THAIS SUZANE DOS SANTOS MILESSI

Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, na área de Microbiologia Aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva

Versão Original

Lorena
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Milessi, Thais Suzane dos Santos

Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta / Thais Suzane dos Santos Milessi. – 2012.

148 p. : il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2012.

Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Bioetanol 3. Células imobilizadas 4. Biotecnologia. I. Título. II. Silva, Silvio Silvério da, orient.

662.636 - CDU

Dedico esta dissertação à meus pais, Sandra e Osvaldo, meus exemplos de vida os quais sempre estiveram ao meu lado, apoiando e incentivando nos momentos difíceis e aplaudindo as vitórias.

Esta conquista também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus e à Nossa Senhora Aparecida pela fé e coragem em sempre seguir em frente e não desistir perante os desafios.

Ao meu orientador Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva por me ensinar muito mais que teorias, mas também me preparar para a vida. Por não somente me incentivar mas chamar a atenção quando foi necessário. Agradeço a dedicação e por compartilhar tanta experiência, ser sua aluna com certeza colaborou para me tornar, não somente uma profissional, mas uma pessoa melhor.

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena por tornar possível a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante a realização deste trabalho.

À meus pais, minha base e apoio infinito, pela educação e amor incondicional sem os quais eu não teria chegado até aqui.

À minha família, pela compreensão e apoio apesar da distância e ausência de minha parte para atingir uma etapa que nenhum de nós ainda havia atingido.

Ao Tayrone com amor, pelo apoio constante, confiança, paciência, carinho e companheirismo, por estar presente em minha vida, manter a calma nos momentos de desespero e pela companhia nas inúmeras amostras de madrugada.

À Prof. Dr^a Rita de Cássia L. B. Rodrigues e ao Prof. Dr. Wálter de Carvalho pela ajuda, paciência e esclarecimento de tantas dúvidas colaborando intimamente para este trabalho e à todo o corpo docente do departamento, pelos ensinamentos e convivência.

Aos técnicos e amigos Nica e Paulinho pelos inúmeros problemas resolvidos e ajuda imensurável.

Aos funcionários do Demar, Valdir, Valdir Marcolino, José e Daenesi por toda ajuda e aprendizado com o biorreator.

Aos amigos Wagner, Felipe e Stéphanie, pela amizade sem igual, apoio contínuo e pelos tantos momentos agradáveis que carrego para sempre em meu coração.

Aos alunos de iniciação científica Danielle e Daniel pelo auxílio em cada etapa deste trabalho e à todos os colegas de trabalho e amigos do laboratório e do departamento que de alguma forma contribuíram para minha formação profissional e pessoal.

Aos amigos de Taubaté, Ana Luisa, Stela e Bettoni por compreenderem minha ausência apesar da falta infinita que fazem em meu dia a dia e aos amigos de Lorena,

Rebeca, Bia, Márcio, Alan Mineiro, Tales, Karina, Gustavo, Sandro, Andrea, Alessandra, Ana, Diego, Andreza, Sáskia e Paula pelos momentos de descontração e por tornarem Lorena o meu lar, vocês moram em meu coração.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho e apesar de não citados jamais serão esquecidos.

*“Um espírito sem limites é o maior tesouro do
homem.*

Ao infinito e além!”

(J.K.Rowling/Walt Disney)

RESUMO

MILESSI, T. S. S. **Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. 2012. 148p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

O presente trabalho teve por objetivo avaliar condições de imobilização da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio visando à produção de bioetanol em biorreator STR tipo cesta à partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Primeiramente, realizou-se as etapas de obtenção, destoxificação e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Realizou-se em seguida um *screening* objetivando a seleção de um meio de cultivo adequado para a produção de etanol por esta levedura. O meio escolhido foi aquele onde se suplementou o hidrolisado com extrato de levedura (3,0 g/L), peptona (5,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L) e CaCl_2 (0,1 g/L), onde verificou-se um fator de conversão de xilose à etanol (Yp/s) de 0,33 g/g. As condições de imobilização da levedura foram então avaliadas por planejamento fatorial 2^3 completo onde os fatores concentração de alginato de sódio, concentração do cloreto de cálcio e tempo de cura foram investigados. Após a análise estatística, as condições 2% de alginato de sódio, 0,1M de cloreto de cálcio e tempo de cura de 12 horas foram fixadas para as etapas seguintes. Nestas condições, avaliou-se então a influência da concentração de células à serem imobilizadas e agitação durante a fermentação a partir de um planejamento fatorial 2^2 completo, definindo-se assim 10 g/L de células e 100 rpm como condições ideais. Após a determinação das condições de imobilização do processo, verificou-se a estabilidade das células imobilizadas em repetidos ciclos fermentativos, para isso cinco bateladas repetidas em frascos Erlenmeyer foram realizadas. Observou-se que apesar da levedura assimilar xilose e produzir etanol em todos os ensaios, uma diminuição na eficiência da fermentação foi verificada, diminuindo em 24% da terceira para a quarta batelada, indicando assim que a levedura imobilizada era viável para o sistema de batelada repetida em até 3 ciclos nas condições estudadas. Iniciou-se então ensaios fermentativos em biorreator STR tipo cesta, realizando-se ensaios em meio sintético e em hidrolisado hemicelulósico. Observou-se reprodutibilidade nos ensaios utilizando os diferentes meios, com um valor de Yp/s de

0,21g/g e uma produtividade volumétrica de 0,15 g/L.h em ambos os ensaios. Fermentações em sistema de bateladas repetidas foram realizadas neste biorreator STR tipo cesta. Realizou-se cinco ciclos consecutivos, ao final dos quais observou-se comportamento semelhante às bateladas repetidas realizadas em frascos Erlenmeyer, na qual a partir de três ciclos a capacidade fermentativa da levedura *S. stipitis* diminuiu, apresentando uma produtividade volumétrica em torno de 0,16 g/L.h nas três primeiras bateladas. O gel de alginato de cálcio apresentou considerável estabilidade em sistema de bateladas repetidas indicando a possibilidade de sua utilização nesse processo. Embora os resultados obtidos neste trabalho sejam inferiores aos observados com células livres por outros autores, os mesmos demonstraram o potencial do emprego do gel de alginato de cálcio e da levedura *Scheffersomyces stipitis* imobilizada para a produção de bioetanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar e contribuíram para os conhecimentos sobre a fermentação de hidrolisado hemicelulósico à etanol.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar. Bioetanol. Células imobilizadas. Biotecnologia.

ABSTRACT

MILESSI, T. S. S. **Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells for second generation ethanol production in basket STR** . 2012. 148p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

This study aimed to evaluate immobilization conditions for the yeast *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 entrapped in calcium alginate gel in basket type of STR bioreactor for ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. For this purpose, first the steps to obtain the hydrolysate by dilute acid pretreatment, detoxification and characterization of hydrolysate was performed. Then, a screening aiming the selection of a suitable culture medium suitable for ethanol production by this yeast was carried out. The medium which showed maximum ethanol production (Yp/s, 0.33 g/g) was selected to continue the further studies. It was composed by the hydrolyzate supplemented with yeast extract (3.0 g/L), peptone (5.0 g/L), (NH₄)₂SO₄ (2.0 g/L), CaCl₂ (0.1g/L). The immobilization conditions of the yeast were then evaluated through a 2³ factorial design where the three process variables i.e. concentration of sodium alginate, concentration of calcium chloride and reaction time were investigated. After statistical analysis, the optimum set of conditions (2% of sodium alginate, 0.1 M of calcium chloride and a reaction time of 12 hrs) were set to perform the following steps of this study. Subsequently, the influence of the cell concentration for immobilization and agitation during fermentation were studied considering a factorial design 2². This study revealed that 10 g/L of cells and 100 rpm were the optimum conditions for ethanol production via immobilized systems. After determination of the conditions for immobilization procedure, the stability of the immobilized cells were evaluated by repeated fermentation cycles, for that five repeated batches were performed in Erlenmeyer flasks. It was observed that despite the yeast assimilates xylose and produces ethanol in all assays, a decrease in the efficiency of the fermentation was verified from the third batch, revealing the 65% efficiency in the second batch and 39% in the fourth batch. This behavior indicates that the immobilized yeast is viable for repeated batch system only up to 3 cycles under the employed conditions. Fermentation tests in basket type STR bioreactor were carried out using synthetic medium and hemicellulosic hydrolysate as carbon source. Reproducibility was observed in assays using the different medium with ethanol yield (Yp/s) of 0.21 g/g

and a volumetric productivity of 0.15 g/L.h in both assays. Fermentation assay in repeated batch system were carried out in STR basket type bioreactor. Five consecutive fermentation cycles were performed which eventually showed the similar behavior with the repeated batches conducted in Erlenmeyer flasks. The fermentative efficiency of the yeast *S. stipitis* was considerably good up to three cycles with a volumetric productivity of 0.16 g/L.h followed by a concomitant down fall. The calcium alginate gel showed a considerable stability in the experiments, indicating the viability of its application in repeated batch system. Although the results of this work are inferior to that observed by other authors using free cells, the calcium alginate gel potential is evident and the yeast *Scheffersomyces stipitis* showed to be capable to produce ethanol in immobilized form, contributing with knowledge for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate adopting biochemical platform.

Keywords: Sugarcane Bagasse. Bioethanol. Immobilized cells. Biotechnology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis.....	19
Figura 2 – Estimativa de produção e consumo de etanol de cana de açúcar no Brasil.....	21
Figura 3 – Rota de produção de etanol para diferentes matérias primas.....	22
Figura 4 – Rota de produção de etanol de etanol de segunda geração.....	24
Figura 5 – Processo integrado de uma biorrefinaria.....	26
Figura 6 – Estrutura da Biomassa Lignocelulósica.....	27
Figura 7 – Parte da composição estrutural da celulose.....	28
Figura 8 – Parte da composição estrutural da hemicelulose.....	28
Figura 9 – Precursores da lignina.....	29
Figura 10 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica.....	30
Figura 11 - Esquema simplificado do Metabolismo de xilose por <i>Scheffersomyces stipitis</i>	37
Figura 12 – Microfotografia da levedura <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124 obtida por microscopia eletrônica de varredura.....	39
Figura 13 – Fator de conversão teórico de xilose em etanol (Yp/s) em condições anaeróbias.....	40
Figura 14 – Fator de conversão teórico de xilose em etanol (Yp/s) em condições aeróbias.....	41
Figura 15 – Ilustração dos métodos de imobilização celular.....	44
Figura 16 – Parte da rede estrutural do suporte alginato de sódio.....	47
Figura 17 – Esquematisação da reação de gelificação do alginato de sódio com cloreto de cálcio.....	48
Figura 18 – Esquema da Imobilização celular em gel de alginato de cálcio.....	49
Figura 19 – Esquema ilustrativo do processo de imobilização celular em gel de alginato de cálcio.....	57
Figura 20 – Microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço de cana-de-açúcar in natura (A – aumentada 1000 vezes) e após pré-tratamento com ácido sulfúrico (B – aumentado 500 vezes).....	64
Figura 21 – Concentrações de xilose, glicose, etanol e biomassa durante os processos fermentativos em diferentes suplementações do hidrolisado hemicelulósico.....	70
Figura 22 – Biomassa livre verificada em cada ensaio do planejamento fatorial.....	75

Figura 23 – Eficiência de imobilização, biomassa imobilizada e biomassa total no sistema ao final dos ensaios.....	76
Figura 24 – Variação do diâmetro das esferas de células imobilizadas em alginato de cálcio durante o processo fermentativo (dm=diâmetro médio).....	77
Figura 25 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta concentração de etanol.....	78
Figura 26 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Y_p/s	79
Figura 27 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Q_p	79
Figura 28 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta consumo de xilose.....	79
Figura 29 – Tendência das variáveis respostas para os níveis positivo e negativo dos fatores investigados.....	82
Figura 30 – Concentração de biomassa livre verificada em cada ensaio do planejamento fatorial realizado.....	85
Figura 31 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Etanol.....	86
Figura 32 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à concentração de etanol em função dos fatores investigados.....	88
Figura 33 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Y_p/s	88
Figura 34 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes ao valor de Y_p/s em função dos fatores investigados.....	90
Figura 35 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Q_p	90
Figura 36 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à Q_p em função dos fatores investigados.....	92
Figura 37 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta consumo de xilose.....	92
Figura 38 – Gráfico de Pareto correspondente à variável Eficiência de imobilização.....	94
Figura 39 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à eficiência de imobilização em função dos fatores investigados.....	95
Figura 40 – Tendência das variáveis respostas para os níveis positivo e negativo dos fatores investigados, onde [X] corresponde à concentração celular.....	97
Figura 41 – Acompanhamento da concentração de xilose em função do tempo durante as bateladas repetidas.....	100
Figura 42 – Acompanhamento da concentração de etanol em função do tempo durante as bateladas repetidas.....	101
Figura 43 – Acompanhamento da concentração de biomassa livre em função do tempo durante as bateladas repetidas.....	101

Figura 44 – Acompanhamento da concentração de biomassa livre e imobilizada em função do volume reacional durante as bateladas repetidas.....	103
Figura 45 – Acompanhamento da eficiência de imobilização durante as bateladas repetidas.....	103
Figura 46 – Cesta utilizada para acomodar as células imobilizadas no biorreator STR tipo cesta.....	106
Figura 47 – Esquema ilustrativo e fotografia do biorreator tipo cesta.....	107
Figura 48 – Concentrações de xilose, glicose, etanol, xilitol e biomassa livre em biorreator STR tipo cesta utilizando meio sintético (A) e hidrolisado (B).....	108
Figura 49 – Variação do pH durante os ensaios fermentativos em meio sintético e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	109
Figura 50 – Concentração de xilose durante as bateladas repetidas em biorreator.....	112
Figura 51 – Concentração de etanol durante as bateladas repetidas em biorreator.....	112
Figura 52 – Concentração de biomassa livre durante as bateladas repetidas em biorreator.....	113
Figura 53 – Acompanhamento do pH durante as bateladas repetidas em biorreator.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações de diferentes métodos de pré-tratamento em diferentes materiais lignocelulósicos.....	31
Tabela 2 – Composição de diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar determinados por diferentes autores.....	35
Tabela 3 – Suportes aplicados à imobilização celular.....	46
Tabela 4 – Composição dos meios de cultivo analisados.....	56
Tabela 5 - Fatores e níveis avaliados no planejamento 2^3	58
Tabela 6 - Matriz do Planejamento Fatorial 2^3 completo com quadriplicata no ponto central.....	59
Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados no planejamento 2^2	59
Tabela 8 - Matriz do Planejamento Fatorial 2^2 completo com quadriplicata no ponto central.....	60
Tabela 9 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar....	65
Tabela 10 – Redução da massa de açúcares e inibidores observada após o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	68
Tabela 11 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos obtidos para os diferentes meios de cultivo testados.....	71
Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central para avaliação da influência das variáveis alginato de sódio (X_1), cloreto de cálcio (X_2) e tempo de cura (X_3) sobre diferentes variáveis resposta após 48 horas de processo.	74
Tabela 13 – Estimativas de efeitos para as variáveis respostas Etanol, Y_p/s , Q_p e Consumo de Xilose.....	78
Tabela 14 – Análise de variância e significância para a concentração de etanol.....	80
Tabela 15 – Análise de variância e significância para o Y_p/s	80
Tabela 16 – Análise de variância e significância para o Q_p	80
Tabela 17 – Análise de variância e significância para o Consumo de Xilose.....	81
Tabela 18 – Nível adequado de acordo com a tendência de cada fator investigado para cada variável resposta.....	83
Tabela 19 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com quatro repetições no ponto central para avaliação da influência da concentração celular na imobilização (X_1) e agitação (X_2) sobre diferentes variáveis resposta após 48 horas de processo.....	84

Tabela 20 – Estimativas dos efeitos dos fatores concentração de células (X1) e agitação (X2) nas as variáveis resposta concentração de etanol, Yp/s, Qp, consumo de Xilose e eficiência de imobilização.....	86
Tabela 21 – Análise de variância e significância para a o Etanol.....	87
Tabela 22 – Análise de variância e significância para a variável Yp/s.....	89
Tabela 23 – Análise de variância e significância para Qp.....	91
Tabela 24 – Análise de variância e significância para a o Consumo de Xilose.....	93
Tabela 25 – Análise de variância e significância para a eficiência de imobilização.....	94
Tabela 26 - Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta estudadas pelas equações 9, 10, 11 e 12.....	96
Tabela 27 – Nível adequado de cada fator investigado para cada variável resposta.....	98
Tabela 28 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos para o sistema de bateladas repetidas.....	105
Tabela 29 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos obtidos após 48 horas de cultivo de células imobilizadas em biorreator STR tipo cesta.....	107
Tabela 30 – Biomassa livre, imobilizada em função do volume do reator e eficiência de imobilização nos ensaios realizados.....	109
Tabela 31 – Produção de etanol e parâmetros fermentativos para o sistema de bateladas repetidas em biorreator tipo cesta após 48 horas de processo em cada batelada.....	113
Tabela 32 – Comparação entre os diferentes sistemas utilizados para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após 48 horas de processo.....	117

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	21
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 Biocombustíveis	23
1.1.1 Etanol.....	25
1.1.2 Etanol de segunda geração.....	28
1.2 Materiais/resíduos lignocelulósicos.....	31
1.3 Bagaço de cana-de-açúcar	38
1.4 Microrganismos produtores de etanol.....	41
1.4.1 <i>Scheffersomyces stipitis</i> NRRL Y-7124	44
1.5 Condução de processos fermentativos utilizando células imobilizadas	46
1.5.1 Métodos e tipos de suporte utilizados para imobilização celular	48
1.5.2 Imobilização de células pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio	51
1.5.3 Biorreatores com células imobilizadas.....	54
2. OBJETIVOS.....	58
3. MATERIAL E MÉTODOS	59
3.1 Matéria prima e preparo do hidrolisado hemicelulósico	59
3.2 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar	59
3.3 Microrganismo e obtenção das células	60
3.4 <i>Screening</i> do meio de cultivo para a produção de etanol	60
3.5 Método experimental de imobilização celular.....	61
3.6 Meio e condições de fermentação	62
3.7 Determinação das condições de imobilização celular	63
3.8 Métodos analíticos	65
3.8.1 Determinação da concentração celular.....	65
3.8.2 Determinação da variação no diâmetro das esferas de gel de alginato de cálcio.....	66
3.8.3 Determinação dos teores de açúcares, etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural	66
3.9 Cálculo de fatores e parâmetros fermentativos	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	69
4.2 <i>Screening</i> do meio de cultivo para produção de etanol	74

4.3 Determinação das condições de imobilização celular	78
4.4 Avaliação da influência da concentração de células imobilizadas e da agitação na produção de etanol.....	89
4.5 Avaliação da estabilidade do sistema imobilizado em bateladas repetidas	105
4.6 Ensaios para produção de etanol em biorreator STR tipo cesta	111
4.7 Avaliação do sistema imobilizado em bateladas repetidas em biorreator tipo cesta.....	116
5. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	126

INTRODUÇÃO

A busca por fontes alternativas de energias limpas, as quais contribuem com um menor impacto ambiental e auxiliam na resolução dos problemas gerados pelo desenvolvimento, vêm ganhando cada vez mais destaque e pesquisas por soluções sustentáveis vêm sendo cada vez mais incentivadas. Desta maneira, os biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel, destacam-se como uma alternativa promissora. Estudos têm comprovado uma significativa redução na emissão de gases do efeito estufa em decorrente da substituição dos combustíveis fósseis derivados de petróleo pelos biocombustíveis, em especial o bioetanol.

O etanol é utilizado principalmente como combustível, assim como também é utilizado como insumo industrial com grande diversidade de aplicações podendo ser produzido a partir de diferentes fontes de matéria prima. Dentre as principais matérias-primas utilizadas atualmente para a produção de etanol encontram-se a cana-de-açúcar, o amido de milho e o açúcar de beterraba. Estes produtos agrícolas têm grandes aplicações alimentícias, fazendo com que haja uma grande demanda por novas alternativas para a produção de etanol. Portanto, o uso futuro da produção de etanol em larga escala pode ser baseado na sua produção a partir de materiais lignocelulósicos.

Os resíduos lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de trigo e a casca de café, são muitas vezes acumulados no ambiente, representando a perda de valiosos recursos. Sendo assim, é fundamental desenvolvimento de pesquisas objetivando o aproveitamento destes resíduos. No Brasil, o subproduto lignocelulósico mais abundante é o bagaço de cana-de-açúcar, sobressaindo-se na corrida para produção de etanol de segunda geração.

Dentre as poucas leveduras fermentadoras de xilose a etanol, a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 vem sendo amplamente aplicada em estudos para a produção de etanol de segunda geração, em função dos seus rendimentos e sua considerável tolerância ao etanol. Entretanto, a maioria dos estudos reportam a utilização dessa levedura em processos envolvendo células livres. Na literatura consultada, não foi encontrado, até o momento, estudos envolvendo a utilização desta levedura na produção de bioetanol em sistemas com células imobilizadas dessa levedura, envolvendo meio sintético e/ou hidrolisados hemicelulósicos.

Diversas vantagens podem ser citadas sobre o emprego de células imobilizadas em processos biotecnológicos, entre elas a facilidade de separação e recuperação do

biocatalisador, a utilização de elevadas densidades celulares e a operação em processos contínuos sem que ocorra “washout”. Além disso, a facilidade de separação do sistema imobilizado do meio permite sua reutilização em processos contínuos e bateladas repetidas, resultando, conseqüentemente, em maiores valores de produtividade.

O gel de alginato de cálcio foi escolhido como suporte de imobilização para se iniciar os estudos de imobilização da levedura *S. stipitis*, uma vez que este polímero natural é um suporte extensamente estudado e de grande aplicabilidade na imobilização de células viáveis.

Considerando a grande importância dos processos operados com células imobilizadas e as vantagens associadas ao mesmo, o presente trabalho teve por objetivo avaliar e determinar condições de imobilização da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 em gel alginato de cálcio visando a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de mistura (STR) tipo cesta, contribuindo com novos conhecimentos e informações para fortalecer o desenvolvimento e viabilidade do processo de produção de etanol de segunda geração.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biocombustíveis

Atualmente, observa-se um rápido aumento na demanda global por energia ocasionado pelo contínuo crescimento da população mundial e pelo desenvolvimento exponencial de países como a China e Índia (HARUN et al., 2010). Destaca-se ainda a industrialização e a motorização crescentes, as quais exigem um aumento da demanda por combustíveis derivados de petróleo, representando 80% da energia consumida mundialmente, dos quais 58% são destinados ao setor de transportes (NIGAM; SINGH, 2011).

Uma série de desvantagens estão ligadas ao emprego de combustíveis fósseis, entre elas destacam-se o esgotamento das reservas de petróleo, a elevada projeção de preços a longo tempo, a emissão de gases causadores do efeito estufa e consequências ambientais como mudanças climáticas atribuídas as emissões de dióxido de carbono (MUSSATTO et al., 2010; DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011; TSIGIE et al., 2011). Estas desvantagens podem ser fortemente reduzidas ou mesmo eliminadas com a substituição destes combustíveis pelos biocombustíveis, os quais representam uma fonte de energia limpa e sustentável e aumentam a renda agrícola de países em desenvolvimento (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005).

Biocombustíveis referem-se à combustíveis líquidos ou gasosos produzidos a partir de biomassa vegetal, como etanol, metanol, biodiesel, e metano e emergiram como uma das estratégias sustentáveis mais promissoras aos derivados de petróleo, apresentando vantagens por serem facilmente obtidos a partir de biomassa vegetal abundante e de baixo custo e serem biodegradáveis (BALAT; BALAT, 2009). Podem ser classificados em primários e secundários, de acordo com a Figura 1. Os biocombustíveis primários são utilizados *in natura*, ou seja, não necessitam de uma etapa de processamento, como por exemplo a lenha. Já os secundários necessitam de uma etapa de processamento para preparar a matéria prima, como no caso do etanol, podendo ainda serem divididos em biocombustíveis de primeira, segunda e terceira geração, de acordo com a matéria prima e o processo de produção utilizados (NIGAM; SINGH, 2011).

Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis (NIGAM; SINGH, 2011).

Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos principalmente à partir de alimentos e de culturas oleaginosas, como beterraba, cana-de-açúcar, milho, óleos vegetais e animais, utilizando tecnologias convencionais para sua produção. Estes biocombustíveis já alcançaram níveis econômicos de produção viáveis e são produzidos e comercializados em larga escala, como o etanol (BRENNAN; OWENDE, 2010).

Por outro lado, os biocombustíveis produzidos utilizando-se tecnologias que convertem a biomassa lignocelulósica, como por exemplo resíduos agrícolas e florestais, são chamados biocombustíveis de segunda geração (TIMILSINA; SHRESTHA, 2011). Enquanto os biocombustíveis de primeira geração já são comercializados mundialmente, tecnologias para a conversão da biomassa lignocelulósica ainda precisam se tornar economicamente viáveis para produção de biocombustíveis de segunda geração comercialmente (RAVINDRANATH et al., 2011).

A recente busca pela utilização de organismos microscópicos como alternativa para a produção de biocombustíveis deu origem aos biocombustíveis de terceira geração. Estes biocombustíveis produzidos a partir de micróbios e microalgas baseiam-se na capacidade destes microrganismos de atuarem como matéria prima (NIGAM; SINGH, 2011). Por exemplo, Xiong et al. (2008) destacaram o potencial de algumas espécies de microalgas para a produção de biodiesel uma vez que acumulam quantidades consideráveis de ácidos graxos em sua biomassa. Entretanto, atualmente este tipo de biocombustível ainda não é uma opção viável devido à grande quantidade de energia necessária quando comparada com os biocombustíveis de primeira e segunda geração (LAM; LEE, 2012).

Desta maneira, inúmeras pesquisas visando o desenvolvimento de novos processos viáveis e a otimização dos processos já existentes vêm sendo extensamente desenvolvidas. Dentre os diversos biocombustíveis estudados atualmente, o bioetanol recebe destaque no Brasil devido à grande disponibilidade de matéria prima e ao seu histórico de pioneirismo neste biocombustível desde o início do século XX.

1.1.1 Etanol

A utilização do etanol está concentrada, em escala mundial, na geração de energia, em sua mistura com a gasolina ou simplesmente desidratado, exercendo um papel considerável na matriz energética mundial (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; LIN; TANAKA, 2006; CORTEZ, 2010).

Bioetanol é o álcool etílico (C_2H_5OH ou EtOH), uma substância incolor, volátil, inflamável e totalmente solúvel em água (SILVA, 2009). Possui um elevado índice de octano (108), permitindo limites mais amplos de inflamabilidade, maiores velocidades de chama e maior calor de vaporização, proporcionando teoricamente uma maior taxa de compressão e menor tempo de combustão que a gasolina (BALAT; BALAT, 2009). Apresenta ainda um elevado teor de oxigênio (35 % m/m), possibilitando uma combustão mais limpa e contribuindo para a redução de gases poluidores, sendo assim um verdadeiro aditivo para a gasolina, uma vez que aumenta o teor de oxigênio do combustível (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008; GÍRIO et al., 2010).

O Brasil iniciou a produção de álcool combustível desde 1927, entretanto devido ao seu alto custo de produção quando comparado aos combustíveis derivados de petróleo, o

potencial do etanol como combustível foi mundialmente ignorado até a crise do petróleo nos anos 70 (MUSSATTO et al., 2010). Em resposta à crise, o governo brasileiro lançou o Programa Nacional do Álcool (PróAlcool) com o objetivo de reduzir o preço dos combustíveis e a dependência nacional da importação de petróleo, uma vez que em 1973 cerca de 80% do petróleo utilizado no Brasil era importado (CERQUEIRA-LEITE et al., 2009). Inicialmente, a prioridade do programa era produzir etanol anidro como aditivo para a gasolina, entretanto na década de 80 o grande desafio passou a ser sua utilização como combustível e a fabricação de veículos movidos a álcool (AMORIN et al., 2011).

Atualmente, o Brasil é o produtor de bioetanol com maior capacidade competitiva do mundo, possuindo um mercado interno bem desenvolvido e cada vez mais estimulado pelo crescimento das vendas de veículos flex. Sendo o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, devido a condições climáticas favoráveis, amplas chuvas durante a época certa e terras produtivas abundantes, o Brasil possui potencial para aumentar significativamente sua produção de etanol e desempenhar um papel importante na satisfação da demanda global futura, sem comprometer a produção de alimentos (CANILHA et al., 2011). A Figura 2 mostra a previsão da produção e consumo de etanol no Brasil para os próximos anos, onde observa-se que a exportação é uma opção viável.

Figura 2 – Estimativa de produção e consumo de etanol de cana-de-açúcar no Brasil (EPE 2007).

No cenário mundial, o Brasil e os Estados Unidos lideram a produção de etanol, compreendendo juntos praticamente 90% da produção global. Enquanto a matéria prima

brasileira é a cana-de-açúcar, os Estados Unidos utilizam o milho para produzir este biocombustível, desta maneira a cana-de-açúcar e o milho são as principais matérias primas utilizadas na produção de bioetanol (HARUN et al., 2010).

A produção de etanol é normalmente realizada em três etapas: obtenção dos açúcares fermentescíveis; fermentação dos açúcares por microrganismos e separação e purificação do etanol, realizada geralmente por destilação, retificação e desidratação (MUSSATO et al., 2010). As matérias primas utilizadas podem ser divididas em 3 grandes grupos, como pode ser visto na Figura 3, matérias primas açucaradas (cana-de-açúcar e beterraba), amiláceas (milho, trigo e arroz) e lignocelulósica (madeira e palha) (JOHN, et al., 2011).

Figura 3 – Rota de produção de etanol para diferentes matérias primas
(Adaptado de SILVA, 2009).

A principal diferença entre a produção de etanol a partir de biomassas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas está na etapa de obtenção dos açúcares fermentescíveis.

Enquanto biomassas açucaradas necessitam somente de uma etapa de moagem para a extração dos açúcares, a produção de etanol a partir de amiláceos necessita de uma etapa de hidrólise das cadeias de carboidratos para obtenção de um xarope de açúcares (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; MUSSATTO et al., 2010).

Já a utilização de biomassa lignocelulósica necessita de uma etapa de pré-tratamento para liberar os açúcares fermentescíveis, possuindo ainda muitos gargalos e encontrando-se em desenvolvimento para sua aplicação em larga escala comercial. Entretanto, apesar dos desafios ainda encontrados, a produção de bioetanol a partir desta matéria prima é uma alternativa sustentável promissora, uma vez que a biomassa lignocelulósica possui grande disponibilidade e baixo custo (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; NIGAM; SINGH, 2011).

1.1.2 Etanol de segunda geração

A produção industrial de biocombustíveis a partir de matérias-primas vegetais concentra-se na utilização de materiais que podem ser facilmente e economicamente processados, tais como óleos vegetais, cana-de-açúcar, e milho. No entanto, estes materiais competem por terras cultiváveis com culturas destinadas à alimentação humana ou animal, aumentando a pressão sobre os preços dos alimentos e acelerando a degradação ambiental (DOHERTY; MOUSAVIOUN; FELLOWS, 2011). Desta maneira, considerando que a biomassa lignocelulósica não compete com as culturas alimentares (por exemplo, resíduos agrícolas como bagaço de cana e palha de trigo) (CHANDEL et al., 2012) e que a matéria prima utilizada corresponde a até 40% do preço final do etanol, a biomassa lignocelulósica, a qual é uma fonte abundante e de baixo custo, vem se mostrando uma alternativa potencial na obtenção de etanol (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica permite aumentar a produtividade de etanol por hectare de cana-de-açúcar plantada (CERQUEIRA LEITE et al., 2009), atendendo assim ao grande interesse brasileiro de aumentar a produtividade de etanol de cana sem aumentar a área de cultivo nas mesmas proporções, não competindo com a produção de alimentos pelo uso da terra (PACHECO, 2011; MARQUES, 2011).

Atualmente, as tecnologias para produção de etanol de segunda geração ainda encontram gargalos importantes e encontram-se em fase de desenvolvimento na busca pela

viabilidade e competitividade comercial (NIGAM; SINGH, 2011). Diversas empresas do setor privado, como a Novozymes, a Oxiteno e a Petrobrás vêm investindo largamente na busca pela produção destes biocombustíveis (MARQUES, 2011; SIMS et al., 2010).

A biomassa lignocelulósica pode ser convertida a bioetanol por duas maneiras: conversão termoquímica ou bioquímica (LIMAYEM; RICKE, 2012). Ambas as rotas envolvem a degradação da estrutura recalcitrante lignocelulósica. No entanto, a via mais importante e utilizada para a obtenção do álcool etílico no Brasil, tanto para a produção de etanol de primeira geração quanto de segunda geração, é a via fermentativa.

Devido à necessidade de uma etapa para ruptura da estrutura da matriz do material fibroso e liberação dos açúcares fermentescíveis, o processo de obtenção de etanol de segunda geração se dá pela realização de um pré-tratamento para tornar os açúcares da celulose e hemicelulose mais acessíveis; hidrólise ácida ou enzimática visando a quebra dos polissacarídeos em açúcares mais simples; fermentação dos açúcares e por fim separação e purificação do etanol produzido (MUSSATO et al., 2010). A Figura 4 mostra um fluxograma esquematizando o processo.

Figura 4 – Rota de produção de etanol de etanol de segunda geração (Adaptado de CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

Apesar das vantagens apresentadas diante dos biocombustíveis de primeira geração, o etanol de segunda geração deve ser capaz de competir economicamente com o etanol de primeira geração (STEPHEN; MABEE; SADDLER, 2011). Na conversão de lignocelulósicos em etanol, o grau de complexidade é mais elevado, envolvendo etapas adicionais como o pré-tratamento, destoxificação e produção de enzimas. Essas operações precisam ser totalmente otimizadas para atingir-se uma usina de etanol eficiente e competitiva (NAIK et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2011). Além disso, o uso da água durante o processo é outro fator crucial a ser considerado na busca por um processo sustentável (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Diante destes gargalos, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando soluções para viabilizar a produção de etanol de segunda geração. Uma vez que um pré-tratamento eficiente pode reduzir os custos de produção, Rodrigues et al. (2010) estudaram condições de otimização e scale-up do processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise ácida. Bak et al. (2010) avaliaram o pré-tratamento biológico da palha de arroz utilizando o fungo *Dichomitus squalens* para aumentar a digestibilidade lignocelulósica e promover a hidrólise da celulose. Já Fonseca et al. (2011) observaram o potencial da levedura *Issatchenkia occidentalis* na remoção dos compostos inibitórios formados durante o pré-tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Grzenia, Shell e Wickramasinghe (2012) observaram remoção eficiente de inibidores de hidrolisado de palha de milho utilizando extração por membrana.

Apesar dos avanços tecnológicos na produção de etanol de segunda geração, o estabelecimento de uma produção integrada entre etanol de primeira e segunda geração com co-produtos de valor agregado aponta como uma alternativa importante para aumentar a rentabilidade e fazer a diferença no desempenho financeiro da planta (WYMAN, 1999; NAIK et al., 2010), surgindo assim o conceito de biorrefinaria.

De acordo com Martin (2011) a biorrefinaria é uma usina na qual a produção de combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa são integrados, permitindo o uso eficiente de todo o potencial das matérias primas juntamente com geração de energia e fabricação de uma ampla gama de produtos de valor agregado.

Os benefícios de uma biorrefinaria integrada são numerosos devido à diversificação de matérias-primas e produtos, assim quanto maior for o grau de integração da biorrefinaria mais econômica, ambientalmente viável e sustentável será o processo

(DEMIRBAS, 2009). Figura 5 mostra um esquema de biorrefinaria proposto por Lyko, Deerberg e Weidner (2009).

Figura 5 – Processo integrado de uma biorrefinaria (Adaptado de LYKO; DEERBERG; WEIDNER, 2009).

1.2 Materiais/resíduos lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos correspondem à maior fonte de compostos orgânicos da biosfera e por serem abundantes e possuírem baixo custo apresentam grande potencial de utilização como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (LATIF; RAJOCA, 2001; CARVALHO et al., 2004; LEE et al., 2008; CANILHA et al., 2010; ZHAO; XIA, 2010).

Estes materiais renováveis representam os principais constituintes da biomassa vegetal, como os resíduos agrícolas e florestais (palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho, dentre outros). Seu não aproveitamento, além de possuir impacto ambiental por ocasionar problemas de poluição, representa perda de recursos, uma vez que poderiam ser aproveitados na geração de produtos de interesse à sociedade (CANILHA et al., 2009; CORTEZ, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são compostos por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas, entre outros compostos (BALAT; BALAT, 2009). Celulose e hemicelulose representam em torno de 70% da constituição da biomassa total e são compostos formados por polímeros de monômeros de açúcares com potencial fermentescível em processos fermentativos (LIMAYEM; RICKE, 2012). Desta maneira, o potencial dos materiais lignocelulósicos como matéria prima sustentável está diretamente relacionado com sua constituição, a qual pode ser observada na Figura 6.

Figura 6 – Estrutura da Biomassa Lignocelulósica (RUBIN, 2008).

A celulose é o componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos, correspondendo a aproximadamente de 40 a 50% da massa seca total. Trata-se de um polímero linear, possuindo porções amorfas e cristalinas, formado por unidades de D-glicose unidas entre si por ligações glicosídicas β -(1,4). (GOLDSTEIN, 1981).

Apresenta uma estrutura química relativamente simples, mas não é um biopolímero facilmente degradável. Essa característica pode ser explicada pelo fato de seus filamentos se encontrarem unidos formando microfibrilas cristalinas, estabilizadas por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares formando estruturas com alto grau de cristalinidade e altamente insolúveis (FENGEL; WEGENER, 1983).

Figura 7 – Parte da composição estrutural da celulose (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009)

A hemicelulose ou poliose é o segundo componente em maior abundância, podendo variar entre 20 e 25% do material lignocelulósico (SJÖSTRÖM, 1993). Possui função de reserva e sustentação e é composta por monossacarídeos como a glicose, manose, xilose e arabinose; assim como por pequenas quantidades de ácidos urônicos. Sua composição irá variar de acordo com o tipo de madeira. Madeiras moles apresentam altas proporções de manose e um número mais elevado de unidades de galactose, enquanto madeiras duras possuem grande quantidade de xilose (FENGEL; WEGENER, 1983). A hemicelulose apresenta baixa massa molecular, é bastante hidrofílica e contém considerável grau de ramificação entre suas cadeias, possuindo uma natureza altamente amorfa, diferentemente da celulose, sendo mais susceptível à hidrólise química sob condições mais brandas (ROWELL, 2005).

Figura 8 – Parte da composição estrutural da hemicelulose (FERRAZ, 2010)

A lignina é uma macromolécula aromática amorfa tridimensional de estrutura rígida mais resistente que a celulose, é formada a partir da polimerização radicalar de unidades de fenil propano (álcool cumárico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) (FENGEL; WEGENER, 1983). É um material de baixa densidade e abrasividade. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose, conferindo rigidez e baixa reatividade às fibras vegetais (GOLDSTEIN, 1981).

Figura 9 – Precursores da lignina (NIGAM; GUPTA; ANTHWAL, 2009)

O reaproveitamento de resíduos lignocelulósicos agroindustriais é algo que ganhou grande destaque na produção de biocombustíveis, entretanto estes três principais componentes (celulose, hemicelulose e lignina) estão dispostos em uma estrutura cristalina a qual é uma matriz de redes de ligação cruzada entre polissacarídeos, proteínas glicosiladas e lignina, dificultando a disponibilidade dos carboidratos para processos fermentativos (SUN; CHENG, 2002; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012). Desta maneira, a natureza extremamente recalcitrante destes materiais constitui a maior barreira para a viabilização de processos biotecnológicos (CHAMPAGNE, 2008; AGUIAR; FERRAZ, 2011).

Por meio de uma etapa de pré-tratamento envolvendo um mecanismo pelo qual a estrutura lignocelulósica é rompida, a fração hemicelulósica pode ser separada e açúcares fermentescíveis como xilose, glicose e arabinose tornam-se mais acessíveis (PANDEY et al., 2000; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005), como pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Efeito do pré-tratamento na estrutura lignocelulósica (Adaptado de SEMENCËNKO et al., 2011)

De acordo com Lynd (1996), um processo de pré-tratamento ideal deve produzir fibras reativas, produzir elevados rendimentos em pentoses não degradadas, não liberar quantidades significativas de inibidores do metabolismo microbiano, exigir nenhuma ou mínima redução de tamanho, ser operado em reatores de tamanho moderado e de custo viável, não produzir elevados níveis de resíduos e ser simples.

O método de pré-tratamento empregado irá depender do tipo de material utilizado. Um determinado tipo de material irá necessitar de um método de pré-tratamento específico para minimizar a degradação do substrato e maximizar o rendimento em açúcar (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). A escolha do método adequado para o pré-tratamento é de grande importância uma vez que esta etapa representa um acréscimo de até \$0,30 por galão no preço final do bioetanol (MOSIER et al., 2005), ou seja, a relação custo-benefício desta etapa ainda consiste em um grande desafio para a produção de etanol de segunda geração

Os métodos de pré-tratamentos utilizados atualmente podem ser divididos em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos (SARKAR et al., 2012). As metodologias mais estudadas envolvem o emprego de ácidos, vapor, solventes orgânicos e agentes

alcalinos (GIRIO et al., 2010). Diferentes metodologias aplicadas a diferentes materiais lignocelulósicos podem ser observadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Aplicações de diferentes métodos de pré-tratamento em diferentes materiais lignocelulósicos

Processo	Algumas aplicações
Físicos	
Moagem	Bagaço de cana-de-açúcar (BUABAN et al., 2010); Palha de cana-de-açúcar (SILVA, A.S. et al., 2010).
Pirólise	Casca de pistache (AÇIKALIN; KARACA; BOLAT, 2012); Madeira (AMUTIO et al., 2012); Palha de milho (CAPUNITAN; CAPAREDA, 2012).
Físico-Químicos	
Explosão à vapor	Bagaço de cana-de-açúcar (KAAR; GUTIERREZ; KINOSHITA, 1998); Talo de girassol (RUIZ et al., 2008); Palha de milho (BALLESTEROS et al., 2006).
Explosão de fibra de amônia (AFEX)	Bagaço de cana-de-açúcar (KRISHNAN et al., 2010); Palha de cana-de-açúcar (KRISHNAN et al., 2010); Palha de milho (LAU; DALE, 2009).
Químicos	
Pré-tratamento ácido	Palha de trigo (KABEL et al., 2007); Bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2010); Palha de arroz (KARIMI; KHERADMANDINIA; TAHERZADEH, 2006).
Pré-tratamento alcalino	Palha de trigo (SAHA; COTTA, 2006; MCINTOSH; VANCOV, 2011); Palha de milho (BANERJEE et al., 2011).
Ozonólise	Palha de trigo (GARCÍA-CUBERO et al., 2009); Palha de centeio (GARCÍA-CUBERO et al., 2009).
Biológico	
Pré-tratamento biológico	Madeira (WANG et al., 2012); Palha de milho (SUN et al., 2011); Palha de arroz (SARITHA; ARORA; NAIN, 2012)

Os métodos de pré-tratamentos físicos são procedimentos simples e de fácil aplicação, entretanto a necessidade de elevadas temperaturas durante o processo e o grande consumo de energia associado à eles não os tornam atrativos em larga escala (HARUN; DANQUAH, 2010).

O método biológico envolve o emprego de enzimas ou microrganismos capazes de degradar a estrutura lignocelulósica e liberar açúcares fermentescíveis. Neste processo, não ocorre a formação de resíduos de alta toxicidade uma vez que as condições de operação

são mais amenas (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002). Em contrapartida, longos tempos de processo ainda são necessários para uma hidrólise eficiente e as enzimas hidrolases utilizadas possuem um elevado custo de aquisição (MOSIER et al., 2005), inviabilizando sua aplicação em larga escala apesar de suas vantagens.

Desta maneira, dentre os inúmeros métodos de pré-tratamento disponíveis, a hidrólise ácida tem sido bastante estudada e se mostrado um método eficiente para a liberação de açúcares fermentescíveis, sendo a mais empregada para a decomposição da estrutura lignocelulósica e geração de açúcares (LAOPAIBOON et al., 2010).

Neste processo, faz-se necessária a utilização de soluções de altas concentrações de ácido assim como um gasto considerável com energia devido ao aquecimento a altas temperaturas do sistema (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002). Ocorre também a formação de compostos inibidores ao metabolismo microbiano (furfural, hidroximetil furfural, ácidos fracos, derivados de furanos e fenóis) devido à degradação dos componentes da biomassa. Estes compostos inibidores formados, posteriormente inibem o processo fermentativo reduzindo a produtividade de etanol (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAL, 2005). Outra desvantagem está na liberação de resíduos após a hidrólise que devem ser devidamente tratados, pois se tratam de fontes altamente poluidoras (DOMÍNGUEZ; CHENG; TSAO, 1996).

A utilização de uma etapa de destoxificação para remoção dos compostos inibidores formados durante o processo é uma alternativa empregada para contornar a produção dos compostos tóxicos durante a hidrólise ácida. Uma variedade de diferentes métodos vem sendo estudados para a destoxificação do hidrolisado lignocelulósico, entre eles podemos citar evaporação (PALMQVIST et al., 1996), o uso de membranas (GRZENIA; SCHELL; WICKRAMASINGHE, 2008), uso de resina de troca iônica (LEE et al., 1999), neutralização (BUHNER; AGBLEVOR, 2004), adsorção por carvão ativo (CANILHA et al., 2008), extração com solvente (CRUZ et al., 1999), alteração de pH (CHANDEL et al., 2007) e ainda métodos biológicos (PARAWIRA; TEKERE, 2011), cada qual apresentando vantagens e sendo empregados de acordo com a necessidade e custo benefício do processo em questão.

As desvantagens associadas ao processo de hidrólise podem ainda ser contornadas a partir da escolha de condições otimizadas de hidrólise, proporcionando assim um rendimento máximo em açúcares e formação mínima de compostos tóxicos, assim como reduzindo o custo do processo e garantindo a sustentabilidade desse método (CHANDEL; SINGH, 2011).

Considerando que a composição da parede celular dos materiais lignocelulósicos e as condições de operação influenciam diretamente a recuperação de açúcares (SHATALOV; PEREIRA, 2012), diversos fatores vem sendo extensamente estudados para aplicação da hidrólise ácida em diferentes materiais lignocelulósicos, entre eles destacam-se o tempo de reação e a concentração de ácido utilizada, os quais influenciam diretamente na formação de inibidores e nos danos causados aos equipamentos utilizados (AKPINAR; ERDOGAN; BOSTANCI, 2009). Entretanto, não existe um método ou fórmula de hidrólise ácida ideal para todo tipo de material lignocelulósico, as condições ótimas irão depender do tipo e espécie do material utilizado (CHANDEL et al., 2012).

Canilha et al. (2011) verificaram condições para a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar e observaram que, na região estudada, o emprego de 2% (v/v) de ácido sulfúrico, 150°C e 30 minutos foi eficiente na liberação dos açúcares fermentescíveis. Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) verificaram maiores eficiências no processo de hidrólise ácida de palha de arroz empregando-se 1% (v/v) de ácido sulfúrico, à 121°C e 27 minutos. Já para a palha de trigo, Baboukani, Vossoughi e Alemzadeh (2012) observaram maiores recuperações de açúcares utilizando 1,6% (v/v) de ácido sulfúrico, 147°C e 30 minutos.

Os carboidratos provenientes da hidrólise podem ser utilizados em vários processos de bioconversão para obtenção de diversas biomoléculas com inúmeras aplicações, como é o caso da xilose (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; HONGZHI et al., 2010). Esta aldose, presente no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, pode ser convertida, por exemplo, a xilitol, um poliálcool com características adoçantes e importantes propriedades nutracêuticas, ou ainda a etanol, como é o foco do presente trabalho. (PANDEY et al., 2000; SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2006; CANILHA et al., 2010; HONGZHI et al., 2010).

1.3 Bagaço de cana-de-açúcar

No Brasil um dos subprodutos lignocelulósicos mais abundantes, para os quais novas tecnologias de aproveitamento são necessárias, é o bagaço de cana-de-açúcar (CANILHA et al., 2010). O bagaço é um subproduto fibroso gerado após a extração do caldo da cana para a produção de açúcar e álcool (CHANDEL et al., 2011). Uma vez que a

lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil devido ao crescente interesse nos biocombustíveis, os problemas graves de acúmulo e estocagem deste subproduto tendem a aumentar. De acordo com a CONAB (2012/2013) a área brasileira destinada à produção de cana-de-açúcar neste ano apresentou um crescimento de 2,1% (171,7 mil hectares) em relação a safra passada. A produtividade média brasileira está estimada em 69.963 kg/ha, 4,3% maior que na safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha (CONAB, 2012/2013).

A safra de cana-de-açúcar de 2012/2013 está estimada em 596,63 milhões de toneladas, apresentando um aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12, a qual foi de 560,36 milhões de toneladas (CONAB, 2012/2013). Sabendo-se que no processamento da cana-de-açúcar são gerados cerca de 140 kg de bagaço seco por tonelada de matéria-prima (CANILHA et al., 2010), em torno de 83,5 milhões de toneladas de bagaço serão gerados.

Do total de bagaço gerado, de 50% a 90 % pode ser destinado à demanda de energia da usina sucroalcooleira (FROLLINI; PIMENTA, 1997). De acordo com Cerqueira-Leite et al. (2009), atualmente no Brasil o bagaço destinado a geração de energia corresponde a 92% do bagaço gerado, resultando ainda numa estimativa de bagaço excedente de 6,7 milhões de toneladas, o qual se acumula de tal forma a ser considerado um problema ambiental (CORTEZ, 2010).

Além da geração de energia elétrica, o bagaço pode ser utilizado ainda para a produção de papel e papelão, aglomerados, ração animal e adubo. Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de uma utilização sustentável do bagaço de cana-de-açúcar. Por exemplo, Alavéz-Ramírez et al. (2012) estudaram o emprego de bagaço de cana-de-açúcar para aumentar a durabilidade e melhorar as propriedades mecânicas de blocos utilizados em construção civil. Souza et al. (2011) avaliaram o potencial deste subproduto na produção de materiais cerâmicos visando sua aplicação na produção de telhas para a construção civil. Entretanto, devido à sua composição química, a aplicação biotecnológica do bagaço de cana-de-açúcar é uma alternativa promissora.

De acordo com Hernández-Salas et al. (2009) o bagaço é composto por 40-50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina. Entretanto esta composição varia de acordo com as condições climáticas de cultivo, tipo do bagaço, condições do solo e uso de fertilizantes (CHANDEL et al., 2011). A Tabela 2 demonstra diferentes composições de bagaço de cana-de-açúcar obtidas por diferentes autores.

Como pode-se observar na Tabela 2, a composição química do bagaço torna-o interessante uma vez que é composto por quantidade considerável de carboidratos, sendo

que a xilose pode representar até 80% dos carboidratos presentes na fração hemicelulósica (MOSIER et al., 2005). Desta maneira, sua aplicação em processos fermentativos na obtenção de produtos de interesse, como etanol de segunda geração, é uma alternativa promissora, uma vez que, apesar de sua estrutura recalcitrante, após uma etapa de pré-tratamento estes açúcares são liberados (SUN; CHENG, 2002; MARTÍNEZ et al., 2003; HONGZHI et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2011).

Tabela 2 – Composição de diferentes tipos de bagaço de cana-de-açúcar determinados por diferentes autores

Componente	Rodrigues et al. (2010)	Silva A.S. et al. (2010)	Rezende et al. (2011)	Silva, V.F.N. et al. (2011)	Rocha et al. (2012)
Celulose	45,4%	38,8%	35,2%	42,8%	43,1%
Hemicelulose	24,1%	26,0%	24,5%	25,9%	25,2%
Lignina	23,4%	32,4%	22,2%	22,1%	22,9%
Cinzas	2,3%	2,8%	20,9%	1,4%	2,8%
Extrativos	n/d%	n/d	n/d	6,1%	4,3%

*n/d – não determinado

A utilização do bagaço como matéria-prima para produção etanol de segunda geração pode potencializar a produtividade do etanol obtido a partir do caldo da cana, sendo que uma parcela de bagaço deve continuar gerando energia elétrica e térmica para o funcionamento das usinas, atendendo assim a modelos sustentáveis de produção (TUBINO; ZAMORA, 2009). Considerando que celulose e hemicelulose juntas constituem em torno de 70% do bagaço de cana-de-açúcar e que em sua maioria são compostos por açúcares fermentescíveis (LIMAYEM; RICKE, 2012), as 6,7 milhões de toneladas de bagaço excedente representam 4,7 milhões de toneladas de açúcares desperdiçados, os quais poderiam ser convertidos à 2,3 milhões de toneladas de etanol. De acordo com Cerqueira-Leite et al. (2009), se 92% do bagaço total for utilizado para a geração de energia, os 8% restantes podem representar um aumento na produção de 2200 litros de etanol por hectare de cana cultivado se utilizados para produção de etanol de segunda geração e com os avanços e pesquisas que vêm sendo desenvolvidos atualmente este número tende a aumentar.

1.4 Microrganismos produtores de etanol

O desenvolvimento de processos eficientes, de baixo custo e ambientalmente viáveis para a produção de etanol de segunda geração requer a seleção de microrganismos adequados que contribuam para alcançar tais objetivos (CARDONA; SANCHÉZ; GUTIÉRREZ, 2009)

Atualmente, o organismo mais utilizado para produção de etanol a partir de hexoses é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, devido a sua tolerância a altas concentrações de açúcar e seu elevado rendimento de etanol (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004; ZHANG et al., 2010). Contudo, como a produção de etanol de segunda geração de baseia na utilização de materiais lignocelulósicos, esta levedura apresenta uma menor versatilidade uma vez que sua forma selvagem não possui um sistema enzimático necessário para o metabolismo de pentoses (xilose e arabinose), principais açúcares presentes na fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos (HAMACHER et al., 2002; NAKAMURA et al., 2001; KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009; FERREIRA et al., 2011).

A fermentação de xilose à etanol é essencial para a bioconversão de lignocelulósicos à biocombustíveis, uma vez que para atingir-se níveis econômicos aceitáveis, todos os constituintes da biomassa que possuam potencial de substrato (glicose e manose da celulose e xilose e arabinose da hemicelulose) devem ser assimilados (HARUN et al., 2010).

O conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses ainda é limitado (HAHN-HARGERDAL et al., 1994) de forma que a busca de novos microrganismos fermentadores de pentoses a etanol ainda é um desafio para a viabilização eficiente da produção de bioetanol. Alguns microrganismos como as leveduras *Candida shehatae*, e *Scheffersomyces stipitis* e o fungo *Fusarium oxysporum*, têm sido avaliados na fermentação de xilose a etanol (HAHN-HAGERDAL et al., 1994; MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004; BETANCUR, 2005).

A Figura 11 mostra um esquema simplificado da principal via metabólica de xilose à etanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Uma vez no interior da célula, a primeira reação envolvida no metabolismo de D-xilose é a redução da pentose à xilitol. Esta reação é catalisada pela enzima xilose redutase – XR (E.C. 1.1.1.21), na presença de NADH e/ou NADPH, dependendo do

microrganismo. Em *Candida guilliermondii* a XR é NADPH-dependente, enquanto em *Scheffersomyces stipitis* esta enzima é NADPH ou NADH-dependente, desta maneira, a especificidade das enzimas envolvidas nas reações de oxidação iniciais do metabolismo de xilose irá depender da levedura utilizada (BRUINENBERG et al., 1984; SILVA et al., 1996, WILSON et al., 2003).

Figura 11 - Esquema simplificado do Metabolismo de xilose por *Scheffersomyces stipitis* (Adaptado de GÍRIO et al., 2010)

O xilitol pode ser oxidado a D-xilulose por uma reação catalisada pela enzima xilitol desidrogenase – XDH (E.C. 1.1.1.9), a qual pode ser NAD⁺-dependente ou ainda

NADP⁺-dependente em casos mais raros (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

A especificidade da enzima XR irá interferir diretamente na oxidação ou acúmulo no citoplasma do xilitol formado. Uma vez que esta aldose redutase possui dependência por NADH ou NADPH, em condições anaeróbias ou de limitação de oxigênio a recuperação do cofator NAD⁺ na etapa seguinte se torna possível, direcionando o metabolismo para a formação de etanol. Entretanto, quando a XR é específica para o NADPH, nestas mesmas condições de limitação de oxigênio, o cofator não será recuperado eficientemente, acarretando o direcionamento do metabolismo para o acúmulo de xilitol, o qual será posteriormente excretado. (JEFFRIES, 1983; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; GÍRIO et al., 2010).

A D-xilulose 5-fosfato é então formada pela fosforilação da molécula de D-xilulose. Esta molécula formada pode ser convertida por reações não-oxidativas em gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato, intermediários da via glicolítica (Embden-Meyerhof-Parnas - EMP). Estes intermediários dão origem ao piruvato, podendo então originar o etanol através das reações de fermentação alcoólica, catalisadas pelas enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, ou ser oxidado no ciclo de Krebs (PREZIOSI-BELLO; NOLLEAU; NAVARRO, 1997; PARAJO et al., 1998; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

Assim, um fator importante para a produção microbiológica de etanol a partir de xilose é a espécie do microrganismo empregado e seus níveis de atividade enzimática responsáveis pela eficiente assimilação e metabolismo de xilose.

A utilização de microrganismos recombinantes é uma estratégia para a fermentação de pentoses a etanol (ELIASSON et al., 2000; JIN; LAPLAZA; JEFFRIES, 2004; DAVIS et al., 2005). Embora a eficiência desses microrganismos seja notável, sua utilização em processos industriais ainda não é viável uma vez que são microrganismos ainda pouco conhecidos e não possuem condições de fermentação otimizadas (DUMSDAY et al., 1997), além disso ainda são necessários estudos para a definição de mecanismos que influenciam na via metabólica destes microrganismos e seus possíveis engenhieramentos, como o sistema de transporte das pentoses para o interior da célula e tolerância à etanol (YOUNG; LEE; ALPER, 2010).

Desta maneira, a maioria dos estudos ainda apontam a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 como um microrganismo potencial na produção de etanol de segunda geração.

1.4.1 A levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

A levedura *Scheffersomyces stipitis* é uma das poucas leveduras capazes de metabolizar todos os açúcares presentes na biomassa vegetal, entre eles xilose, glicose, manose e galactose (CHO et al., 2010; UNREAN; NGUYEN, 2012).

Esta levedura é considerada o microrganismo naturalmente fermentador de pentose mais promissor para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos uma vez que geralmente produz elevadas concentrações de etanol a partir de xilose (LIN et al., 2012). Sua atividade fermentativa é induzida pela resposta à limitação de oxigênio, sendo assim uma espécie anaeróbia facultativa a qual aumenta a produção de etanol em condições microaeradas (CORREIA, 2008).

Morfolologicamente, a levedura *S. stipitis* possui células esféricas, elípticas ou ainda alongadas, com tamanho em torno de 2,2 a 6 µm e possui reprodução assexuada, normalmente por gemulação lateral (CORREIA, 2008).

Figura 12 – Microfotografia da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 obtida por microscopia eletrônica de varredura aumentada 5000 vezes (HUGHES et al., 2012)

Anteriormente conhecida como *Pichia stipitis* desde 1967, a levedura *S. stipitis* teve seu gênero modificado para *Scheffersomyces* após ser analisada filogeneticamente em 2010. Kurtzman e Suzuki (2010) analisaram as seqüências de rRNA D1/D2 LSU (“large subunit”) e SSU (“small subunit”) para determinar a colocação filogenética de diferentes espécies de *Pichia* e estabeleceram o novo gênero em homenagem ao Prof. W. Alexander Scheffers, Delft University of Technology, Holanda, devido às suas imensas contribuições nos campos de fisiologia de leveduras e biotecnologia, em particular na fermentação de D-xilose.

A Figura 13 apresenta o rendimento estequiométrico teórico de xilose em etanol (Yp/s), baseando-se na formação de 5 moléculas de etanol para cada 3 moléculas de xilose, a partir da qual pode-se observar que o fator de conversão teórico para a reação é de 0,511 grama de etanol por grama de xilose.

Figura 13 – Fator de conversão teórico de xilose em etanol (Yp/s) em condições anaeróbias (SLININGER et al., 1990)

Entretanto de acordo com Kuyper et al. (2004), este valor (0,511 g/g) é válido para processos anaeróbios. Em processos onde há disponibilidade de oxigênio, como no caso da levedura *S. stipitis*, este valor teórico reduz para 0,46 g/g, uma vez que ocorre uma competição entre a respiração e a fermentação e parte do carbono é desviado para formação de biomassa, conforma demonstrado na Figura 14.

Levando em consideração este fator, diversos autores têm obtido resultados promissores para obtenção de etanol a partir de xilose empregando *Scheffersomyces stipitis*. Silva, J.P.A. et al. (2010) avaliaram a influencia de diferentes fatores na produção de etanol por células livres desta levedura em hidrolisado de palha de arroz e obtiveram um Yp/s de 0,37 g/g. Canilha et al. (2010) obtiveram um rendimento de 0,30 g/g em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Okur e Saraçoglu (2006) analisaram a produção de etanol a partir de hidrolisado de semente de girasol e obtiveram um Yp/s de 0,41 g/g, destacando assim o potencial desta levedura na produção do biocombustível.

Figura 14 – Fator de conversão teórico de xilose em etanol (Y_{p/s}) em condições aeróbias (KUYPER et al., 2004)

Um outro fator positivo relevante é que a levedura *Scheffersomyces stipitis* não produz quantidades significativas de xilitol em condições limitantes de oxigênio (JEFFRIES; JIN, 2004; GÍRIO et al., 2010). Além destes fatores, o interesse biotecnológico por esta levedura é reforçado pela facilidade de manuseio da mesma e obtenção de grandes quantidades de massa celular, assim como sua adaptação a uma grande variedade diferente de substratos (OLIVEIRA, 2010).

1.5 Condução de processos fermentativos utilizando células imobilizadas

A imobilização celular pode ser definida como o confinamento físico ou locação de células microbianas viáveis em uma região definida do espaço de forma a exibir características diferentes daquela do meio ao seu redor e mantendo suas atividades catalíticas (COELHO, 2007; CUNHA, 2006; COVIZZI et al., 2007).

A principal vantagem desta técnica é a facilidade de separação e recuperação do biocatalisador, o que possibilita seu emprego em sistemas conduzidos em bateladas repetidas. Esta forma de condução de processos permite eliminação da etapa de preparo do inóculo, a recuperação e reutilização das células e maiores produtividades e rendimentos (CARVALHO, 2000; CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; SARROUH, 2009; ZHAO; XIA, 2010). A técnica de imobilização celular além de resultar em maiores produtividades e rendimentos, possibilita a operação em processos contínuos sem que ocorra “washout” e facilita o controle das propriedades do meio e a manutenção dos bioreatores uma vez que não acarreta problemas de adesão e obstrução de eletrodos e tubos (DERVAKOS; WEBB, 1991; PARK; CHANG, 2000; SILVA et al., 2007; KUMAR; GAYEN, 2011). O aprimoramento da estabilidade de uma determinada enzima de interesse também pode ser incluído como uma vantagem da imobilização celular (CHIBATA; TOSA, 1981).

A principal desvantagem desta técnica está relacionada à possíveis obstáculos no transporte de substratos e produtos e limitações na transferência de oxigênio. Além disso, a matriz utilizada pode romper-se devido ao crescimento celular e evolução de gases. Entretanto estas limitações podem ser contornadas através do emprego do método, do suporte de imobilização e do tipo de biorreator mais adequados (CARVALHO, 2000; SILVA et al., 2007; SARROUH, 2009). De modo que embora apresente algumas desvantagens, o uso de células imobilizadas é compensado pelas vantagens que o método proporciona (COVIZZI et al., 2007). Além disso, a imobilização celular pode amenizar a inibição causada por altas concentrações de substrato e produto presentes no meio (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2012).

A imobilização celular se originou na década de setenta (CHIBATA; TOSA, 1981) e foi inicialmente desenvolvida baseada em conhecimentos adquiridos anteriormente na imobilização de enzimas. O objetivo inicial da imobilização de microrganismos era simplificar as biorreações catalisadas por múltiplas enzimas intracelulares, uma vez que estas reação, além de complexas, envolviam cofatores e coenzimas de custo elevado, sendo assim economicamente mais viáveis que a separação e purificação das enzimas imobilizadas (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999; BAI et al., 2008). A partir da década de 1980, as tecnologias empregando células imobilizadas foram ganhando importância, podendo atualmente ser encontradas milhares de publicações referentes a imobilização celular (JUNTER; JOUENNE, 2004; CUNHA, 2006).

De acordo com Pradella (2001) os processos operados em sistemas imobilizados podem ser divididos em dois tipos principais. O primeiro no qual utiliza-se as enzimas contidas nas células, não havendo necessidade das células estarem vivas durante o processo, e o segundo tipo onde necessita-se manter a viabilidade celular uma vez que o produto de interesse requer uma série de etapas de transformação para sua formação.

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização celular assim como o aprimoramento das técnicas já existentes juntamente com o desenvolvimento de novos materiais com potencial para uso como suporte têm possibilitado que processos conduzidos com células imobilizadas possam ser realizados em condições adversas de pH, de assepsia e agitação (WANG; YU; CHANG, 2005; COVIZZI 2007).

Devido às suas consideráveis vantagens, processos utilizando sistemas imobilizados vêm sendo estudados para diversas finalidades. Galai et al. (2010) propõem o uso de células imobilizadas de *Stenotrophonas maltophilia* em bioreator de coluna para tratamento de efluentes. Dembczynsk e Jankowski (2002) estudaram a atividade acidificante de células de *Lactobacillus rhamnosus* imobilizadas em cápsulas de alginato/amido. Razmovski e Vučurović (2012) verificaram a produção de bioetanol a partir de melão de beterraba utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em tecido de haste de milho.

1.5.1 Métodos e tipos de suporte utilizados para imobilização celular

Os métodos utilizados para imobilização celular podem ser agrupados em quatro grandes grupos (KOURKOUTAS et al., 2004) apresentados na Figura 15.

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies é um método simples e barato, possuindo como principal desvantagem a vulnerabilidade e perda dos biocatalisadores imobilizados para o meio reacional (SILVA et al., 2007). Este método envolve a adesão celular a suportes de imobilização através de ligações iônicas ou covalentes entre as células e os grupos reativos do suporte (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Materiais celulósicos, como a serragem, e materiais inorgânicos, como vidro poroso e porcelana porosa, são exemplos de superfícies utilizadas para imobilização celular (KOURKOUTAS et al., 2004). Santos et al (2005a) estudaram a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por células de

Candida guilliermondii imobilizadas em vidro poroso. Yan et al. (2012) utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em palha de milho para a produção de etanol a partir de hidrolisado celulósico de palha de milho.

Figura 15 – Ilustração dos métodos de imobilização celular
(Adaptado de KOURKOUTAS et al., 2004 e CANILHA; CARVALHO;
ALMEIDA E SILVA, 2006).

O aprisionamento em matrizes porosas é baseado na difusão celular em uma matriz porosa, a qual pode ser pré-formada ou sintetizada *in situ*. Este método vem sendo extensamente estudado na imobilização de células viáveis por possibilitar o emprego de polímeros hidrofílicos biocompatíveis como suportes de imobilização, uma vez que para este tipo de células os métodos devem ser os mais amenos possíveis objetivando preservar a integridade celular (CARVALHO, 2000; SILVA et al., 2007). Outra vantagem deste método é a formação de esferas, as quais possuem grande superfície de contato, o que representa uma vantagem diante das limitações de transferência de massa (CARVALHO et al., 2006; COVIZZI et al., 2007). O encapsulamento das células em géis de

polissacarídeos, como alginatos, k-carragenina, ágar e quitosana são exemplos deste tipo de imobilização é o (KOURKOUTAS et al., 2004). Sarrouh e Silva (2010) utilizaram a levedura *Candida guilliermondii* imobilizada em gel de alginato de cálcio para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico em biorreator de leito fluidizado e obtiveram resultados promissores. Fierro, Sánchez-Saavedra e Copalcúa (2008) avaliaram a viabilidade e o consumo de nitrogênio e fosfato por células de *Scenesdesmus sobliquus* imobilizadas em quitosana visando sua aplicação no tratamento de efluentes.

O método de contenção por barreiras, também conhecido como método por contenção em membranas, baseia-se na formação de uma membrana em torno das células, seja esta membrana pré-formada ou formada *in situ* (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006). Este método vem sendo extensamente estudado por possuir potencial na substituição do método de aprisionamento em matrizes uma vez que apresenta menores limitações de transferência de massa por não possuir um núcleo gelificado (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). A grande desvantagem deste método é a limitação de transferência de massa e a ocorrência de bioincrustação na membrana devido ao crescimento celular (KOURKOUTAS et al., 2004). Kovalenko et al. (2005) aplicou esta técnica de imobilização para a produção de sacarose invertida. Loh, Chung e Ang (2000) utilizaram um biorreator de membrana com células imobilizadas de *Pseudomonas putida* para a remoção de fenóis durante o tratamento de efluentes.

A técnica de imobilização por meio de auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida, de modo que os biocatalisadores fiquem ligados entre si sem que seja necessária a presença de um suporte (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA E SILVA, 2006). O tamanho relativamente grande dos agregados celulares permite a sua utilização em biorreatores projetados para trabalhos com células imobilizadas, porém devido à ausência de um suporte de imobilização, sua principal desvantagem é instabilidade e baixa resistência a tensão de cisalhamento (KOURKOUTAS et al., 2004; CARVALHO et al., 2006). Li et al. (2010) utilizaram quitosana para induzir a floculação de *Pseudomonas delafieldii* visando a dessulfuração de diesel. O potencial da capacidade de auto-agregação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de bebidas alcoólicas foi reportada por Jin e Speers (1998) e por Soares (2011).

De acordo com Silva et al. (2007), o método empregado para imobilização celular não deve apresentar efeitos adversos nas propriedades biocatalíticas desejadas, deve

também ser seguro e simples, requerer poucas etapas e ingredientes para o seu preparo, possibilitar ampliação de escala e ser econômico.

Já quanto ao suporte utilizado, é desejável que não apresente toxidez às células, possua alta capacidade de retenção, seja resistente ao ataque químico e microbiano, possua pouca sensibilidade às condições mecânicas (tensão de cisalhamento), seja ambientalmente seguro ou reciclável e possua alta difusividade de substratos e produtos (PRADELLA, 2001). Devem ainda não reagir com os componentes do meio e ser insolúvel sob as condições de operação empregadas (SILVA et al., 2007).

A Tabela 3 apresenta diferentes suportes utilizados em imobilização celular, os quais podem ser utilizados individualmente ou combinados dependendo da finalidade da imobilização (PRADELLA, 2001).

Tabela 3 – Suportes aplicados à imobilização celular (PRADELLA, 2001)

Polímeros Naturais	Polímeros Sintéticos	Materiais inorgânicos
Alginato	Poliacrilamida	Alumina
K-carragenana	Cloreto de polivinila	Sílica
Ágar	Poliestireno	Zircônia
Pectina	Poliuretano	Vidro
Celulose	Polietileno glicol	Diatomita
Dextrana		Vermiculita
Colágeno		

De maneira geral, não existe um método de imobilização nem um suporte universal que se adéque a qualquer tipo de situação. As condições de imobilização empregadas irão depender das características do microrganismo empregado assim como das condições do sistema de imobilização, e geralmente poderão ser estabelecidas somente de maneira empírica (SANTOS, 2005; SARROUH, 2009).

1.5.2 Imobilização de células pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio

O método de imobilização celular por aprisionamento em polímeros naturais vem sendo muito estudado por ser um método simples e que permite uma retenção celular eficiente sem perda de atividade catalítica (CARVALHO, 2000; SARROUH, 2009)

O alginato é o polímero natural mais estudado para imobilização de células viáveis devido a sua biocompatibilidade (HERNÁNDEZ et al., 2010). É um polissacarídeo linear presente em algas marrons constituído de unidades de ácido manurônico ligados por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, e também, por unidades de ácido gulurônico, unidas por ligações do tipo $\alpha(1\rightarrow4)$ (GUO et al., 2006; GUIDONI et al., 2008), conforme Figura 16.

Figura 16 – Parte da rede estrutural do suporte alginato de sódio (OLIVEIRA, 2004).

A proporção entre blocos de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) varia dependendo da fonte do qual o alginato foi extraído, e irá interferir diretamente na adesão celular e na estabilidade final do gel (WANG et al., 2003). A gelificação do alginato ocorre rapidamente na presença de cátions divalentes, como cálcio, bário e estrôncio, por meio de reações de cross-link, onde a interação destes cátions com as unidades de ácido gulurônico formam pontes poliméricas (RABANEL et al., 2009). Uma vez que a formação do gel ocorre a partir da interação electrostática entre os radicais carboxílicos dos blocos G do alginato e os cátion multivalentes, quanto maior a relação de G:M, mais resistente e resistente será o gel resultante (HUNT; GROVER, 2010). A Figura 17 apresenta uma esquematização da reação de gelificação do alginato de sódio em presença de cloreto de cálcio.

A principal vantagem da utilização deste material como suporte de imobilização celular deve-se a esta rápida gelificação na presença de cátions divalentes sob condições amenas, o que permite conservar a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados (COVIZZI et al., 2007). Estas vantagens associadas ao baixo custo justificam seu grande emprego em procedimentos de imobilização celular (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999; SANTOS, 2005).

Figura 17 – Esquematização da reação de gelificação do alginato de sódio com cloreto de cálcio (Adaptado de Royal Society of Chemistry).

Os géis de alginato de cálcio são quimicamente instáveis na presença de alguns componentes presentes no meio de cultivo, como íons fosfato e citrato, podendo sofrer rupturas ou mesmo dissolverem-se no meio (COVIZZI et al., 2007). Este obstáculo vem sendo contornado por alguns autores empregando sais de bário em preferência ao de cálcio ou pelo tratamento do suporte com quitosana visando aumentar a resistência (YOO et al., 1996; DEMBCZYNSKI; JANKOWSKI, 2002; PASPARAKIS; BOUROPOULOS, 2006).

O procedimento de imobilização em gel de alginato de cálcio consiste na adição de uma suspensão de alginato de cálcio com células a uma solução contendo cátions divalentes (por exemplo, o cloreto de cálcio), resultando na formação de *pellets* com células imobilizadas, pois os íons cálcio formam ligações cruzadas com o alginato, aumentando sua viscosidade até a formação do gel (SANTOS, 2005).

Figura 18 – Esquema da Imobilização celular em gel de alginato de cálcio
(Adaptado de COVIZZI et al., 2007)

1.5.3 Biorreatores com células imobilizadas

A otimização de um processo utilizando células imobilizadas só será possível a partir da escolha do biorreator mais adequado ao sistema. Embora para cada sistema exista uma grande variedade de tipos de reatores disponíveis, esta escolha dependerá de fatores como facilidade de operação, características de mistura e homogeneização, transferência de oxigênio, distribuição de células viáveis, atrito com o biocatalisador, facilidade de *scale-up*, cinética de reação, necessidade de controle do processo e custo do biorreator (SANTOS, 2005; COVIZZI, 2007; SARROUH, 2009).

A maioria dos biorreatores é composta por três fases distintas: sólida (biomassa, suporte), líquida (solução de nutrientes e produtos) e gasosa (ar ou gás alimentado no reator). O emprego de sistemas imobilizados permite a utilização de biorreatores de configurações diferenciadas, podendo ser do tipo coluna, agitação ou membrana, operados em sistema de batelada, contínuo ou semi-contínuo, empregando leito fixo ou fluidizado (PRADELLA, 2001; GALACTION; LUPASTEANU; CASCAVAL, 2007).

Biorreatores de leito fixo se tornaram bastante popular devido ao seu baixo custo de operação e manutenção (RIVALDI; SARROUH; SILVA, 2008). Consistem em

biorreatores nos quais as células imobilizadas são empacotadas em uma coluna pela qual o meio de fermentação é escoado (CANILHA; CARVALHO, ALMEIDA E SILVA, 2006). Estes biorreatores promovem a fácil separação entre as fases e permitem taxas de fluxo elevadas para substratos com baixa solubilidade (GALACTION et al., 2011). Entretanto possuem algumas desvantagens, o fluxo para dentro do leito é laminar, conduzindo assim a baixa taxa de transferência de calor e massa. Por outro lado, as partículas sólidas do efluente podem obstruir o leito de biocatalisadores acarretando a redução da taxa de fluxo no interior do leito e a inativação do biocatalisador. Outro fenômeno indesejável é a formação de caminhos preferenciais de fluxo no interior do leito, induzindo um desvio do fluxo e uma conversão ineficiente de substrato (CASCAVAL; GALACTION; ROTARU 2011).

Os biorreatores de leito fluidizado constituem-se de uma coluna vertical de seção circular na qual as células imobilizadas são colocadas em uma proporção de até 70% do volume útil do fermentador e são fluidizadas ou expandidas pela injeção de ar, reciclo parcial do efluente ou movimentação do fluido (PRADELLA, 2001). Estes biorreatores aliam as boas condições de homogeneização dos reatores de mistura às baixas tensões de cisalhamento dos reatores de leito fixo. Assim sendo, as principais dificuldades observadas em reatores com leito fixo podem ser contornadas utilizando leito fluidizado uma vez que este tipo de biorreator facilita a mistura entre as fases líquida e sólida, facilita a remoção de gases e minimiza a tensão de cisalhamento. Entretanto, dependendo do tamanho e densidade do suporte, das taxas de fluxo de gases e líquidos e da geometria do leito, diversos padrões de mistura podem ser obtidos, nos quais as fases podem não estar sendo misturadas adequadamente, desta forma, dependendo das condições hidrodinâmicas do sistema os agregados podem sofrer limitações de transferência de massa, prejudicando as taxas de produção (CANILHA; CARVALHO, ALMEIDA E SILVA, 2006).

1.5.3.1 Biorreator STR tipo cesta

Os biorreatores do tipo tanque com agitação (STR) são os mais utilizados em processos envolvendo células livres, tanto em escala industrial quanto em escala laboratorial. Permitem fácil controle de temperatura e pH, uma vez que misturas bastante

homogêneas podem ser facilmente obtidas e sua operação em modo contínuo é adequada em casos de inibição pelo substrato (RIVALDI; SARROUH; SILVA, 2008).

Apesar deste tipo de reator oferecer as melhores características de mistura e transferência de oxigênio (GROBOILLOT et al., 1994), seu principal obstáculo em sistemas com células imobilizadas é a abrasão das partículas do suporte, a qual se deve não somente às pás do agitador ou a tensão de cisalhamento gerada, mas também a injeção de ar do sistema (SANTOS, 2005).

A operação de processos em sistemas imobilizados possui a facilidade de permitir o *design* e a construção de biorreatores específicos e convenientes para o processo em questão a partir dos biorreatores convencionais. Assim sendo, tais problema podem ser amenizados a partir do empacotamento do sistema célula/suporte em uma unidade tubular, obtendo-se um reator com leito empacotado tipo cesta (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996)

Apesar de manterem as características construtivas e funcionais do biorreator STR e do leito fixo, dos quais são derivados, os biorreatores tipo cesta oferecem vantagens importantes, como resistência à forças de cisalhamento, aumento do número de ciclos repetidos de biossíntese utilizando-se as mesmas partículas de biocatalisadores, a recuperação mais fácil dos biocatalisadores e a diminuição ou prevenção de processos de inibição (GALACTION et al., 2011). Além disso, evitam ainda fenômenos de deposição ou ruptura mecânica das partículas de biocatalisadores, observados nos biorreatores com leitos fluidizado (CASCAVAL; GALACTION; ROTARU 2011).

O reator tipo cesta tem sido investigado para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, na produção de ácidos carboxílicos e antibióticos (GALACTION et al., 2011). Sheelu, Kaviha e Fadnavis (2008) verificaram a utilização de lecitase imobilizada em biorreator tipo cesta para a degomagem de arroz. Meanwell e Shama (2008) analisaram a produção de estreptomicina a partir de quitina utilizando *Streptomyces griseus* em biorreator tipo cesta.

O potencial desde biorreator para a produção de etanol foi comprovado por Gamarra, Cuevas e Lescano (1986). Estes autores utilizaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em gel de alginato de cálcio para a produção de etanol à partir de glicose e observaram elevadas produtividades. Galaction et al. (2011) avaliaram diferentes condições de agitação para a produção de etanol a partir de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em gel de alginato de cálcio utilizando biorreator STR tipo cesta. Rotaru, Galaction e Cascaval (2012) avaliaram a produção de etanol a

partir de glicose pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio e observaram o potencial para a aplicação do processo em sistema de batelada repetida, podendo estender o processo fermentativo para até 9 bateladas repetidas utilizando os mesmos biocatalizadores.

Até o presente momento não foi verificado na literatura estudos utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* imobilizada, assim como também não constam trabalhos utilizando-se biorreator STR tipo cesta utilizando esta levedura, sendo assim avaliado pela primeira vez no presente trabalho. A fermentação de hidrolisados hemicelulósicos visando a produção de etanol é extensamente estudada empregando-se células livres, entretanto, a fermentação de hidrolisados ricos em pentoses por células imobilizadas é um assunto pouco investigado, tornando o presente trabalho pioneiro e de difícil comparação com a literatura.

2. OBJETIVOS

- **Geral:**

- Iniciar estudos de imobilização *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e avaliação do sistema imobilizado na produção de etanol em meio utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

- **Específicos:**

- Determinar, por planejamento experimental, a influência dos parâmetros concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura na imobilização de células de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124;
- Determinar, por planejamento experimental, a influência dos parâmetros concentração de células imobilizadas e agitação na imobilização de células de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124;
- Realizar e comparar ensaios de obtenção de etanol utilizando células livres e células imobilizadas de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 em frascos *Erlenmeyer*;
- Avaliar a estabilidade do sistema imobilizado na produção de bioetanol em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL em sistema de bateladas repetidas usando condições pré-determinadas;
- Avaliar a estabilidade do suporte de imobilização celular na produção de bioetanol em biorreator STR tipo cesta em sistema de bateladas repetidas usando condições pré-determinadas;
- Verificar condições de produção de bioetanol em biorreator STR tipo cesta operado com células imobilizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Matéria prima e preparo do hidrolisado hemicelulósico

Utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar proveniente da Usina São Francisco localizada na cidade de Sertãozinho/SP. O teor de umidade do bagaço *in natura* foi determinado em analisador de umidade de halogênio LJ16 (Greifensee, Switzerland),

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido em reator de hidrólise em condições previamente determinadas pelo grupo. O bagaço foi percolado com H_2SO_4 98 % de pureza como catalisador em uma razão de 100 mg H_2SO_4 / g de matéria seca durante 20 minutos à temperatura de 121° C, utilizando-se uma proporção de 1/10 entre massa de bagaço e volume da solução de H_2SO_4 . Após resfriado, o hidrolisado foi centrifugado e estocado em câmara fria a 4 °C. O hidrolisado foi então concentrado (fator de concentração igual a 3) sob pressão reduzida em um concentrador com capacidade volumétrica de 32 litros a 70°C, a fim de se obter a concentração de xilose da ordem de 30 g/L.

O hidrolisado foi caracterizado quimicamente pela determinação de seus açúcares componentes, e tratado conforme metodologia estabelecida por Alves et al. (1998), a qual envolve três fases:

1ª Fase: Elevação do pH até 7,0 com óxido de cálcio;

2ª Fase: Redução do pH até 5,5 com ácido fosfórico;

3ª Fase: Adição de carvão ativo na proporção 2,5% m/v, sendo a mistura mantida em incubadora de movimento rotatório a 200 min⁻¹ sob 30°C por 1 hora.

Após cada uma das fases do tratamento o hidrolisado foi filtrado sob vácuo sendo, depois da última fase autoclavado sob pressão manométrica de 0,5 atm (110 °C) por 15 min.

3.2 Microscopia eletrônica de varredura do bagaço de cana-de-açúcar

A análise de microscopia eletrônica de varredura do bagaço *in natura* e pré-tratado quimicamente foi realizada como descrito por (KRISTENSEN et al., 2008). A amostra foi lavada duas vezes com água bidestilada estéril e distribuída em uma lamela de vidro de 12

milímetros revestida com poli-L-lisina (Sigma Diagnostics, São Paulo, Brasil). As secções da amostra foram fixadas durante 50 min por incubação em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato. As amostras e os enxertos de cobertura de vidro foram lavadas duas vezes em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio e pós-fixados usando 10% de H₂SO₄ em 0,1 M de tampão cacodilato. Para melhorar a arquitetura de superfície, secções pós-fixadas foram enxaguadas cuidadosamente, com 0,1 M de tampão cacodilato e tratada com tiocarboidrazida 6%. As amostras foram então lavadas com água bidestilada e desidratadas por meio de uma série graduada de soluções de etanol. A secção a seco foi montada em bases de alumínio, por pulverização catódica revestida (JEOL JFC-1600) com uma camada de ouro e usada para digitalização. As amostras preparadas foram digitalizados e fotografadas com um microscópio eletrônico de varredura Hitachi S520 (Hitachi, Tokyo, Japão).

3.3 Microrganismo e obtenção das células

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124, proveniente da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL-USP) e mantida em meio ágar extrato de malte à 4°C. Para obtenção das células utilizadas na etapa de imobilização, uma alçada de células provenientes da cultura estoque foi transferida para frascos de *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL de meio sintético composto por 30,0 g/L de xilose, 10,0 g/L de extrato de levedura e 20,0 g/L de peptona. As células foram cultivadas em incubadora com movimento rotatório de 200 rpm e 30 °C por 24 horas e recuperadas por centrifugação a 3000 x g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada.

3.4 Screening do meio de cultivo para a produção de etanol

Foram testadas quatro diferentes suplementações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. A composição dos meios encontra-se na Tabela 4.

Tabela 4 – Composição dos meios de cultivo analisados

	Extrato de Levedura (g/L)	Peptona (g/L)	Extrato de Malte (g/L)	CaCl ₂ (g/L)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L)	Extrato de Farelo de Arroz (% v/v)
Meio 1	3,0	5,0	---	---	---	---
Meio 2	3,0	5,0	5,0	---	---	---
Meio 3	3,0	5,0	---	0,1	2,0	---
Meio 4	---	---	---	0,1	3,0	10

Ensaio fermentativos foram realizados empregando-se células livres contendo 50 mL de meio e 1,0 g/L de células iniciais. O meio de cultivo no qual a levedura apresentou maior desempenho foi selecionado para as etapas seguintes.

3.5 Método experimental de imobilização celular

As células foram imobilizadas pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio, conforme a Figura 19.

A suspensão celular obtida conforme o Item 3.3 foi adicionada a uma solução de alginato de sódio (*Alginic acid Sodium salt from Brown algae* – Fluka analytical) previamente autoclavada a 111°C por 15 minutos, de maneira a obter-se uma suspensão final contendo uma concentração de alginato de 1%, 1,5% ou 2% e uma concentração celular de 3,0 g/L, 6,5 g/L ou 10,0 g/L, de acordo com as condições experimentais estudadas em cada ensaio.

Esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão em uma solução de cloreto de cálcio mantida sobre agitação, com concentração de 0,10M, 0,15M ou 0,20M, previamente preparada em água bidestilada e esterilizada a 121°C por 20 minutos.

Para o gotejamento da suspensão celular na solução de cloreto de cálcio foi empregado um equipo hospitalar. As esferas formadas, contendo as células imobilizadas foram mantidas na solução de cloreto de cálcio a 4°C por um período de cura de acordo com o planejamento fatorial. Após o período de cura as esferas foram lavadas em água destilada esterilizada e utilizadas nos ensaios fermentativos.

Figura 19 – Esquema ilustrativo do processo de imobilização celular em gel de alginato de cálcio

3.6 Meio e condições de fermentação

O meio de fermentação foi preparado pela suplementação do hidrolisado de acordo com o Meio 3 (Tabela 4).

Durante a etapa de determinação das condições de imobilização as fermentações foram conduzidas em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 40 mL de meio de cultivo e 10 mL de biocatalisadores imobilizados por um período de 96 h em incubadora com movimento rotatório a 30°C.

Durante a etapa de avaliação da estabilidade operacional das células imobilizadas em frascos *Erlenmeyer*, as fermentações foram realizadas em sistema de bateladas repetidas em *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 40 mL de meio e 10 mL de biocatalisadores por um período de 48 h em incubadora com movimento rotatório a 30°C. Ao final de cada

batelada o meio fermentado foi descartado e os biocatalisadores imobilizados foram reutilizados para uma nova fermentação, após adição de novo meio preparado.

Realizou-se ainda fermentações por batelada repetida em fermentador Bioengineering (Wald, Suíça) com capacidade para 2,4L. O volume de meio nas fermentações foi de 1200 mL, sendo composto por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado como descrito anteriormente. As fermentações foram devidamente controladas utilizando-se sensores apropriados no recipiente principal do reator tipo cesta, monitorando-se a temperatura, o pH e o oxigênio dissolvido no meio fermentativo. O pH inicial do processo foi de 5,5 e a temperatura foi mantida a 30 °C. A agitação foi realizada por uma turbina de Rushton com seis pás e o biorreator foi acoplado à um concentrador para evitar perda de meio reacional por evaporação.

3.7 Determinação das condições de imobilização celular

Para determinação das condições de imobilização foram avaliados os efeitos principais bem como os efeitos devido às interações entre as variáveis concentração de alginato de sódio, concentração da solução de cloreto de cálcio e tempo de cura sobre as variáveis respostas consideradas (produção de etanol, fator de conversão de xilose à etanol e consumo de xilose). A determinação dos efeitos foi realizada através de um planejamento fatorial completo do tipo 2^3 com três ensaios no ponto central. Os níveis das variáveis estudadas encontram-se apresentados na Tabela 5 e a matriz do planejamento fatorial 2^3 completo é mostrada na Tabela 6.

Tabela 5 - Fatores e níveis avaliados no planejamento 2^3 .

Fatores	(-1)	0	(+1)
Concentração de alginato de sódio (% p/v)	1,0	1,5	2,0
Concentração de cloreto de cálcio (mol.L ⁻¹ de Ca ⁺²)	0,1	0,15	0,2
Tempo de cura (h)	12	18	24

Tabela 6 - Matriz do Planejamento Fatorial 2^3 completo com quadriplicata no ponto central.

Ensaio	Valores codificados			Valores reais		
	X_1^*	X_2^{**}	X_3^{***}	X_1 (%p/v)	X_2 (mol.L ⁻¹)	X_3 (h)
1	-1	-1	-1	1,0	0,1	12
2	+1	-1	-1	2,0	0,1	12
3	-1	+1	-1	1,0	0,2	12
4	+1	+1	-1	2,0	0,2	12
5	-1	-1	+1	1,0	0,1	24
6	+1	-1	+1	2,0	0,1	24
7	-1	+1	+1	1,0	0,2	24
8	+1	+1	+1	2,0	0,2	24
9	0	0	0	1,5	0,15	18
10	0	0	0	1,5	0,15	18
11	0	0	0	1,5	0,15	18
12	0	0	0	1,5	0,15	18

* Concentração de alginato de sódio; ** Concentração da solução de cloreto de cálcio; *** Tempo de cura

Realizou-se ainda um planejamento fatorial completo 2^2 objetivando determinar a influencia da concentração de células imobilizadas e da agitação empregada na fermentação. Os níveis das variáveis estudadas encontram-se apresentados na Tabela 7 e a matriz do planejamento fatorial 2^3 completo é mostrada na Tabela 8.

A análise dos testes estatísticos foi realizada utilizando-se os programas STATGRAPHICS 16.1.11 e DESIGN-EXPERT 8.0.7.1. Os resultados estão expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão e ainda em tabelas de análise de variância e nível de significativa (p).

Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados no planejamento 2^2 .

Fatores	(-1)	0	(+1)
Concentração de células (g/L)	3,0	6,5	10,0
Agitação (rpm)	100	200	300

Tabela 8 - Matriz do Planejamento Fatorial 2^2 completo com quadriplicata no ponto central.

Ensaio	Valores codificados		Valores reais	
	X_1^*	X_2^{**}	X_1 (g/L)	X_2 (rpm)
1	-1	-1	3,0	100
2	+1	-1	10,0	100
3	-1	+1	3,0	300
4	+1	+1	10,0	300
5	0	0	6,5	200
6	0	0	6,5	200
7	0	0	6,5	200
8	0	0	6,5	200

* Concentração de células; ** Agitação da fermentação

3.8 Métodos analíticos

3.8.1 Determinação da concentração celular

A concentração de células livres a ser imobilizada foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (BECKMAN 640B), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/L) através de uma curva de calibração correspondente. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada.

A determinação das concentrações de células imobilizadas nas esferas de gel de alginato de cálcio foram determinadas por espectrofotometria (BECKMAN 640B), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/L) através de uma curva de calibração correspondente. As esferas de gel contendo as células foram dissolvidas em vórtex pela adição de citrato de potássio (2%) em uma proporção de 10 mL de citrato para 80 esferas de gel contendo as células. A suspensão obtida foi centrifugada à 2000 x g por 15 minutos,

o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em água destilada e devidamente diluídas para determinação de sua concentração.

3.8.2 Determinação da variação no diâmetro das esferas de gel de alginato de cálcio

A variação no diâmetro das esferas de alginato de cálcio foi acompanhada visando-se avaliar a estabilidade do suporte de imobilização diante das condições utilizadas experimentalmente. Uma amostragem de 10 esferas foram coletadas ao acaso e medidas utilizando-se um paquímetro de precisão de 0,05 mm. O diâmetro médio das esferas foi então determinado pela média aritmética dos diâmetros avaliados.

3.8.3 Determinação dos teores de açúcares, etanol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural

A determinação das concentrações de glicose, arabinose, xilose, ácido acético e etanol foram verificadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), acoplado a um detector de índice de refração RID-6A, com eluente ácido sulfúrico 0,01N a um fluxo de 0,6 µl/min, temperatura da coluna de 45 °C e volume de amostra injetado de 20µl. Antes de se efetuar as leituras em HPLC, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18.

A determinação do teor de furfural e hidroximetilfurfural no hidrolisado foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cromatógrafo SCHIMADZU-LC 10 AD (Kyoto – Japão), equipado com coluna HP-RP18 (200 x 4,6mm), acoplado a um detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS, com eluente acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, com um fluxo de 0,8 ml/min, comprimento de onda de 276nm, temperatura da coluna de 25 °C e volume de amostra injetado de 20µl. Antes de se efetuar as leituras em HPLC, as amostras foram filtradas em membranas MINISART 0,22µm (SARTORIUS).

3.9 Cálculo de fatores e parâmetros fermentativos

- a) Fator de rendimento de xilose em etanol ($Y_{p/s}$, g etanol/g xilose).

$$Y_{p/s} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad \text{Equação (1)}$$

Na qual: P_f = concentração final de etanol;
 P_i = concentração inicial de etanol;
 S_f = concentração final de xilose;
 S_i = concentração inicial de xilose

- b) Produtividade volumétrica em etanol (Q_p , g etanol.L⁻¹. h⁻¹).

$$Q_p = \frac{P_f - P_i}{t} \quad \text{Equação (2)}$$

Na qual: t = tempo de fermentação.

- c) Fator de rendimento de xilose em biomassa ($Y_{x/s}$, g biomassa/g xilose).

$$Y_{x/s} = -\frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad \text{Equação (3)}$$

Na qual: X_f = concentração final de células livres;
 X_i = concentração inicial de células livres;

- d) Produtividade volumétrica em biomassa (Q_x , g biomassa.L⁻¹. h⁻¹).

$$Q_x = \frac{X_f - X_i}{t} \quad \text{Equação (4)}$$

e) Taxa global de consumo do substrato (Q_s , g substrato. $L^{-1} \cdot h^{-1}$).

$$Q_s = \frac{S_f - S_i}{t} \quad \text{Equação (5)}$$

f) Concentração de células livres em função do volume (X_m , g/L).

$$X_m = \frac{X \cdot V_m}{V_t} \quad \text{Equação (6)}$$

Na qual: X = concentração de células livres;

V_m = volume de meio;

V_t = volume total.

g) Concentração de células imobilizadas livres em função do volume (X_{im} , g/L).

$$X_{im} = \frac{X_i \cdot V_i}{V_t} \quad \text{Equação (7)}$$

Na qual: X_i = concentração de células imobilizadas;

V_i = volume de células imobilizadas;

V_t = volume total.

h) Eficiência da Imobilização (ϵ , %).

$$\epsilon = \frac{X_{im}}{X_{total}} \times 100 \quad \text{Equação (8)}$$

Na qual: X_{total} = concentração total de células ($X_{im} + X_m$);

* OBSERVAÇÃO: O final do processo, momento no qual são calculados os parâmetros fermentativos, será considerado quando a concentração de xilose (Substrato) atingir um valor menor ou igual a 10% do valor inicial.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar apresentou teor médio de umidade de 18% e foi submetido à hidrólise ácida conforme descrito anteriormente.

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar despolimeriza a fração hemicelulósica da parede celular. Durante as reações termoquímicas, o ácido sulfúrico atua como catalisador, clivando as ligações glicosídicas β -(1,4) e liberando os monômeros da hemicelulose (Alvira et al., 2010) deixando a celulose e a lignina (celulignina). A Figura 20 apresenta a microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço da cana nativo e após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, na qual é evidente que o ácido sulfúrico funcionou mecanicamente sobre a degradação da hemicelulose, modificando a morfologia lignocelulósica.

Figura 20 – Microfotografia obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (A – aumentada 1000 vezes) e após pré-tratamento com ácido sulfúrico (B – aumentado 500 vezes).

O hidrolisado gerado a partir da hidrólise do bagaço de cana de açúcar é denominado hidrolisado bruto. Este hidrolisado foi então concentrado para obter-se uma concentração de xilose da ordem de 30,0 g/L. Finalmente, o hidrolisado concentrado foi destoxificado por metodologia de Alves et al. (1998) como descrito anteriormente, dando origem ao hidrolisado destoxificado. Os hidrolisados bruto, concentrado e destoxificado foram submetidos à caracterização química em relação às concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. Esta caracterização química pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar

Compostos (g/L)	Hidrolisado Bruto	Hidrolisado Concentrado (3x)	Hidrolisado Tratado
Glicose	0,467	1,06	0,711
Xilose	12,45	36,02	33,03
Arabinose	mld	mld	mld
Ácido Acético	0,81	1,09	1,03
HMF	0,05	0,01705	0,0066
Furfural	0,68	0,089	0,017
pH	1,0	0,7	5,5

*mld::menor que o limite de detecção

Como pode ser observado na Tabela 9, as condições de hidrólise promoveram um hidrolisado rico em xilose, com uma concentração cerca de 26 vezes maior que a de glicose, indicando que a hemicelulose foi susceptível a hidrólise nas condições utilizadas, permanecendo a celulose sem considerável degradação. Este comportamento corrobora com a literatura, uma vez que a hemicelulose devido a sua estrutura é mais facilmente hidrolisada que a celulose (FENGEL; WENEGER, 1983). A concentração de glicose obtida foi significativamente inferior àquela observada em outros trabalhos, realizados sob condições de hidrólise semelhantes, Chaud (2010), Sarrouh (2009) e Cunha (2006) verificaram 1,82 g/L, 1,6 g/L e 1,3 g/L de glicose, respectivamente. Já Fonseca (2009) observou valores semelhantes ao observado neste trabalho (12,0 g/L de xilose e 0,41 g/L de glicose).

Observou-se a ausência de arabinose no hidrolisado obtido, essas diferenças entre as concentrações de açúcares liberados podem ser atribuídas às diferentes condições de estudo realizadas, assim como às origens e tipo do bagaço de cana-de-açúcar utilizado em cada caso demonstrando a influência da variedade do bagaço empregado na composição final do hidrolisado obtido, uma vez que a constituição dos materiais lignocelulósicos varia entre os diferentes tipos de madeiras e espécies. Além dos açúcares, observa-se também a presença de compostos tóxicos aos microrganismos como ácido acético, originado dos grupos acetila presentes na fração hemicelulósica, e furfural e hidroximetilfurfural (HMF), originados da degradação dos açúcares durante o processo de hidrólise (GOLDSTEIN, 1981).

Verificou-se um decréscimo do pH do hidrolisado hemicelulósico de 1,0 para 0,7, a qual pode ser justificada pelo aumento da concentração de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado no processo de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar e pela concentração dos ácidos orgânicos presentes no hidrolisado (FERRAZ, 2010).

Após a etapa de concentração do hidrolisado, os teores dos açúcares aumentaram proporcionalmente ao fator de concentração (3 vezes), entretanto o mesmo não foi observado em relação ao ácido acético, ao HMF e ao furfural. De fato, observou-se uma redução na concentração destes inibidores após a etapa de concentração, sendo particularmente importante na remoção de furfural do hidrolisado, removendo 87% deste composto do hidrolisado bruto após a evaporação. A remoção de furfural após a concentração do hidrolisado já foi observada anteriormente por outros autores. Por exemplo, Larsson et al. (1998) observaram uma remoção de 100 deste composto após a concentração do hidrolisado. Vilarreal et al. (2006) obtiveram uma redução de 97,7% de furfural após a concentração do hidrolisado em um fator de cinco vezes. Este comportamento deve-se à grande volatilidade do furfural (Rodrigues et al., 2001). O ácido acético e o HMF não sendo voláteis como o furfural foram removidos em menores quantidades (64% e 55%, respectivamente). O comportamento destes compostos ocorreu de forma semelhante ao relatado por Rodrigues et al. (2001), os teores de HMF e furfural diminuíram após a etapa de concentração enquanto o teor de ácido acético aumentou, porém não proporcionalmente ao fator de concentração. Vilarreal et al. (2006) observaram uma redução de 61,3% de HMF e 22,8% de ácido acético. Segundo Parajó et al. (1998) a evaporação permite a redução na quantidade de diversos compostos voláteis, sendo possível a remoção de até 50% do ácido acético presente.

A temperatura utilizada durante o processo de concentração mostrou-se adequada, uma vez que observou-se o aumento da concentração de xilose sem degradação deste açúcar. Também foi observada uma redução da quantidade total de ácido acético, um inibidor potente em processos fermentativos (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA 1998; CHANDEL et al., 2007).

Após o processo de destoxificação por alteração de pH seguido de adsorção em carvão ativo, observou-se uma redução na concentração dos compostos inibidores, apresentando uma redução de 81% de furfural e 61% de HMF. Reduções superiores foram observadas por outros autores, Silva (2001) observou 87,83% e 100% de remoção de furfural e HMF, respectivamente, essa diferença pode ser atribuída à origem da matéria prima empregada no processo de hidrólise, uma vez que a composição e a proporção entre os constituintes variam de acordo com os diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (LYND et al., 2005; CHAUD, 2010). Foram também observadas reduções de 8,3% na concentração de xilose e 33,0% na concentração de glicose, valores superiores aos encontrados por CUNHA (2006) que verificou 6,8% e 22,92%, respectivamente. De acordo com CUNHA (2006) essas perdas podem ser atribuídas pela ocorrência de arrastes destes compostos pelos precipitados formados durante o tratamento do hidrolisado.

Verificou-se um aumento na relação da concentração de xilose com a concentração de glicose. Antes do processo de destoxificação, esta relação era de 33,9, ou seja, a concentração de xilose no hidrolisado era 33,9 vezes maior que a de glicose. Após a etapa de destoxificação, esta relação aumentou para 46,5, a concentração de glicose (0,711 g/L) passou a corresponder a 2,15% da xilose presente. Esta baixa concentração de glicose em relação à xilose é desejada uma vez que esta hexose pode prejudicar o metabolismo desta pentose devido à repressão catabólica, na qual ocorre a inibição da transcrição dos genes responsáveis pelas enzimas presentes na assimilação de xilose (CHAUD, 2010; YOUNG; LEE; ALPER, 2010).

O processo de tratamento empregado acarretou uma perda de 25% do volume de hidrolisado hemicelulósico. A Tabela 10 apresenta a influência do tratamento na redução da massa de açúcar e compostos inibidores presente no hidrolisado, considerando essa perda volumétrica.

Pode-se notar na Tabela 10 uma redução de 31,2% da massa total de xilose presente no hidrolisado. Esta perda pode ser atribuída à precipitação ou remoção de compostos durante o processo de destoxificação, adsorção de líquido pelo carvão ativo, evaporação durante a autoclavagem ou ainda perdas durante a filtração (SANTOS, 2005). Apesar desta

perda indesejável de açúcares utilizados como substrato em processos fermentativos, observou-se também destacada redução da massa dos inibidores (29,1% para o ácido acético, 71,0% para o HMF e 85,7% para o furfural), fato positivo uma vez que a remoção destes compostos inibidores beneficia o consumo de xilose, aumentando a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (FONSECA, 2009).

Tabela 10 – Redução da massa de açúcares e inibidores observada após o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Compostos (gramas)	Hidrolisado Concentrado (3x)	Hidrolisado Tratado	Redução (%)
Glicose	0,848	0,427	49,7
Xilose	28,8	19,8	31,2
Ácido Acético	0,872	0,618	29,1
HMF	0,0136	0,004	71,0
Furfural	0,0712	0,0102	85,7

De maneira geral, o emprego de ácido sulfúrico no pré-tratamento da biomassa lignocelulósica tem sido extensivamente estudado para diferentes matérias primas. Rodrigues et al. (2010) utilizaram este processo em bagaço de cana-de-açúcar, Moutta et al. (2012) aplicaram em palha de cana-de-açúcar, outro sub produto do processamento de cana, Kim et al. (2011) verificaram boas condições para a hidrólise de palha de cevada e Roberto, Mussato e Rodrigues (2003) obtiveram bons resultados para o pré-tratamento de palha de arroz. Assim sendo, apesar das perdas e desvantagens relacionadas ao processo, o pré-tratamento com ácido diluído ainda é um processo promissor e o mais comum e extensamente explorado para a liberação de açúcares fermentescíveis em processos biotecnológicos, uma vez que libera os monômeros constituintes da hemicelulose e torna a fração celulósica mais acessível às enzimas celulolíticas para posterior uso desta fração na obtenção de produtos a partir de hidrolisado celulósico, como o etanol celulósico (Chandel et al., 2012).

4.2 Screening do meio de cultivo para produção de etanol

A presença de nutrientes no meio de fermentação é um fator de grande importância para a eficiência do processo fermentativo, uma vez que os microrganismos envolvidos requerem nutrientes diferenciados para seu crescimento e suas funções metabólicas (SILVA, D.D.V. et al., 2011). Desta maneira, objetivando selecionar a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizada, quatro diferentes meios foram testados com células livres da levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. A produção de etanol, biomassa, consumo de xilose, glicose e os parâmetros fermentativos observados nos processos fermentativos encontram-se detalhados na Figura 21 e na Tabela 11. Para a realização dos cálculos utilizou-se o tempo de 48 horas para os meios 1, 2 e 3 e de 72 horas para o meio 4, tempos nos quais observou-se concentração de xilose inferior à 10% da inicial, ou seja, momento final do processo.

A maior produção de etanol foi observada no ensaio utilizando o meio 3, no qual verificou-se 10,3 g/L de etanol. Os melhores valores para o fator de conversão de xilose a etanol ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p) também foram observados neste ensaio, correspondendo à 0,33 g/g e 0,22 g/L.h, respectivamente. Silva D.D.V. et al. (2011) testaram diferentes meios de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar visando a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* e também observaram melhores resultados de $Y_{p/s}$ e Q_p (0,46 g/g e 0,56 g/L.h) utilizando a suplementação do meio com peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio e cloreto de cálcio nas mesmas concentrações que o presente trabalho. De acordo com Pastore, Hasan e Zempulski (2011), fontes de nitrogênio como extrato de levedura, peptona e sulfato de amônio são requeridos para a síntese de aminoácidos, vitaminas, purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos, justificando assim a presença destes compostos na suplementação selecionada. Silva et al. (2012) entre diferentes fontes de nitrogênio concluíram que o extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais importante para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*. De acordo com os autores, este composto formado por aminoácidos, vitamina e magnésio possui efeitos positivos sobre o crescimento, viabilidade e fermentação da levedura.

Figura 21 – Concentrações de xilose, glicose, etanol e biomassa durante os processos fermentativos em diferentes suplementações do hidrolisado hemicelulósico

A principal diferença entre os meios 1 e 3 é a presença de sulfato de amônio e cloreto de cálcio, a qual acarretou melhores produtividades e rendimento, com um aumento de 18% no valor de Y_p/s e 16% em Q_p . Tal favorecimento pode ser atribuído ao fato do sulfato de amônio favorecer o crescimento de leveduras (CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; FELIPE, 2002). Além disso, elementos minerais como o cálcio, também são necessários em concentrações da ordem de miligramas por litro (PELCZAR; REID;

CHAN, 1980), podendo interferir na velocidade da glicólise e na conversão de piruvato a etanol, influenciando diretamente na eficiência da fermentação. Zeng et al. (2010) verificaram que a presença de cloreto de cálcio favorece a produção de etanol por uma linhagem recombinante de *Zymomonas mobilis*. Os autores observaram ainda que a presença deste sal aumentava a estabilidade da membrana celular, uma vez que auxilia na transferência de compostos visando manter o equilíbrio iônico e as funções da membrana citoplasmática. Desta maneira, o cloreto de cálcio pode exercer um papel crucial para a viabilidade celular em meios estressantes como hidrolisados ácidos.

Tabela 11 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos obtidos para os diferentes meios de cultivo testados

Meio	Nutrientes	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	Q_p	Q_x	Q_s
1	Peptona (5,0 g/L) Extrato de levedura (3,0 g/L)	9,2	0,28	0,23	0,19	0,17	0,68
2	Peptona (5,0 g/L) Extrato de levedura (3,0 g/L) Extrato de malte (5,0 g/L)	7,2	0,26	0,24	0,17	0,16	0,65
3	Peptona (5,0 g/L) Extrato de levedura (3,0 g/L) (NH ₄) ₂ SO ₄ (2,0 g/L) CaCl ₂ (0,1 g/L)	10,3	0,33	0,25	0,22	0,17	0,65
4	Extrato de farelo de arroz (10%) (NH ₄) ₂ SO ₄ (3,0 g/L) CaCl ₂ (0,1 g/L)	6,9	0,23	0,23	0,10	0,10	0,42

* $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ encontram-se em g/g e Q_x , Q_p e Q_s encontram-se em g/L.h

Apesar da suplementação necessária variar dependendo do microrganismo e do meio de cultivo utilizado (Silva, J.P.A. et al., 2011) o extrato de levedura e a peptona também mostraram-se nutrientes favoráveis para outras linhagens estudadas para produção de etanol. Laopaiboon et al. (2009) observaram que a suplementação de caldo de sorgo com 3,0 g/L de extrato de levedura e 5,0 g/L de peptona favoreciam a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* NP0, entretanto os autores observaram que a adição de sulfato de amônio juntamente com estes compostos era prejudicial, favorecendo a formação de subprodutos. Bafrncová et al. (1999) verificaram que a adição de extrato de

levedura diminuía em 28 horas o tempo de fermentação à etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Maruthai, Thangavelu e Kanagasabai (2012) analisaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura *Saccharomyces diasticus* em suco de caju e observaram que extrato de levedura e sulfato de amônio apresentavam efeito significativo na fermentação etanólica, aumentando o rendimento e a produtividade

No presente trabalho, a presença de extrato de malte não foi favorável para a produção de etanol, uma vez que observou-se um decréscimo de 22% na produção de etanol (de 9,2 para 7,2 g/L). Os valores de Y_p/s e Q_p verificados foram 0,26 e 0,17, respectivamente, valores relativamente inferiores ao ensaio sem adição de extrato de malte, utilizando somente peptona e extrato de levedura. Tal fato pode ser explicado pela composição do extrato de malte ser 73,1% de maltose, glicose e frutose, sendo que somente a maltose corresponde à 52,2% (CRUEGER; CRUEGER, 1993) assim sendo, apesar de ser uma fonte de nitrogênio, a adição das hexoses presentes no extrato de malte ao meio podem ter prejudicado o metabolismo de xilose.

Não observou-se diferença significativa no Y_x/s apresentado pelos 4 ensaios (0,23; 0,24; 0,25 e 0,23 g/g), demonstrando que as diferentes composições dos meios não interferiram na formação de biomassa, a qual cresceu livremente. Verificou-se ainda que em todos os meios o valor de Y_x/s não foi superior ao valor de Y_p/s , assim sendo os meios utilizados nas condições empregadas não favoreceram o crescimento de biomassa e sim a produção de etanol.

Considerando que a aplicação de nutrientes de baixo custo podem diminuir o custo de produção do etanol e que as fontes de nitrogênio convencionalmente empregadas contribuem com até 50% do custo de produção (ANANDA; VADLANI; MADL, 2011), a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com extrato de farelo de arroz foi verificada. Este nutriente é um subproduto do processamento do grão de arroz, possuindo características interessantes para sua aplicação em processos fermentativos, como alto teor de nitrogênio e proteínas totais (MORO; ROSA; HOELZEL, 2004).

O potencial do emprego do extrato de farelo de arroz foi verificado e aplicado anteriormente por outros autores na produção de xilitol. Por exemplo, Canilha, Carvalho e Almeida e Silva (2005) investigaram a aplicação do extrato de farelo de arroz na produção do poliálcool pela levedura *Candida guilliermondi* a partir de hidrolisado de palha de milho. Os autores observaram maiores produtividades e rendimentos utilizando extrato de

farelo de arroz e sulfato de amônio. Milessi et al. (2011) otimizaram a produção da enzima xilose redutase pela levedura *Candida guilliermondii* empregando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de farelo de arroz, sulfato de amônio e cloreto de cálcio. Entretanto, apesar do potencial e aplicabilidade comprovados por estes autores, no presente trabalho o meio empregando o extrato de farelo de arroz não apresentou resultados promissores, na realidade foi o meio no qual atingiu-se resultados inferiores, 6,9 g/L de etanol com um Yp/s correspondente de 0,23 g/g e Qp de 0,10 g/L.h. Assim sendo apesar da levedura *Candida guilliermondii* apresentar boa adaptação à este nutriente em outros trabalhos, a levedura *S. stipitis* não apresentou bons desempenhos neste meio. Apesar de o extrato de farelo de arroz ser um nutriente de composição rica em proteínas e carboidratos (PARRADO et al., 2006) possui uma composição complexa, sendo assim, as condições utilizadas para a levedura *C. guilliermondii* podem não ser as melhores para a levedura *S. stipitis*.

Desta maneira o meio selecionado para as etapas seguintes foi o meio 3, o qual apresentou resultados mais promissores em etanol e consistiu na suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com peptona (5,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), sulfato de amônio (2,0 g/L) e cloreto de cálcio (0,1 g/L).

4.3 Determinação das condições de imobilização celular

Objetivando estabelecer condições de imobilização da levedura *Scheffersomyces stipitis* pelo método do aprisionamento em gel de alginato de cálcio, um planejamento fatorial completo 2^3 foi realizado investigando a concentração de alginato de sódio, a concentração de cloreto de cálcio e o tempo de cura empregados no processo. A matriz do planejamento, assim como os resultados obtidos, encontram-se na Tabela 12.

Pode-se observar na Tabela 2 que a produção de etanol variou significativamente de 4,88 g/L a 9,90 g/L, assim como as demais variáveis também apresentaram valores variados entre os ensaios realizados. O ensaio que apresentou melhores resultados quanto à produção de etanol foi o ensaio 6 onde se utilizou 2% de alginato, 0,1M de cloreto de cálcio e 24 horas de tempo de cura. Nestas condições onde verificou-se a produção de 9,9 g/L de etanol, um Yp/s de 0,29 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,21 g/L.h.

Tabela 12 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com quatro repetições no ponto central para avaliação da influência das variáveis alginato de sódio (X_1), cloreto de cálcio (X_2) e tempo de cura (X_3) sobre diferentes variáveis resposta após 48 horas de processo.

Ensaio	Valores codificados			Valores Reais			Variáveis Respostas			
	X_1	X_2	X_3	X_1 (%)	X_2 M	X_3 h	Etanol (g/L)	Y_p/s (g/g)	Q_p (g/L.h)	Consumo de Xilose (%)
1	-1	-1	-1	1,0	0,1	12	6,87	0,23	0,143	93,97
2	+1	-1	-1	2,0	0,1	12	7,20	0,26	0,150	90,69
3	-1	+1	-1	1,0	0,2	12	7,68	0,22	0,160	94,45
4	+1	+1	-1	2,0	0,2	12	5,63	0,20	0,117	83,74
5	-1	-1	+1	1,0	0,1	24	7,29	0,21	0,152	99,69
6	+1	-1	+1	2,0	0,1	24	9,90	0,29	0,206	98,66
7	-1	+1	+1	1,0	0,2	24	4,88	0,16	0,102	99,72
8	+1	+1	+1	2,0	0,2	24	4,95	0,17	0,103	97,24
9	0	0	0	1,5	0,15	18	5,09	0,17	0,106	99,68
10	0	0	0	1,5	0,15	18	5,07	0,17	0,106	99,68
11	0	0	0	1,5	0,15	18	5,02	0,16	0,105	99,72
12	0	0	0	1,5	0,15	18	5,15	0,17	0,107	99,75

A assimilação da xilose não foi prejudicada pela presença do suporte de imobilização, uma vez que em todos os ensaios realizados observou-se um consumo de xilose superior à 80%, sendo superior à 90% em 92% dos ensaios. Tal fato é positivo uma vez que demonstra que o suporte não limitou as transferências de massa do substrato, não interferindo negativamente no processo fermentativo.

A concentração de células livres presentes no meio de fermentação no final dos ensaios variou de 6,03 g/L (ensaio 4) à 9,4 g/L (ensaio 9), podendo ser observada na Figura 22.

Figura 22 – Concentração de biomassa livre verificada em cada ensaio do planejamento fatorial

Apesar de observar-se a presença de células livres em todos os ensaios realizados, os fatores investigados não apresentaram influência sobre este fato. A presença de células livres caracteriza o sistema como um sistema de células livres e imobilizadas. Este comportamento foi também observado por Nigam (2000), os quais utilizando *k*-carragenina como suporte de imobilização, observou a presença de células livres em sistema imobilizado de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de etanol a partir de abacaxi em conserva. Carvalho et al. (2002a) observaram a presença de células livres de *Candida guilliermondii* na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando aprisionamento em gel de alginato de cálcio. Santos et al. (2005b) observaram o crescimento de 12,0 g/L de células livres de *Candida guilliermondii* na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator de leito fluidizado empregando células da levedura imobilizadas em partículas de vidro poroso. De acordo com Carvalho et al. (2003) tal comportamento é observado devido ao aparecimento de poros na superfície do gel de alginato de acordo com o crescimento microbiano imobilizado, assim as células passam por estes poros e crescem livremente no meio. Desta maneira, a eficiência de imobilização foi definida a partir da Equação 8 a qual expressa a razão entre biomassa imobilizada (X_{im}) e a biomassa total (X_{total}) que compreende células livres e imobilizadas. A Figura 23 compreende os valores da biomassa imobilizada, biomassa total no sistema e da eficiência de imobilização ao final dos ensaios fermentativos.

Figura 23 – Eficiência de imobilização, biomassa imobilizada e biomassa total no sistema ao final dos ensaios.

Os fatores investigados neste trabalho não apresentaram influência na eficiência de imobilização do sistema, a qual também não apresentou influência na produção de etanol. Quan, Fan e Ohta (2003) observaram uma taxa de imobilização de 16% da levedura *Candida krusei* imobilizada em gel de alginato de cálcio visando a produção de fitase em reator de coluna de vidro. Já Carvalho et al. (2003) observaram uma taxa de imobilização de 70% da levedura *Candida guilliermondii* imobilizada em gel de alginato de cálcio na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Desta maneira, a taxa de imobilização vai depender do microrganismo utilizado e das condições de fermentação empregadas, as quais podem favorecer o desprendimento de células do suporte para crescerem livres no meio, como elevadas agitações, as quais representam condições de maior turbulência e maiores tensões, podendo favorecer o desprendimento de células e instabilidade das esferas.

Diante do considerável desprendimento celular observado nos ensaios realizados no planejamento fatorial completo, o diâmetro das esferas de células imobilizadas foi acompanhado visando observar variações nas características do suporte, perda de massa e rompimento das esferas devido às condições experimentais utilizadas. A Figura 24 apresenta os diâmetros das esferas verificados durante os ensaios fermentativos.

Figura 24 – Variação do diâmetro das esferas de células imobilizadas em alginato de cálcio durante o processo fermentativo (dm=diâmetro médio).

De acordo com os valores apresentados na Figura 24, observou-se que não houve uma variação elevada no diâmetro dos *pellets* de células imobilizadas durante as 72 horas de processo, além disso, não identificou-se diferença significativa entre os *pellets* utilizados em diferentes condições de imobilização, apresentando valores entre 3,48 mm à 3,53 mm em todos os ensaios do planejamento fatorial. Desta maneira, o suporte utilizado mostrou-se estável às condições fermentativas empregadas em hidrolisado hemicelulósico, apresentando um o diâmetro médio das esferas em torno de 3,5 mm. Esta estabilidade é positiva uma vez que reforça o potencial do emprego deste gel em sistemas de bateladas repetidas.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o software STATGRAPHICS 16.1.11. As estimativas de efeitos de cada fator para cada variável resposta considerada

(Concentração de etanol, Yp/s, Qp e Consumo de Xilose) podem ser observadas na Tabela 13.

Tabela 13 – Estimativas de efeitos dos fatores concentração de alginato de sódio (X_1), concentração de cloreto de cálcio (X_2) e tempo de cura (X_3) para as variáveis respostas

Fator	Etanol, Yp/s, Qp e Consumo de Xilose			
	Estimativa de efeito			
	Etanol	Yp/s	Qp	Consumo de Xilose
X_1	0,238358	0,0238226	0,004965	-4,375
X_2	-2,03452	-0,0596525	-0,042386	-1,965
X_3	-0,0900945	-0,0197152	-0,001877	8,115
$X_1 * X_2^{**}$	-1,23224	-0,0313702	-0,025672	-2,22
$X_1 * X_3^{**}$	1,10244	0,0197206	0,022968	2,62
$X_2 * X_3^{**}$	-1,6538	-0,0233792	-0,034454	1,27

** $X_1 * X_2$, $X_1 * X_3$ e $X_2 * X_3$ são as interações entre os fatores investigados

As interações de terceira ordem não encontram-se presentes na Tabela 13 pois não foram significativas para todas as variáveis resposta estudadas. As Figuras de 25 à 28 apresentam os Gráficos de Pareto para cada variável resposta.

Figura 25 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta concentração de etanol

Figura 26 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Y_p/s

Figura 27 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Q_p

Figura 28 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta consumo de xilose

A partir da análise dos gráficos de Pareto, podemos observar que o único fator significativo à nível de 95% de confiança foi o tempo de cura na variável resposta consumo de xilose, sendo ideal em seu nível positivo. Os demais fatores investigados não apresentaram influência nas demais variáveis respostas. Diante deste fato, a análise de

variância e nível de significância para cada variável resposta foi realizada e pode ser observadas nas Tabelas de 14 à 17.

Tabela 14 – Análise de variância e significância para a concentração de etanol

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	19,35	7	2,76	1,40	0,3908
X ₁	0,113629	1	0,113629	0,06	0,8219
X ₂	8,27853	1	8,27853	4,21	0,1096
X ₃	0,016234	1	0,016234	0,01	0,9320
X ₁ *X ₂ **	3,03683	1	3,03683	1,54	0,2821
X ₁ *X ₃ **	2,43075	1	2,43075	1,23	0,3288
X ₂ *X ₃ **	5,4701	1	5,4701	2,78	0,1708
X ₁ *X ₂ *X ₃	0,00321971	1	0,00321971	0,001	0,9697
Curvatura	7,87	1	7,87	2676,20	<0,0001*
Total error	7,87402	4	1,96851		
Total (corr.)	27,2233	11			

* significativo à nível de confiança 95%.

Tabela 15 – Análise de variância e significância para o Yp/s

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	0,013	7	0,001842	1,06	0,5067
X ₁	0,001135	1	0,001135	0,65	0,4638
X ₂	0,007116	1	0,007116	4,11	0,1127
X ₃	0,000777	1	0,000777	0,45	0,5397
X ₁ *X ₂ **	0,001968	1	0,001968	1,14	0,3466
X ₁ *X ₃ **	0,000777	1	0,000777	0,45	0,5396
X ₂ *X ₃ **	0,001093	1	0,001093	0,63	0,4716
X ₁ *X ₂ *X ₃	0,000025	1	0,000025	0,01	0,9087
Curvatura	0,006855	1	0,006855	261,89	0,0005*
Total error	0,006933	4	0,001733		
Total (corr.)	0,019827	11			

* significativo à nível de confiança 95%.

Tabela 16 – Análise de variância e significância para o Qp

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	0,008398	7	0,001200	1,40	0,3908
X ₁	0,000049	1	0,000050	0,058	0,8219
X ₂	0,003593	1	0,003593	4,21	0,1096
X ₃	0,000007	1	0,000007	0,008	0,9320
X ₁ *X ₂ **	0,001318	1	0,001318	1,54	0,2821
X ₁ *X ₃ **	0,001055	1	0,001055	1,23	0,3288
X ₂ *X ₃ **	0,002374	1	0,002374	2,78	0,1708
X ₁ *X ₂ *X ₃	0,000001	1	0,000001	0,002	0,9697
Curvatura	0,003414	1	0,003414	2676,2	<0,0001*
Total error	0,003418	4	0,000854		
Total (corr.)	0,012	11			

* significativo à nível de confiança 95%.

Tabela 17 – Análise de variância e significância para o Consumo de Xilose

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	208,99	7	29,86	1,84	0,2907
X ₁	38,28	1	38,28	2,36	0,1997
X ₂	7,72	1	7,72	0,48	0,5285
X ₃	131,71	1	131,71	8,10	0,0466*
X ₁ *X ₂ **	9,86	1	9,86	0,61	0,4796
X ₁ *X ₃ **	13,73	1	13,73	0,84	0,4101
X ₂ *X ₃ **	3,23	1	3,23	0,20	0,6790
X ₁ *X ₂ *X ₃	4,47	1	4,47	0,28	0,6277
Curvatura	65,01	1	65,01	56124	<0,0001*
Total error	65,01	4	16,25		
Total (corr.)	274,01	11			

* significativo à nível de confiança 95%.

Nas Tabelas de 14 à 17, X₁ corresponde á concentração de alginatto, X₂ à concentração de cloreto de cálcio e X₃ ao tempo de cura. De acordo com os resultados observados nas análises de variância (Tabelas 14, 15, 16 e 17), estimativas de efeito e Gráfico de Pareto, pode-se observar que a concentração de alginato não foi significativa para nenhuma variável resposta analisada, uma vez que os valores de p-value foram superiores à 0,05 (95% de confiança) sendo assim, este fator não influencia no processo. A concentração de cloreto de cálcio também não se mostrou significativa, apresentando valores de p-value de 0,1096; 0,1127; 0,1096 e 0,5285 para as variáveis concentração de etanol, Yp/s, Qp e consumo de xilose, respectivamente. Porém, o fator tempo de cura mostrou-se significativo à um nível de 95% de confiança em relação ao consumo de xilose, indicando que maiores valores de consumo de xilose são obtidos por esferas submetidas à elevados tempos de cura.

Observou-se falta de ajuste do modelo (p-value > 0,05) e uma curvatura significativa para todas as variáveis resposta (Tabelas 14, 15, 16 e 17), não sendo possível expressar o comportamento destas variáveis em relação aos fatores investigados por um modelo matemático confiável na região estudada.

A Figura 29 apresenta o comportamento de cada variável resposta analisada para cada nível dos fatores investigados, ou seja, a tendência de cada variável quando se aumenta ou diminui um determinado fator.

Figura 29 – Tendência das variáveis respostas para os níveis positivo e negativo dos fatores investigados

A Tabela 18, desenvolvida a partir da Figura 29, sumariza o nível adequado de cada fator investigado para cada variável resposta, ou seja, apresenta em qual nível dos fatores (+1 ou -1) as respostas obtidas apresentariam valores mais elevados.

Tabela 18 – Nível adequado de acordo com a tendência de cada fator investigado para cada variável resposta

	Fator		
	X ₁	X ₂	X ₃
	Alginato	CaCl ₂	Tempo de Cura
Etanol	+	-	-
Yp/s	+	-	-
Qp	+	-	-
Consumo de Xilose	-	-	+
Condições Ideais	+	-	-

De acordo com a Tabela 17, as condições ideais para o processo de imobilização dentro da região estudada seriam 2,0 %, 0,1 M e 12 horas para o alginato de sódio, cloreto de cálcio e tempo de cura, respectivamente. Carvalho et al. (2002a) analisaram condições de imobilização da levedura *Candida guilliermondii* visando a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Estes autores também observaram melhores resultados utilizando-se 2% de alginato de sódio e cloreto de cálcio 0,1M.

De acordo com Domínguez et al. (1999) concentrações mais elevadas de alginato de sódio durante o processo de imobilização aumentam a estabilidade química do sistema em hidrolisados hemicelulósicos. Najafpour, Younesi e Ismail (2004) avaliaram diferentes concentrações de alginato de sódio na imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol. Os autores concluíram que dentre as concentrações investigadas, 2% mostrou-se a mais vantajosa uma vez que era estável o suficiente sem afetar a transferência de massa. De acordo com os autores, esferas com 1,5% ou menos de alginato são rompidas facilmente e esferas com altas concentrações do gel (6%) apesar de resistentes acarretam problemas de difusão e transferência de massa. Assim sendo, no presente trabalho os fatores investigados foram fixados para as etapas seguintes à serem realizadas em seus níveis positivo (+1) para o alginato de sódio, negativo (-1) para o cloreto de cálcio e negativo (-1) para o tempo de cura, ou seja, 2%, 0,1M e 12 horas.

4.4 Avaliação da influência da concentração de células imobilizadas e da agitação na produção de etanol

Objetivando avaliar a influência da concentração de células utilizadas no processo de imobilização e da agitação utilizada no processo fermentativo sobre a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, um planejamento fatorial completo 2^2 foi realizado investigando o efeito destes fatores na obtenção de etanol pela levedura *S. stipitis* imobilizada. A matriz do planejamento realizado assim como os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 com quatro repetições no ponto central para avaliação da influência da concentração celular na imobilização (X_1) e agitação (X_2) sobre diferentes variáveis resposta após 48 horas de processo

Ensaio	Valores codificados		Valores reais		Variáveis Resposta				
	X_1	X_2	X_1 (g/L)	X_2 (rpm)	Etanol (g/L)	Y_p/s (g/g)	Q_p (g/L.h)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Imobilização (%)
1	-1	-1	3,0	100	5,30	0,21	0,110	75,6	30,1
2	+1	-1	10,0	100	8,90	0,33	0,185	84,5	42,5
3	-1	+1	3,0	300	5,04	0,18	0,105	91,3	20,2
4	+1	+1	10,0	300	4,77	0,15	0,099	99,9	11,3
5	0	0	6,5	200	5,67	0,18	0,118	90,9	29,5
6	0	0	6,5	200	5,99	0,21	0,125	86,3	22,2
7	0	0	6,5	200	4,62	0,20	0,096	77,9	27,6
8	0	0	6,5	200	5,24	0,16	0,109	91,6	25,5

Em todas as condições estudadas observou-se que a levedura foi capaz de assimilar a xilose e produzir etanol, variando consideravelmente o teor de etanol produzido entre os ensaios realizados de 4,62 g/L no ensaio 7 à 8,9 g/L no ensaio 2. Este ensaio se destaca por apresentar os melhores resultados entre os ensaios do planejamento realizado, um valor de

$Y_{p/s}$ de 0,33 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,19 g/L.h valores os quais são similares aos observados com células livres.

Assim como nas etapas anteriores deste trabalho, observou-se a formação de um sistema de células livres e imobilizadas, a concentração de biomassa livre nos ensaios pode ser observada na Figura 30.

Figura 30 – Concentração de biomassa livre verificada em cada ensaio do planejamento fatorial realizado

Pode-se observar que a concentração de células livres foi influenciada pela agitação utilizada. Utilizando-se maiores agitações (300 rpm) verificou-se um maior crescimento celular do que quando se utilizou baixas agitações (100 rpm). Tal comportamento deve-se ao desvio do metabolismo para a produção de biomassa devido à grande disponibilidade de oxigênio. Este comportamento está de acordo com Laplace et al. (1991) que afirmam que sob condições de excesso de oxigênio, o piruvato sofre um desvio para o ciclo do ácido tricarboxílico em detrimento da via fermentativa, aumentando a concentração de biomassa e não de etanol. Observou-se ainda maiores concentrações celulares nos ensaios onde as esferas de gel foram submetidas à imobilização utilizando-se 10 g/L de células, uma vez que a presença de mais células dentro dos pellets acarreta uma maior liberação das mesmas no meio de cultivo.

O diâmetro médio das esferas de gel de alginato de cálcio, assim como no planejamento anterior, não sofreu variação nos ensaios realizados, permanecendo em torno de 3,5 mm em todos os experimentos, destacando a viabilidade e estabilidade do suporte empregado para futura aplicação em sistema de batelada repetida.

As estimativas de efeitos de cada fator para cada variável resposta podem ser observadas na Tabela 20.

Tabela 20 – Estimativas dos efeitos dos fatores concentração de células (X_1) e agitação (X_2) nas as variáveis resposta concentração de etanol, Y_p/s , Q_p , consumo de Xilose e eficiência de imobilização

Fator	Estimativa de efeito				
	Etanol	Y_p/s	Q_p	Consumo de Xilose	Eficiência
X_1	1,660	0,046	0,035	8,75	1,75
X_2	-2,197	-0,102	-0,046	15,55	-20,55
$X_1 * X_2$	-1,935	-0,079	-0,040	-0,15	-10,65

* $X_1 * X_2$ é a interação entre os fatores investigados

A Figura 31 apresenta o Gráfico de Pareto para o Etanol baseado em um nível de confiança de 95% (t crítico = 2,7764).

Figura 31 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Etanol

A Tabela 21 apresenta a análise de variância (ANOVA) e nível de significância para a concentração de etanol.

Tabela 21 – Análise de variância e significância para a o Etanol

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	11,33	3	3,78	8,23	0,0347*
X ₁	2,75672	1	2,75672	6,01	0,0704
X ₂	4,82661	1	4,82661	10,52	0,0316*
X ₁ *X ₂	3,74496	1	3,74496	8,16	0,0461*
Curvatura	0,79	1	0,79	2,26	0,2295
Total error	1,05	3	0,35		
Total (corr.)	13,164	7			

* significativo à nível de confiança 95%.

Para a variável resposta concentração de etanol, os fatores que mostraram-se significativos à nível de confiança 95% foram a agitação e a interação entre os fatores agitação e concentração celular, as quais apresentaram um valor de p-value inferior à 0,05. A agitação apresentou um efeito negativo sobre esta variável (Tabela 20), ou seja maiores produções de etanol são observadas utilizado-se menores agitações. Já o fator concentração celular (X₁) não foi significativo à 95% de confiança, entretanto este fator à 90% de confiança é significativo, uma vez que seu p-value foi menor que 0,1, possuindo um efeito positivo na produção de etanol, corroborando com o efeito negativo da interação.

O modelo aplicado mostrou-se significativo em 95% de confiança (p-value = 0,0347) sem falta de ajuste. Como a curvatura não foi significativa (p-value = 0,2295), o comportamento da variável etanol em função dos fatores investigados pode ser representado pelo modelo da Equação 9, Onde X₁ e X₂ são valores codificados das variáveis concentração celular e agitação, respectivamente.

$$\text{Etanol} = 5,68964 + 0,830168 \cdot X_1 - 1,09848 \cdot X_2 - 0,967595 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad \text{Equação (9)}$$

O maior valor absoluto do coeficiente relativo à agitação utilizada demonstra que esta variável é o fator que mais influencia a produção de etanol na faixa estudada. A Figura 32 apresenta a superfície de resposta e as curvas de nível correspondentes a variável Etanol em função dos fatores investigados. Observa-se que, caso o objetivo seja maximizar a produção de etanol, estudos abrangendo menores agitações e maiores densidades celulares devem ser realizados. Entretanto, em tais condições a viabilidade operacional do processo pode não ser viável.

Figura 32 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à concentração de etanol em função dos fatores investigados

A Figura 33 apresenta o Gráfico de Pareto para o fator Yp/s baseado em um nível de confiança de 95% (t crítico = 2,7764).

Figura 33 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Yp/s

A Tabela 22 apresenta a análise de variância (ANOVA) e nível de significância para o fator Yp/s.

Tabela 22 – Análise de variância e significância para a variável Yp/s

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	0,019	3	0,00627	7,28	0,0425*
X ₁	0,00212	1	0,00212	2,46	0,1916
X ₂	0,010	1	0,010	12,07	0,0255*
X ₁ *X ₂	0,00629	1	0,00629	7,31	0,0539
Curvatura	0,001947	1	0,001947	3,90	0,1428
Total error	0,001497	3	0,000499		
Total (corr.)	0,022	7			

* significativo à nível de confiança 95%.

Assim como para a variável resposta concentração de etanol, o fator agitação (X₂) mostrou-se significativo à nível de confiança 95% , uma vez que o valor de p-value foi menor que 0,05 (Tabela 22). Já à 90% de confiança, a interação entre os fatores mostrou-se significativa em seu nível negativo (p-value <0,1). Entretanto, o fator concentração celular não foi significativo para esta variável resposta, uma vez que apresentou um p-value de 0,1916.

O modelo aplicado mostrou-se significativo em 95% de confiança (p-value = 0,0425) sem falta de ajuste. Como a curvatura não foi significativa à nível de 90% de confiança (p-value = 0,1428), o comportamento da variável Yp/s em função das variáveis estudadas pode ser representado pelo modelo apresentado na Equação 10, Onde X₁ e X₂ são valores codificados das variáveis concentração celular e agitação, respectivamente.

$$Y_{p/s} = 0,203842 + 0,0230281 * X_1 - 0,0509695 * X_2 - 0,0396574 * X_1 * X_2 \quad \text{Equação (10)}$$

A variável agitação é o fator que exerce maior influência sobre a conversão de xilose em etanol, a Figura 34 apresenta a superfície de resposta e as curvas de nível correspondentes ao valor de Yp/s em função dos fatores investigados. Assim como para a concentração de etanol, caso o objetivo seja maximizar o Yp/s, maiores estudos abrangendo menores agitações e maiores densidades celulares devem ser realizados, uma vez que a região onde os valores desta variável são mais elevados tendem para esta região do gráfico.

Figura 34 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes ao valor de Y_p/s em função dos fatores investigados

A Figura 35 apresenta o Gráfico de Pareto para a produtividade volumétrica (Q_p) baseado em um nível de confiança de 95% (t crítico = 2,7764).

Figura 35 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta Q_p

A Tabela 23 apresenta a análise de variância (ANOVA) e nível de significância para a produtividade volumétrica (Q_p).

Tabela 23 – Análise de variância e significância para Q_p

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	0,004917	3	0,001639	8,23	0,0347*
X_1	0,001196	1	0,001196	6,01	0,0704
X_2	0,002095	1	0,002095	10,52	0,0316*
$X_1 * X_2$	0,001625	1	0,001625	8,16	0,0461*
Curvatura	0,000342	1	0,000342	2,26	0,2295
Total error	0,000454	3	0,000151		
Total (corr.)	0,005714	7			

* significativo à nível de confiança 95%.

O fator agitação e a interação entre os fatores agitação e concentração celular mostraram-se novamente significativos à nível de confiança 95%, uma vez que apresentaram p-value inferior à 0,05. Já o fator concentração celular (X_1) pode ser considerado significativo à 90% de confiança, pois observou-se p-value de 0,0704, ou seja, o valor de p-value foi inferior à 0,1. Desta maneira, como à partir da Tabela 20 observa-se que o efeito da agitação é negativo, assim como a interação entre os fatores, com o elevação da concentração celular imobilizada e decréscimo da agitação maiores produtividades devem ser obtidas.

O modelo do comportamento de Q_p em função das variáveis investigadas é significativo e encontra-se apresentado na Equação 11, onde X_1 e X_2 são valores codificados das variáveis concentração celular e agitação, respectivamente. A curvatura do modelo não foi significativa, uma vez que apresentou um p-value de 0,2295.

$$Q_p = 0,118534 + 0,0172952 * X_1 - 0,0228849 * X_2 - 0,0201582 * X_1 * X_2 \quad \text{Equação (11)}$$

A partir da Equação 11 pode-se observar que a variável que mais influencia a produtividade volumétrica é a agitação utilizada, tal fato pode ser afirmado uma vez que este fator (X_2) apresenta o maior coeficiente relativo da equação (0,022). A Figura 36 apresenta a superfície de resposta e as curvas de nível correspondentes à produtividade volumétrica em função dos fatores investigados.

Figura 36 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à Q_p em função dos fatores investigados

A Figura 37 apresenta o Gráfico de Pareto para o consumo de xilose, baseado em um nível de confiança de 95% (t crítico = 2,7764).

Figura 37 – Gráfico de Pareto correspondente à variável resposta consumo de xilose

A Tabela 24 apresenta a análise de variância (ANOVA) e nível de significância para o Consumo de Xilose.

Tabela 24 – Análise de variância e significância para a o Consumo de Xilose

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	318,39	3	106,13	3,48	0,1297
X ₁	76,56	1	76,56	2,51	0,1881
X ₂	241,80	1	241,80	7,93	0,0480*
X ₁ *X ₂	0,022	1	0,022	0,0007	0,9796
Curvatura	2,65	1	2,65	0,067	0,8131
Total error	119,25	3	39,75		
Total (corr.)	440,28	7			

* significativo à nível de confiança 95%.

De acordo com a ANOVA apresentada na Tabela 24, a agitação do sistema apresentou p-value inferior à 0,05 (p-value = 0,048) sendo assim significativa à nível de confiança de 95% no processo, apresentando influência positiva sobre o consumo de substrato uma vez que seu efeito foi positivo. Assim sendo, para maiores agitações maior a assimilação da pentose. Entretanto, para as demais variáveis resposta, a agitação apresentou efeito negativo, conforme pode ser observado na Tabela 20. Desta maneira, apesar da diferença observada entre o consumo de xilose nos ensaios realizados, a obtenção de maiores valores para as demais variáveis estudadas é prioridade quando comparada ao consumo de xilose, uma vez que o objetivo é a produção de etanol. Percebe-se assim que, apesar da agitação ser significativa em seu nível positivo para o consumo de xilose, o emprego de menores agitações no sistema nas condições analisadas são mais adequadas para as demais variáveis estudadas. O modelo proposto para o consumo de xilose não foi significativo, uma vez que seu valor de p-value foi superior à 0,05 (p-value = 0,1297) apesar de não apresentar curvatura, não podendo ser utilizado para expressar o comportamento da variável resposta.

A Figura 38 apresenta o Gráfico de Pareto para a eficiência de imobilização baseado em um nível de confiança de 95% (t crítico = 2,7764).

Figura 38 – Gráfico de Pareto correspondente à variável Eficiência de imobilização

A Tabela 25 apresenta a análise de variância (ANOVA) e nível de significância para a eficiência de imobilização.

Tabela 25 – Análise de variância e significância para a eficiência de imobilização

<i>Source</i>	<i>Sum of Squares</i>	<i>Df</i>	<i>Mean Square</i>	<i>F-Ratio</i>	<i>P-Value</i>
Modelo	538,79	3	179,60	24,43	0,0049
X ₁	3,06	1	3,06	0,42	0,5538
X ₂	422,30	1	422,30	57,45	0,0016*
X ₁ *X ₂	113,42	1	113,42	15,43	0,0171*
Curvatura	0,061	1	0,061	0,00626	0,9419
Total error	29,34	3	9,78		
Total (corr.)	568,19	7			

* significativo à nível de confiança 95%.

A eficiência de imobilização é significativamente influenciada pela agitação (X₁) a qual apresentou p-value inferior à 0,05. De acordo com os resultados obtidos, em condições de maiores agitações a eficiência de imobilização do sistema diminui. Tal fato pode ser explicado por uma maior turbulência e tensões físicas do sistema devido à elevada agitação. Embora a concentração celular não influencie esta variável resposta, sua interação com a agitação é significativa em seu nível negativo (Tabela 20). O modelo do comportamento da eficiência de imobilização em função dos fatores investigados é significativo e encontra-se apresentado na Equação 12, onde X₁ e X₂ são valores codificados das variáveis concentração celular e agitação, respectivamente. A curvatura do modelo não foi significativa (p-value = 0,9419).

$$\text{Eficiência} = 26,1125 + 0,875 \cdot X_1 - 10,275 \cdot X_2 - 5,325 \cdot X_1 \cdot X_2 \quad \text{Equação (12)}$$

A variável agitação apresentou um coeficiente relativo significativamente mais elevado que as demais variáveis, conforma pode ser observado na Equação 12. Desta maneira, a agitação do sistema está intimamente ligada com a eficiência de imobilização. Em maiores agitações diversos fatores como turbulência, forças mecânicas e de cisalhamento contribuem para a instabilidade do suporte e liberação de células livres no meio. Assim sendo, maiores valores de eficiência de imobilização serão observadas no nível inferior de agitação (100 rpm). A Figura 39 apresenta a superfície de resposta e as curvas de nível correspondentes à eficiência de imobilização e demonstra essa tendência.

Figura 39 - Superfície de resposta e curvas de nível referentes à eficiência de imobilização em função dos fatores investigados

A Tabela 26 expressa o teste de validade dos modelos propostos para cada variável resposta.

Tabela 26 - Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta estudadas pelas equações 9, 10, 11 e 12

Variáveis resposta	Condições de cultivo			
	[X] = 10 g/L; 100 rpm		[X] = 10 g/L; 300 rpm	
	Resposta Prevista	Resposta experimental	Resposta Prevista	Resposta Experimental
Etanol	8,6	8,45	4,45	4,41
Yp/s	0,32	0,31	0,14	0,14
Qp	0,180	0,176	0,093	0,092
Eficiência	42,6	42,9	11,4	10,9

A partir dos dados apresentados na Tabela 22, observa-se que os modelos propostos para as variáveis respostas analisadas previram os resultados experimentais obtidos eficientemente com 95% de confiança.

De acordo com os resultados observados na análise de variância, estimativas de efeito e Gráficos de Pareto, pode-se observar que, o fator agitação é o fator que mais influencia no processo, sendo de efeito significativo todas as variáveis respostas. A interação entre a agitação e a concentração celular mostrou-se outro fator de importância. A Figura 40 apresenta a tendência de cada variável resposta analisada com o aumento ou diminuição dos os níveis de cada fator investigado.

Figura 40 – Tendência das variáveis respostas para os níveis positivo e negativo dos fatores investigados, onde [X] corresponde à concentração celular

A Tabela 27 apresenta o nível adequado de cada fator para cada variável baseado na Figura 40, ou seja, as condições ideais de células imobilizadas e agitação para cada variável.

Tabela 27 – Nível adequado de cada fator investigado para cada variável resposta

	Fator	
	X ₁	X ₂
	Concentração celular	Agitação
Etanol	+	-
Yp/s	+	-
Qp	+	-
Consumo de Xilose	+	+
Eficiência	+	-
Condições Ideais	+	-

Desta maneira, para as etapas seguintes os fatores investigados foram fixados em seus níveis positivo (10,0 g/L) para a concentração de células imobilizadas, e negativo (100 rpm) para a agitação durante o processo fermentativo.

O emprego de maiores concentrações celulares no processo fermentativo é um fator interessante e uma vantagem do emprego de células imobilizadas, uma vez que proporcionam maiores rendimentos e produtividades, apresentando tempos de fermentação mais curtos e eficientes do que aqueles observados em processos utilizando menores concentrações celulares (NAGODAWITHANA; STEINKRAUS, 1975).

A vantagem de aplicar-se maiores concentrações celulares em processos fermentativos é um fato concreto observado por outros autores. Agbogbo et al. (2007) observaram que altas concentrações iniciais de células aumentam a taxa de assimilação de xilose e a formação de etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS6054 em meio sintético, atingindo um valor de Yp/s de 0,38 g/g quando utilizadas 6,5 g/L iniciais da levedura livre. Matsushika e Sawayama (2010) avaliaram a influencia de diferentes concentrações iniciais da levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* MA-R4 na assimilação de xilose e concluíram que altas concentrações da levedura acarretam um aumento na assimilação de xilose e na produção de etanol. Os autores observaram os índices mais elevados de consumo de xilose e produção de etanol (2,58 g/L.h e 0,83 g/L.h, respectivamente)

empregando-se 13,1 g/L de células livres. Entretanto, de acordo com estes autores, deve-se tomar cuidado ao empregar-se elevadas densidades celulares uma vez que extremas concentrações celulares podem favorecer a formação de subprodutos, como o xilitol, prejudicando a produção de etanol. No presente trabalho não observou-se a formação deste poliálcool como subproduto do processo fermentativo, desta maneira a fixação da densidade celular imobilizada mostrou-se viável em seu nível positivo do planejamento (+1), ou seja 10 g/L.

A agitação é um parâmetro de grande importância em um processo fermentativo, interferindo diretamente na taxa de transferência de nutrientes e oxigênio no processo (LIU; SHEN, 2008). A aplicação de agitação em um processo fermentativo resulta em uma melhor homogeneização do meio e mantém um gradiente entre o interior e o exterior da célula, facilitando a entrada de nutrientes e a saída de gases e outros produtos do catabolismo celular (RODMUI; KONGKIATTIKAJORN; DANDUSITAPUN, 2008) De acordo com Skoog and Hahn-Hägerdal (1990) o oxigênio disponível no sistema desempenha um importante papel no metabolismo da levedura *S. stipitis* interferindo diretamente no crescimento celular, balanço redox, funcionalidade da mitocôndria e na geração de energia para o transporte de xilose. Ainda Gamarra, Cuevas e Lescano (1986) afirmam que a agitação do sistema é responsável pela rápida eliminação de CO₂ e de etanol do interior das esferas em sistemas imobilizados.

Silva, Mussato e Roberto (2010) investigaram a interferência da agitação na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado de palha de arroz e observaram um desvio do metabolismo da levedura para a produção de biomassa com o aumento da agitação empregada no sistema. Os autores afirmam que a fonte de carbono disponível no processo é dividida entre a formação de biomassa e a formação de produto, a qual é fortemente influenciada pelo oxigênio disponível no sistema. Rodmui, Kongkiattikajorn e Dandusitapun (2008) analisando diferentes valores de agitação (de 0 à 200 rpm) para a produção de etanol por cultura mista de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* a partir de uma mistura de xilose e glicose observaram que melhores níveis de etanol eram obtidos em agitações mais baixas, atingindo resultados mais elevados em 50 rpm (Yp/s = 0,38 g/g). Desta maneira, a agitação foi fixada em seu nível negativo do planejamento (-1), ou seja 100 rpm para as etapas seguintes do presente trabalho, caracterizando um sistema microaerado, favorecendo a formação de etanol em relação à biomassa e garantindo a estabilidade do suporte de imobilização devido à menores tensões relacionadas.

4.5 Avaliação da estabilidade do sistema imobilizado em bateladas repetidas

O emprego de sistemas com células imobilizadas apresenta a vantagem de proporcionar fácil recuperação dos biocatalisadores, uma vez que duas fases distintas (células e meio fermentativo) encontram-se dispostas no processo (ZHAO; XIA, 2010). Considerando esta facilidade de separação da biomassa, a condução de processos com células imobilizadas em sistema de bateladas repetidas mostra-se um procedimento promissor, possibilitando maiores produtividades e eficiências devido à adaptação da célula ao meio (SANTOS, 2005).

Visando avaliar a estabilidade operacional das células imobilizadas sob as condições determinadas anteriormente neste trabalho, ensaios fermentativos em sistema de bateladas repetidas foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 40 mL de meio e 10 mL de biocatalisadores. Realizou-se cinco ciclos fermentativos sob condição de agitação determinada anteriormente, à 30°C por 48 h (tempo final de fermentação e produção máxima de etanol observado nos ensaios realizados nas etapas anteriores). Ao final de cada batelada o meio fermentado foi recuperado e as células imobilizadas foram reutilizados para nova fermentação, após adição de novo meio preparado.

O suporte de gel de alginato de cálcio mostrou-se estável às repetições, uma vez que não observou-se variação significativa no diâmetro das esferas de gel assim como não ocorreu cisalhamento ou deformação das esferas após 5 repetições de processo, demonstrando o potencial do emprego deste suporte para a imobilização celular.

O acompanhamento das concentrações de xilose, etanol e biomassa nas bateladas repetidas em função do tempo de processo encontram-se nas Figuras 41, 42 e 43.

Figura 41 – Acompanhamento da concentração de xilose em função do tempo durante as bateladas repetidas.

Figura 42 – Acompanhamento da concentração de etanol em função do tempo durante as bateladas repetidas

Figura 43 – Acompanhamento da concentração de biomassa livre em função do tempo durante as bateladas repetidas

A partir da Figura 41, pode-se observar um favorecimento do consumo de xilose com a seqüência dos ciclos fermentativos. No primeiro ciclo 43,9% da pentose havia sido consumida em 24 horas de processo e 92,1% após 48 horas. Já na terceira batelada, observou-se um consumo de 66,1% em 24 horas e 99,9% após 48 horas. Esta maior assimilação de xilose pode ser atribuída à adaptação da levedura ao meio de cultura, amenizando efeitos inibitórios do meio e favorecendo a obtenção do produto de interesse (Santos et al., 2005b). Entretanto, após a terceira batelada observou-se xilose residual nas bateladas seguintes (3,1 g/L e 5,3 g/L, respectivamente) demonstrando possível estresse celular. Nuanpeng et al. (2011) também observaram a presença de açúcar residual na produção de etanol por bateladas repetidas. Utilizando a levedura *Saccharomyces*

cerevisiae NP 01 livre em 8 bateladas repetidas em caldo de sorgo, estes autores verificaram que a partir da segunda batelada, açúcar residual era observado no final da fermentação.

Zhao e Xia (2010) verificaram a produção de etanol em sistema de batelada repetida a partir de hidrolisado de palha de milho pela levedura recombinante *S. cerevisiae* ZU-10 imobilizada em alginato de cálcio. Os autores observaram que após bateladas repetidas, o consumo de xilose podia ser mantido em taxas superiores à 92,1% e a concentração final de etanol se estabilizou. Os autores atribuíram esta estabilidade à adaptação da levedura ao hidrolisado e à estabilidade em relação à compostos inibidores proporcionada pela presença do suporte, o qual agiu como uma barreira protetora.

No primeiro ciclo observou-se uma produção mais baixa de etanol em relação aos ciclos fermentativos seguintes, este comportamento pode ser atribuído ao fato das células ainda não estarem completamente adaptadas ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Nos ciclos seguintes, observou-se um aumento na produção de etanol, significando maior adaptação da levedura ao meio. Carvalho et al. (2002b) observaram comportamento semelhante na produção de xilitol por sistema de batelada repetida pela levedura *Candida guilliermondii* imobilizada em alginato de cálcio a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Na primeira batelada verificaram uma produção de 2,3 g/L do poliálcool nas primeiras 12 horas de fermentação. Já nas bateladas seguintes este valor aumentou significativamente para 9,2; 8,7; 9,2 e 8,8 g/L. Os autores atribuem esse aumento na eficiência após a primeira batelada não só à adaptação celular mas também à possíveis limitações de crescimento das células imobilizadas, maximizando a produção de xilitol devido à limitada transferência de massa de oxigênio para as células imobilizadas, às quais cessaram o crescimento após a primeira batelada.

O acompanhamento da concentração de biomassa imobilizada pode ser observado na Figura 44, assim como a eficiência de imobilização durante o processo encontra-se na Figura 45.

Figura 44 – Acompanhamento da concentração de biomassa livre e imobilizada em função do volume reacional durante as bateladas repetidas

Figura 45 – Acompanhamento da eficiência de imobilização durante as bateladas repetidas

A caracterização de um sistema de células livres e imobilizadas foi evidente, entretanto a presença de células livres no meio de fermentação durante a primeira batelada foi menor, uma vez que para as bateladas de 2 à 5 células livres pertencentes ao ciclo anterior possivelmente já estavam presentes no meio no tempo inicial do processo, acarretando maiores valores de biomassa. Ariyajaroenwong et al. (2012) observaram comportamento similar na produção de etanol a partir de caldo de sorgo pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em talo de sorgo. De acordo com os autores, o suporte contendo as leveduras imobilizadas age como um inóculo para a batelada seguinte na produção de etanol.

Como pode ser observado na Figura 44, a concentração de células imobilizadas em gel de alginato de cálcio em relação ao volume de meio de fermentação aumentou consideravelmente durante a primeira batelada (de 0,5 g/L à 2,9 g/L). Entretanto, assim como observado por Carvalho et al. (2002b) nas bateladas seguintes a concentração de biocatalizador imobilizado manteve-se constante. Os autores afirmam que tal comportamento acontece porque as esferas de gel utilizadas atingiram a capacidade máxima de retenção celular em apenas uma batelada, justificando assim a maior liberação de células livres nas bateladas seguintes.

A concentração inicial de células livres nas bateladas de 2 à 5 foram similares, indicando que o desprendimento de células da levedura imobilizada do gel de alginato de cálcio em cada batelada foi praticamente constante. Laopaiboon e Laopaiboon (2012) observaram comportamento semelhante na produção de etanol a partir de caldo de sorgo pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em caroço de milho. Os autores observaram um desprendimento por volta de 6,5 células por mL de meio em cada repetição de 8 bateladas repetidas.

Como pode ser observado na Figura 45, ao iniciar-se uma nova batelada, ou seja, retirar o meio fermentado e substituir por um novo meio rico em xilose, a presença de células livres no meio era praticamente inexistente, caracterizando um sistema completamente imobilizado. Entretanto no decorrer do processo a eficiência de imobilização foi diminuindo devido à liberação de células livres no meio. Pode-se observar que com o aumento do número de bateladas o valor da eficiência de imobilização diminuiu gradativamente, de 44% para 36%, tal fato deve-se à estagnação do crescimento de células imobilizadas e maior crescimento de biomassa livre com o tempo de fermentação.

A substituição do meio fermentado contendo etanol pelo novo meio da batelada seguinte, rico em xilose não mostrou interferência por inibição do substrato ou produto nas células de *S. stipitis*. De acordo com Jamuna e Ramakrishna (1992) a presença do suporte de imobilização no sistema pode atuar como uma camada protetora ao redor do microrganismo reduzindo a concentração do produto no microambiente imediato do microrganismo, diminuindo assim a inibição pelo produto. Estes autores afirmam ainda que a inibição pelo substrato é contornada pois a taxa de fermentação se iguala ou excede a difusão de açúcares pela matriz do gel.

Os parâmetros fermentativos referentes às cinco bateladas repetidas realizadas podem ser observados na Tabela 28.

Tabela 28 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos para o sistema de bateladas repetidas

Batelada	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	Q_p	Q_x	Q_s
1	6,14	0,21	0,16	0,13	0,09	0,60
2	8,22	0,30	0,19	0,18	0,11	0,58
3	9,49	0,29	0,18	0,20	0,12	0,67
4	6,10	0,18	0,21	0,13	0,14	0,65
5	4,49	0,10	0,21	0,09	0,13	0,63

* $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ encontram-se em g/g e Q_x , Q_p e Q_s encontram-se em g/L.h

A partir da terceira batelada observou-se um decaimento no valor de $Y_{P/S}$ e um aumento no valor de $Y_{X/S}$, significando um desvio de metabolismo da produção de etanol para a produção de biomassa devido às condições limitantes ou estressantes no meio (como repetição de ciclos) ou ainda às limitações de transferência de massa devido à elevada densidade celular. Silva et al (2003) observaram comportamento semelhante na produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* imobilizada em vidro poroso. Os autores atingiram melhores níveis e produtividade deste poliálcool nas primeiras bateladas. De acordo com os autores, uma possível explicação seria o *wash-out* das células durante a troca do meio de fermentação entre cada ciclo.

A produtividade volumétrica de etanol (Q_p) também sofreu um decréscimo a partir de terceira batelada, atingindo uma diminuição de 55% entre a terceira e a última bateladas realizadas. Ercan, Irfan e Mustafa (2012) observaram resultados semelhantes utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. Os autores realizaram cinco bateladas repetidas utilizando como fonte de carbobo extrato de *Ceratonia siliqua* L., uma árvore perene da região mediterrânea, e observaram que após a terceira batelada a produção de etanol era desfavorecida.

Sendo assim, o gel de alginato mostrou-se estável em sistema de bateladas repetidas e a levedura *S. stipitis* mostrou-se capaz de produzir etanol neste tipo de condução de processo, assimilando xilose à etanol nas cinco bateladas realizadas, entretanto após a terceira batelada um decréscimo da capacidade fermentativa foi observado, devido à

presença do suporte, estresse celular e limitações de oxigênio, demonstrando que nestas condições o sistema foi efetivo e estável na realização de três bateladas repetidas.

4.6 Ensaios para produção de etanol em biorreator STR tipo cesta

De acordo com Cascaval, Galaction e Rotaru (2011), a taxa de bioconversão em sistemas heterogêneos é consideravelmente mais baixa do que as observadas em meios homogêneos devido à diminuição radical da concentração de substrato dentro da partícula do biocatalizador. Assim sendo, os biorreatores do tipo tanque com agitação (STR) são os mais utilizados em processos envolvendo células livres, tanto em escala industrial quanto em escala laboratorial, devido às inúmeras vantagens que este tipo de biorreator proporciona, como o fácil controle das condições de fermentação e o alto grau de homogeneização do meio (RIVALDI; SARROUH; SILVA, 2008).

Desta maneira, após a avaliação da estabilidade do sistema imobilizado em incubadora com movimento rotatório, iniciou-se teste em biorreator de bancada. Utilizou-se fermentador Bioengineering (Wald, Suíça) com capacidade para 2,4L. O sistema foi empacotado para minimizar as tensões de cisalhamento geradas, caracterizando um reator de mistura tipo cesta. A Figura 46 apresenta a cesta utilizada nos experimentos e a Figura 47 apresenta o sistema montado no fermentador.

Figura 46 – Cesta utilizada para acomodar as células imobilizadas no biorreator STR tipo cesta

Figura 47 – Esquema ilustrativo e fotografia do biorreator tipo cesta

Ensaio fermentativos em meio sintético e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foram realizados empregando-se 1,2L de volume de meio reacional. O meio sintético e o hidrolisado foram suplementados como descrito anteriormente no Item 3.4. A temperatura do processo foi mantida a 30 °C, pH inicial 5,5 e 100 rpm. O acompanhamento dos teores de açúcares, produtos e biomassa durante os processos encontram-se na Figura 48. A máxima produção de etanol foi observada após 48 horas de processo em ambos os ensaios e encontram-se na Tabela 29 juntamente com os parâmetros fermentativos referentes à cada ensaio.

Tabela 29 – Produção de etanol e Parâmetros fermentativos obtidos após 48 horas de cultivo de células imobilizadas em biorreator STR tipo cesta

Meio	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	Q_p	Q_x	Q_s
Sintético	6,97	0,21	0,08	0,145	0,06	0,66
Hidrolisado	7,30	0,21	0,08	0,152	0,07	0,71

* $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ encontram-se em g/g e Q_x , Q_p e Q_s encontram-se em g/L.h

Figura 48 – Concentrações de xilose, glicose, etanol, xilitol e biomassa livre em biorreator STR tipo cesta utilizando meio sintético (A) e hidrolisado (B)

A partir da Figura 48, pode-se observar comportamentos muito semelhantes entre os ensaios empregando-se meio sintético e hidrolisado hemicelulósico. Em ambos os processos não foi verificada a presença de xilose residual final, indicando que o suporte utilizado não acarretou dificuldades de transferência de massa de substrato e a levedura *S. stipitis* imobilizada pode assimilar a pentose sem dificuldades. Entretanto em 48 horas de processo ainda encontrava-se em torno de 5,0 g/L de xilose no meio sintético, enquanto em hidrolisado hemicelulósico esta pentose já havia sido totalmente consumida no mesmo intervalo. Esta maior taxa de consumo de substrato (Q_s) em hidrolisado hemicelulósico (7,6% maior) pode ser atribuída ao aumento do pH do meio durante o processo, o qual atingiu pH 6 em 12 horas de processo, enquanto em meio sintético o pH era 5,5 (Figura 49). Este aumento de pH no meio baseado em hidrolisado hemicelulósico deve-se ao consumo do ácido acético presente no meio. Ferrari et al. (1992) verificaram que, apesar da presença do ácido acético em sua forma não dissociada ser de grande toxicidade ao metabolismo microbiano, o aumento sucessivo do pH do meio de 5 para 5,5 ou 6,0 favorece a fermentação dos açúcares. Pode-se ainda atribuir esta diferença à uma possível menor estabilidade do suporte de imobilização frente ao hidrolisado hemicelulósico se comparado ao meio sintético, favorecendo o transporte do substrato pelos poros do suporte e atingindo o biocatalisador mais facilmente.

Figura 49 – Variação do pH durante os ensaios fermentativos em meio sintético e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A produção de etanol em ambos os ensaios foi praticamente a mesma, observando-se uma produção ligeiramente mais elevada em hidrolisado hemicelulósico (7,3 g/L). Entretanto não observou-se diferença entre os fatores de conversão de xilose à etanol ($Y_{p/s}$) e biomassa ($Y_{x/s}$), os quais atingiram valores de 0,21 g/g e 0,08 g/g, respectivamente em ambos os ensaios, observando reprodutibilidade do comportamento em meio sintético com o hidrolisado. Desta maneira, o emprego do hidrolisado hemicelulósico não prejudicou a produção de etanol pelo sistema imobilizado, sendo de grande potencial para o estudo. A Tabela 30 apresenta a eficiência de imobilização.

Tabela 30 – Biomassa livre, imobilizada em função do volume do reator e eficiência de imobilização nos ensaios realizados

Meio	Biomassa livre (g/L)		Biomassa Imobilizada (g/L)		Eficiência de Imobilização (%)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Sintético	0,002	3,63	0,299	1,316	99,5	28,7
Hidrolisado	0,006	5,24	0,278	1,695	98,1	26,4

Observa-se na Tabela 30 uma maior eficiência de imobilização em meio sintético que em hidrolisado. Assim como uma maior liberação de células livres no meio utilizando-se hidrolisado. Tais evidências validam a possível menor estabilidade do suporte em frente à natureza ácida e complexidade do hidrolisado, entretanto este fenômeno não prejudicou o processo uma vez que observou-se reprodutibilidade nos ensaios. Além disso, não verificou-se variação no diâmetro das esferas ou cisalhamento das mesmas, sendo o sistema adequado para o empacotamento de microrganismos imobilizados.

Em ambos os ensaios observou-se uma pequena produção de xilitol, entretanto não foi significativa uma vez que o Y_p/s mais elevado foi de 0,07 g/g em meio sintético, o qual corresponde à uma eficiência de 7%. Este pequeno desvio do metabolismo para a produção deste poliálcool ocorre de acordo com as condições de aeração e disponibilidade de oxigênio uma vez que em condições limitantes de oxigênio a formação de xilitol é favorecida pelo acúmulo de NADH e subsequente inibição da enzima xilitol desidrogenase (PRAKASHAM; RAO; HOBBS 2009). De acordo com Carvalho et al. (2003) a ocorrência de condições de limitação de oxigênio em microrganismos imobilizados em gel de alginato pode ser atribuída à possível formação de zonas anaeróbicas dentro das esferas de gel. Segundo os autores, estas zonas seriam responsáveis por prejudicar o transporte de xilose e consequentemente a eficiência do processo.

Entretanto, apesar destes obstáculos, o biorreator STR tipo cesta com microrganismos imobilizados já foram utilizados na produção de etanol por outros autores e apresentaram resultados promissores utilizando outros microrganismos e outros substratos.

Gamarra, Cuevas e Lescano (1986) analisaram a produção de etanol a partir de glicose comercial em biorreator STR tipo cesta pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio. Os autores observaram taxas de produção mais elevadas e rápidas do que as observadas com células livres, atingindo uma produtividade volumétrica de 7,4 g/L.h durante o processo. Rotaru, Galaction e Cascaval (2012) estudaram a produção de etanol por células de *S. cerevisiae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio a partir de glicose comercial utilizando biorreator STR tipo cesta. Os autores observaram uma conversão de xilose à etanol de 0,36 g/g (71% em relação ao teórico) e concluíram que o emprego do biorreator tipo cesta neste caso poderia estender o processo fermentativo para até 9 bateladas repetidas utilizando os mesmos biocatalizadores.

As vantagens proporcionadas pelo biorreator STR foram estudadas ainda por Ercan, Irfan e Mustafa (2012). Os autores analisaram a produção de etanol por células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* em biorreator STR convencional, sem emprego de uma cesta. A levedura foi imobilizada em alginato de cálcio e extrato de *Ceratonia siliqua* L. foi utilizado como substrato. Entretanto, apesar de atingirem níveis consideráveis de etanol (0,46 g/g), os autores observaram que em elevadas agitações as esferas sofriam abalos devido às forças físicas e se rompiam, não podendo ser aproveitadas em ensaios posteriores. Tal desvantagem não foi observada no presente trabalho uma vez que o emprego da cesta no biorreator STR previne este acontecimento.

Apesar dos resultados promissores encontrados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não foram encontrados relatos até então na literatura utilizando *S. stipitis* em biorreator STR tipo cesta. Van Zyl e Prior (1988) estudaram a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis* livre em biorreator STR. Os autores observaram um Yp/s de 0,38 g/g e uma produtividade de 0,25 g/L.h. Nigam (2001) analisou a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo pela levedura *S. stipitis* livre em biorreator de mistura em escala laboratorial e observaram uma conversão da pentose em etanol de 0,41 g/g. Silva, J.P. et al (2011) em meio composto por xilose comercial atingiu uma conversão de 0,32 g/g e produtividade correspondente de 0,32g/L.h utilizando *S. stipitis* em biorreator de mistura.

Quando comparada à levedura *S. stipitis* utilizada em sua forma livre, os resultados apresentados no presente trabalho ainda apresentam desvantagens em relação à produtividade e eficiência do processo, entretanto o emprego de sistema de bateladas repetidas na condução do processo é uma vantagem que pode contornar essa diferença e aumentar a viabilidade do processo.

4.7 Avaliação do sistema imobilizado em bateladas repetidas em biorreator tipo cesta

Após os ensaios preliminares de familiarização com o biorreator tipo cesta utilizado e a reprodutibilidade dos resultados obtida utilizando-se hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, a estabilidade do sistema imobilizado foi avaliada operando o biorreator SRT tipo cesta em sistema de batelada repetida. Estes ensaios foram reforçados uma vez

que a levedura imobilizada mostrou-se capaz de produzir etanol em sistemas de bateladas repetidas em agitador rotatório.

Foram realizadas cinco bateladas repetidas com duração de 48 horas cada, tempo no qual foi observada máxima produção de etanol e consumo total de xilose nos ensaios anteriores realizados neste trabalho, definindo 48 horas como o tempo final do processo, no qual o meio fermentado foi retirado do biorreator e substituído por um meio novo de hidrolisado rico em xilose e nutrientes.

As bateladas repetidas foram realizadas empregando-se 100 mL de biocatalizador imobilizados em gel de alginato de cálcio e 1100 mL de volume de hidrolisado suplementado, resultando em um volume total de 1200 mL no biorreator. As condições de cultivo foram ajustadas para pH inicial de 5,5, agitação de 100 rpm e temperatura de 30°C. O acompanhamento das concentrações de xilose, etanol, biomassa, pH e os parâmetros fermentativos referentes às bateladas repetidas encontram-se na Tabela 31 e nas Figuras 50, 51, 52 e 53.

Figura 50 – Concentração de xilose durante as bateladas repetidas em biorreator

Figura 51 – Concentração de etanol durante as bateladas repetidas em biorreator.

Figura 52 – Concentração de biomassa livre durante as bateladas repetidas em biorreator

Figura 53 – Acompanhamento do pH durante as bateladas repetidas em biorreator

Tabela 31 – Produção de etanol e parâmetros fermentativos para o sistema de bateladas repetidas em biorreator tipo cesta após 48 horas de processo em cada batelada

Batelada	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	Q_p	Q_x	Q_s
1	7,20	0,22	0,088	0,15	0,066	0,67
2	7,80	0,24	0,082	0,16	0,071	0,67
3	5,90	0,20	0,073	0,12	0,060	0,61
4	5,01	0,19	0,197	0,10	0,120	0,54
5	3,46	0,12	0,076	0,07	0,046	0,44

* $Y_{X/s}$ e $Y_{p/s}$ encontram-se em g/g e Q_x , Q_p e Q_s encontram-se em g/L.h

Conforme pode ser observado na Figura 50, diferentemente do comportamento observado nas bateladas repetidas realizadas em agitador rotatório, nas quais observou-se um aumento na velocidade de assimilação da xilose, nos ensaios realizados em biorreator observou-se uma diminuição na porcentagem de substrato assimilado, ou seja, um aumento na xilose residual. Enquanto nas duas primeiras bateladas a xilose foi totalmente consumida em 48 horas de processo, a partir da terceira batelada um acúmulo final de substrato passou a ser observado, apresentando uma concentração de xilose residual de 13% (4,7 g/L) na terceira batelada, 24% na quarta batelada e 42% na quinta batelada. Tal comportamento pode ser explicado pela limitação de oxigênio causada pela formação de zonas anaeróbias dentro dos pellets, a qual prejudica o transporte de xilose assim como descrito anteriormente por Carvalho et al. (2003). Comportamento semelhante foi observado por SANTOS (2005) utilizando células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em zeólitas para a produção de xilitol em biorreator de leite fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico em de bagaço de cana-de-açúcar. O autor observou um decréscimo do consumo de xilose de 69% para 40% da primeira para a terceira batelada repetida e atribuiu tal comportamento ao fornecimento escasso de oxigênio, uma vez que a concentração celular teria aumentado ao longo das bateladas fazendo com que a quantidade de oxigênio fosse insuficiente, contornando a situação com o aumento da aeração do sistema.

Em todas as bateladas repetidas realizadas observou-se a produção de etanol, atingindo o valor máximo (7,8 g/L) durante a segunda batelada. Entretanto, após as bateladas seguintes observou-se uma queda considerável na produção de etanol, a qual pode estar relacionada com a existência de xilose residual, uma vez que a formação de etanol está diretamente conectada à assimilação de xilose, e com o desvio do metabolismo para a produção de biomassa, uma vez que observou-se um aumento considerável na biomassa livre na quarta batelada, chegando à 5,7 g/L, como pode ser observado na Figura 45. Desta maneira, diferentemente do esperado, o fator de rendimento de xilose à etanol ($Y_{p/s}$) e a produtividade volumétrica (Q_p) dos ensaios foram diminuindo sistematicamente, mostrando uma possível diminuição do metabolismo celular e da capacidade fermentativa.

Rotaru, Galaction e Cascavel (2012) estudando a produção de etanol a partir de glicose por células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em gel de alginato de cálcio em biorreator STR tipo cesta, observaram uma redução do valor de $Y_{p/s}$ de 0,36 para 0,30 após sete bateladas repetidas. Os autores atribuíram este acontecimento ao acúmulo de

etanol dentro das esferas após as primeiras bateladas, causando inibição pela presença de etanol nas bateladas seguintes. Assim como descrito pelos autores, no presente trabalho observou-se um aumento na produção de etanol durante os dois primeiros ciclos fermentativos e um decréscimo a partir do terceiro ciclo. Este comportamento pode ser explicado pela hipótese de inibição pela presença de etanol dentro dos pellets, uma vez que se as condições utilizadas durante a fermentação não facilitaram a saída deste produto para fora das esferas, a concentração de etanol dentro do suporte poderia ultrapassar o limite suportado pela levedura *S stipitis*, superando os benefícios da adaptação celular ao meio de fermentação e prejudicando a capacidade fermentativa da levedura.

Observou-se uma eficiência final de imobilização de 35,95% após o término da quinta batelada, eficiência esta que era de 100% no início do processo. Infelizmente devido ao design do biorreator não foi possível realizar o acompanhamento da eficiência de imobilização durante as bateladas repetidas realizadas. Entretanto quando comparada a eficiência de imobilização final observada após as bateladas repetidas em biorreator e em agitador rotatório, valores similares são observados (35,95% e 36,36%, respectivamente), demonstrando que, assim como em fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer, o suporte de alginato foi estável nas cinco bateladas repetidas realizadas em biorreator, havendo liberação similar de células livres no meio e não apresentando variação no diâmetro das esferas entre o início e o final do processo.

Apesar do consumo de sais de amônio, como o sulfato de amônio, presentes no meio causarem uma diminuição no pH, pode-se observar uma elevação do pH ao longo do processo fermentativo em todas as bateladas repetidas, indo de um pH inicial 5,5 para em torno de 7,0 em todos os ensaios. Tal comportamento pode ser atribuído ao consumo de ácido acético pela levedura *S stipitis*, o qual foi observado em todos os ensaios, diminuindo a concentração de íons H^+ no meio e conseqüentemente aumentando o pH. Este comportamento foi observado por outros autores empregando a levedura *S stipitis* em hidrolisados hemicelulósicos, por exemplo Rodrigues, Kenealy e Jeffries (2011) também observaram um aumento do pH do meio de fermentação devido ao consumo de ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de milho utilizando a levedura *S stipitis*. Agbogbo e Wenger (2007) também em hidrolisado hemicelulósico de palha de milho observaram este comportamento da levedura *S stipitis*. Canilha et al (2010) observaram consumo total do ácido acético presente no meio pela levedura *S stipitis* livre em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Os autores afirmaram que o fato da levedura *S stipitis* consumir ácido acético apesar deste composto ser um inibidor

metabólico demonstra a versatilidade e potencial desta levedura em assimilar variadas fontes de carbono. Felipe et al. (1995), observaram que baixas concentrações de ácido acético, como no presente trabalho a qual foi de 1,03 g/L, favoreciam a fermentação de xilose pela levedura *Candida guilliermondii* em meio semi-sintético. Larsson et al. (1999) também demonstraram que baixas concentrações de ácido acético favoreciam a produção de etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A condução de processos em sistemas de bateladas repetidas tem apresentado resultados promissores com diferentes microrganismos na obtenção de diferentes produtos. Por exemplo, Ma et al. (2008) utilizaram processo conduzido em batelada repetida para o tratamento biológico de licor negro pelo basidiomiceto *Fomitopsis* SP. IMER2 e obtiveram resultados promissores utilizando-se 12 ciclos consecutivos. Mussato, Rodrigues e Teixeira (2009) produziram β -frutofuranosidase pelo fungo *Aspergillus japonis* imobilizado em fibra vegetal em sistema de bateladas repetidas com oito ciclos de repetição. Ercan, Irfan e Mustafa (2012) estudaram a produção de etanol a partir de extrato de *Ceratonia siliqua* L. pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada em alginato de cálcio e concluíram que a levedura era capaz de manter a capacidade fermentativa por cinco ciclos repetidos, apresentando valores de Yp/s em torno de 0,41 g/g ou superior em todas as bateladas.

Infelizmente, o presente trabalho apresentou eficiências de fermentação e produtividades volumétricas consideravelmente baixas quando comparadas às obtidas com células livres, além disso um decréscimo considerável de produtividade à partir da terceira batelada foi observado. Apesar disto, analisando o processo isoladamente, assim como nos ensaios utilizando-se frascos Erlenmeyer, observou-se a possibilidade da operação do processo em três bateladas repetidas, nas quais observou-se capacidade fermentativa da levedura. Assim sendo, uma alternativa para contornar esta baixa produtividade apresentada e estender o número de ciclos do processo seria a otimização das condições utilizadas na condução do processo em biorreator STR tipo cesta, uma vez que no *scale-up* de um bioprocessos nem sempre as condições estabelecidas para frascos são as ideais em escalas maiores, podendo assim serem contornadas as situações de limitação de oxigênio e inibição pelo substrato observadas neste trabalho.

A Tabela 32 apresenta uma comparação entre os diferentes sistemas estudados no presente trabalho visando a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

. Tabela 32 – Comparação entre os diferentes sistemas utilizados para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após 48 horas de processo.

	<i>S. stipitis</i>	Bateladas	Etanol g/L	Yp/s g/g	Qp g/L.h	ε (%)
Erlenmeyer	Livre	Simples	10,3	0,33	0,22	71,7
	Imobilizada	Simples	9,9	0,29	0,21	63,0
	Imobilizada	Repetidas*	9,5	0,29	0,20	65,2
Biorreator STR tipo cesta	Imobilizada	Simples	7,3	0,21	0,15	45,6
	Imobilizada	Repetidas**	7,8	0,24	0,16	52,2

Onde ε é a eficiência da fermentação quando comparada ao Yp/s teórico.

* resultados obtidos durante a terceira batelada repetida

**resultados obtidos durante a segunda batelada repetida

Conforme pode ser observado na Tabela 32, os resultados obtidos com o uso de células imobilizadas não reproduziram os resultados observados utilizando-se a levedura *S. stipitis* em sua forma livre. Observa-se que utilizando-se frascos Erlenmeyer o fator de conversão de xilose à etanol não ultrapassou 91% do observado com células livres, entretanto valores de produtividades similares foram observados. De acordo com Santos (2005) ao se utilizar células imobilizadas em frascos Erlenmeyer, as partículas sólidas em movimento nos frascos podem auxiliar em uma maior dissolução do oxigênio no meio, resultando em desvio metabólico para a produção de biomassa. Entretanto no presente trabalho não observou-se diferença significativa entre as biomassas livres finais dos ensaios realizados em frascos Erlenmeyer, correspondendo a 8,8 g/L para células livres e 8,7 e 7,3 g/L para células imobilizadas em batelada simples e batelada repetida, respectivamente. Assim sendo, a diferença observada na produção de etanol deve-se provavelmente às limitações de transferência da massa e oxigênio devido à presença do suporte.

De acordo com a Tabela 32, verifica-se que uma maior eficiência de fermentação foi obtida operando-se o biorreator STR tipo cesta em sistema de bateladas repetidas, entretanto os valores obtidos para os ensaios fermentativos realizados em biorreator mostraram-se consideravelmente inferiores aos observados em frascos Erlenmeyer. A comparação dos resultados obtidos no presente trabalho com dados da literatura é dificultada, uma vez que até o presente momento não foram encontrados trabalhos

empregando a levedura *S. stipitis* imobilizada em sistema de batelada repetida em biorreator tipo cesta, entretanto acredita-se que com maiores investigações e otimização das condições do processo em biorreator, os valores ligeiramente menores de rendimento e produtividade podem ser contornados com o emprego do sistema de bateladas repetidas.

5. CONCLUSÕES

Considerando que o aumento do fator de rendimento e da produtividade de etanol de segunda geração em larga escala ainda é um desafio dentro da biotecnologia, os resultados obtidos no presente trabalho permitiram aumentar o conhecimento de parâmetros importantes neste processo fermentativo, assim sendo, conclui-se que:

- O processo de destoxificação utilizado no presente trabalho para remoção de compostos inibidores ao metabolismo microbiano mostrou-se eficiente na remoção destes compostos, entretanto apresentou a desvantagem de perda de volume e substrato durante o processo;
- Pode-se afirmar que é possível a produção de etanol de segunda geração à partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 imobilizada em gel de alginato de cálcio;
- O meio composto pela suplementação do hidrolisado com extrato de levedura, peptona, sulfato de amônio e cloreto de cálcio foi o meio mais efetivo para a produção de etanol;
- A concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio e tempo de cura não mostraram-se significativos para a produção de etanol na região estudada, sendo fixados em 2% de alginato de sódio, 0,1M de cloreto de cálcio e 12 horas de tempo de cura;
- O aumento na agitação utilizada no processo fermentativo influencia negativamente o fator de conversão de xilose em etanol assim como a produtividade dentro da faixa estudada. Tal fato deve-se ao desvio metabólico para produção de biomassa causada por condições de maior aeração;
- A agitação utilizada durante a fermentação mostrou-se um fator significativo na produção de etanol por células imobilizadas, assim como sua interação com

a concentração de células imobilizadas, fatores os quais a partir de análise estatística foram definidos em 100 rpm e 10 g/L de células, dentro da região estudada;

- Os modelos empíricos propostos para as variáveis resposta em função dos fatores agitação e concentração celular foram capazes de prever os resultados obtidos experimentalmente, estando assim devidamente ajustados;
- A velocidade de consumo de xilose aumenta ao longo dos ciclos de repetição em bateladas repetidas utilizando células imobilizadas em gel de alginato de cálcio quando o processo é operado em frascos Erlenmeyer;
- Operando-se em sistema de batelada repetida em biorreator STR tipo cesta com células imobilizadas nas condições utilizadas, observa-se um aumento na xilose residual a cada batelada repetida e decréscimo da eficiência e produtividade do processo, fato o qual pode ser atribuído à limitação de oxigênio e à possível inibição pela concentração de etanol dentro das esferas de células imobilizadas;
- O sistema imobilizado mostrou-se estável na condução em bateladas repetidas tanto em frascos Erlenmeyer quanto em biorreator STR tipo cesta, não apresentando variação no diâmetro das esferas, cisalhamento das mesmas, ou variação nas características do suporte;
- O sistema imobilizado apresentou capacidade fermentativa para a produção de etanol em até três bateladas repetidas, após as quais houve queda de rendimento em ambas as escalas;
- Os resultados obtidos utilizando-se células imobilizadas no presente trabalho não foram superiores aos observados utilizando-se células livres em frascos Erlenmeyer. Este fato pode ser atribuído à limitações de transferência de massa e oxigênio, podendo ser contornadas pela otimização do processo conduzido em bateladas repetidas.

REFERÊNCIAS

AÇIKALIN, K.; KARACA, F.; BOLAT, E. Pyrolysis of pistachio shell: Effects of pyrolysis conditions and analysis of products. **Fuel**, v.95, p.169-177, 2012.

AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.; JEFFRIES, T.W. The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136-140, p.653-662, 2007.

AGBOGBO, F.K.; WENGER, K.S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.723-727, 2007.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismos envolvidos na Biodegradação de Materiais Lignocelulósicos e aplicações tecnológicas correlativas. **Química Nova**, v.34, n.10, p.1729-1738, 2011.

AKPINAR, O.; ERDOGAN, K.; BOSTANCI, S. Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. **Carbohydrate Research**, v.344, p.660-666, 2009.

ALAVÉS-RAMIREZ, R.; MONTES-GARCÍA, P.; MARTÍNEZ-REYES, J.; ALTAMIRANO-JUÁREZ, D.C.; GOCHI-PONCE, Y. The use of sugarcane bagasse ash and lime to improve the durability and mechanical properties of compacted soil blocks. **Construction and Building Materials**, v.34, p.296-305, 2012.

ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70/72, p.89-98, 1998.

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRÓ, M.J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4851-4861, 2010.

AMORIM, H.V.; LOPES, M.L.; OLIVEIRA, J.V.C.; BUCKERIDGE, M.S.; GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.91, p.1267-1275, 2011.

AMUTIO, M.; LOPEX, G.; AGUADO, R.; ARTETXE, M.; BILBAO, J.; OLAZAR, M. Kinetic study of lignocellulosic biomass oxidative pyrolysis. **Fuel**, v.95, p.305-311, 2012.

ANANDA, N.; VADLANI, P.; MADL, R.L. Rice bran extract is an effective substitute for yeast extract in ethanol fermentation. **Journal of biobased materials and bioenergy**, v.5, n.1, p.70-74(5), 2011.

ARIYAJAREARNWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, L. Repeated-batch ethanol production from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sweet sorghum stalks. **Energies**, v.5, p.1215-1228, 2012.

BABOUKANI, B.S.; VOSSOUGH, M.; ALEMZADEH, I. Optimization of dilute-acid pretreatment conditions for enhancement sugar recovery and enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biosystems Engineering**, v.111, p.166-174, 2012.

BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D.; SLÁVIKOVÁ, I.; PÁTKOVÁ, J.; DOMÉNY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.21, p.337-341, 1999.

BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v.26, p.89-105, 2008.

BAK J.S.; KIM M.D.; CHOI I.G.; KIM K.H. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. **New Biotechnology**, v.30, p.424-434, 2010

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v.86, p.2273-2282, 2009.

BALLESTEROS, I.; NEGRO, M.J.; ALIVA, J.M.; CABANAS, A.; MANZANARES, P. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.129-132, p.496-508, 2006.

BANERJEE, G.; CAR, S.; SCOTT-CRAIG, J.S.; HODGE, D.B.; WALTON, J.D. Alkaline peroxide pretreatment of corn stover effects of biomass, peroxide and enzyme loading and composition on yields of glucose and xylose. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.16, 2011.

BARON, G.; WILLAERT, R.G.; BACKER, L. Immobilized cell reactors. In: BARON, G.; WILLAERT, R.G.; BACKER, L. (eds) **Immobilized Living cell systems: Modelling and experimental Methods**. John Wiley & Sons Ltd, p.67-95, 1996.

BETANCUR, G.J.V. **Avanços em biotecnologia de hemicelulose para produção de etanol por *Picchia stipitis***. 123p. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from microalgae – A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.557-577, 2010

BRUINENBERG, P.M.; DE-BOT, P.H.M.; VAN-DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.256-260, 1984.

BUABAN, B.; INOUE, H.; TANAPONGPIPAT, S.; RUANGLEK, V.; CHAMPREDA, V.; PICHYANGKURA, R.; RENGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L. Bioethanol production from ball-milled bagasse using an on-site produced fungal enzyme cocktail and xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.110, n.1, p.18-25, 2010.

BUHNER, J.; AGBLEVOR, F.A. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.119, p.13-30, 2004.

CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências farmacêuticas**, v.38, n.3, p.323-331, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat straw hemicellulosic hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.1087-1093, 2005.

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

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: Hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.333-336, 2008.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M.F.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da Biomassa Lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n.44, p.48-53, 2009.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010.

CANILHA, L.; SANTOS, V.T.O.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A.M.F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.1467-1475, 2011.

CAPUNITAN, J.A.; CAPAREDA, S.C. Assessing the potential for biofuel production of corn stover pyrolysis using a pressurized batch reactor. **Fuel**, v.95, p.563-572, 2012.

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

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, O.J.; GUTIÉRREZ, L.F. **Process Synthesis for fuel production**. New York: CRC Press, 2009. p.131-153.

CARVALHO, W. **Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 108 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2000.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M.V.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; SILVA, M.B.; MANCILHA, I.M. Use of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Cell Immobilization Conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p. 489- 496, 2002a.

CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Improvement in Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Achieved by Use of a Repeated-Batch Immobilized Cell System. **Z Naturforsch C.**, v.57, n.1-2, p.109-112, 2002b.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.553-9, 2003.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S. S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v.39, n.12, p.2135-41, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, v.23, p.60-10, 2006.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v.31, p.493-498, 2008.

CASCAVAL, D.; GALACTION, A.I.; ROTARU, R. Effect of glucose internal diffusion on alcoholic fermentation in a stationary basket bioreactor with immobilized yeast cells. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, n.3, p.6200-6208, 2011.

CERQUEIRA-LEITE, R.C.; LEAL, M.R.L.V.; CORTEZ, L.A.B.; GRIFFIN, W.M.; SCANDIFFIO, M.I.G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol?. **Energy**, v.34, p.655-661, 2009.

CHAMPAGNE, P. Bioethanol from agricultural waste residues. **Environmental Progress**, n.27, p.51-57, 2008.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v.98, p.1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; SILVA, S.S.; CARVALHO, W.; SINGH, O.V. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.87, p.11-20, 2011

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of “Biofuel”. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, p.1289-1303, 2011.

CHANDEL, A.K.; ANTUNES, F.A.F.; ARRUDA, P.V.; MILESSI, T.S.S.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: State-of-the-art. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K.(eds), **D-Xylitol: fermentative production, application and commercialization**. Heidelberg: Springer, 2012. ISBN: 978-3-642-31886-3

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 92 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2010.

CHIBATA, I.; TOSA, T. Use of immobilized cells. **Annual Review of Biophysics & Bioengineering**, v.10, p.197-216, 1981.

CHO, D.H.; SHIN, S.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y.H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.101, p.4947-4951, 2010.

COELHO, T.C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol**. 90 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2007.

CONAB 2012/2013 – Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Disponível em

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_08_10_14_57_19_boletim_can_a_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf>. Acesso em 04 de Setembro de 2012.

CORREIA, M.F. **Produção de bioetanol a partir de licor de cozimento ao sulfito ácido**. 98 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, 2008.

CORTEZ, D.V. **Permeabilização de Células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol**. 125p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2010.

COVIZZI, L.G. **Seleção de um Suporte Sintético para imobilizar células do *Botryosphaeria rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas**. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, n.2, p.143-160, 2007.

CRUEGER, W.; CRUEGER, A. **Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology**, Sunderland: Sinauer Associates Inc, 1993. 368 p.

CRUZ, J. M.; DOMINGUEZ, J. M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.67, p.147–153, 1999.

CUNHA, M.A.A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2006.

DAVIS, L.; JEON, Y. J.; SVENSON, C.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v.29, p.49-59, 2005.

DEMBCZYNSKI, R.; JANKOWSKI, T. Growth characteristics and acidifying activity of *Lactobacillus rhamnosus* in alginate/starch liquid-core capsules. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.111-1115, 2002.

DEMIRBAS, M.F. Biorefineries for biofuel upgrading: A critical review. **Applied Energy**, v.86, p.s151-s161, 2009.

DERVAKOS, G.A.; WEBB, C. On the merits of viable-cell immobilization. **Biotechnology Advertisements**, v.9, p.559-612, 1991.

DOHERTY, W.O.S.; MOUSAVIOUN, P.; FELLOWS, C.M. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. **Industrial Crops and Products**, v.33, p.259-276, 2011.

DOMÍNGUEZ, J.M.; CHENG, S.G.; TSAO, G.T. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.49-56, 1996.

DOMÍNGUEZ, J.M.; CRUZ, J.M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, p. 119–130, 1999.

DUMSDAY, G.J.; JONES, K.; STANLEY, G.A.; PAMMENT, N.B. Recombinant organisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolyzates – A Review of Recent Progress. **Australasian Biotechnology**, v.7, n.4, p.285-295, 1997.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XYS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.8, p.3381-3386, 2000.

ERCAN, Y.; IRFAN, T.; MUSTAFA, K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. **Bioresource Technology**, 2012.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, p.171-177, 1995.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood – Chemistry Ultrastructure Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

FERRARI, M.E.; NEIROTTI, e.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology Bioengineering**, v.40, p.753-759, 1992.

FERRAZ, F.O. **Influência de diferentes métodos de destoxificação sobre a composição e fermentabilidade do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar à xilitol e etanol**. 88 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2010.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian Forest. **Yeast**, v.28, p.547-554, 2011.

FIERRO, S.; SÁNCHEZ-SAAVEDRA, M.P.; COPALCÚA, C. Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scedesmus*. **Bioresource Technology**, v.99, p.1274-1279, 2008.

FONSECA, B.D. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de Cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 111 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Biotecnologia, Universidade de São Paulo, 2009.

FONSECA, B.G.; MOUTTA, R.O.; FERRAZ, F.O.; VIEIRA, E.R.; NOGUEIRA, A.S.; BARATELLA, B.F.; RODRIGUES, L.C.; HOU-RUI, Z.; SILVA, S.S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.199-207, 2011

FROLLINI, F., PIMENTA, M. S. A. Lignin: Utilization as a macromonomer in the synthesis of phenolic type resins. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 46, n. 1, p. 43-49, 1997.

GALACTION, A.; LUPASTEANU, A.; CASCAVAL, D. Bioreactors with stirred bed of immobilized cells 2. Studies on distribution of mixing efficiency. **CI & CEQ**, v.13, n.3, p.135-150, 2007.

GALACTION, A.; BALTARU, R.; TURNEA, M.; CASCAVAL, D. Ethanol production in a basket bioreactor with immobilized yeasts cells 2. Study on the mixing efficiency in the outer region of basket for a double Rushton turbine impeller. **Romanian Biotechnological Letters**, v.16, n.4, p.6344-6353, 2011.

GALAI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M.N. Decolorization of an industrial effluent by free and immobilized cells of *Stenotrophomonas maltophilia* AAP56. Implementations of efficient down flow column reactor. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.26, p.1341-1347, 2010.

GAMARRA, J.A.; CUEVAS, C.M.; LESCANO, G. Production of ethanol by a stirred catalytic basket reactor with immobilized yeast cells. **Journal of Fermentation Technology**, v.64, n.1, p.25-28, 1986.

GARCÍA-CUBERO, M.T.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; INDACOECHEA, I.; COCA, M.; BOLADO, B. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. **Bioresource Technology**, v.100, p.1608-1613, 2009.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v.101, p.4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v.36, p.2086-2097, 2008.

GOLDSTEIN, I.S. **Organic Chemicals from Biomass**. USA: CRS Press, 1981.

GROBOILLOT, A.; BOADI, D.K.; PONCELET, D.; NEUFELD, R.J. Immobilization of cells for application in the food industry. **Critical Reviews in Biotechnology**. v.14, p.75-107, 1994.

GRZENIA, D. L.; SCHELL, D. J.; WICKRAMASINGHE, S. R. Membrane extraction for removal of acetic acid from biomass hydrolysates. **Journal of Membrane Science**, v.322, p.189-195, 2008.

GRZENIA, D.L.; SHELL, D.J.; WICKRAMASINGHE, S.R. Membrane extraction for detoxification of biomass hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.111, p.248-254, 2012

GUIDONI, I.; CHLAPANIDAS, T.; BUCCO, M.; CROVATO, F.; MARAZZI, M.; VIGO, D.; TORRE, M.L.; FAUSTINI, M. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. **Cytotechnology**, v.58, p.49-56, 2008.

GUO, X.; DENG, G.; XU, J.; WANG, M. Immobilization of *Rhodococcus* sp. AJ270 in alginate capsules and its application in enantioselective biotransformation of trans-2-methyl-3-phenyl-oxiranecarbonitrile and amide. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.1-5, 2006.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.16, p.933-942, 1994.

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xilose-transporting properties of yeast hexosetransporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v.148, p.2783-2788, 2002.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAALJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v.28, p.384-410, 2005.

HARUN, R.; JASON, W.S.Y.; CHERRINGTON, T.; DANQUAH, M.K. **Microalgal biomass as cellulosic fermentation feedstock for bioethanol production**. Disponível em <www.elsevier.com/locate/rser>. Acesso em: Nov. 2010.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K. Influence of acid pre-treatment on microalgal biomass for bioethanol production. **Process Biochemistry**, v.46, p.304-309, 2010.

HERNÁNDEZ, R.M.; ORIVE, G.; MURUA, A.; PEDRAZ, J.L. Microcapsules and microcarriers for in situ cell delivery. **Advanced Drug Delivery**, v.62, p.711-730, 2010.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane ad agave bagasse. **Bioresource Technology**, v.100, p.1238-1245, 2009

HONGZHI, L.; KEKE, C.; JINGPING, G.; JINGPING, G.; WENXIANG, P. Statistical optimization of xylitol production from corn cob hemicelluloses hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **New Biotechnology**, v.00, n.00, 2010.

HUGHES, S.R.; GIBBONS, W.R.; BANG, S.S.; PINKELMAN, R.; BISCHOFF, K.M.; SLININGER, P.J.; QURESHI, N.; KURTZMAN, C.P.; LIU, S.; SAHA, B.C.; JACKSON, J.S.; COTTA, M.A.; RICH, J.O.; JAVERS, J.E. Pandom UV-C mutagenesis of *Scheffersomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.163-173, 2012

HUNT, N.C.; GROVER, L.M. Cell encapsulation using biopolymer gels for regenerative medicine. **Biotechnology Letters**, v.32, p.733-742, 2010.

JAMUNA, R.; RAMAKRISHNA, S.V. High concentration ethanol production using immobilized yeast cells. **Biomass and Bioenergy**, v.3, p.117-119, 1992.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xilose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v.27, p.1-32, 1983.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.63, p.495-509, 2004.

JIN, Y.; SPEERS, R.A. Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Research International**, v.31, n.6-7, p.421-440, 1998.

JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.6816-6825, 2004.

JOHN, R.P.; ANISHA, G.S.; NAMPOOTHIRI, K.M.; PANDEY, A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v.102, p.186-193, 2011.

JUNTER, G.A.; JOUENNE, T. Immobilized viable microbial cells: from the process to the proteome em leader oor the card before the horse. **Biotechnology Advances**, v.22, p.633-658, 2004.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.14, n.3, p.277-287, 1998.

KABEL, M.A.; BOS, G.; ZEEVALKING, J.; VORAGEN, A.G.J.; SCHOLS, H.A. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. **Bioresource Technology**, v.98, n.10, p.2034-2042, 2007.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, MJ, Conversion of rice straw to sugars by dilute acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v.30, p.247-253, 2006.

KIM, S.B.; LEE, J.H.; OH, K.K.; LEE, S.J.; LEE, J..Y.; KIM, J.S.; KIM S.W. Dilute Acid Pretreatment of barley straw and its saccharification and fermentation. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, p.725-732, 2011.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v.21, p.377-397, 2004.

KOVALENKO, G.A.; PERMINOVA, L.V.; PLAKSIN, G.V.; KOMOVA, O.V.; CHUENKO, T.V.; RUDINA, N.A. Immobilized yeast membranes as biocatalysts for sucrose inversion. **Applied Biochemistru and Microbiology**, v.41, n.4, p.399-403, 2005.

KRISHNAN, C.; SOUSA, L.C.; JIN, M.; CHANG, L.; DALE, B.E.; BALAN, V. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v.107, p.441-450, 2010.

KRISTENSEN, J.B.; THYGESEN, L.G.; FELBY, C.; JORGENSEN, H.; ELDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology Biofuel**, v.1, p.5, 2008.

KUMAR A; SINGH LK; GHOSH S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.100, p.3293–3297, 2009.

KUMAR, M.; GAYEN, K. Developments in biobutanol production: new insights. **Applied Energy**, v.88, p.1999-2012, 2011.

KURTZMAN, C.P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Milleroyzyma*, *Priceomyces* and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v.51, p.2-14, 2010.

KUYPER, M.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Research**, v.4, p.655-664, 2004.

LAOPAIBOON, L.; NUANPENG, S.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. **Bioresource technology**, v.100, n.18, p.4176-4182, 2009.

LAOPAIBOON, L.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice in repeated-batch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on corncob. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.28, p.559-566, 2012.

LAOPAIBOON, P.; THANI, A; LEELAVATCHARAMAS, V.; LAOPAIBOON, L. Acid hydrolysis of sugarcane bagasse for lactic acid production. **Bioresource Technology**, v.101, p.1036-1043, 2010.

LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* – oxygen requirement as key factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, n.2, p.158-162, 1991.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.O.; JONSSON, L.J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysate of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, p.-91-103, 1998.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.151-159, 1999.

LATIF, F.; RAJOCA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v.77, p.57-63, 2001.

LAU, M.W.; DALE, B.E. Cellulosic Ethanol Production from AFEX-treated Corn Stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.106, n. 5, p.1368- 1373, 2009.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p.367-380, 2002.

LEE, W. G.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, p.547-559, 1999.

LEE, J.; PARAMESWARAN, B.; LEE, J.; PARK, S. Recent developments of key technologies on cellulosic ethanol production. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.865-873, 2008.

LI, Y.; LI, W.; GAO, H.; XING, J.; LIU, H. Integration of flocculation and adsorptive immobilization of *Pseudomonas delafieldii* R-8 for diesel oil biodesulfurization. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.86, p.246-250, 2010.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.449-467, 2012.

LIN, T.H.; HUANG, G.F.; GUO, G.L.; HWANG, W.S.; HUANG, S.L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.116, p.314-319, 2012.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.69, p.627-642, 2006

LIU, R.; SHEN, F. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). **Bioresource Technology**, v.99, p.847-854, 2008.

LOH, K.C.; CHUNG, T.S.; ANG, W.F. Immobilized-cell membrane bioreactor for high strength phenol wastewater. **Journal of Environmental Engineering**, v.126, n.1, p.75-79, 2000

LYKO, H.; DEERBERG, G.; WEJDNER, E. Coupled production in biorefineries – Combined use of biomass as a source of energy, fuels and materials. **Journal of Biotechnology**, v.142, p.78-86, 2009.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment and policy. **Annual Review of Energy and Environmental**, v.21, p.403-465, 1996.

LYND, R.L.; VAN ZYL, W.H.; MCBRIDE, J.E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577-583, 2005.

MA F.; XIONG, Z.; ZHENG, Y.; YU, X.; ZHANG, X. Repeated batch process for biological treatment of black liquor using brown-rot basidiomycete *Fomitopsis* sp. IMER2. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.2627-2632, 2008.

MARQUES, F. Bagasse is the Target. **Pesquisa FAPESP**, Special Issue, p.32-36, 2011.

MARTIN, C. Biorrefinaria Industrial. **O Papel**, p.30-36, 2011

MARTINEZ, E.A.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N.; FELIPE, M.G.A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1677-1683, 2003.

MARUTHAI, K.; THANGAVELU, V.; KANAGASABAI, M. Statistical screening of medium components on ethanol production from cashew apple juice using *Saccharomyces diasticus*. **International Journal of Chemical and Biological Engineering**, v.6, p.108-111, 2012.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Effect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with xylose-fermenting ability. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.162, p.1952-1960, 2010.

MCINTOSH, S.; VANCOR, T. Optimisation of dilute alkaline pretreatment for enzymatic saccharification of wheat straw. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.3094-3103 2011.

MEANWELL, R.J.; SHAMA, G. Production of streptomycin from chitin using *Streptomyces griseus* in bioreactors of different configuration. **Bioresource Technology**, v.99, n.13, p.5634-5639, 2008.

MILESSI, T.S.S.; CHANDEL, A.K.; BRANCO, R.F.; SILVA, S.S. Effect of dissolved oxygen and inoculum concentration on xylose reductase production from *Candida guilliermondii* using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Food and Nutrition Sciences**, v.2, p.235-240, 2011.

MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of Rhizomucor, Mucor in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, n.4, p.1020-1029, 2004.

MORO, J.D.; ROSA, C.S.; HOELZEL, S.M. Composição centesimal e ação oxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum Scentia**, v.4, n.1, p.33-44, 2004.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005.

MOUTTA, R.O.; CHANDEL, A.K.; RODRIGUES, R.C.L.B; SILVA, M.B.; ROCHA, G.J.M.; SILVA, S.S. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Technology**, v.14, n.1, p.53-60, 2012.

MUSSATO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P.M.R.; SILVA, J.P.A.; CAMEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v.28, p.817-830, 2010.

MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A. β -Fructofuranosidase production by repeated batch fermentation with immobilized *Aspergillus japonicus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.923-928, 2009.

NAGODAWAWITHANA, T.W.; STEINKRAUS, K.H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "Rapid Fermentation". **Applied and Environmental Microbiology** v.31, n.2, p.158-162, 1976.

NAIK, S.N.; GOUD, V.V.; ROUT, P.K.; DALAI, A.K. Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.14, p.578-597, 2010.

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

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **Journal of Chemical Technology And Biotechnology**, v.76, p.586-592, 2001.

NIGAM, J.N. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste using immobilized yeast cells. **Journal of Biotechnology**, v.80, p.189-193, 2000.

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v.87, p.17-27, 2001.

NIGAM, P.S.; GUPTA, N.; ANTHWAL, A. Pre-treatment of Agro-Industrial Residues. In: NIGAM, P.S.; PANDEY, A. (eds) **Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilisation**. Heindelberg: Springer, 2009. p.13-38.

NIGAM, P.S.; SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.37, p.52-68, 2011.

NUANPENG, S.; LAOPAIBOON, L.; SRINOPHAKUN, P.; KLANRIT, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**. Disponível em <<http://www.ejbiotechnology.info>>. Acesso em: Agosto 2012.

OKUR, M.T.; SARAÇOGLU, N.E. Ethanol production from sunflower seed hull hydrolysate by *Pichia stipitis* under uncontrolled pH conditions in a bioreactor. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences**, v.30, p.317-322, 2006.

OLIVEIRA, A.P.C. **Produção e Caracterização de partículas de hidrogéis para aplicações em cosméticos**. 178 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

OLIVEIRA, F.P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 141p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFJR).
PACHECO, T.F. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração? **Embrapa Agroenergia**, ISSN 2177-4420, 2011.

PANDEY, A.; SOCOOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, p.69-80, 2000.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.470-476, 1996.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40, 1998.

PARAWIRA, W.; TEKERE, M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.31, p.20-31, 2011.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p.303-19, 2000.

PASPARAKIS, G.; BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. **International Journal of Pharmaceutics**, v.323, p.34-42, 2006.

PASTORE, N.S.; HASAN, S.M.; ZEMPULSKI, D.A. Produção de Ácido Cítrico por *Aspergillus Níger*: avaliação de diferentes fontes de nitrogênio e de concentração de sacarose. **Engevista**, v.13, n.3, p.149-159, 2011.

PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo: Mc Graw Hill, 1980, v.1, 566p.

PRADELLA, J.G.C. Reatores com células imobilizadas. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (eds) **Biotecnologia Industrial** – Editora Edgard Blucher LTDA, 2001. v.2.

PRAKASHAM, R.S.; RAO, R.S.; HOBBS, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.3, p.9-36, 2009.

QUAN, C.S.; FAN, S.D.; OHTA, F.Y. Immobilization of *Candida krusei* cells producing phytase in alginate gel beads: an application of the preparation of myo-inositol phosphates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.62, p.41-47, 2003.

PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.21, p.124-9, 1997.

RABANEL, J.; BANQUY, X.; ZOUAOU, H.; MOKHTAR, M. Progress Technology in Microencapsulation Methods for Cell Therapy. **Biotechnology Progress**, v.25, n.4 p.946-963, 2009.

RAMAKRISHNA, S.V.; PRAKASHAM, R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v.77, n.1, 1999.

RAVINDRANATH, N.H.; LAKSMI, C.S.; MANUVIE, R.; BALACHANDRA, P. Biofuel production and implications for a land use, food production and environment in India. **Energy Policy**, v.39, p.5737-5745, 2011

RAZMOVSKI, R.; VICUROIC, V. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. **Fuel**, v.92, p.1-8, 2012.

REZENDE, C.A.; LIMA, M.A.; MAZIERO, P.; AZEVEDO, E.R.; GARCIA, W.; POLIKARPOV. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to a delignification process for enhanced enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v.4, p.54, 2011

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; SILVA, S.S. An Evaluation of different bioreactor configurations with immobilized yeast for bioethanol production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v.6, 2008.

ROBERTO, I.C.; MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v.17, p.171-6, 2003.

ROCHA, G.J.M.; GONÇALVES, A.R.; OLIVEIRA, B.R.; OLIVARES, E.G.; ROSSEL, C.E.V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, p.274-279, 2012

RODMUI, A.; KONGKIATTIKAJORN, J.; DANDUSITAPUN, Y. Optimization of agitation conditions for maximum ethanol production by coculture. **Kasetsart Journal**, v.42, p.285-293, 2008.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Joournal of Chemical Engineering**, v.18, p.299-311, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B.; ROCHA, G.J.M.; RODRIGUES JR. D.; FILHO, H.J.I., FELIPE, M.G.A.; PESSOA JR., A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v.101, p.1247-1253, 2010.

RODRIGUES, R.C.L.B.; KENEALY, W.R.; JEFFRIES, T.W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipis* YS-30. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.1649-1655, 2011.

ROTARU, R.; GALACTION, A.; CASCAVAL, D. Study on alcoholic fermentation in a stationary basket bioreactor with immobilized yeast cells. **Chemistry & Chemical Engineering Biotechnology Food Industry**, v.12, p.65-76, 2012.

ROWELL, R.M. **Handbook of chemistry and wood composites**. USA: Taylor & Francis, 2005.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. (RSC) **Cross-linking polymers – alginate worms**. Disponível em <http://www.rsc.org/Education/Teachers/Resources/Inspirational/resources/3.1.9.pdf>. Acesso em: 25/09/12

RUBIN, E.A. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v.454, p.841-845, 2008

RUIZ, E.; CARA, C.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; CASTRO, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. **Enzyme and Microbial Technology**, v.42, p.160-166, 2008.

SAHA, B.; COTTA, M.A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. **Biotechnology progress**, v.22, p.449-453, 2006.

SANTOS, J.C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais.** 212 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATTO, S.I.; SILVA, S.S. Influence of aeration rate and Carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v.40, p.113-118, 2005a

SANTOS, J.C.; SILVA, S.S.; MUSSATTO, S.I.; CARVALHO, W.; CUNHA, M.A.A. Immobilized cells cultivated in semi-continuous mode in a fluidized bed reactor for xylitol production from sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.21, p.531-535, 2005b.

SARITHA, M.; ARORA, A.; NAIN, L. Pretreatment of paddy straw with *Trameters hirsute* for improved enzymatic saccharification. **Bioresource Technology**, v.104, p.459-465, 2012.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT K. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. **Renewable Energy**, v.37, p.19-27, 2012.

SARROUH, B.F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: Avaliação de Parâmetros operacionais e viabilidade econômica.** 185 p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena EEL-USP, 2009.

SARROUH, B.F.; SILVA, S.S. Application of Response Surface Methodology for Optimization of Xylitol Production from Lignocellulosic Hydrolysate in Fluidized Bed Reactor. **Chemical Engineering Technology**, v.33, n.9, p.1481-1487, 2010

SEMENCENKO, V.V.; MOJOVIC, L.V.; PETROVIC, S.D.; OCIC, O.J. Novi trendovi u proizvodnji bioetanola. **Hem. Ind.**, v.65, n.2, p.103-114, 2011.

SHATALOV, A.A.; PEREIRA, H. Xylose production from giant reed (*Arundo donax* L.): Modelig and optimization of dilute acid hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, v.87, p.210-217, 2012.

SHEELU, G.; KAVITHA, G.; FADNAVIS, N.W. Efficient Immobilization of lecithase in Gelatin hydrogel and Degumming of rice bran oil using a spinning basket reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.85, p.739-748, 2008.

SILVA, S.S.; VITOLO, M.; PESSOA Jr., A.; FELIPE, M.G.A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.36, 1996.

SILVA, D.D.V. **Bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana:** estudo do efeito do ácido acético. 99 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2001.

SILVA, S.S.; SANTOS, J.C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K.K.; VITOLO, M. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, v.38, p.903-907, 2003.

SILVA, C.J.S.M.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench reactor. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.115-119, 2006.

SILVA, S.S.; MUSSATO, S.I.; SANTOS, J.C.; SANTOS, D.T.; POLIZEL, J. Cell Immobilization and Xylitol Production using sugarcane bagasse as raw material. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.141, p. 215-227, 2007.

SILVA, V.F.N. **Estudo de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** 116 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena, EEL-USP, 2009.

SILVA, A.S.; INOUE, H.; ENDO, T.; YANO, S.; BOM, E.P. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v.101, p.7402-7409, 2010.

SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. The Influence of initial Xylose Concentration, Agitation, and Aeration on Ethanol Production by *Pichia stipitis* from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.162, p.1306-1315, 2010.

SILVA, D.D.V.; CÂNDIDO, E.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Fermentative performance of *Pichia stipitis* and *Candida guilliermondii* yeasts grown in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with different nutrients. In: 1st BRAZILIAN BIOENERGY SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE 1., 2011, **Anais do 1st BBEST**, 2011.

SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol Production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.28, n.1, p.151-156, 2011.

SILVA, V.F.N.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Fermentation of cellulosic hydrolysates obtained by enzymatic saccharification of bagasse pretreated by hydrothermal processing. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.38, p.809-817, 2011

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.L.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v.37 p.259-265, 2012.

SIMS, R.E.H.; MABEE, W.; SADDLER, J.N.; TAYLOR, M. An overview of second generation biofuel technology. **Bioresource Technology**, v.101, p.1570-1580, 2010

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2nd ed. USA: Academic Press, 1993.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAHL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.3389–3394, 1990.

SLININGER, P.J.; BRANSTRATOR, L.E.; LOMONT, J.M.; DIEN, B.S.; OKOS, M.R.; LADISCH, M.R. Stoichiometry and kinetics of xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.589, p.25-40, 1990

SOARES, E.V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v.110, p.1-18, 2010

SOUZA, A.E.; TEIXEIRA, S.R.; SANTOS, G.T.A.; COSTA, F.B.; LONGO, E. Reuse of sugarcane bagasse ash (SCBA) to produce ceramic materials. **Journal of Environmental Management**, v.92, p.2774-2780, 2011.

STEPHEN, J.D.; MABEE, W.E.; SADDLER, J.N. Will second-generation ethanol be able to compete with first-generation ethanol? Opportunities for cost reduction.. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v.6, p.159-176, 2012.

SUN, F.H.; LI, J.; YUAN, Y.X.; YAN, Z.Y.; LIU, X.F. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsute* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.65, p.931-938, 2011.

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

TIMILSINA, G.R.; SHRESTHA, A. How much hope should we have for biofuels? **Energy**, v.36 p.2055-2069, 2011

TSIGIE, Y.A.; WANG, C.Y.; TRUONG, C.T.; JU, Y.H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.102, p.9216-9222, 2011

TUBINO, L.O.; ZAMORA, M.A.M. O bioetanol é a melhor opção? Uma avaliação das novas tecnologias do bioetanol e suas implicações sócio-ambientais. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE TECNOLOGIA E SOCIEDADE, 2009. **Anais do III Simpósio Nacional de Tecnologia e Sociedade**, Pato Branco, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2009.

UNREAN, P.; NGUYEN, N.H.A. Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.94, p.1387-1398 2012.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C. Production of ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.17, p.357-369, 1988.

VILARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.17-24, 2006

WANG, L.; SHELTON, R.M.; COOPER, P.R.; LAWSON, M.; TRIFFIT, J.T.; BARRALET, J.E. Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, p.3475–3481, 2003.

WANG, M.Y.; YU, Y.T.; CHANG, T.M.S. New method for preparing more stable microcapsules for the entrapment of genetically engineered cells. **Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology**, v.33, p.257-269, 2005.

WANG, W.; YUAN, T.; WANG, K.; CUI, B.; DAI, Y. Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*. **Bioresource Technology**, v.107, p.282-286, 2012.

WILSON, D.K.; KAVANAGH, K.L.; KLIMACEK, M.; NIDETZY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo_/keto reductase and opportunities for protein engineering. **Chemical Biological Interactions**, v.143/144, p.515-521, 2003.

WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial Conversion of D-Xylose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86 (1), p.1-14, 1998.

WYMAN, C.E. Biomass Ethanol: Technical progress, opportunities, and commercial challenges. **Annual Review of Energy and the Environment**, v.24, p.189-226, 1999.

XIONG, W.; Li, X.; Xiang, J.; Wu., O. High-density fermentation of microalga *Chlorella protothecoides* in bioreactor for microbiodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.78, p.29-36, 2008

YAN, S.; CHEN, X.; WU, J.; WANG, P. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.94, p.829-838, 2012

YOO, I.; SEONG, G.H.; CHANG, H.N.; PARK, J.K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginate capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.19, p.428-433, 1996.

YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for biofuels**. Disponível em <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/3/1/24>>. Acesso em: 2010.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocelluloses: a challenge for metanolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p.17-37, 2001.

ZENG, Y.; WEI, N.; LOU, M.; FU, L.; XIONG, P.; WANG, H. Calcium chloride improve ethanol production in recombinant *Zymomonas mobilis*. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.45, p.7687-7691, 2010.

ZHANG, T.; CHII, Z.; ZHAO, C.H.; CHI, Z.M.; GONG, F. Bioethanol production from hydrolysate of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces sp.* W0. **Bioresource Technology**, v.101, p.8166-8170, 2010.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, v.49, p.28-32, 2010.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. **Biofuels, Bioproducts and Biorefinery**, v.6, p.465-482, 2012.