticos 61
4.2.8 Delineamento Experimental 62
4.3 Análise estatística 64

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO **67**
5.1 Caracterização da farinha da algaroba quanto aos aspectos físico-químicos e microbiológicos 67
5.2 Elaboração do Substrato 71
5.3 Curvas de Crescimento dos Microrganismos 72
5.4 Planejamento Fatorial 79
5.5 Extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* sob condição estática 84
6 CONCLUSÕES **92**
7 REFERÊNCIAS **95**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Seqüência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose) (LIMA et al., 2001). 30

Figura 2 - Árvore da Algaroba (*Prosopis juliflora*). 44

Figura 3 - Vagens de Algaroba. 45

Figura 4 - Fluxograma de etapas para obtenção das curvas de crescimento de *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios padrão e extrato de algaroba. 60

Figura 5 – Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio padrão (caldo Sabouraund) e em extrato da algaroba sob agitação e estático.
SCS: *S. cerevisiae* em caldo Sabouraund; SEA: *S. cerevisiae* em extrato da algaroba. 74

Figura 6 – Curvas de crescimento de *Zymomonas mobilis* em meio padrão (caldo SSDL) e em extrato de algaroba sob agitação e estático.
ZCSDL: *Z. mobilis* em caldo SSDL; ZEA: *Z. mobilis* em extrato de algaroba. 78

Figura 7 - Médias da produção de etanol (A), dos teores de glicose (B) e das concentrações de biomassa (C), em função do tempo de fermentação, tipo de microrganismo e condições de cultivo. 82

Figura 8 – Interação entre as variáveis “condição de cultivo” e “tipo de microrganismo” quanto à produção de etanol (g/L). 84

Figura 9 – Processo fermentativo da *Z. mobilis* sob condição estática. 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição centesimal da vagem inteira e das sementes da algaroba. 47

Tabela 2 - Níveis codificados das variáveis. 62

Tabela 3 - Níveis decodificados das variáveis. 63

Tabela 4 – Composição físico-química da farinha da algaroba. 67

Tabela 5 – Composição de minerais da farinha de algaroba. 69

Tabela 6 – Análise Microbiológica da Farinha da Algaroba. 70

Tabela 7 – Teores de glicose, proteínas totais e pH em diferentes concentrações de farinha da algaroba solubilizada no extrato aquoso. 71

Tabela 8 – Crescimento celular de *Saccharomyces cerevisiae* em meio padrão e em extrato da algaroba nas diferentes condições de cultivo durante 24 horas. 73

Tabela 9 – Crescimento celular de *Zymomonas mobilis* em meio padrão e em extrato da algaroba nas diferentes condições de cultivo durante 24 horas. 77

Tabela 10 – Determinação dos efeitos principais do planejamento fatorial 2^3. 80

Tabela 11 – Analise de variância para o ajuste de um modelo linear aos dados obtidos da produção de Etanol (g/L) de 2 a 36 horas a partir do extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* sob condição estática. 88

Tabela 12 – Analise de variância para o ajuste de um modelo linear aos dados obtidos para a fase exponencial de crescimento da *Zymomonas mobilis,* no extrato aquoso da algaroba*,* sob condição estática, de 0 a 36 horas. 88

Tabela 13 – Parâmetros do extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* considerando três distintos tempos de fermentação. 89

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Entende-se por biotecnologia o conjunto de conhecimentos, técnicas e métodos, de base científica ou prática, que permite a utilização de seres vivos como parte integrante e ativa do processo de produção industrial de bens e serviços (REGULY, 1998).

A possibilidade de rápida formação de material celular (biomassa) e o uso deste como alimento, devido ao seu teor protéico, tanto para animais quanto para o homem, gerou, desde o início do século, crescente interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos baseados na reprodução controlada, primeiramente de leveduras e, depois, de bactérias e fungos filamentosos (MARQUES; SERRA, 2004).

O meio em que os microrganismos se desenvolvem, quando usado pelo homem para obter produtos do metabolismo celular ou a própria massa celular, pode ser constituído de substratos, os mais variados, alguns de baixo custo, incluindo muitas vezes resíduos agrícolas ou industriais. Estes substratos alternativos, ao contrário de constituírem um problema ambiental, podem servir para a produção de insumos industriais ou alimentares (REGULY, 1998; MIELENZ, 2001).

Desde o século passado a produção de dióxido de carbono (CO_2) tem aumentado exponencialmente devido, principalmente, à intensa expansão no setor de transportes resultando em notáveis mudanças no ecossistema. O CO_2 tem a capacidade de reter a radiação infravermelha do sol na atmosfera, estabilizando a temperatura terrestre por meio do efeito estufa. Esta ação vem provocando um aumento na temperatura terrestre e pode trazer várias

conseqüências em escala global, pondo em risco a sobrevivência de seus habitantes (PRASAD et al., 2007).

A fim de prevenir mudanças irreversíveis e reduzir o impacto dos gases que provocam o efeito estufa é preciso que sejam encontradas soluções para este problema a nível mundial. Um passo bastante efetivo nesse processo, já que a maioria do CO_2 é produzido pelo setor de transportes, seria usar derivados de biomassa como combustíveis alternativos (KÁDÁR et al., 2004).

Para um país tropical como o Brasil, o substituto natural para o petróleo é a biomassa. Além de ser renovável ela reduz a poluição, pois é formada a partir de CO_2 e H_2O, aproveitando a energia solar. A biomassa foi reconhecida no mundo como fonte de energia renovável para declinar os recursos que sustentam a produção do combustível fóssil (OZCIMEN; KARAOSMANOGLU, 2004; JEFFERSON, 2006). É atrativa sob três razões principais, I) é um recurso renovável que poderia ser sustentável no futuro, II) proporciona impactos ambientais positivos por não liberar dióxido de carbono (CO_2) e muito baixo índice de enxofre, III) e possuir um potencial econômico significativo considerando as elevações dos preços do combustível fóssil no futuro (MARQUES; SERRA, 2004). Um dos principais componentes da biomassa são os carboidratos não-estruturais (amido e sacarose), de grande valor para a indústria química por serem facilmente convertidos a etanol (SCHUCHARDT; RIBEIRO, 2001; DATAR et al., 2004; MARQUES; SERRA, 2004).

No Brasil, a principal matéria-prima utilizada como biomassa para produção do combustível etanol é a cana-de-açúcar. A indústria utiliza tradicionalmente a cana-de-açúcar devido seu alto conteúdo em sacarose e largo cultivo (TANO; BUZATO, 2003). Segundo MACEDO (2007) o Brasil

produziu 311 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 1998 (25% da produção mundial) em 5 milhões de hectare, refletindo uma média de 62 toneladas por hectare. Há 50 mil produtores de cana-de-açúcar e 308 unidades de processamento industrial, todas privadas levando a 17,7 milhões de toneladas de açúcar e 13,7 milhões de m^3 de etanol por ano. A indústria de cana no Brasil mantém o maior sistema de produção de energia comercial da biomassa, no mundo, através do etanol (substituindo cerca de 40% da gasolina) e do uso quase total do bagaço, equivalente a 11 milhões de toneladas, como combustível.

Atualmente o etanol de origem microbiana é considerado como um combustível alternativo quando no futuro os combustíveis fósseis forem esvaziados. Vários microrganismos são candidatos satisfatórios para produzir etanol, incluindo bactérias como *Clostridium* sp. e *Zymomonas mobilis*, além de leveduras bem conhecidas, como *Saccharomyces cerevisiae* (NAJAFPOUR et al., 2004).

O etanol, além de sua extrema importância como combustível obtido por fontes renováveis, também é utilizado na indústria de bebidas, onde, geralmente, os estudos em fermentação alcoólica são realizados com a finalidade de otimizar a produção. Sendo assim, todos os parâmetros utilizados para a condução da fermentação devem auxiliar as destilarias brasileiras, como temperatura e tempo de fermentação, além de possibilitar a produção de novas bebidas oriundas de novos substratos (MARQUES; SERRA, 2004, CARVALHO et al., 2006).

Além da cana-de-açúcar, no Brasil, outra fonte de sacarose merece destaque como substrato para produção de etanol, a algaroba [*Prosopis*

juliflora (SW) DC]. Trata-se de uma leguminosa arbórea tropical que alcança em média 12 metros de altura, tendo chegado ao Brasil por volta de 1942 através de J. B. Griffing, onde se adaptou muito bem, principalmente no Nordeste Brasileiro (EL HAG et al., 2000). Consegue sobreviver com índices pluviométricos muito baixos, e cresce em solos pobres em função de realizar o processo da fixação simbiótica do nitrogênio, porém alcança melhor desenvolvimento em solos de aluvião. A produtividade de suas vagens varia de 3 a 8 toneladas por hectare e inicia-se a partir do quinto ano do plantio (SILVA et al., 2003a).

Esta leguminosa é utilizada para a produção de madeira, carvão vegetal, estacas, melaço, alimentação animal e humana, apicultura, reflorestamento, ajardinamento, sombreamento, além da produção de álcool, tornando-se, por conseguinte, uma cultura de valor econômico e social (PEREZ; MORAES, 1991; VIEIRA et al., 1995). Suas vagens inteiras quando secadas e trituradas em moinho produzem uma farinha que possui elevado valor nutritivo, principalmente proteínas e açúcares (FIGUEIREDO, 1990).

A algaroba apresenta-se como matéria-prima viável para o processo fermentativo por ser disponível de forma perene, possuir baixo custo e conter um elevado teor de açúcares podendo ser hidrolisados, gerando compostos como etanol.

Devido à importância sócio-econômica da produção biológica de etanol no Brasil e no mundo, tendo em vista a utilização deste produto em indústrias de alimentos e bebidas e, como fonte de combustível ecologicamente correta, estudos visando a obtenção de melhores procedimentos tecnológicos no processo fermentativo tornam-se de fundamental importância.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da algaroba na produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Elaborar e caracterizar a farinha da algaroba quanto aos aspectos físico-químicos e microbiológicos;
- ✓ Verificar a melhor concentração de farinha para elaboração do substrato para fermentação (extrato aquoso);
- ✓ Determinar as curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* e de *Zymomonas mobilis* em meio complexo (padrão) e no substrato estudado;
- ✓ Avaliar a produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* através de um planejamento fatorial;
- ✓ Obter a curva de fermentação para obtenção de etanol com o melhor resultado obtido através do planejamento fatorial;
- ✓ Analisar os parâmetros do processo fermentativo, como: produtividade de etanol, conversão do substrato em etanol e eficiência de fermentação;

Fundamentação Teórica

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DO ETANOL

A biotecnologia é baseada na busca e descoberta de recursos biológicos industrialmente exploráveis. É reconhecida como uma das tecnologias promissoras no século 21, devido ao seu potencial de solucionar problemas globais através de produtos, serviços e ou processos para a saúde, produção de alimentos e poluição ambiental, bem como a promessa de desenvolvimento industrial sustentável através da utilização de recursos renováveis (BULL et al., 2000).

O conceito biotecnológico de fermentação refere-se a como ela é executada tecnicamente, entendendo-se como um processo de conversão química de matérias-primas em produtos, através da ação de microrganismos. Todas as fermentações obedecem a mecanismos bioquímicos de transformação do substrato em produtos, sendo as reações que compõem o processo global de transformação catalisadas por enzimas, geralmente na presença dos microrganismos produtores destas últimas (REGULY, 1998).

O etanol é o biocombustível líquido atualmente mais utilizado. É um álcool fermentado de açúcares, amidos ou de compostos celulolíticos, utilizado, principalmente, como fonte de combustível obtido da energia renovável, além da manufatura de cosméticos e produtos farmacêuticos e da produção de bebidas alcoólicas (DEMIRBAS, 2007).

Praticamente, qualquer produto natural ou seus derivados de natureza orgânica, basicamente produtos ou subprodutos da agricultura e do processamento de vegetais, podem se constituir a base ou substrato para

processos fermentativos (MIELENZ, 2001). Devem estar presentes no substrato, como elementos essenciais para o desenvolvimento dos microrganismos, compostos nitrogenados, sob a forma de proteínas, aminoácidos, sais amoniacais, fatores de crescimento como vitaminas e coenzimas, além dos micro-elementos. Como principais fontes de carbono, os carboidratos possuem elevada importância para o metabolismo de qualquer célula viva, constituindo-se como principal matéria-prima das fermentações (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). Teoricamente, 100 g de glicose produzirão 51,4 g de etanol e 48,8 g de dióxido de carbono. Entretanto, na prática, os microrganismos usam parte da glicose para seu crescimento e o rendimento real é menor que 100% (PRASAD et al., 2007).

A fermentação da sacarose é executada através de uma reação química composta da hidrólise enzimática da sacarose seguida pela fermentação dos açúcares simples. Primeiramente, a enzima invertase ou sacarase catalisa a hidrólise da sacarose convertendo-a em glicose e frutose.

$$\underset{\text{Sacarose}}{C_{12}H_{22}O_{11}} \rightarrow \underset{\text{Glicose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Frutose}}{C_6H_{12}O_6}$$

Após essa conversão uma outra enzima que também está presente no fermento, a zimase, converte a glicose e a frutose em etanol (DEMIRBAS, 2007).

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

A produção de etanol a partir de grãos envolve a moenda dos grãos, a hidrólise do amido para liberar o açúcar fermentável, seguida pela inoculação do microrganismo fermentador. Quimicamente o amido é um polímero de glicose, com isso o microrganismo não pode usar o amido diretamente para a produção do etanol (PETERSON, 1995). Conseqüentemente, o amido tem que ser hidrolisado completamente em glicose por uma combinação de duas enzimas, amilase e amiloglicosidase, antes que a fermentação ocorra para produzir o etanol. O milho (60-70% de amido) é a matéria-prima predominante na indústria mundial produtora de bioetanol a partir do amido (DU et al., 2004, BOTHAST; SCHLICHER, 2005).

3.1.1 Metabolismo microbiano para produção de etanol

O metabolismo de qualquer ser vivo pode ser dividido didaticamente em anabolismo e catabolismo. O processo anabólico diz respeito a reações de síntese de material celular, tais como proteínas, gorduras, polissacarídeos, etc., através da energia celular armazenada na molécula de ATP. No catabolismo o processo se inverte, as moléculas são quebradas e oxidadas, sendo que a energia química produzida nessas reações é acumulada nas moléculas de ATP (VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO_2 envolve 12 reações em seqüência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular sendo, portanto, nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa (Figura 1). Essas enzimas, referidas como “glicolíticas”, sofrem ações de

diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperatura e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelos microrganismos. Os carboidratos considerados substratos para a fermentação, tanto podem ser endógenos (constituintes do microrganismo, como glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos ao microrganismo presente no substrato (LIMA et al., 2001; CARVALHO et al., 2007).

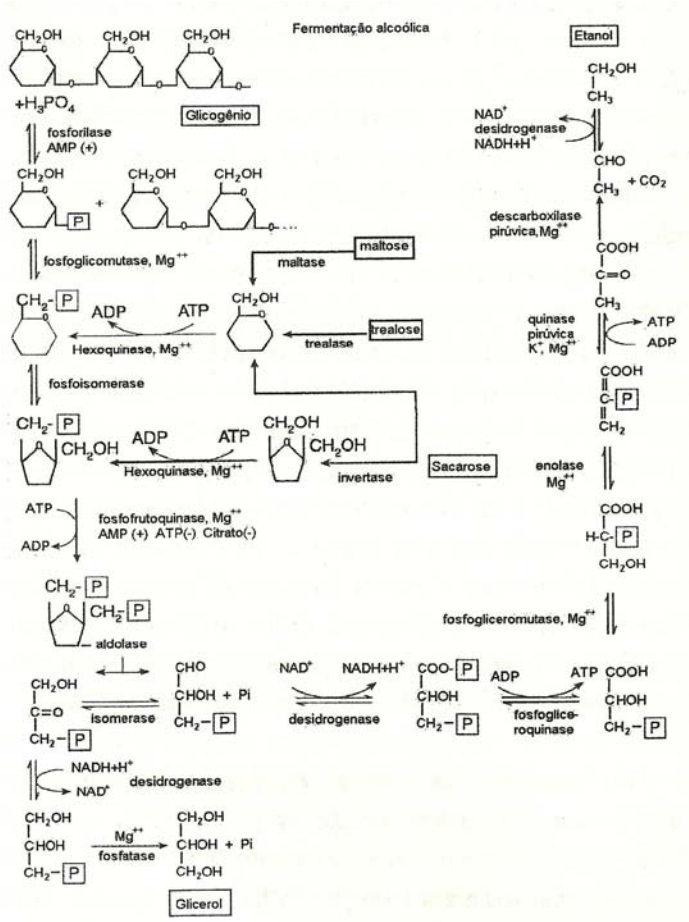


Figura 1 – Seqüência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose) (LIMA et al., 2001).

Dos fatores ambientais que regulam a respiração e a fermentação, a disponibilidade de glicose e oxigênio é o mais documentado (WALKER, 2000). No caso de algumas leveduras, entre elas *Saccharomyces cerevisiae*, em presença de glicose mesmo em condições estritamente aeróbias, o metabolismo é do tipo respiro-fermentativo (KOREN; DUVNJAK, 1993). Este comportamento metabólico é provocado por um efeito conhecido como efeito *Crabtree* ou *repressão catabólica*. Este efeito se pronuncia em condições onde a concentração de glicose ultrapassa um valor limite. O mecanismo responsável pela repressão catabólica pode ser bastante complexo, mas estudos mostram que ocorre principalmente através do forte efeito repressivo da glicose sobre a atividade de enzimas respiratórias e também, possivelmente, pela inibição da expressão genética de enzimas constituintes da via respiratória, fazendo com que parte do piruvato que não pode ser oxidado pelo ciclo de Krebs seja reduzido a etanol pelo processo fermentativo (BAKKER et al., 2001). Sabe-se que a glicose e a frutose (ou qualquer açúcar que forneça um destes açúcares por hidrólise), em concentração elevada, reprimem o metabolismo oxidativo (CARVALHO et al., 2007).

O objetivo primordial dos microrganismos ao metabolizar anaerobicamente o açúcar, é gerar uma forma de energia (ATP) que será empregada na realização de diversos trabalhos fisiológicos (absorção, excreção) e biossíntese, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação microbiana. O etanol e o CO_2 resultantes se constituem tão somente de produtos de excreção, sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose. Entretanto, o etanol, bem como outros produtos de excreção (como o glicerol e ácidos orgânicos) podem ser oxidados metabolicamente,

gerando mais ATP e biomassa, mas apenas em condições de aerobiose (WALKER, 2000; LIMA et al., 2001).

Na seqüência de reações enzimáticas de produção de ATP, e intrínsecas à formação de etanol, rotas metabólicas alternativas aparecem para propiciar a formação de materiais necessários à constituição da biomassa (polissacarídeos, lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e outros), bem como para a formação de outros produtos de interesse metabólico, relacionados direta e indiretamente com a adaptação e sobrevivência. Assim, juntamente com o etanol e o CO_2, o metabolismo anaeróbio permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, acetoína, butilenoglicol, além de outros compostos de menor significado quantitativo. Simultaneamente ocorre o crescimento do microrganismo (formação da biomassa) (LIMA et al., 2001).

O acetaldeído é o precursor imediato do etanol. Quantidades significativas passam para o mosto fermentado e são reabsorvidas, no final da fermentação. Se presente em excesso (25 mg/L) na produção de cerveja proporciona um flavor de “amônia”. A fermentação em altas temperaturas e a super dosagem do fermento podem ocasionar um aumento no teor de acetaldeído (AZEREDO, 1999).

Uma das soluções propostas para reduzir o tempo de fermentação e aumentar a concentração de etanol é a suplementação nutricional do meio com fontes de nitrogênio assimilável, vitaminas, esteróis e ácidos graxos insaturados (DRAGONE et al., 2003).

Denominam-se fatores de crescimento os compostos orgânicos indispensáveis a um determinado microrganismo, mas que ele não consegue

sintetizar. Tais fatores, portanto, devem estar presentes no meio para que o microrganismo possa crescer. Muitos desses são vitaminas, em especial do complexo B; outras vezes são aminoácidos, nucleotídeos e ácidos graxos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Além de carbono e nitrogênio, os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgânicos. Alguns são necessários em quantidades apreciáveis – *macronutrientes* – enquanto que de outros bastam traços – *micronutrientes*. Dentre os primeiros está o fósforo, sob a forma de fosfatos, importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucléicos. O enxofre, necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e cisteína e para a síntese de vitaminas como a biotina e tiamina; o potássio, ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica; o magnésio, ativador de enzimas extracelulares e fator importante na esporulação; o ferro, necessário para síntese dos citocromos e de certos pigmentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). De acordo com AZEREDO (1999), os íons magnésio desempenham um importante papel no crescimento da levedura, como co-fator em muitas reações metabólicas.

Diversos microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis* e algumas linhagens de *Clostridium* sp. são desejáveis candidatos para produção de etanol.

- ***Saccharomyces cerevisiae***

O uso de microrganismos na biotecnologia tem grande importância e interesse econômico em todo o mundo. Entre esses microrganismos a levedura

Saccharomyces cerevisiae tem grande destaque nos processos fermentativos e muitas de suas cepas são especialmente exploradas e selecionadas para fermentação do pão, de cervejas, vinhos, queijos e para produção de álcool, glicerol e invertase (JAY, 2005; CARVALHO et al., 2006).

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* apresenta-se na natureza sob a forma oval ou esférica e quanto ao padrão respiratório, é um anaeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose (ausência de oxigênio molecular). Os produtos finais da metabolização do açúcar irão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra. Assim, enquanto uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO_2 e H_2O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO_2 em anaerobiose, processo denominado fermentação alcoólica (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

Contudo, para obtermos as condições ótimas de crescimento da levedura em questão, diversos fatores devem ser considerados. O pH ótimo para seu crescimento deve ser próximo a 4,5. Em relação às bactérias, é menos exigente quanto à atividade de água; é mais resistente à pressão osmótica, podendo crescer em altas concentrações de açúcar e sal, e requer menores concentrações de nitrogênio. Além disso, em função do comportamento anaeróbio facultativo, revelam uma capacidade de crescimento em valores reduzidos de potencial de oxidorredução, oscilando entre +100 a +300mV (MADRID; CENZANO, 1995; TORTORA et al., 2000; EMBRAPA, 2006; CARVALHO et al., 2006).

S. cerevisiae mostra um padrão alternante e reversível de crescimento, denominado dimorfismo, que é caracterizado por uma oscilação entre células

brotantes e pseudohifas em condições limitantes de nitrogênio, o que confere à célula vantagem na procura por nutrientes (CECCATO–ANTONINI; SUDBERY, 2004). Assim, quando se utiliza meio de cultura rico em nutrientes, como nas fermentações industriais, a reprodução ocorre por processo assexuado, isto é, por brotamento - mitose; e se as condições do meio forem adversas ela se multiplica por via sexuada formando ascósporos através da meiose, processo capaz de fornecer descendentes diferentes que resistam melhor às condições desfavoráveis do meio sendo este um artifício de perpetuação da espécie (NOGUEIRA; VENTURINI FILHO, 2005; RIBEIRO; HORII, 1999).

- ***Zymomonas mobilis***

Zymomonas mobilis são bactérias Gram negativas, anaeróbias facultativas e algumas anaeróbias restritas. Microscopicamente apresentam-se na forma de bastonetes curtos e grossos, isolados ou aos pares e macroscopicamente suas colônias são lenticulares, de bordas irregulares e de coloração branca. Em geral são móveis com 1 a 4 flagelos (SWINGS, DE LEY, 1977; KANG; KANG, 1998). Em meio líquido, seu crescimento é observado pela alta densidade celular dispersa, como também pelo sedimento flocoso. Crescem em temperatura que varia entre 25 a 42ºC (VASCONCELOS, 2002).

Quanto à nutrição, são microrganismos quimiorganotróficos, necessitam principalmente de nitrogênio, fósforo e enxofre (DADDS; MARTIN, 1973; FALCÃO DE MORAIS, 1982). Tanto a glicose quanto à frutose podem ser utilizadas por todas as linhagens de *Zymomonas mobilis*.

Z. mobilis é bem utilizada em estudos biotecnológicos por apresentar algumas vantagens que tornam essa bactéria atrativa para produção de etanol, tais como: tolerância osmótica a altas concentrações de açúcar, alta tolerância ao álcool, e alta taxa de crescimento específico. O metabolismo anaeróbico de carboidratos com *Z. mobilis* ocorre ao longo da via Entner-Doudoroff, onde cada mol de glicose consumida produz um mol de ATP, sendo uma importante base para aplicação industrial desta bactéria (SWINGS; DE LEY, 1977; KANNAN et al., 1997). Este mecanismo minimiza a quantidade de glicose convertida em biomassa e aumenta a produtividade do etanol. Entretanto, a produtividade do etanol é afetada devido à síntese de sorbitol e levana que ocorre quando são utilizados como fonte de carbono meios ricos em sacarose ou misturas de glicose/frutose (VIIKARI, 1986; SHENE; BRAVO, 2001). Levana é um polissacarídeo da frutose produzida quando a sacarose é fermentada por *Z. mobilis* (BORSARI et al., 2006).

A produção de etanol a partir da bactéria *Zymomonas mobilis* requer substratos ricos em glicose, frutose ou sacarose, pois meios contendo celulose, inulina ou amido não são usados diretamente como substratos para fermentação alcoólica devido à bactéria não ser capaz de hidrolisar estes polímeros, necessitando de uma etapa de hidrólise anterior à fermentação. Carboidratos menos complexos como inulina e amido têm sido usados para produção de etanol (SWINGS, DE LEY, 1977). Por exemplo, em estudo utilizando farinha de trigo como substrato apresentou boa produção de etanol por *Z. mobilis* após hidrólise enzimática usando α – amilase e amiloglicosidase (FAVELA TORRES; BARATTI, 1988).

Viikari (1986) e Diez e Yokoya (1996) mencionaram que os principais subprodutos produzidos durante a fermentação da sacarose por *Z. mobilis* são: fenol, ácido lático, álcoois superiores, acetaldeído, metanol e levana.

Diversos estudos, em diferentes países, têm explorado o potencial de *Z. mobilis* na produção de etanol. Na Austrália, Canadá, Estados Unidos e Japão, esta bactéria tem sido utilizada para produção de álcool etílico em larga escala (TANAKA et al., 1999; MCLELLAN et al., 1999; SHANE et al., 2000).

No Brasil, mas especificamente no Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, diversas pesquisas são realizadas utilizando *Z. mobilis* em processos fermentativos. O envolvimento desde departamento com esta bactéria começou em 1952 através de Gonçalves de Lima que retornou para Recife após estada de um ano no México onde isolou a linhagem *Zymomonas mobilis* Ag11 a partir de amostras de agave (*Agave atrovirens*). Esta cepa permaneceu única até 1970 quando GONÇALVES DE LIMA et al. (1970) isolou as linhegens CP1, CP2, CP3 e CP4 a partir de amostras do suco da cana-de-açúcar ligeiramente degradado, bebida local conhecida como “caldo de cana picado”. Essas culturas foram consideradas distintas até a análise do perfil do plasmídio (DALLY et al., 1982) revelar que elas são uma mesma linhagem agora conhecida como CP4. Essa linhagem foi distribuída para vários países e é indubitavelmente a mais pesquisada na engenharia genética. Na década de 80, motivado pelo aumento do interesse na produção de etanol de origem microbiana, Falcão de Morais et al. (1983) e Falcão de Morais et al. (1980/81) direcionou seus esforços na seleção e isolamento de novas culturas principalmente de amostras do suco e do melaço da cana-de-açúcar coletados em destilarias produtoras de etanol. Atualmente,

a coleção de *Z. mobilis* é formada por 24 linhagens, sendo 19 destas consideradas como cepas distintas aguardando análises do perfil de plasmídios e DNA cromossômico (FALCÃO DE MORAIS et al., 1993).

Recentemente diversos tipos de substratos têm sido utilizados para produção de etanol em fermentações com *S. cerevisiae* e *Z. mobilis* como o caldo da cana-de-açúcar (RIBEIRO; HORII, 1999; TANO; BUZATO, 2003), farinha e farelo de trigo (MONTESINOS; NAVARRO, 2000; PALMAROLA-ADRADOS et al., 2005), melaço da beterraba (NAHVI et al., 2002; ATIYEH; DUVNJAK, 2002), resíduos industriais (KÁDÁR et al., 2004), além de meios sintéticos como misturas de glicose/frutose (SHENE; BRAVO, 2001) e sacarose (ATIYEH; DUVNJAK, 2001a; ATIYEH; DUVNJAK, 2001b). Até o momento não foram encontradas publicações científicas utilizando a algaroba como substrato para produção de etanol.

3.1.2 Importância tecnológica do etanol

Nos Estados Unidos e na Europa a produção de etanol tem aumentado como substituto dos combustíveis fósseis no setor de transportes. Diversos países da Europa, Canadá e Austrália utilizam amido de trigo como matéria-prima para produção de etanol, no entanto, a cana-de-açúcar e o milho são as reservas dominantes atualmente (ZALDIVAR et al., 2005). Entretanto, demandas indicam a projeção de outras matérias-primas ricas em amido e/ou açúcares para produção de etanol (PALMAROLA-ADRADOS et al., 2005, PRASAD et al., 2007, CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Atualmente, os Estados Unidos consomem aproximadamente 20 milhões de barris de óleo bruto todos os dias dos quais cerca de 60% são importados. O transporte líquido de combustíveis incluindo gasolina, diesel e gás combustível correspondem a quase 70% do total. Neste país o combustível renovável mais comum é o etanol, cuja produção anual recentemente superou 4 bilhões de barris. Nos EUA a principal matéria prima para produção do etanol é o milho, produzindo cerca de 13 bilhões de barris por ano (BOTHAST; SCHLICHER, 2005; GRAY et al., 2006).

A principal matéria-prima utilizada para produção de álcool combustível é a cana-de-açúcar, por seu alto conteúdo em sacarose e largo cultivo. Segundos estimativas da consultoria DATAGRO (SCARAMUZZO, 2006) na safra 2006/07 da cana-de-açúcar no Brasil deverá processar 412,19 milhões de toneladas de cana, volume 6,6% maior em comparação com a safra passada. A produção de açúcar no país atingirá 29,2 milhões de toneladas, 12,3% maior sobre 2005/06, e a de álcool deve ser 16,73 bilhões de litros, volume 5,1% maior que no ciclo anterior. Segundos dados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior (MDIC), o Brasil produz hoje 35% do álcool do mundo. O mesmo índice é alcançado pelos Estados Unidos (EUA), que usa o milho como matéria prima. Os outros produtores são Índia (4%), China (8%) e União Européia (5%). Os 13% restantes são de outros países. Em 2005 o Brasil exportou 2,59 bilhões de litros de álcool combustível, somando US$ 765 milhões de dólares. A Índia foi o maior comprador, respondendo por 410 milhões de litros. Depois o Japão (315 milhões de litros) e EUA (260 milhões de litros) (O POVO / ECONOMIA, 2007).

As vantagens do etanol como combustível oriundo de fontes renováveis impulsionou o Brasil a desenvolver uma tecnologia 100% nacional, o PROALCOOL (Programa Nacional do Álcool). Criado pelo decreto nº 79.953, de 14 de novembro de 1975, e subsidiado pelo Governo Federal foi considerado como a solução brasileira para a crise do petróleo. O aumento da produção nacional e o uso do álcool como combustível automotivo fizeram com que diminuíssem as despesas com importação do petróleo ao longo da década de 80. Porém, ao final desta década o programa foi fortemente atingido por uma redução na safra de cana-de-açúcar aliada ao excesso de carros a álcool em circulação. Isto provocou uma falta generalizada do produto no país, havendo um grande impacto sobre a credibilidade do programa. Durante a década de 90, a conveniência do modelo adotado pelo PROALCOOL foi posta em discussão. A anterior fabricação exacerbada de carros a álcool, aliada ao fato de que a produção nacional deste combustível não conseguiu acompanhar o crescimento da demanda (mesmo com os grandes subsídios dados ao setor), tornou o Brasil, ao mesmo tempo, o maior produtor de etanol do mundo e também o maior importador. O programa criado para diminuir a dependência externa em combustíveis mostrou-se dependente de importações para a sua manutenção (TEIXEIRA et al., 1997).

Segundo Schuchardt e Ribeiro (2001) muitos insumos petroquímicos podem ser produzidos facilmente a partir dos componentes da biomassa, sendo necessário menos de 1% da biomassa produzida anualmente no país, o que não traria nenhum prejuízo para outros setores. Além disso, parte da utilização da biomassa pode ser feita a partir de resíduos agrícolas que hoje são sub-utilizados, causando até graves problemas ambientais em relação à

estocagem, como é o caso do bagaço de cana. Segundo o mesmo autor, o Brasil tem a grande chance de sair pioneiro nesta área e produzir produtos petroquímicos a partir de fontes renováveis enquanto os países desenvolvidos ainda dependem do petróleo.

Com o progresso da tecnologia de bebidas, as linhagens de leveduras foram sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo e ao produto. A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes (atividade "killer") são constantes fontes de interesse (RIBEIRO; HORII, 1999).

As bebidas alcoólicas se classificam em fermentadas (cerveja, vinho, vinho de frutas e outros fermentados), por mistura (licor, aguardente composta e bebidas mistas) e fermento-destiladas (aguardente de cana ou caninha, aguardente de melaço ou cachaça, rum, uísque, conhaque, aguardente de frutas, tequila, vodca, genebra, gim, etc.) (AQUARONE et al., 1983).

Dentre as bebidas alcoólicas mais consumidas no Brasil estão a cerveja e a cachaça. Segundo a Associação Brasileira de Bebidas - ABRABE (2006) o Brasil ocupa o quarto lugar no mundo em consumo de cerveja, perdendo em volume para os EUA (23,6 bilhões de litros/ano), China (18 bilhões de litros/ano) e Alemanha (11,7 bilhões de litros/ano). Em 2002 o consumo da bebida totalizou 8,41 bilhões de litros. A cachaça é a primeira bebida destilada mais consumida no Brasil e a terceira no mundo com produção anual de 1,3 bilhões de litros. O processo biotecnológico de produção de aguardente de cana segue ainda princípios rudimentares de fermentação que impedem não só

a escolha, a seleção e o uso de linhagens adequadas de leveduras, como também impossibilita um controle de processo e de qualidade de produto pela existência de um padrão tecnológico muito incipiente (RIBEIRO; HORII, 1999).

Silva et al. (2003a) no estado da Paraíba realizaram um estudo a partir da extração e da fermentação do caldo de algaroba com intuito de obter parâmetros ideais para produção de aguardente. Sendo assim, verifica-se que esta leguminosa apresenta características favoráveis ao desenvolvimento de novos produtos para a indústria de alimentos e bebidas, colocando o Brasil como pioneiro em pesquisas utilizando a algaroba para esta finalidade.

3.2 ALGAROBA [*Prosopis juliflora* (Sw) DC]

3.2.1 Considerações Gerais

O gênero *Prosopis* pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Mimosoideae* e tem cerca de 44 espécies. São arbustos de tamanho médio ou árvores de grande porte, que podem atingir 20 metros de altura, com tronco de mais de um metro de diâmetro. Embora cresçam nas proximidades de água, diferentes espécies de *Prosopis* desenvolvem-se em lugares secos, onde dificilmente outras plantas poderiam sobreviver. Podem tolerar e crescer com rapidez em solos salinos e em solos ácidos de baixa fertilidade (PERES; MORAES, 1991).

A introdução da espécie no Nordeste brasileiro ocorreu por volta de 1942, em Serra Talhada, Pernambuco, por J. B. Griffing, e, posteriormente, em 1947, em Angicos, Rio Grande do Norte, pela Companhia Brasileira de Linhas de Coser, através de sementes trazidas do Peru por Sidney Cross Harland e, mais tarde, em 1948, com sementes recebidas do Sudão (EL HAG et al., 2000).

Prosopis juliflora (Sw.) D.C., espécie originária do deserto de Piura no Peru, surge, no Nordeste, como planta providencial para ocupar as terras áridas e secas, nas quais a sua capacidade de reprodução e expansão é enorme. De grande rusticidade, a algarobeira (Figura 2 e 3) apresenta características que justificam a sua utilização nas áreas semi-áridas. Além do elevado valor nutritivo de suas vagens (Tabela 1), esta xerófita apresenta a importante característica de frutificar na época mais seca do ano, quando os estoques de forragens naturais atingem o estádio crítico, produzindo de 5 a 15

toneladas de vagens por hectare (FIGUEIREDO, 2000). No Nordeste, comparando-se a produtividade desta leguminosa com o milho, verifica-se que o milho produz em média de 600 kg/ha (precipitação de 700 mm), enquanto que a algaroba pode variar de 3000 a 8000 kg/ha, com pluviosidade de 300 mm (SILVA et al., 2003a).

Figura 2 – Árvore da Algaroba (*Prosopis juliflora*)

A algaroba, principalmente no Nordeste, constitui-se numa das raras espécies capazes de possibilitar aos animais e ao próprio homem uma convivência harmoniosa com o fenômeno adverso e periódico das secas. A espécie é utilizada para a produção de madeira, carvão vegetal, estacas, álcool, melaço, alimentação animal e humana, apicultura, reflorestamento, ajardinamento e sombreamento, tornando-se, por conseguinte, uma cultura de elevado valor econômico e social (PEREZ; MORAES, 1991; VIEIRA et al., 1995). Por outro lado, se mal manejada, a algaroba é capaz de invadir habitat's naturais e inibir a regeneração das espécies de caatinga, reduzindo a

biodiversidade vegetal do bioma, sendo chamada de “praga do sertão”. A semente germina em áreas salinizadas e degradadas (com pouca densidade de espécies nativas). Animais que ingerem as vagens “in natura” disseminam as sementes através das fezes após a digestão no rumem, e no solo encontram condições ótimas de umidade, germinam e crescem, infestando as áreas. A Embrapa Semi-árido está desenvolvendo um projeto inovador que pretende favorecer a exploração produtiva da algaroba sem causar maiores danos ao meio ambiente, reduzindo em até 60% o avanço espontâneo da algarobeira sobre áreas da caatinga, sendo uma das medidas de controle do manejo de animais nessas áreas (SILVA et al., 2001).

Figura 3 - Vagens de Algaroba

3.2.2 Valor Nutritivo

Esta planta produz grande quantidade de vagens de excelente palatabilidade e boa digestibilidade, apresentando composição química variável, que está na dependência do local onde é produzida (SILVA et al., 2003b).

A vagem de algaroba assemelha-se em sua composição às outras leguminosas, exceto a soja, por possuir um teor de gordura mais elevado. De acordo com a Tabela 1 pode-se visualizar a composição centesimal da algaroba por vários autores. Verifica-se que as vagens inteiras se caracterizam por seu alto teor em carboidratos (açúcares e fibras) e as sementes por seu elevado teor em proteínas. As vagens e as sementes assemelham-se por seus teores aproximados em cinzas e lipídios. Dentre os tipos de açúcares presentes na algaroba, a sacarose encontra-se em maior quantidade, apresentando uma concentração de 29% dos açúcares totais segundo Figueiredo (1990).

Tabela 1 - Composição centesimal da vagem inteira e das sementes da algaroba.

Autores	Análises (g/100g)											
	Umidade		Cinzas		Proteínas		Extrato Etéreo		Carboidratos		Fibras Totais	
	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V	S	V
FIGUEIREDO, 1990.	-	-	4,4	4,3	36,3	5,6	5,7	4,9	53,6	75,2	-	-
SILVA et al., 1996.	11,4	-	3,3	-	34,5	-	4,2	-	40,4	-	6,2	-
HOLMQUIST-DONQUIS & REY, 1997.	-	-	-	4,2	-	14,5	-	3,2	-	59,6	-	44,1
MAHGOUB et al., 2005.	-	9,3	-	4,0	-	12,0	-	2,6	-	-	-	-

S – sementes
V – vagem inteira
(-) não analisado

Mesmo as proteínas sendo consideradas de boa qualidade, possuem limitações em aminoácidos essenciais, tais como lisina, treonina, metionina e cisteína (SILVA et al., 1990). Em um estudo realizado em ratas *Wistar* com objetivo de verificar os efeitos da farinha de algaroba durante as fases de gestação e lactação foi observado, medindo-se a eficácia alimentar das dietas com relação ao valor protéico, que a proteína da algaroba, apesar de suas limitações, conseguiu que os animais, em termos de ganho de peso, apresentassem um desempenho satisfatório (27%) no período de gestação, devendo-se isso a uma ingestão de alimento 1,59 vezes maior do que dos animais alimentados com a dieta padrão (caseína). O valor protéico foi compensado pela maior quantidade de alimento ingerido. Também verificou-se que não houve perda de peso das crias de nutrizes alimentadas com a dieta

teste (algaroba), evidenciando que a algaroba foi capaz de manter o peso das crias durante o período de aleitamento (SILVA et al., 2003b).

Algumas leguminosas, como a algaroba, apresentam também em sua composição compostos fenólicos tais como o tanino, que produzem efeito adstringente aos alimentos derivados. Formam soluções coloidais sob ação do calor, produzindo turbidez em produtos como cerveja, vinhos e sucos de frutas. Processos como adsorção com clarificantes (FENNEMA, 1992) e eliminação por microfiltração (MEYER, 1969) são considerados simples e de baixo custo quando comparados a outros processos químicos de remoção de taninos (MARAKIS; MARAKIS, 1996), podendo ser facilmente aplicados ao processamento do extrato de algaroba.

A composição em sais-minerais da farinha de algaroba é de aproximadamente 3,3% (SILVA et al., 2003b). Conforme Figueiredo (1990), os minerais em maior concentração são: potássio (1,030 mg/100g), cálcio (410 mg/100g), magnésio (150 mg/100g), fósforo (140 mg/100g), ferro (75 ppm), cobre (16 ppm), manganês (20 ppm) e cobalto (2,3 ppm). Os minerais desempenham funções essenciais para o organismo dos animais e do homem, como, participação como componentes estruturais dos tecidos corporais (por exemplo, Ca e P), atuação nos tecidos e fluidos corporais como eletrólitos para manutenção do equilíbrio ácido-básico, da pressão osmótica e da permeabilidade das membranas celulares (Ca, P, Na, Cl), e como ativadores de processos enzimáticos (Cu, Mn), ainda como integrantes da estrutura de metalo-enzimas (Zn, Mn) ou vitaminas (Co) (TOKARNIA et al., 2000).

3.2.3 Utilizações

Costuma-se dizer que da algaroba se aproveita tudo: raízes e galhos para produção de carvão vegetal, caule como madeira de boa qualidade, a casca é usada para curtir o couro e a vagem, na alimentação animal, na fabricação de farinha e na preparação de xarope e de uma bebida semelhante ao café.

A algaroba foi muito utilizada pelas civilizações sul americanas antes da chegada dos espanhóis, como alimento de subsistência e até na "medicina" popular. Com os europeus, novos costumes foram sendo introduzidos, passando a algaroba a ser utilizada mais como alimento para os animais. Os indígenas, principalmente na América Latina, tinham na algaroba um recurso natural muito importante, utilizando-a na preparação de farinhas, mel, aguardente, café, álcool, goma, curtição de couro (pelo seu elevado teor de tanino) e na tinturaria (GRADOS et al., 1994).

No Brasil, vem chamando a atenção de pesquisadores pela sua grande utilidade e versatilidade como na produção de carbono ativado e fabricação de óleos, amplamente requeridos nas indústrias farmacêuticas e de alimentos (KAILAPPAN et al., 2000), como fonte de minerais (JOSHI; HINGLAJIA, 2000), caracterização (SINHA et al., 1997), regulação (SANE et al., 1999) e ativação de enzimas, galactomanas (PATHERE et al., 2000), podendo sua goma ser substituída ou associada às gomas guar e caroba, pela semelhança entre seus polissacarídeos (FIGUEIREDO; PRICE, 1990).

Com crescimento rápido e excelente resistência à seca, a espécie *Prosopis juliflora* é uma candidata natural como combustível. Com gravidade

específica de 0,70 ou maior, a madeira possui um índice de calor elevado, queimando-se lentamente e uniformemente e mantendo um bom calor. Em vilas indianas esta espécie representa 90% de combustível utilizado. Possui uma estrutura biológica que ajuda na fixação do nitrogênio ao solo e na recuperação de áreas degradadas (BURMAN et al., 2001).

A algaroba também foi muito usada na terapêutica. A goma exudada auxiliava na cura de infecções oculares e inflamações na garganta. Um chá preparado com as raízes da algarobeira jovem auxiliava no tratamento contra diarréia, enquanto o líquido preparado a partir da casca da árvore era usado como laxativo (FIGUEIREDO, 1990).

A algaroba possui diversas formas de utilização, porém poucos são os estudos que destacam sua aplicação em consumo humano. Apesar de possuir elevado valor nutritivo e boa digestibilidade a sua aplicação em alimentos ainda tem sido limitada (HOLMQUIST-DONQUIS; REY, 1997).

A maioria dos produtos obtidos da vagem da algaroba para alimentação humana é produzida de forma artesanal, não utilizando, praticamente, nenhum tipo de máquinas ou equipamentos sofisticados. Contudo no Brasil, o uso da algaroba para este fim não se constitui hábito.

Sabe-se que a algaroba é consumida em regiões da América Latina e Oriente Médio, sob a forma de geléia, mel e farinha (FIGUEIREDO, 2000). Seus ramos e frutos vêm sendo utilizados empiricamente na alimentação dos diferentes rebanhos da nossa região. Este fato, ao lado de sua adaptabilidade às nossas condições de clima e de solo e da procura por novas fontes alimentares, nutricionalmente satisfatórias e de baixo custo, tem levado pesquisadores a estudar fontes alternativas para serem usadas como

suplementação alimentar, visando o aproveitamento dessa leguminosa na alimentação humana (LIMA et al., 1990; VIEIRA; BION, 1998; VIEIRA et al., 1995).

Na década de 80 muitos estudos foram realizados com o objetivo principal de incorporar produtos obtidos da algaroba na alimentação da população, especialmente no semi-árido. A EMATER/RN através de uma equipe chamada Bem-Estar Social desenvolveu um trabalho de capacitação de equipes de campo visando treinar as comunidades no aproveitamento da algaroba como alimento humano. Neste trabalho foi elaborado todo um receituário que foi difundido através de cursos realizados em regiões onde há maior ocorrência da algarobeira. Dentre os alimentos feitos estavam incluídos biscoitos, doces, bolos, pudins, sopas e geléias (ROCHA, 1986).

Outra forma de emprego das vagens da algaroba é como forragem. A qual têm sido utilizadas como alimento para bovinos, eqüídeos, ovinos e caprinos em países como Peru, Chile, Argentina, Colômbia, Venezuela, dentre outros.

Prosopis juliflora pode contribuir para aumentar a fonte de alimento para animais por apresentarem diversas vantagens, como:

- Baixo custo em comparação com outros produtos;
- Concentração elevada de proteína;
- Aproveitamento de áreas inativas nas regiões do semi-árido pela facilidade de adaptação do vegetal nestas condições.

Esta leguminosa pode ser uma fonte útil de alimentação animal, substituindo ou reduzindo, com custos mais baixos, o uso de milho, soja e trigo que podem ser produzidas em escalas limitadas nas áreas do semi-árido.

Estudos realizados com a farinha de algaroba obtida a partir do processamento de suas vagens mostraram que a proteína dessa leguminosa, depois de submetida à cocção, para inativação de substâncias antinutricionais presentes nas leguminosas em geral, foi capaz de promover o crescimento em animais desmamados aos 21 dias de idade, quando avaliados por meio do Quociente de Eficácia Protéica (PER) de 1,20 (SILVA et al., 1990). Essa farinha mostrou-se, ainda, eficiente como complemento protéico no feijão, no milho e no trigo (LIMA et al., 1990) como também foi capaz de repletar tecidos de animais jovens desnutridos (FARIAS et al., 1990).

Mahgoub et al. (2005) avaliaram a substituição de parte da ração para cabras por vagens de algaroba e obtiveram resultados que indicaram que a proporção de 200g/kg/dia na alimentação desses animais apresentou aumento da ingesta alimentar e ganho de peso dos animais.

Estudos no Brasil mostraram que a farinha de algaroba pode substituir em até 600g/kg da farinha de trigo nas rações de vacas lactantes e como resultados verificaram que a ingesta, o ganho de peso e a produção de leite aumentaram de forma crescente, enquanto no gado de corte foi possível substituir totalmente a farinha de trigo pela farinha de algaroba (HABIT; SAAVEDRA, 1990).

A leguminosa é capaz de fornecer proteína e sacarose ao organismo bovino, por outro lado, suas vagens apresentam uma toxicidade que pode ser fatal quando dada em excesso para bovinos ou servida como única fonte de alimento (TABOSA et al., 2000). As primeiras reclamações dos criadores do Nordeste sobre seu efeito deletério ocorreram no início da década de 80, quando criadores da Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte, observaram

sintomas clínicos da doença neurológica chamada “Cara Torta”, caracterizada por desvio lateral da cabeça, mastigação constante, salivação abundante, tremores nos músculos da face, protusão da língua e emagrecimento acentuado, levando os animais à morte pela incapacidade em se alimentar. Se bem utilizada e sob orientação técnica o risco deixa de existir (MAHGOUB et al., 2005).

Em experimentos com animais de laboratório a farinha de algaroba foi capaz de manter a gestação e o aleitamento, apesar da sua proteína ser deficiente em aminoácidos essenciais, sem provocar mortalidade ou canibalismo, fenômenos que ocorrem durante a administração de dieta hipoprotéica, usualmente descritos na literatura (SILVA et al., 2003b).

Portanto, como observado anteriormente, muitos estudos estão sendo realizados utilizando-se a algaroba na alimentação animal, demonstrando sua aplicabilidade e viabilidade em diferentes estados fisiológicos e em idades diversas.

Considerando a elevada produtividade da vagem de algaroba no Brasil, especialmente no Nordeste, seu alto teor de açúcares, além da expressiva quantidade de frutos desperdiçados no campo, verifica-se que a algaroba apresenta-se como matéria-prima viável a pesquisas na área da biotecnologia.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1 Materia-prima:

Foram utilizadas vagens maduras de algaroba, cedidas pela SUPRANOR (Suprimentos de Alimentos do Nordeste S/A). Estas foram selecionadas descartando-se as atacadas por insetos, fungos e as de pequeno desenvolvimento.

4.2. Métodos

4.2.1 Caracterização da Farinha de Algaroba

4.2.1.1 Produção da Farinha:

A farinha de algaroba foi elaborada a partir das vagens secas em estufa com circulação de ar a 45°C por 18 horas. Após a secagem as vagens foram trituradas em moinho, até obtenção de um material homogêneo. Em seguida foram submetidas a tamização com peneira em malha de 28 mesh com 0,59 mm de diâmetro.

4.2.1.2 Composição Físico-Química da farinha:

As análises físico-químicas (umidade, cinzas, açúcares totais, açúcares redutores, proteína, extrato etéreo, fibras e taninos) foram realizadas de acordo com a metodologia do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1976).

A determinação dos tipos de açúcares predominantes na farinha de algaroba foi realizada através de Cromatografia em Camada Delgada utilizando-se placa de alumínio sílica gel 60 F_{254} MERCK. Na fase móvel foi utilizada solução com álcool butílico (40mL), acetona (50mL) e água destilada (10ml). Para preparação dos padrões utilizou-se Glicose, Frutose e Sacarose "Merck". Foi usado como revelador uma solução contendo difenilamina e acetona p.a. que apresenta cor azul para glicose, vermelho para frutose e marrom para sacarose. A placa foi revelada em câmara escura com luz ultravioleta.

Para determinação dos teores dos elementos minerais foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica (modelo 5100 PC, Perkin Elmer) com módulo de atomização em chama, pérola de impacto e correção de fundo com lâmpada de deutério. Misturas acetileno/ar foram empregadas nas proporções recomendadas pelo fabricante do instrumento para os diferentes elementos.

4.2.1.3 Análise Microbiológica da farinha:

Foram realizadas as análises de detecção de *Salmonella* sp./25 g, contagem de Coliformes a 45°C (AOAC/02 986.33), *Bacillus cereus*/g (AOAC/02 980.31) e bolores e leveduras/g (AOAC/02 997.02) [1]. Os

resultados relacionados à análise de *Salmonella* foram expressos em ausência/presença, enquanto os demais resultados foram expostos em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC/g).

4.2.2 Elaboração do Substrato fermentativo:

A adequada concentração de farinha para obtenção do substrato para a fermentação (extrato-aquoso) foi verificada através da execução de ensaios em triplicata utilizando farinha da algaroba e água destilada nas seguintes concentrações: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45%. Todos os ensaios foram submetidos as seguintes etapas: homogeneização mecânica da farinha com a água destilada, repouso a 50ºC em banho-maria por 1 hora com homogeneização em intervalos de 10 minutos, centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, filtração em bomba de vácuo do sobrenadante para retirada do material em suspensão e esterilização em autoclave a 115ºC a 1 atm por 15 minutos sob pressão.

Como critério de escolha da concentração ideal da farinha de algaroba para obtenção do substrato fermentativo foi verificado o teor de glicose (mg/dL) através de sistema enzimático utilizando o kit GLICOSE PAP – Liquiform da LABTEST DIAGNÓSTICA e de proteínas totais através de sistema de determinação colorimétrica utilizando-se o kit PROTEÍNAS TOTAIS da LABTEST DIAGNÓSTICA de todas as concentrações, observando-se a estabilidade dos resultados. Foi determinado o pH de todas as concentrações através de pHmetro da marca Micronal modelo B474. Após a determinação da concentração ideal de farinha para elaboração do substrato foi verificado o teor

de sólidos solúveis totais utilizando refratômetro de Abbe com leitura em grau Brix.

4.2.3 Microrganismos e condições de cultivo:

Foram utilizadas as seguintes cepas de microrganismos: *Zymomonas mobilis* UFPEDA-205 ZAP e *Saccharomyces cerevisiae* UFPEDA-1012, cedidas pela coleção de microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

Para crescimento e manutenção das cepas estoques foram utilizados os seguintes meios:

- *Zymomonas mobilis*: Caldo SSDL (SWINGS; DE LEY, 1977) composto de 5,0 g/L de extrato de levedura e 20,0 g/L de glicose.
- *Saccharomyces cerevisiae*: Ágar Sabouraud composto de 10,0 g/L de peptona, 20,0 g/L de glicose anidra e 17,0 g/L de Ágar-ágar.

Foram consideradas jovens as cepas com 24 a 96 horas de crescimento em estufa a 28ºC para *S. cerevisiae* e 37ºC para *Z. mobilis*.

4.2.4 Pré-inóculo:

Para obtenção do pré-inóculo foram utilizadas células jovens de *S. cerevisiae* e de *Z. mobilis* adicionadas numa concentração de 5% (v/v) em caldo Sabouraud (10,0 g/L de peptona e 20,0 g/L de glicose) e caldo SSDL, respectivamente. Foram submetidas à agitação em shaker rotatório (150 rpm) por 24 horas a temperatura ambiente.

4.2.5 Curvas de Crescimento dos Microrganismos

Através da técnica da Contagem Padrão em Placas de células viáveis (UFC/mL) segundo Cirigliano e Carman (1983) foram obtidas as seguintes curvas de crescimento:

- *S. cerevisiae* em meio padrão (caldo Sabouraund);
- *S. cerevisiae* em extrato de algaroba acrescido de 0,2% de Fosfato de potássio (KH_2PO_4) e 0,1% de Sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$);
- *Z. mobilis* em meio padrão (caldo SSDL);
- *Z. mobilis* em extrato de algaroba acrescido de sais (0,2% de KH_2PO_4 e 0,1% de $(NH_4)_2SO_4$).

O crescimento dos microrganismos foi verificado através da inoculação de 5 mL do pré-inóculo para 95 mL dos meios correspondentes a curva desejada e posteriormente submetidos a diferentes condições de cultivo: agitação (shaker rotatório com 150 rpm) e estático (em bancada), em temperatura ambiente durante 24 horas com extração de alíquotas em intervalos de 2 horas.

O crescimento dos microrganismos foi verificado segundo o fluxograma descrito na Figura 4:

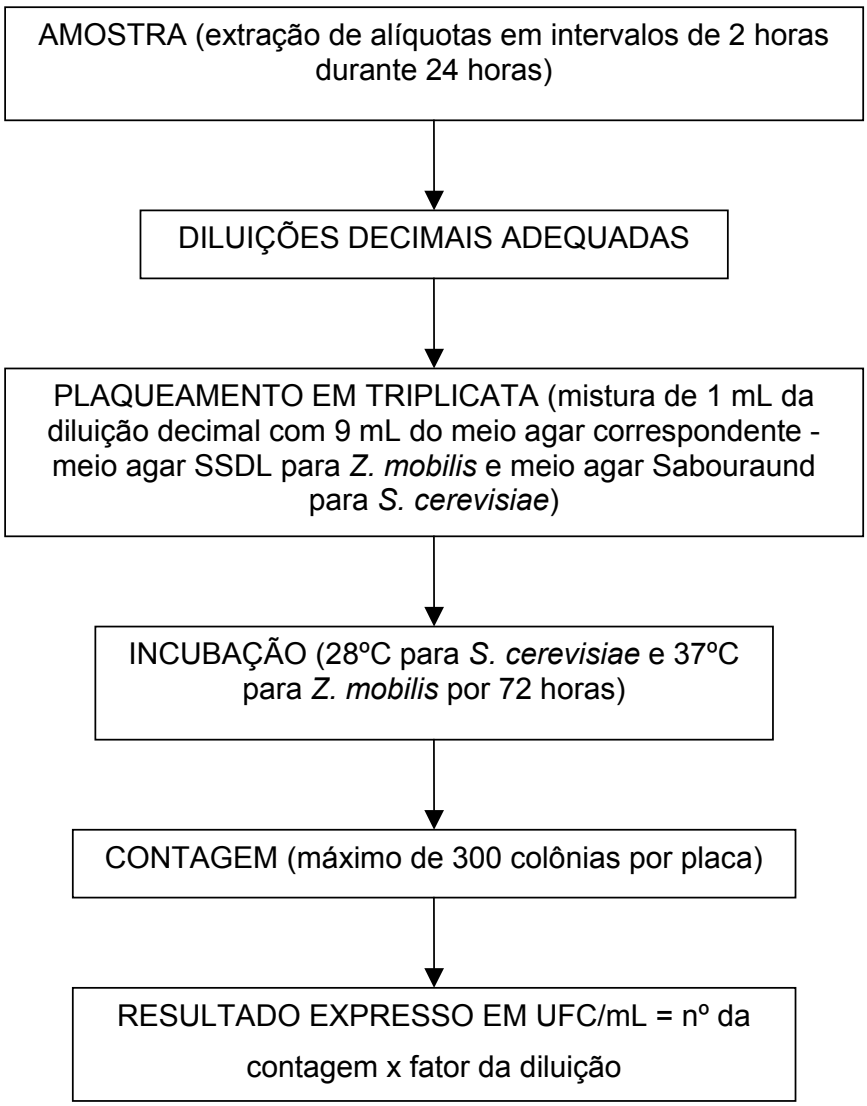


Figura 4 – Fluxograma de etapas para obtenção das curvas de crescimento de *Zymomonas mobilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios padrão e extrato de algaroba.

4.2.6 Condições de Fermentação

O extrato aquoso obtido da farinha da algaroba acrescido de sais, 0,2% de fosfato de potássio (KH_2PO_4) e 0,1% de sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$), foi utilizado como substrato para fermentação. Foi adicionada uma concentração de 5% do pré-inóculo dos diferentes microrganismos estudados ao extrato aquoso e submetidos ao processo fermentativo submerso sob duas condições de cultivo: agitação (shaker rotatório com 150 rpm) e estático (em bancada), em temperatura ambiente (28±1ºC) por um período de incubação de 18 e 36 horas para execução dos ensaios do Planejamento fatorial 2^3 e de 0 a 72 horas com o ensaio do planejamento fatorial que obteve a máxima produção de etanol (g/L).

4.2.7 Métodos Analíticos

A produção de etanol foi analisada através de Cromatógrafo a Gás modelo CG 3537D equipado com um detector de ionização de chama. Coluna 10% carbomax 20M 1/8'' x 2m (aço inox) com temperatura 102ºC (isotérmico). Amostra injetada sem diluição com volume de 2 µL, temperatura do injetor de 100ºC, utilizando como gás de arraste o hidrogênio com vazão de 5 mL/minuto, e temperatura do detector de 120 ºC.

O teor de glicose foi determinado através do sistema enzimático (descrito no item 4.2.2). A biomassa através da metodologia da Contagem Padrão em Placas (Cirigliano e Carman, 1983) e pH através do pHmetro.

4.2.8 Delineamento Experimental

Foi utilizado um Planejamento fatorial 2^3 com as seguintes variáveis independentes: 1 - Tempo de fermentação (horas); 2 - Tipos de microrganismos e 3 – Condições de cultivo. Este planejamento gerou 8 ensaios, com duas repetições cada, cujas condições (níveis codificados e decodificados) encontram-se apresentadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente (BARROS NETO et al., 2001). As respostas de interesse foram Etanol (g/L), Glicose (g/L) e Biomassa (UFC/mL).

Tabela 2 - Níveis codificados das variáveis.

Ensaios	Tempo de fermentação (horas)	Tipo de microrganismos	Condições de cultivo
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1

Tabela 3 - Níveis decodificados das variáveis.

Níveis codificados	Tempo de fermentação (horas)	Tipo de microrganismos	Condições de cultivo
-1	18	*S. cerevisiae*	Estático
1	36	*Z. mobilis*	Agitação

Em seguida foi realizada a fermentação de 0 a 72h com o ensaio do planejamento fatorial que obteve a máxima produção de etanol (g/L).

Cálculos dos parâmetros de fermentação:

- **Açúcar consumido:**

$S = -(S_f - S_0)$, onde:

$S =$ açúcar consumido (g de glicose.L^{-1});

$S_f =$ concentração final de açucares (g de glicose.L^{-1});

$S_0 =$ concentração inicial de açucares (g de glicose.L^{-1}).

- **Etanol produzido:**

$P = (P_f - P_i)$, onde:

$P =$ etanol produzido (g.L^{-1});

$P_f =$ concentração de etanol final (g.L^{-1});

$P_i =$ concentração de etanol inicial (g.L^{-1}).

- **Fator de conversão de substrato em etanol:**

$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P}{S}$, onde

$Y_{\frac{P}{S}} =$ fator de conversão de substrato em etanol ($g.g^{-1}$);

- **Produtividade de etanol:**

$PR = \frac{P}{t}$, onde

$PR =$ produtividade de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$),

$t =$ tempo de fermentação (h).

- **Eficiência de fermentação** $(\eta_{P(\%)})$, com base no rendimento teórico proveniente da equação de Gay-Lussac (51,1 g etanol. 100g $glicose^{-1}$):

$$\eta_{P(\%)} = \frac{Y_{\frac{P}{S}} x100}{51,1}$$

4.3. Análise estatística

Uma analise de regressão linear foi aplicada aos valores experimentais para a fase exponencial de crescimento da bactéria como também para o aumento de produção de etanol de acordo com as equações 1 e 2, respectivamente:

$\log[X] = \mu.t + b,$ **(1)** onde:

$\log[X] =$ logaritmo da concentração de bactérias na fase exponencial de crescimento;

$\mu =$ velocidade específica máxima de crescimento (h^{-1});

$t =$ tempo (h);

$b =$ coeficiente linear da equação do logaritmo da concentração de bactérias em função do tempo de fermentação, na fase exponencial de crescimento.

$y = at + b,$ **(2)** onde:

$y =$ produção de etanol (g/L);

$t =$ tempo (h);

$b =$ coeficiente linear da equação da produção de etanol em função do tempo de fermentação.

$a =$ velocidade máxima de produção de etanol(h^{-1});

Os dados obtidos das curvas de crescimento foram analisados pelo teste "t" de student, as proteínas e glicose dos diferentes percentuais de farinha como também a regressão linear foram avaliadas pela ANOVA, os dois primeiros utilizando o teste de Duncan para comparação, todos ao nível de 5% de significância. As analises dos resultados acima e os efeitos principais e interações entre as variáveis do planejamento fatorial foram realizados através do programa computacional Statistica 6.0 (STATSOFT, 1996).

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química e microbiológica da farinha da algaroba

Para obtenção da farinha da algaroba as vagens foram secadas a 45ºC em estufa com circulação de ar por um período de 18 horas. Fatores estes, quando não controlados adequadamente, interferem na qualidade final, podendo alterar a cor pelo elevado conteúdo em açúcares presentes nas vagens. O rendimento médio da farinha foi de, aproximadamente, 35%.

A composição físico-química e de minerais da farinha da algaroba está apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição físico-química da farinha da algaroba.

Análises	g/100g
Umidade	5,8 ± 0,9
Açúcares Totais	56,5 ± 0,4
Açúcares redutores	4,6 ± 0,3
Fibra bruta total	7,2 ± 0,5
Proteínas	9,0 ± 1,5
Cinzas	3,6 ± 0,1
Extrato etéreo	2,1 ± 1,3
Tanino	0,3 ± 0,0

A concentração de açúcares totais na farinha de algaroba foi de 56,5 g/100g, valor que somado a concentração de fibras totaliza 63,7 g/100g de carboidratos. Este resultado é inferior ao encontrado por Figueiredo (1990) que

encontrou 75,2 g/100g de carboidratos na vagem de algaroba, cuja diferença pode estar ligada a fatores como diferentes condições de cultivo e solo. Os tipos de açúcares presentes na farinha foram verificados pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada mostrando acentuada predominância da sacarose e discreta presença de glicose. Silva et al. (2001) e Figueiredo (1990) detectaram 46% e 29% de sacarose, respectivamente, na vagem da algaroba, comprovando assim que a sacarose é o açúcar predominante na farinha.

Com relação ao teor de proteínas (Tabela 4) foi encontrada uma concentração de 9,0 g/100g. Verifica-se na literatura uma variabilidade nos teores de proteínas da vagem de algaroba como pode ser observado em estudos realizados por Holmquist-Donquis e Rey (1997) e Figueiredo (1990) que detectaram 14,5 g/100g e 5,6 g/100g, respectivamente.

Silva et al. (1996) verificaram que a vagem de algaroba em comparação ao milho apresenta conteúdo de proteína similar, porém é mais fibrosa. Os autores confirmam ainda a presença de 0,33 g/100g de tanino na vagem, resultado este semelhante ao encontrado neste trabalho. Além disso, no endosperma da semente da algarobeira (7,6% do fruto), são encontrados galactomananos, compostos por 46,3% de manose e 34% de galactose, que apresentam capacidade de reter grande quantidade de água, aumentando de volume diversas vezes e formando soluções altamente viscosas (FIGUEIREDO; SCHMIDT, 1999).

Quanto à concentração de lipídios (extrato etéreo) encontrada (2,1g/100g), esta apresentou teor inferior ao encontrado por Holmquist-Donquis e Rey (1997) e Figueiredo (1990) que detectaram 3,2 g/100g e 4,9 g/100g na vagem de algaroba, respectivamente.

A partir do conteúdo em cinzas detectado (3,6 g/100g) foram determinadas as concentrações de alguns dos minerais presentes na farinha de algaroba (Tabela 5). Este resultado corrobora com Silva et al. (2003b) cujo conteúdo em sais-minerais da farinha de algaroba foi de 3,3 g/100g.

Tabela 5 – Composição de minerais da farinha de algaroba.

Minerais	mg/100g
Cálcio (Ca)	390,00
Fósforo (P)	749,00
Magnésio (Mg)	173,00
Ferro (Fe)	11,00
Zinco (Zn)	0,20
Sódio (Na)	1,20
Potasio (K)	0,66
Manganês (Mn)	0,19
Silício (Si)	0,52
Alumínio (Al)	330,00
Cobre (Cu)	32,50

Dentre os minerais analisados o fósforo (749 mg/100g), o cálcio (390 mg/100g) e o magnésio (173 mg/100g), destacam-se por sua elevada influência sobre o crescimento de microrganismos. Resultados obtidos por Figueiredo (1990) comparados a este trabalho, foram inferiores quanto ao teor de fósforo (140 mg/100g) e semelhantes ao cálcio e ao magnésio (410 mg/100g e 150 mg/100g, respectivamente).

O fósforo é essencial para o crescimento de microrganismo por estimular o metabolismo energético e a síntese de ácidos nucléicos; Os íons magnésio desempenham um importante papel no crescimento do fermento, devido sua

capacidade como ativador de enzimas extracelulares e fator importante na esporulação (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004). O íon cálcio é importante no processo de mosturação durante a fabricação de cerveja (CARVALHO et al., 2007).

Outros minerais, também presentes na farinha da algaroba, são essenciais para o desenvolvimento de microrganismos, como potássio (0,66 mg/100g), ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica, e o ferro (11,0 mg/100g), necessário para a síntese de citocromos e de certos pigmentos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2004).

A análise microbiológica da farinha da algaroba está apresentada na Tabela 6, mostrando que os resultados estão de acordo com os limites estabelecidos pela Resolução – RDC Nº12, de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001), confirmando que o processo utilizado para produção da farinha é satisfatório do ponto de vista de segurança microbiológica.

Tabela 6 – Análise Microbiológica da Farinha da Algaroba.

Análise microbiológica	**Resultado**	**Resolução – RDC Nº12/2001**
Salmonella sp/25g	Ausência	Ausência
Coliformes a 45ºC (UFC/g)	50	10^2
Bacillus cereus (UFC/g)	<10	3×10^3
Bolores e Leveduras (UFC/g)	$5{,}4 \times 10^3$	-

UFC/g: Unidades Formadoras de Colônias por grama

Portanto, quanto às condições higiênico-sanitárias da farinha de algaroba, esta apresenta-se adequada para elaboração do extrato aquoso (substrato) utilizado no processo fermentativo.

5.2 Elaboração do Substrato

Para determinação da concentração ideal de farinha da algaroba para elaboração do substrato foram realizados diferentes ensaios e analisados quanto ao teor de glicose e de proteínas totais, cujos resultados estão dispostos na Tabela 7.

Tabela 7 – Teores de glicose, proteínas totais e pH em diferentes concentrações de farinha da algaroba solubilizada no extrato aquoso.

Concentração de Farinha	Glicose (g/L)	Proteínas totais (g/L)	pH
10%	1,29 ± 0,01d	5,90 ± 0,28e	5,5
15%	2,21 ± 0,03c	10,40 ± 1,41d	5,5
20%	2,29 ± 0,06c	11,35 ± 1,48cd	5,5
25%	3,46 ± 0,01b	14,95 ± 1,34bc	5,5
30%	3,99 ± 0,38a	17,70 ± 1,13ab	5,4
35%	3,98 ± 0,10a	18,85 ± 0,92ab	5,4
40%	3,79 ± 0,07ab	18,10 ± 2,97ab	5,5
45%	3,88 ± 0,03a	19,80 ± 2,54a	5,5

Médias seguidas de letras iguais na vertical não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste Duncan.

Verificou-se que a partir da concentração de 30% de farinha da algaroba a concentração de glicose e de proteínas totais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$), demonstrando que houve uma saturação quanto à solubilização destes nutrientes no meio aquoso.

Não houve variação de pH nas concentrações analisadas, sendo o valor considerado ideal para o processo fermentativo, pois de acordo com Reguly (1998) a faixa viável de tolerância do microrganismo para fermentação varia entre 4,0 e 6,0.

A partir desses dados determinou-se que a concentração de farinha da algaroba utilizada para elaboração do extrato aquoso (substrato) seria de 30%, visto que a solubilização da farinha alcançou um patamar de estabilidade quanto ao teor de glicose e de proteínas totais.

O caldo da cana-de-açúcar, utilizado no Brasil em larga escala para produção de etanol, deve possuir uma diluição que não ultrapasse a faixa de 12 a 18ºBrix. No extrato aquoso com 30% de farinha da algaroba foi verificado que o teor de sólidos solúveis foi de 18ºBrix, demonstrando que o extrato aquoso da algaroba quando comparado ao caldo da cana-de-açúcar apresenta uma adequada concentração de açúcares que podem ser hidrolisados para produção de etanol no processo fermentativo. O teor de açúcar do caldo da cana-de-açúcar costuma ser controlado pelo grau Brix, em cuja escala cada grau representa g de sacarose por 100g de caldo, identificando, portanto, % peso/peso (REGULY, 1998).

5.3 Curvas de Crescimento dos Microrganismos

Os resultados obtidos após contagem das células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae* em meio padrão e em extrato da algaroba, sob duas condições de cultivo (agitação e estático), estão apresentados na Tabela 8 e Figura 5.

Tabela 8 – Crescimento celular de *S. cerevisiae* em meio padrão e em extrato da algaroba nas diferentes condições de cultivo durante 24 horas.

Tempo (horas)	Saccharomyces cerevisiae – *log UFC/mL*			
	Meio Padrão (caldo Sabouraund)		Extrato da algaroba	
	Agitação	Estático	Agitação	Estático
0	5,00±0,11^{Aa}	4,98±0,00^{Aa}	5,03±0,07^{Aa}	4,97±0,01^{Aa}
2	5,11±0,03^{Aa}	4,72±0,07^{Ab}	5,13±0,03^{Aa}	4,87±0,11^{Aa}
4	4,98±0,23^{Aa}	4,79±0,05^{Ba}	5,42±0,06^{Aa}	5,29±0,15^{Aa}
6	4,82±0,03^{Ba}	4,85±0,03^{Ba}	5,69±0,12^{Aa}	5,06±0,01^{Ab}
8	5,26±0,02^{Ba}	4,83±0,01^{Bb}	5,98±0,06^{Aa}	5,31±0,07^{Ab}
10	5,40±0,03^{Ba}	4,87±0,05^{Bb}	6,08±0,03^{Aa}	5,66±0,08^{Ab}
12	6,04±0,05^{Ba}	5,55±0,11^{Ab}	6,35±0,03^{Aa}	5,68±0,06^{Ab}
14	6,03±0,06^{Ba}	5,02±0,08^{Bb}	6,37±0,02^{Aa}	5,70±0,03^{Ab}
16	6,14±0,03^{Ba}	5,45±0,03^{Bb}	6,34±0,01^{Aa}	5,71±0,03^{Ab}
18	5,79±0,01^{Ba}	5,22±0,06^{Bb}	6,36±0,01^{Aa}	5,92±0,06^{Ab}
20	5,97±0,01^{Ba}	5,22±0,06^{Bb}	6,14±0,05^{Aa}	5,89±0,04^{Ab}
22	5,88±0,02^{Ba}	5,23±0,04^{Bb}	6,28±0,06^{Aa}	5,64±0,03^{Ab}
24	6,17±0,07^{Aa}	5,74±0,06^{Ab}	6,11±0,11^{Aa}	5,40±0,01^{Bb}

Medias com letras minúsculas iguais, no mesmo meio, na horizontal não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste “t” de Student.

Medias com letras maiúsculas iguais, em meios diferentes com a mesma condição de cultivo na horizontal não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste “t” de Student.

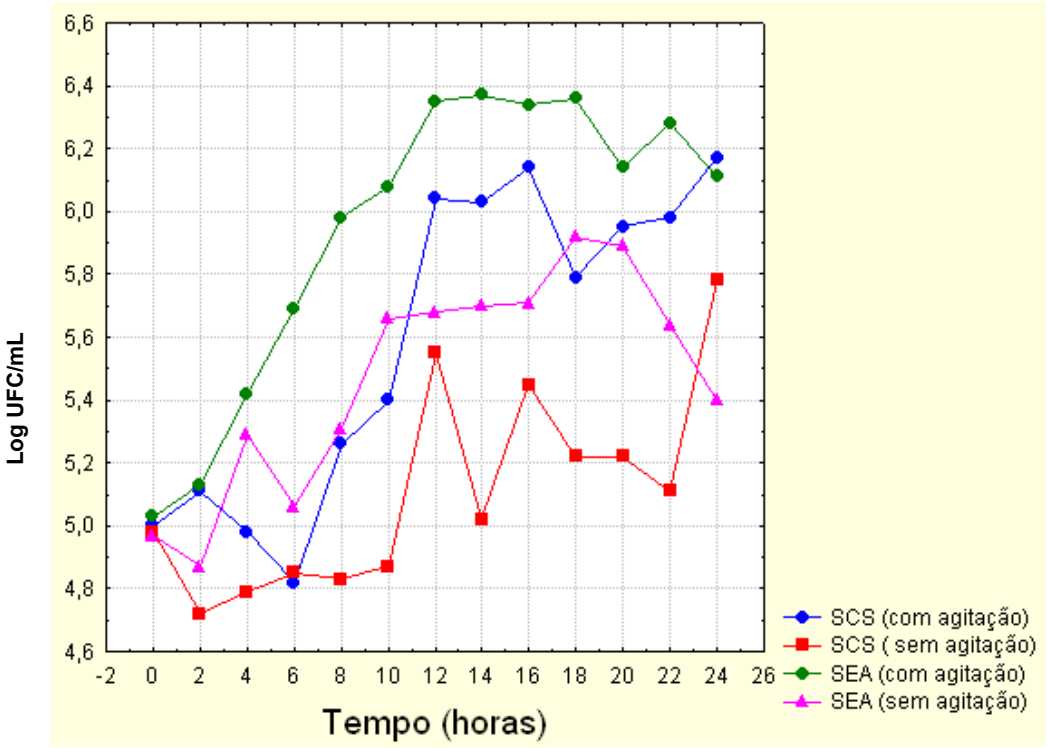


Figura 5 – Curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio padrão (caldo Sabouraund) e em extrato da algaroba sob agitação e estático.

SCS: *S. cerevisiae* em caldo Sabouraund; SEA: *S. cerevisiae* em extrato da algaroba.

Verificou-se no meio padrão (caldo Sabouraund) que dentro do período de 24 horas em que a curva foi medida, o intervalo de tempo onde houve uma maior diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as condições de cultivo agitação e estático ocorreu a partir de 8 horas até o final do período considerado. A condição de cultivo que apresentou as contagens mais elevadas foi agitação, comprovando que esta levedura se desenvolve melhor em presença de oxigênio, ou seja, sob aeração.

No extrato da algaroba, esta levedura apresentou-se de forma semelhante ao meio padrão, porém com maior crescimento celular. A diferença

significativa ($p \leq 0,05$) começou a ser verificada a partir de 6 horas apresentando maior crescimento celular sob aeração. Este fenômeno é chamado efeito Pasteur, muito comum em linhagens do gênero *Saccharomyces*, que pela aeração seu metabolismo é oxidativo e a levedura consome o açúcar para se reproduzir intensamente (REGULY, 1998).

Foi verificado ainda um efeito contrário ao efeito Pasteur chamado repressão catabólica/enzimática que se observa um decréscimo no crescimento celular em diferentes intervalos da curva. Este fenômeno decorre da elevada concentração de glicose no meio (> 3%), que atua como repressora da síntese das enzimas respiratórias, e, conseqüentemente, do consumo de oxigênio, havendo crescente atividade fermentativa, mesmo em condições de aerobiose (REGULY, 1998; CARVALHO et al., 2007).

Analisando-se as mesmas condições de cultivo em diferentes meios verificou-se que tanto em agitação como estático, a levedura apresentou maior crescimento celular no extrato da algaroba (Tabela 8). O intervalo de tempo que apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$) na condição de cultivo agitação foi entre 6 e 22 horas e estático entre 4 e 22 horas de crescimento.

Estes resultados comprovam que o extrato aquoso da algaroba apresenta em sua composição nutrientes essenciais para o crescimento da *S. cerevisiae*. De acordo com Azeredo (1999), esta levedura requer para seu desenvolvimento de fontes de carbono, preferencialmente de carboidratos, de nitrogênio de sais amoniacais, aminoácidos, peptonas e peptídios, além de elementos inorgânicos como fósforo, potássio, magnésio, sódio, enxofre, e traços de outros minerais como cobre, ferro e zinco. De acordo com resultados

apresentados na Tabela 6, muitos destes nutrientes estão presentes na farinha da algaroba utilizada para elaboração do extrato aquoso.

As contagens das células viáveis de *Zymomonas mobilis*, em meio padrão e em extrato de algaroba, sob duas condições de cultivo (agitação e estático), estão apresentados na Tabela 9 e Figura 6.

Observa-se que no meio padrão (caldo SSDL), no período de 24 horas, o intervalo de tempo que houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as condições utilizadas, agitação e estático, foi entre 10 e 24 horas de crescimento. A condição de estudo da fermentação submersa que apresentou as contagens mais elevadas foi estático, confirmando a necessidade desta bactéria em se desenvolver facultativamente em anaerobiose. Este comportamento é comprovado por Mastroeni et al. (2003), que em estudo com meio sintético utilizando *Z. mobilis* obteve crescimento significativamente elevado em condição estática (sem agitação) comparado ao observado em culturas aeradas. De acordo com O'Brien et al. (1971) a presença de oxigênio causa um decréscimo no crescimento máximo específico de microrganismos devido à ação extremamente efetiva como aceptor de elétrons observada em determinados microrganismos, danificando o poder requerido para biossíntese e outras funções celulares. No entanto, *Z. mobilis* é capaz, também, de crescer em presença de oxigênio com alteração no rendimento celular. Porém, sob condições anaeróbicas o crescimento celular ocorre muito mais rapidamente, resultando num tempo de processo mais curto (BRINGER et al., 1984).

Z. mobilis no extrato da algaroba apresentou comportamento diferente do observado em meio padrão. Foi verificado, entre as condições de cultivo agitação e estático, um pequeno intervalo de tempo com diferença significativa

($p \leq 0,05$), entre 18 e 24 horas. Este resultado mostra que no extrato de algaroba o crescimento desta bactéria desenvolveu-se de forma semelhante nas duas condições de cultivo analisadas.

Tabela 9 – Crescimento celular de *Zymomonas mobilis* em meio padrão e em extrato da algaroba nas diferentes condições de cultivo durante 24 horas.

Tempo (horas)	**Zymomonas mobilis – *log UFC/mL***			
	Meio Padrão (Caldo SSDL)		**Extrato da algaroba**	
	agitação	**estático**	**agitação**	**estático**
0	$5,68±0,05^{Aa}$	$5,70±0,07^{Aa}$	$5,72±0,03^{Aa}$	$5,71±0,03^{Aa}$
2	$5,23±0,07^{Bb}$	$5,97±0,16^{Aa}$	$5,81±0,02^{Aa}$	$5,81±0,00^{Aa}$
4	$5,82±0,10^{Aa}$	$5,89±0,20^{Aa}$	$5,88±0,00^{Aa}$	$5,95±0,04^{Aa}$
6	$6,04±0,07^{Aa}$	$5,64±0,15^{Aa}$	$5,93±0,01^{Aa}$	$5,85±0,02^{Aa}$
8	$6,38±0,00^{Aa}$	$6,26±0,18^{Aa}$	$6,04±0,07^{Ba}$	$5,96±0,01^{Aa}$
10	$6,42±0,08^{Ab}$	$8,01±0,02^{Aa}$	$6,10±0,03^{Ba}$	$6,11±0,04^{Ba}$
12	$7,11±0,16^{Ab}$	$8,98±0,18^{Aa}$	$6,10±0,03^{Ba}$	$6,15±0,08^{Ba}$
14	$7,56±0,08^{Ab}$	$9,53±0,09^{Aa}$	$6,75±0,02^{Ba}$	$6,94±0,17^{Ba}$
16	$7,69±0,00^{Ab}$	$9,66±0,11^{Aa}$	$6,78±0,03^{Ba}$	$6,82±0,02^{Ba}$
18	$8,05±0,09^{Ab}$	$9,81±0,06^{Aa}$	$7,07±0,01^{Ba}$	$6,71±0,03^{Bb}$
20	$8,27±0,09^{Ab}$	$9,82±0,08^{Aa}$	$7,09±0,01^{Ba}$	$6,79±0,04^{Bb}$
22	$7,46±0,08^{Ab}$	$9,83±0,02^{Aa}$	$7,10±0,06^{Ba}$	$6,65±0,04^{Bb}$
24	$7,85±0,12^{Ab}$	$9,85±0,03^{Aa}$	$7,09±0,03^{Ba}$	$6,62±0,01^{Bb}$

Medias com letras minúsculas iguais, no mesmo meio, na horizontal não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste “t” de Student.

Medias com letras maiúsculas iguais, em meios diferentes com a mesma condição de ciltivo na horizontal não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste “t” de Student.

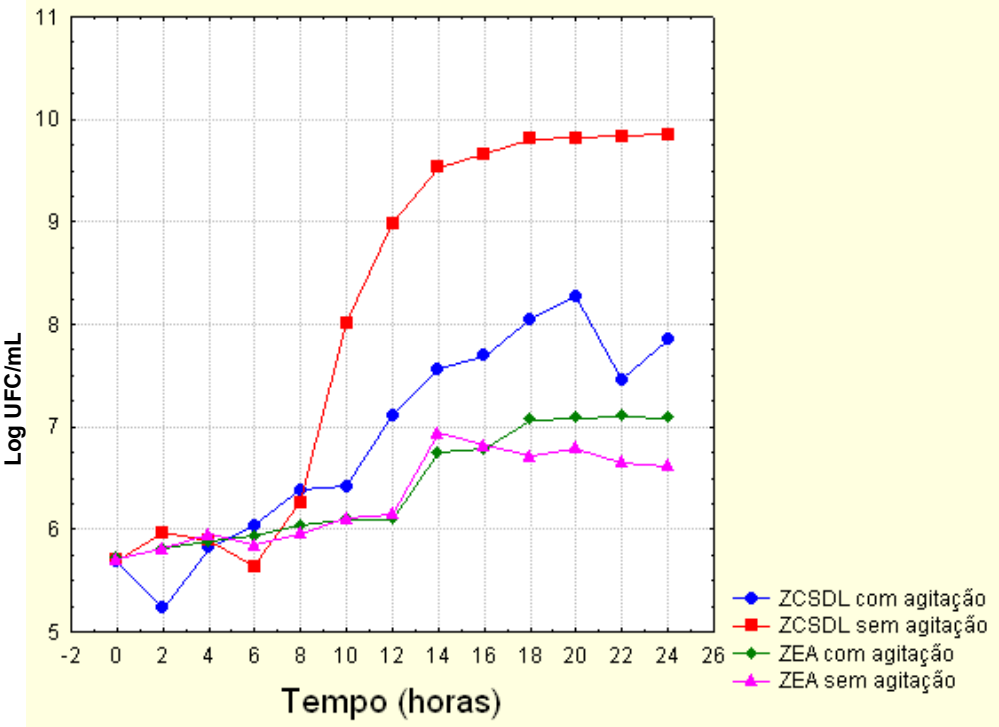


Figura 6 – Curvas de crescimento de *Zymomonas mobilis* em meio padrão (caldo SSDL) e em extrato de algaroba sob agitação e estático.

ZCSDL: *Z. mobilis* em caldo SSDL; ZEA: *Z. mobilis* em extrato de algaroba.

Analisando os dois meios utilizados a partir de uma mesma condição de cultivo verificou-se que esta bactéria apresentou maior crescimento celular em meio padrão, tanto em agitação como estático. Os maiores intervalos de tempo com diferença significativa ($p \leq 0,05$) foi entre 8 e 24 horas de crescimento em agitação e entre 10 e 24 horas na condição estática, nos dois meios utilizados.

Estes resultados comprovam que o extrato da algaroba, mesmo sendo nutricionalmente rico, não apresentou resultado favorável para o crescimento de *Zymomonas mobilis* quando comparado ao meio padrão utilizado neste estudo. Possivelmente, isto deve ter ocorrido devido esta bactéria ser seletiva a determinados nutrientes que não estão presentes no extrato da algaroba.

Sendo o meio SSDL seletivo para o crescimento de *Z. mobilis* este apresentou-se mais favorável para o crescimento deste microrganismo.

No decorrer da obtenção das curvas de crescimento, tanto de *S. cerevisiae* como de *Z. mobilis*, foi verificado o pH dos meios (padrão e extrato da algaroba) em agitação e estático nos intervalos de tempo para obtenção das amostras. Os resultados variaram entre 4,8 e 5,2, não apresentando alterações significativas. Segundo Trabulsi e Alterthum (2004) alterações significativas do pH do meio, afastando-se do pH ótimo para crescimento da cultura, provocam o afastamento das proteínas de superfície como, por exemplo, as permeases, pelos íons presentes no meio, impedindo assim uma penetração adequada dos nutrientes. Bruscas alterações de pH também servem como indicador de contaminação do meio por outros microrganismos durante o desenvolvimento do processo. Logo estas alterações não foram verificadas durante a obtenção das curvas de crescimento.

5.4 Planejamento Fatorial

Analisando a Tabela 10 verificamos que o tipo de microrganismo foi a variável que apresentou maior influência sobre a produção de etanol com efeito positivo. Demonstrando que *Z. mobilis* teve maior influência no processo que *S. cerevisiae* para produção de etanol.

Tabela 10 – Determinação dos efeitos principais do planejamento fatorial 2^3.

Variáveis	Etanol (g/L)	Glicose (g/L)	Biomassa (Log UFC/mL)
Tempo de fermentação (X_1)	-4,17	-5,02	-0,16
Tipo de microrganismo (X_2)	58,28	1,24	NS
Condições de cultivo (X_3)	-35,65	-1,46	0,45
X_1 e X_2	NS	-1,25	NS
X_1 e X_3	-11,18	1,47	NS
X_2 e X_3	-31,60	1,49	-0,16
X_1, X_2 e X_3	-10,72	-1,50	-0,20

NS = Não significativo ($p < 0,05$)

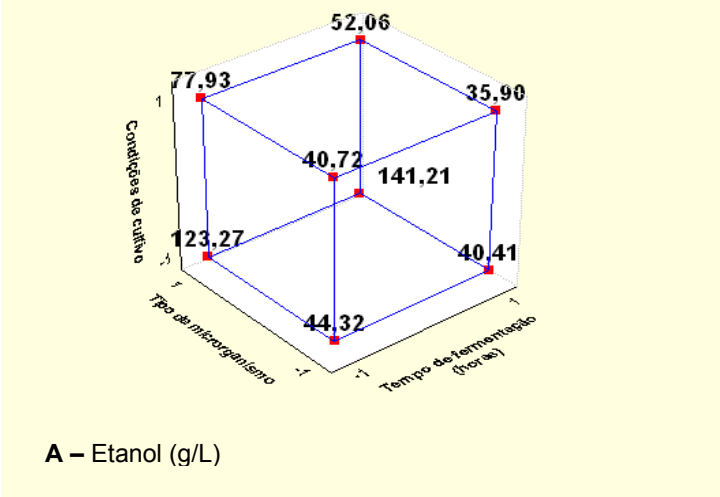
De acordo com a figura 6A observa-se que a maior produção de etanol (141,21 g/L) foi obtida nos seguintes níveis: 1 (tempo de fermentação), 1 (tipo de microrganismo) e –1 (condições de cultivo), ou seja, com 36 horas, utilizando *Z. mobilis* sob a condição estática.

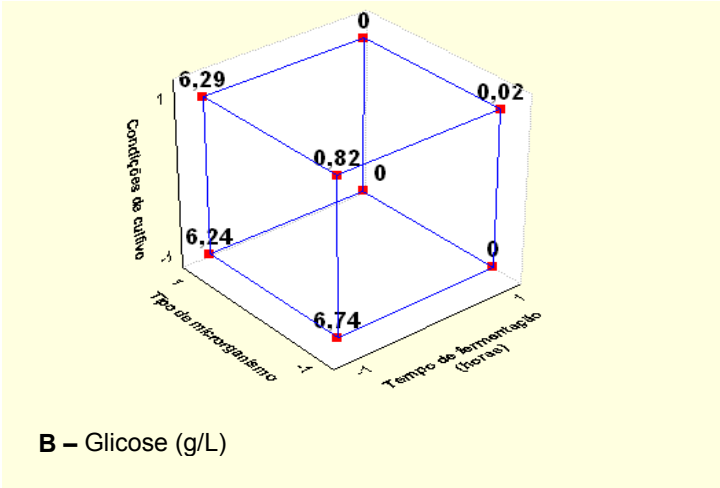
Shene e Bravo (2001) trabalhando com *Z. mobilis* sob condição estática utilizando como substrato uma mistura de glicose-frutose, detectaram a maior produção de etanol em 24 horas com 40,0 g/L. Mastroeni et al. (2003) em meio sintético composto de 4% de glicose, 0,25% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e sais como KH_2PO_4, $(NH_4)SO_4$ e $MgSO_4.7H_2O$, sob condições anaeróbicas, obtiveram rendimento de 38,0 g/L de etanol com 20 horas de fermentação utilizando a *Z. mobilis*. Sendo assim, o extrato aquoso da algaroba apresenta uma maior produção de etanol comparado a outros substratos, comprovando que sua composição nutricional apresentou-se satisfatória ao

desenvolvimento do metabolismo fermentativo da *Z. mobilis* utilizada neste estudo.

A melhor produção de etanol a partir da condição de agitação (Figura 7A), com 77,93 g/L, foram verificadas nos níveis: –1 (tempo de fermentação), 1 (tipo de microrganismo) e 1 (condições de cultivo), ou seja, 18 horas de fermentação utilizando *Z. mobilis*. Este resultado é superior ao encontrado por Borsari et al. (2006) que detectaram 23,34 g/L de etanol com 20 horas de fermentação utilizando como substrato o caldo da cana-de-açúcar inoculado com *Z. mobilis* sob agitação.

Com relação ao teor da glicose durante a fermentação foi observado que o tempo de fermentação foi a variável que teve maior influencia (Tabela 10), com sinal negativo, ou seja, quanto maior o tempo de fermentação menor o teor de glicose no meio. Na figura 7B verifica-se que tanto para *Z. mobilis* como para *S. cerevisiae* a maior produção de glicose foi com 18 horas caindo sensivelmente nas 36 horas de fermentação, onde não foi detectada presença de glicose nos meios para *Z. mobilis* em agitação e estático, e para *S. cerevisiae* em condição estática. Foram detectados apenas traços de glicose no meio com 36 horas, utilizando *S. cerevisiae* em agitação.





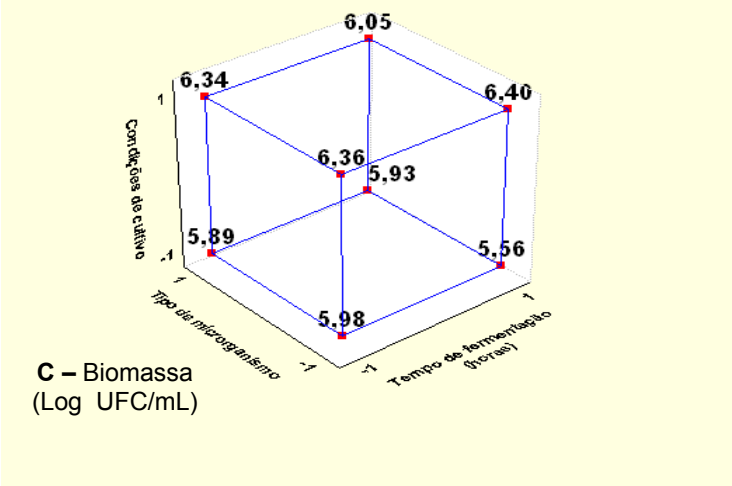


Figura 7 - Médias da produção de etanol (A), dos teores de glicose (B) e das concentrações de biomassa (C), em função do tempo de fermentação, tipo de microrganismo e condições de cultivo.

Estes resultados comprovam que com 36 horas de fermentação o processo de hidrólise da sacarose presente no meio, para produção de glicose e frutose, já foi encerrado e que praticamente toda a glicose do meio foi metabolizada convertendo-se em etanol.

Foi verificado que, praticamente, não houve alteração na concentração de biomassa (Figura 7C) no meio durante os tempos analisados para os dois microrganismos em estudo. Como pode-se observar na Tabela 10, a variável tempo de fermentação teve uma leve significância sobre a biomassa (-0,16), ao passo que a variável condição de cultivo teve uma influencia positiva (0,45), ou seja, a condição de agitação apresentou maiores contagens de células comparada à condição estática.

Verifica-se na Tabela 10 que a interação entre as variáveis X_2X_3 ("tipo de microrganismo" e "condições de cultivo") apresentou a segunda maior influência na produção de etanol (Figura 8), cujo resultado de maior relevância (132,24 g/L) foi detectado quando utilizada *Z. mobilis* em condição estática.

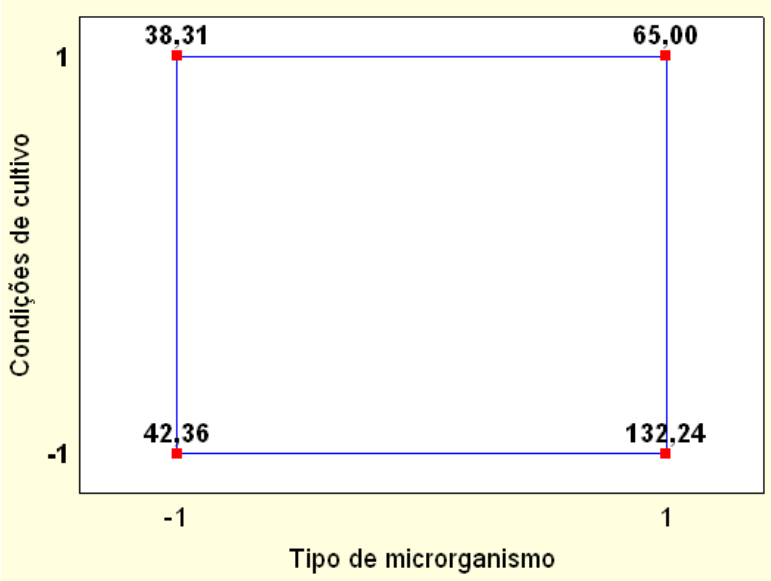


Figura 8 – Interação entre as variáveis "condição de cultivo" e "tipo de microrganismo" quanto à produção de etanol (g/L).

Os dados obtidos no planejamento demonstraram que, dentro das condições utilizadas no processo, a fermentação utilizando *Z. mobilis* sob condição estática apresentou melhor desempenho na produção de etanol a partir do extrato aquoso da algaroba utilizado como substrato.

5.5 Extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* sob condição estática

Com o objetivo de aprofundar o estudo da produção de etanol por *Zymomonas mobilis* a partir da utilização do substrato aquoso de algaroba foi realizada a fermentação durante 72 horas.

O perfil dos resultados obtidos de produção de etanol (g/L), concentração de glicose (g/L), biomassa (Log UFC/mL) e pH do processo

fermentativo durante 72 horas utilizando como substrato o extrato aquoso da algaroba fermentado por *Z. mobilis* sob condição estática está representado na figura 9.

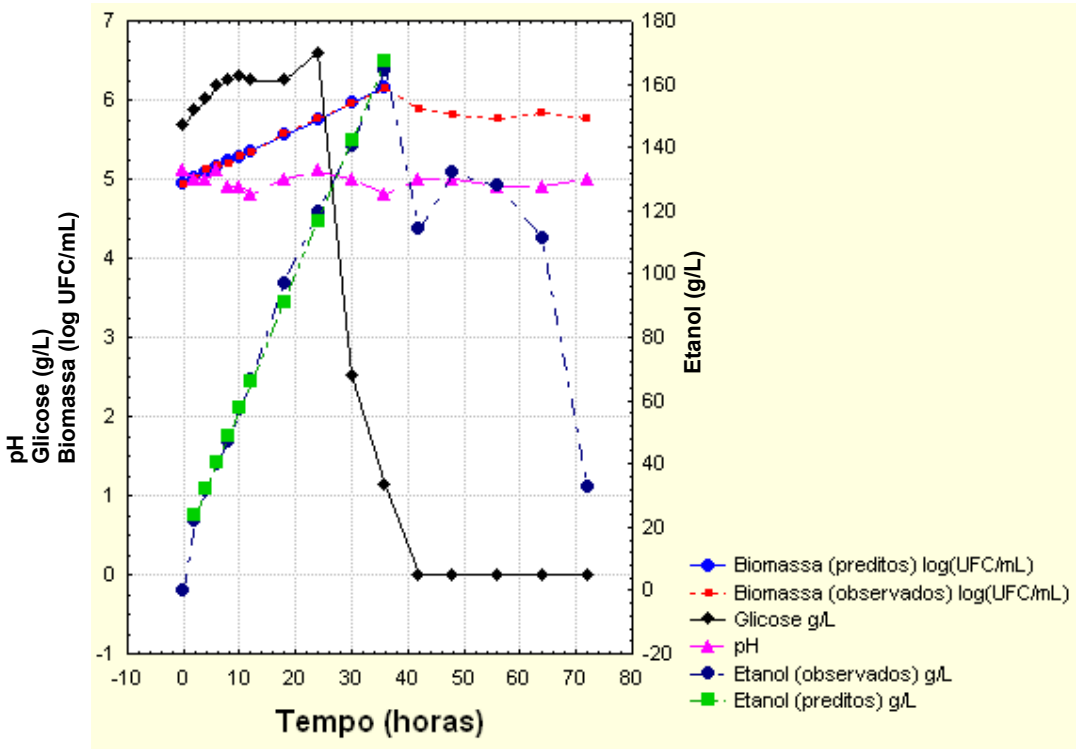


Figura 9 – Processo fermentativo de *Zymomonas mobilis* sob condição estática.

Observou-se que durante o processo fermentativo houve produção de glicose no meio até 24 horas, sendo verificada uma expressiva diminuição a partir das 30 horas de fermentação. O aumento da glicose no meio se deve à elevada concentração de sacarose presente no extrato da algaroba que durante a fermentação é hidrolisada pela bactéria em glicose e frutose, comprovando a capacidade da *Z. mobilis* em hidrolisar diretamente sacarose, glicose e frutose como fontes de carbono para produção de etanol (SWINGS;

DE LEY, 1977). Ao término da concentração de sacarose no meio, ou seja, encerrando o processo de hidrólise, a glicose tende a ser consumida completamente para conversão em etanol e produção de biomassa.

Estudo desenvolvido por Favela Torres e Baratti (1988) demonstrou que o crescimento da *Z. mobilis* durante o processo fermentativo foi fortemente inibido por altas concentrações de glicose. Porém, foram verificados elevados rendimentos de etanol, levando a conclusão que altas concentrações de glicose inibem o crescimento da bactéria, mas não a produção de etanol.

Durante o processo verificou-se que o pH manteve-se relativamente estável numa faixa considerada adequada para crescimento do microrganismo durante a fermentação. Estes dados demonstram que a fermentação ocorreu sem interferência de microrganismos competidores, indicadores de contaminação.

Uma análise de regressão foi aplicada para modelar os valores da produção de etanol de 2 a 36 horas, e do crescimento da *Z. mobilis* de 0 a 36 horas, sob condição estática, como funções lineares do tempo de fermentação. Estes tempos de fermentação foram escolhidos por terem tido comportamento de uma reta, os quais representam a produção crescente de etanol e a fase exponencial de crescimento da bactéria.

De acordo com a Tabela 11 e 12, os modelos obtidos para a produção de etanol (g/L), de 2 a 36 horas, como também para o crescimento de *Z. mobilis* sob condição estática, de 0 a 36 horas, apresentaram regressão significativa (F calculado superior ao F tabelado) ($p<0,05$), ou seja, ambos dependem linearmente do tempo de fermentação. Os coeficientes de determinação foram superiores a 0,91, indicando um bom ajuste dos dados a

estes modelos, representados pelas equações 3 e 4. De acordo com Box e Wetz (1973), um modelo pode ser considerado preditivo quando apresenta um valor de F calculado superior a 3 vezes o valor de F tabelado, e nestes dois casos, observou-se que o valor de F calculado foi bem maior que 3 vezes o valor de F tabelado.

$y = 4{,}2320t + 15{,}1089$ (3) – Crescimento do microrganismo

$y = 0{,}0336t + 4{,}9482$ (4) – Produção de etanol

Estas equações de regressão obtidas neste estudo podem ser usadas para encontrar a maior produção de etanol e quantidade de *Z. mobilis*, ambos em função do tempo de fermentação. Entretanto, deve ser lembrado que a validade das equações obtidas nesta pesquisa restringe-se aos limites dos fatores ambientais utilizados.

Ainda nas tabelas 11 e 12 observamos que a soma quadrática dos resíduos foi baixa tanto para produção de etanol como de crescimento da *Z. mobilis*, representando 0,29% e 0,31%, respectivamente, do valor total, comprovando mais uma vez o bom ajuste dos dados aos modelos.

Tabela 11 – Analise de variância para o ajuste de um modelo linear aos dados obtidos da produção de Etanol (g/L) de 2 a 36 horas a partir do extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* sob condição estática.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	21670,97	1	21670,97	2786,627	5,32
Resíduos	62,21	8	7,78		
Total	21733,19	9		R^2=0,997	

Tabela 12 – Analise de variância para o ajuste de um modelo linear aos dados obtidos para a fase exponencial de crescimento de *Zymomonas mobilis,* no extrato aquoso da algaroba*,* sob condição estática, de 0 a 36 horas.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F calculado	F tabelado
Regressão	1,596745	1	1,596745	2927,284	5,12
Resíduos	0,004909	9	0,000545		
Total	1,601655	10		R^2=0,997	

Os resultados obtidos dos parâmetros da fermentação, baseados em produtividades de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$), fator de conversão de substrato em etanol e eficiência de fermentação (%), estão apresentados na tabela 13.

Foram determinados três tempos de fermentação distintos baseados na verificação da menor faixa de tempo com melhores resultados quanto aos parâmetros analisados.

Tabela 13 – Parâmetros do extrato aquoso da algaroba fermentado por *Zymomonas mobilis* considerando três distintos tempos de fermentação.

	Tempos de Fermentação (horas)		
	até 72	**até 36**	**até 30**
$PR =$ produtividade de etanol ($g.L^{-1}.h^{-1}$)	0,45	4,56	4,69
$Y_{\frac{P}{S}} =$ fator de conversão de substrato em etanol	5,76	35,96	44,36
$\eta_{P(\%)}$ = Eficiência de fermentação (%)	11,27	70,37	86,81

Ao analisar os parâmetros de fermentação verificou-se uma superioridade com 30 horas sobre os demais tempos considerados. Com relação à produtividade de etanol foi verificado que com 30 e 36 horas de fermentação obteve-se 4,69 $g.L^{-1}.h^{-1}$ e 4,56 $g.L^{-1}.h^{-1}$, respectivamente. Estes resultados foram superiores aos encontrados por Favela Torres e Baratti (1988), cuja produtividade de etanol apresentou resultados de 2,3 $g.L^{-1}.h^{-1}$ com 35 horas de fermentação, utilizando como substrato farinha de trigo hidrolisada enzimaticamente e fermentada por *Z. mobilis* sob agitação.

A maior conversão de substrato em etanol e, portanto, de eficiência de fermentação também foi verificada até 30 horas. Ao nível de aplicação industrial, verifica-se que este representa o período mais breve com melhores resultados quanto aos parâmetros estudados, significando economia de tempo e custo para a indústria.

Culturas anaeróbicas de *Z. mobilis* produzem etanol a partir de glicose com elevados rendimentos, com valores máximos teóricos de 0,51 g de etanol produzido por g de glicose consumida (PRASAD et al., 2007). Entretanto, muitos baixos rendimentos, como 0,17 g g^{-1} (VIIKARI, 1986), ou 0,13 g g^{-1} (KALNENIEKS et al., 2000), foram relatados a partir de culturas aeróbias.

Tano e Buzato (2003) obtiveram uma baixa produção de etanol (29,0 g/L) durante 48 horas de fermentação utilizando o caldo da cana-de-açúcar fermentado por *Z. mobilis* ATCC31821 sob condição de agitação, cujo fator de conversão de substrato em etanol foi de 0,42. Estes resultados foram atribuídos, pelos autores, aos compostos minerais presentes no substrato considerados como inibitórios da fermentação por *Z. mobilis*. Possivelmente, a condição de agitação também pode ter influenciado a baixa produção de etanol neste estudo.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se inferir que:

- A farinha da algaroba elaborada a partir dos parâmetros utilizados é satisfatória quanto à caracterização físico-química e microbiológica, com excelente concentração de carboidratos, principalmente sacarose, além de proteínas e outros nutrientes, e minerais importantes para o desenvolvimento microbiano como fósforo, cálcio e magnésio.
- A concentração de 30% da farinha da algaroba a partir dos teores de glicose e proteínas é estável quanto à solubilização destes nutrientes.
- As contagens de células viáveis de *Z. mobilis* são superiores em meio padrão (caldo SSDL) do que no substrato sob condição de cultivo estática. *S. cerevisiae* tem contagens superiores no substrato obtido a partir do extrato aquoso da algaroba sob condição de agitação.
- A produção de etanol é elevada com 36 horas de fermentação, utilizando *Z. mobilis* sob condição de cultivo estática.
- Tanto o crescimento da *Z. mobilis* sob condição estática de 0 a 36 horas, como a produção de etanol de 2 a 36 horas, tiveram uma associação linear significativa com o tempo de fermentação ($p<0,05$).
- Dentro das faixas de tempo analisadas, a melhor produtividade de etanol, maior conversão do substrato em etanol e, conseqüentemente, a melhor eficiência de fermentação é obtida até 30 horas.

- A algaroba apresenta-se como matéria-prima viável para ser utilizada em processos biotecnológicos, visando um maior aproveitamento das vagens produzidas e, portanto, obter um produto com maior valor agregado.

Referências

7 REFERÊNCIAS

ABRABE – Associação Brasileira de Bebidas. São Paulo, 12 dez. 2006. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br>. Acesso em: 12 dez. 2006.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** 17.ed, Washington, 2002. 570p.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia – alimentos e bebidas produzidos por fermentação**, v. 5, São Paulo: Edgard Blücher. 1983. 243p.

ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Production of Fructose and Ethanol from Media with High Sucrose Concentration by a Mutant of *Saccharomyces cerevisae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, n. 10, p. 1017-1022, 2001a.

ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Study of the Production of Fructose and Ethanol from Sucrose Media by *Saccharomyces cerevisae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 407-411, 2001b.

ATIYEH, H.; DUVNJAK, Z. Production of Fructose and Ethanol from Sugar Beet Molasses Using *Saccharomyces cerevisae* ATCC 36858. **Biotechnology Progress**, v. 18, n. 2, p. 234-239, 2002.

AZEREDO, D. R. P. **Síntese e Degradação de Glicogênio e Viabilidade de Levedura Cervejeira.** 103p. 1999. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ.

BAKKER, B. M.; OVERKAMP, K. M.; VAN MARIS, A. J. A.; KÖTTER, P.; LUTTIK, A. H.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Stoichiometry and Compartimentation of NADH Metabolism in Saccharomyces cerevisae. **FEMS Microbiology Reviews,** v 25, n. 1, p. 15-37, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas: Editora da Universidade Estadual de Campinas, 2001.

BORSARI, R. R. J.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Inflence of carbon source and the fermentation process on levan production by *Zymomonas mobilis* analyzed by the surface response method. **Ciencia e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 604-609, 2006.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 67, n.1, p. 19-25, 2005.

BOX, P.; WETZ, J. Criteria for judging adequacy of estimation by an approximate response function. **University of Wisconsin Technical Report**, n. 9, 1973.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC Nº 12, de 2 de janeiro de 2001, dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos.

BRINGER, S.; FINN, R. K.; SAHM, M. Effect of oxygen on the matabolism of *Zymomonas mobilis*. **Archives of Microbiology**, v. 139, n.4, p. 376-381, 1984.

BULL, A. T.; WARD, A. C.; GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paeadigm shift. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 3, p. 573-606, 2000.

BURMAN, U.; SHARMA, S. K. Water relation and growth of *Simmondsia chinensis* and *Prosopis juliflora* seedlings at nursery stage. **Indian Forester**, v. 127, n. 3, p. 351-357, 2001.

CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportinities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª. parte – As Leveduras. **Revista Analytica**. n. 25, p. 46-54, 2006.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 2ª. parte – A Fermentação. **Revista Analytica**. n. 26, p. 46-54, 2007.

CECCATO–ANTONINI, S. R; SUDBERY, P. E. Filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Jornal of Microbiology,** v. 35, n. 3, p. 173-181, 2004.

CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. A plating technique for the selective isolation of yeast utilizing water immiscible carbon. **Journal Food Science,** v. 48, n. 4, p. 1554-1555, 1983.

DADDS, M. J. S.; MARTIN, P. A. The genus *Zymomonas* – A review. **Journal of the Institute of Bewing**, v. 79, n. 5, p. 386-391, 1973.

DALLY, E. L.; STOKES, H. E.; EVELEIGH, D. E. A genetic comparison of strains of *Zymomonas mobilis* by analysis of plasmid DNA. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 2, p. 91-96, 1982.

DATAR, R. P.; SHENKMAN, R. M.; CATENI, B. G.; HUHNKE, R. L.; LEWIS, R. S. Fermentation of Biomass-Generated Producer Gas to Ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 587-594, 2004.

DEMIRBAS, A. Progress and recent trend in biofuels. **Progress in energy and combustion science**, v. 33, n. 1, p. 1-18, 2007.

DIEZ, J. C.; YOKOYA, F. Effect of temperature and pH on ethanol and levan production during sucrose fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Arquivos de Biologia e Tecnologia,** v. 39, n. 1, p. 129 –137, 1996.

DRAGONE, G; SILVA, D. P.; ALMEIDA, E.; SILVA, J. B. Influência da Concentração do Mosto na Produção em Escola Piloto de Cervejas pelo Processo "Hight Gravity". **Engarrafador Moderno,** v. 60, p. 30-35, 2003.

DU W, XU Y, LIU D, ZENG J. Comparative study on lipase-catalysed transformation of soybean oil for boidiesel production with different acyl acceptors. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 30, n. 3-4, p. 125-129, 2004.

El HAG, M. G.; Al SHARGI, K. M.; EID, A. A. The nutrient composition of animal feeds available in the Sultanate of Oman. **Agriculture and Fisheries Research Bulletin**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2000.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Suplementação direta de microrganismos e seus extratos.** Disponível em: <http://www.cnpgc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/08microorganismos.html>. Acesso em: 23 jul. 2006.

FALCÃO DE MORAIS, J. O. *Zymomonas mobilis* e seu emprego como agente de fermentação alcoólica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, n. 1/2, p. 169-182, 1982.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; ARAÚJO, J. M.; RIOS, E. M.; Fermentação alcoólica de mosto de melaço em escala semi-industrial por *Zymomonas mobilis*. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 20, n. 1, p. 3-10, 1980/81.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; ARAÚJO, J. M.; RIOS, E. M.; MELO, B. R. Isolamento de *Zymomonas mobilis* em mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais. **Revista de Microbiologia**, v. 14, n. 1, p. 6-10, 1983.

FALCÃO DE MORAIS, J. O.; RIOS, E. M. M. M.; CALAZANS, G. M. T.; LOPES, C. E. *Zymomonas mobilis* research in the Pernambuco Federal University. **Journal of Biotechnology**. v. 31, n.1, p. 75-91, 1993.

FARIAS, G. G. M.; SILVA, L. F.; LEITE, E. L.; NASCIMENTO, C. B. S.; LIMA, C. J.; NEGREIROS, A. N. M.; LIMA, D. F. A study on the repletion capability of *Prosopis juliflora* (SW) DC protein in undernourished rats. In: HABIT, M. A.; SAAVEDRA, Y. V. **The Current State of Knowledge on *Prosopis juliflora***, Washington, FAO, 1990, p. 361-369.

FAVELA TORRES, E.; BARATTI, J. Ethanol production from wheat flour by *Zymomonas mobilis*. **Journal of Fermentation and Technology**, v. 66, n. 2, p. 167-172, 1988.

FENNEMA, O. R. **Química de los Alimentos.** Zaragoza, Acribia, 1992. 1096p.

FIGUEIREDO, A. A. Mesquite: history, composition and food uses. **Food Technology**, v. 44, n. 11, p. 118-128, 1990.

FIGUEIREDO, A. A.; PRICE, R. L. Chemical structure of mesquite (*Prosopis juliflora* SW (DC)) seed polysaccharide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 10, n. 2, p. 287-300, 1990.

FIGUEIREDO, A. A. **Algaroba, Tecnologia, Produtos e Usos – Meio Século no Brasil**. Rio de Janeiro - UFRJ, 2000, 17p.

FIGUEIREDO, A. A.; SCHMIDT, R. Rheological behavior of mesquite seed gum (MSG) in presence of some food ingredients. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 1-2, p. 17-21, 1999.

GONÇALVES de LIMA, O.; ARAÚJO, J. M.; SCHUMACHER, I. E.; CAVALCANTI da SILVA, E. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I – Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) Kluyver e Van Niel (1936): *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (Gonçalves de Lima, Araújo, Schumacher & Cavalcanti) (1970). Isolada da bebida popular denominada "caldo de cana picado". **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 10, n. 1, p. 3-15, 1970.

GRADOS, N.; BRAVO, L.; SAURA, F. Composition and potential uses of Mesquite pods (*Prosopis pallida* L.). Comparasion with carob pods (*Ceratonia siliqua* L.) **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 65, n.3, p. 303-306, 1994.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology,** v. 10, n. 2, p. 141-146, 2006.

HABIT, M. A., SAAVEDRA, J. C. **The Current State of Knowledge on *Prosopis juliflora*** . FAO, Plant Production and Protection Division, Rome, Italy, 1990, 466p.

HOLMQUIST-DONQUIS, I.; REY, G. R. Propiedades funcionales de la proteína de cují (*Prosopis juliflora*). **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 47, n. 4, p. 343-351, 1997.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas.** São Paulo: IAL, 1976. v. 1, Métodos físicos e químicos para análise de alimentos.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005, 712p.

JEFFERSON, M. Sustainable energy development: performance and prospects. **Renew energy**, v. 31, p. 571-582, 2006.

JOSHI, A. J.; HINGLAJIA, H. Accumulation of organic and inorganic solutes in *Prosopis juliflora* SW (DC) growing in coastal belt of Gujarat. **Proceedings of the National Academy of Sciences. India Section B. Biological Sciences**, v. 70, n. 2, p. 171-178, 2000.

KAILAPPAN, R.; GOTHANDAPANI, L.; VISWANATHAN, R. Production of activated carbon from prosopis (*Prosopis juliflora)*. **Bioresource Technology**, v. 75, n. 3, p. 241-243, 2000.

KÁDÁR, Z. S.; SZENGYEL, Z. S; RÉCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermantation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products,** v. 20, n. 1, p. 103-110, 2004.

KALNENIEKS, U.; GALININA, N.; TOMA, M. M.; POOLE, R. K. Cyanide inhibits respiration yet stimulates aerobic growth of *Zymomonas mobilis*. **Microbiology**, v. 146, p. 1259-1266, 2000.

KANG, H. L.; KANG, H. S. A physical map of the genome of ethanol frementative bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 and localization of genes on the map. **Gene**, v. 206, n. 2, p. 223-228, 1998.

KANNAN, T. R.; SANGILIYANDI, G.; GUNASEKARAN, P. Influence of intra- and extracellular sucarases of *Zymomonas mobilis* on the etanol production and by-product formation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 7, p. 661-664, 1997.

KOREN, D.W.; DUVNJAK, Z. Kinetics of the Selective Fermentation of Glucose from Glucose/Frutose Mixtures using *Saccharomyces cerevisae* ATCC 36859. **Acta Biotechnologica,** v. 13, n. 4, p. 311-322, 1993.

LIMA, D. F.; FARIAS, G. G. M.; LEITE, F. L.; NEGREIROS, A. N. M.; NASCIMENTO, C. B. S; SILVA, L. F.; FLORES, H.; LIMA, C. J. Ascertaining optimum *P. juliflora* protein supplementation levels as compared with plant protein used in the region. In: HABIT, M. A.; SAAVEDRA, Y. V. **The current state of knowledge on *Prosopis juliflora***. Washington, FAO, 1990. p. 387-395.

LIMA, U. A; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Produção de Etanol.** In: Almeida Lima, U., Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. Biotecnologia Industrial Processos Fermentativos e Enzimáticos, v.3, São Paulo: Edgar Blücher, 2001. p. 01-43.

MACEDO, I. C. Energia da cana de açúcar no Brasil. **União dos Produtores de Bioenergia**. São Paulo, 24 jan. 2007, Disponível em: <http://www.udop.com.br/geral.php?item=noticia&cod=855>. Acesso em 24 jan. 2007.

MADRID, A.; CENZANO; V. J. M. **Manual de Indústria dos Alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 1995. 599p.

MAHGOUB, O.; KADIM, I. T.; FORSBERG, N. E.; AL-AJMI, D. S.; AL-SAQRY, N. M.; AL-ABRI, A. S.; ANNAMALAI, K. Evaluation of Meskit (*Prosopis juliflora*) pods as feed for goats. **Animal Feed Science and Technology**. v.121, n. 3-4, p. 319-327, 2005.

MARAKIS, S. G.; MARAKIS, G. S. Fructose syrup and ethanol from deseeded carob pod. **Journal of Food Science and Technology**, v. 33, n. 2, p. 108-111, 1996.

MARQUES, T. A.; SERRA, G. E. Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 532-535, 2004.

MASTROENI, M. F.; GURGEL, P. V.; SILVEIRA, M. M.; MANCILHA, I. M.; JONAS, R. The influence of oxygen supply on the production of acetaldehyde by *Zymomonas mobilis*. **Brazilian Journal Chemical Engineering,** v. 20, n. 2, p. 120-132, 2003.

MCLELLAN, P. J.; DAUGULIS, A. J.; LI, J. The Incidence of Oscillatory Behaviour in the Continuous Fermentation of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 4, p. 667-680, 1999.

MEYER, L. H. **Food Chemistry.** Van Nostrand, New York, 1969, 320p.

MIELENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MONTESINOS, T.; NAVARRO J. M. Production of alcohol from raw wheat flour by Amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisae.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 6, p. 362-370, 2000.

NAHVI, I.; EMTIAZI, G.; ALKABI, L. Isolation of a flocculating *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. **Biomass and Bioenergy**. V. 23, p. 481-486, 2002.

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technolog,** v. 92, n. 3, p. 251-260, 2004.

NOGUEIRA, A. M. P; VENTURINI FILHO, W. G. **Manual de Aguardente de Cana.** Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agronômicas. 2005, 66p.

O`BRIEN, R. W.; SHVINKA, J. E.; BEKER, M. J. Oxygen and the growth and metabolism of *Clostridium acetobutylicum*. **Journal Genetic and Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 307-318, 1971.

O POVO / ECONOMIA. **Detran Ceará**. Fortaleza, 19 jan. 2007. Disponível em: <http://www.detran.ce.gov.br/site/default.asp?id=16&pagina=5idnoticia=654>. Acesso em 19 jan. 2007.

OZCIMEN, D.; KARAOSMANOGLU, F. Production and characterization of bio-oiln and biochar from rapessed cake. **Renewable Energy**, v. 29, n. 5, p. 779-787, 2004.

PALMAROLA-ADRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource technology**, v. 96,n. 7, p. 843-850, 2005.

PATHERE, U. V.; SINHA, A. K.; RANADE, S. A.; SHIRKE, P. A. Activation of sucrose-phosphate syntase from *Prosopis juliflora* in light: effects of protein kinase and protein phosphatase inhibitors. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 3, p. 249-254, 2000.

PEREZ, S. C. J. A.; MORAES, J. A. P. V. Influência do estresse híbrico e do pH no processo germinativo da algarobeira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 7, p. 981-988, 1991.

PETERSON, A. **Production of fermentable extrats from cereals and fruits**. Londres-Inglaterra. Blackie Academic and Professional. 1995. p. 1-31.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 1-39, 2007.

REGULY, J. C. **Biotecnologia dos Produtos Industriais – Fermentações Industriais, Biomassa Celular.** v. 2, Editora e Gráfica Universitária – UFPel, Pelotas-PR, 1998.

RIBEIRO, C. A. F.; HORII, J. Potencial de linhagens de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação do caldo de cana. **Scientia Agrícola**, v. 56, n. 2, p. 1-16, 1999.

ROCHA, R. G. A. **A algaroba na alimentação e farmacopéia do homem rural norte-riograndense**. Natal, EMATER, 1986. p.16.

SANE, P. V., DESAI, T. S., RANE, S. S., TATAKE, V. G. Regulation of sucrose phosphate synthase in *Prosopis juliflora*. **Journal of Plant Biology**, v. 26, n. 3, p. 205-212, 1999.

SCARAMUZZO, M. São Paulo: faturamento das usinas de cana-de-açúcar crescerá 10% em 2006/07. **Página Rural**. São Paulo, 24 ago. 2006. Disponível em:<http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.asp?subcategoriaid=4&id=47000>. Acesso em: 19 jan. 2007.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima?. **Química Nova**, v. 24, n.2, p. 247-251, 2001.

SHANE, G. S.; JOACHIMSTHAL, E. L.; DUNN, N. W.; ROGERS, P. L. Isolation and preliminary characterization of a Zymomonas mobilis mutant with an altered preference for xylose and glucose utilization. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 2, p. 157-164, 2000.

SHENE, C.; BRAVO, S. *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. **Applied Microbiology and Biotechnology,** v. 57, n. 3, p. 323-328, 2001.

SILVA, J. B.; BORA, P. S.; QUEIROGA NETO, V. Caracterização de propriedades funcionais do isolado protéico de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora* (SW) D.C.). **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 14, n. 2, p. 253-272, 1996.

SILVA, L. F.; FARIAS, G. G. M.; LEITE, E. L.; NASCIMENTO, C. B. S.; LIMA, C. J.; NEGREIROS, A. N. M.; LIMA, D. F.; FLORES, H. *Prosopis juliflora* Pod Flour and Syrup Processing and Nutritional Evaluation. In: HABIT, M. A.; SAAVEDRA, Y. V. **The current state of knowledge on *Prosopis juliflora***. Washington, FAO, 1990, p.405-418.

SILVA, C. G.; MATA, M. E. R. M. C.; BRAGA, M. E. D; QUEIROZ, V. S. Extração e Fermentação do Caldo de Algaroba (*Prosopis juliflora* (Sw) DC) para obtenção de aguardente. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais,** v. 5, n.1, p. 51-56, 2003a.

SILVA, L. F.; LIMA, D. F.; NASCIMENTO, C. B. S.; LIMA, R. B.; FARIAS, G. G. M.. Efeitos da farinha de algaroba (*Prosopis juliflora*) durante as fases de gestação e lactação em ratas *wistar*. **Acta Scientiarium - Biological Sciences**, v. 25, n. 2, p. 459-465, 2003b.

SILVA, S. A.; SOUZA, A. G.; CONCEIÇÃO, M. M.; ALENCAR, A. L. S.; PRASAD, S.; CAVALHEIRO, J. M. Estudo termogravimétrico e calorimétrico da algaroba. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 460-464, 2001.

SINHA, A. K.; PATHRE, U.; SANE, P. V. Purification and Characterization of Sucrose Phosphate Synthesis from *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 3, p. 441-447, 1997.

STATSOFT, Inc. **STATISTICA for Windows** [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 1996.

SWINGS, J.; DE LEY, J. The Biology of *Zymomonas*. **Bacteriology Review**. v. 41, n.1, p. 1-46, 1977.

TABOSA, J. M.; SOUZA, J. C.; GRAÇA, D. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N.; RIE CORREA, F. Neuronal vacuolation of the trigeminal nuclei

in goates caused by ingestion of *Prosopis juliflora* pods. **Journal Veterinary and Human Toxicology**, v. 42, n. 4, p. 155-158, 2000.

TANAKA, H.; EBATA; T.; KUWAHARA, I.; MATSUO, M.; OGBONNA, J. C. Development and apliccation of a sistem for analysis of mixed cultures of microorganisms. **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 80, n. 1; p. 51-64, 1999.

TANO, M. S.; BUZATO, J. B. Effect of the presence of initial ethanol production in sugar cane juice fermented by *Zymomonas mobilis.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 242-244, 2003.

TEIXEIRA, C. G.; JARDINE, J. G.; BEISMAN, D. A. Utilização do sorgo sacarino como matérias-prima complementar à cana-de-açúcar para obtenção de etanol em microdestilaria. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 17, n. 3, p. 248-251, 1997.

TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Deficiências minerais em animais de fazenda, principalmente bovinos em regime de campo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 20, n. 3, p. 127-138, 2000.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2000. 827p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4ª. Edição, Editora Atheneu, Sao Paulo, 2004, 718p.

VASCONCELOS, J. C. S. N.; **Avaliação da atividade antifúngica e padronização do liófilo da cultura *Zymomonas mobilis*.** 89p. 2002. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de produtos Bioativos. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. **Cerveja**. In: Eugênio Aquarone; Walter Borzani; Willibaldo Schmidell; Urgel de Almeida Lima. Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos. 1ª ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, v. 4, p. 91-144.

VIEIRA, R. L.; GUERRA, N. B.; FREITAS, E. M. Sucedâneo do Café a partir de *Prosopis juliflora* D.C. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 121-124, 1995.

VIEIRA, R. L.; BION, F. M. Valor Biológico de dieta à base de soja (*Glycine hispide*) e algaroba (*Prosopis juliflora*), **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 16, n. 1, p. 85-98, 1998.

VIIKARI, L. By-product formation in ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Tecnhnical Research Center of Finland,** v. 27, p. 3-29, 1986.

WALKER, G. M. **Yeast Metabolism**. In: Yeast Physiology and Biotechnology, ed. Jonh Wiley & Sons, Scotland: Wiley, 2000. 264p.

ZALDIVAR, J.; ROCA, C.; FOLL, C. L.; HAHN-HAGERDAL, B.; OLSSON, L. Etanolic fermentation of acid pré-treated starch industry effluents by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strarins. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 5, p. 1670-1676, 2005.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo