

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**Influência das Condições de Encapsulamento em Alginato e da
Suplementação com Nutrientes sobre a Fermentação de Xilose por
Saccharomyces cerevisiae recombinante**

Daniella Guimarães Rosa

Trabalho de Graduação apresentado ao
Departamento de Engenharia Química da
Universidade Federal de São Carlos

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos – SP

2020

BANCA EXAMINADORA

Trabalho de Graduação apresentado no dia 14 de dezembro de 2020 para a seguinte banca examinadora:

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

Convidada: MSc Caroline Lopes Perez

Professor da Disciplina: Prof. Dr. Gustavo Dias Maia

AGRADECIMENTOS

À minha família que é meu apoio e minha base em primeiro lugar em toda minha trajetória. Em especial meu pai, Samuel, minha mãe, Ivania e meus irmãos Fernanda e Henrique, por todos os conselhos, conversas e ensinamentos.

Ao meu namorado Francisco que é meu braço direito e meu ouvinte.

Aos meus amigos, essenciais no caminho trilhado na universidade.

À minha orientadora Teresa pela oportunidade e direcionamento ao longo de minha Iniciação Científica e de meu Trabalho de Graduação.

À Caroline pela parceria e ensinamentos ao longo da IC.

À todas as mulheres que vieram antes de mim, abrindo esse caminho e tornando possível a jornada na engenharia, me permitindo ocupar cada vez mais espaços.

A todos que me ajudaram e compartilharam comigo esse caminho árduo, porém com ótimas histórias e frutos que foi a universidade.

RESUMO

A implementação de processo industrial de produção de etanol 2G utilizando linhagens recombinantes depende do desenvolvimento de estratégias de fermentação adequadas para a obtenção de etanol em altas concentrações a partir de hidrolisados de hemicelulose concentrados, contendo compostos inibidores. Inúmeros estudos relatam o efeito de proteção conferido pelo gel de alginato, enquanto outros mencionam que a suplementação com lipídeos e nutrientes ricos em proteínas pode contribuir para uma maior tolerância ao etanol. Assim, o principal objetivo deste trabalho é avaliar a influência das características das cápsulas de alginato de cálcio, enriquecidas (ou não) com nutrientes específicos, sobre o desempenho do processo fermentativo de xilose por levedura recombinante imobilizada, a partir de planejamento experimental Plackett-Burman, com experimentos realizados em meio A (sem suplementação de etanol) e meio B (com suplementação de etanol). Dessa forma, foi realizado inicialmente um estudo específico para definição dos níveis escolhidos para suplementação do meio fermentativo, para o qual foram conduzidos experimentos em meio suplementado com diferentes concentrações de peptona, extrato de levedura, glicerol e ácido oleico. Com o mesmo objetivo, foram realizados experimentos para avaliação da concentração inicial de etanol a ser utilizada nos experimentos do planejamento experimental conduzidos em meio suplementado com etanol (meio B). Todos os experimentos foram realizados em mini-reatores de 8 mL de volume útil, contendo 3 mL de meio YPX (extrato de levedura, peptona e xilose) e 3 ml de células de *rS. cerevisiae* MDS130 imobilizadas em alginato de cálcio, a 35 °C e em condição estática. O acompanhamento das fermentações foi realizado por meio da perda de massa devido à liberação de CO₂ e, ao final das bateladas, o sobrenadante era armazenado para posterior análise da concentração de açúcares e metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência. A viabilidade celular ao final das bateladas foi determinada em câmara de Neubauer, após rompimento das cápsulas e coloração com azul de metileno. Assim, foram realizados os experimentos do planejamento experimental Plackett-Burman utilizando matriz PB12 e tendo como fatores a fração mássica de alginato de sódio, o diâmetro médio das cápsulas, a concentração de peptona, a concentração de extrato de levedura, a fração mássica de glicerol e a fração mássica de ácido oleico. Para a análise estatística, foram escolhidas as respostas produtividade volumétrica de etanol (Q_p [g/L.h]), seletividade em etanol (S [get/gxil]), rendimento global em etanol (Y_p/s [get/gxil]) e conversão final (X_f [%]). Por fim, a partir dos resultados obtidos nos ensaios realizados, identificou-se que o diâmetro médio e as concentrações de glicerol e de extrato de levedura foram os fatores que apresentaram efeitos significativos no desempenho da fermentação de xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

ABSTRACT

The implementation of the second-generation (2G) bioethanol's industrial production using recombinant yeast relies on developing proper fermentation strategies to obtain ethanol in high concentrations from hemicellulosic concentrated hydrolysates, containing inhibitory compounds. Several studies relate the protection effect given by alginate gel, whilst other mention that supplementation with lipids and nutrients rich in protein can contribute to a higher ethanol tolerance. Therefore, the main objective of this work is to evaluate the influence of alginate gel microcapsules, enriched (or not) with key nutrients, on the performance of xylose fermentation by immobilized recombinant yeast, through Plackett-Burman's experimental design with experiments carried out under medium A (without ethanol supplementation) and medium B (with ethanol supplementation). In the first place, a specific study was conducted to assess the chosen levels for the fermentative medium's supplementation. For this purpose, experiments using enriched medium with different concentrations of peptone, yeast extract, glycerol and oleic acid were performed. Similarly, experiments to evaluate ethanol's initial concentration to be used in the experimental design runs under ethanol supplementation (medium B) were also conducted. All experiments were carried out inside mini reactors with 8 mL of useful volume, containing 3 mL of medium YPX (yeast extract, peptone, and xylose) and 3 mL of *rS. cerevisiae* MDS130 immobilized in calcium alginate, under 35 °C and stationary condition. The fermentations were monitored by mass loss associated to CO₂ release and, at the end of each batch, the supernatant was stored to posterior analysis of its sugar and metabolites concentrations through high performance liquid chromatography. Cells viability after the batches were determined in Neubauer chamber, after capsules disruption and staining with methylene blue. Then, the Plackett-Burman's design runs using a PB12 matrix was carried out. The selected studied factors were: sodium alginate mass fraction, capsule diameter, peptone concentration, yeast extract concentration, glycerol mass fraction, and oleic acid mass fraction. For the statistical analysis, the responses volumetric productivity (Q_p [g/L.h]), ethanol selectivity (S [get/gxil]), overall ethanol yield ($Y_{p/s}$ [get/gxil]), and final conversion (X_f [%]) were chosen. Thus, according to the statistical analysis results, the capsule's diameter and the concentrations of glycerol and yeast extract were identified as the factors that presented significant effects over the performance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* xylose's fermentation.

SUMÁRIO

Banca Examinadora.....	i
Dedicatória.....	ii
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Quadros.....	vii
1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biocombustíveis e bioetanol.....	3
2.2. Efeito inibidor do etanol sobre o metabolismo celular.....	4
2.3. Imobilização celular.....	6
2.4. Suplementação do meio fermentativo.....	7
2.5. Planejamento Plackett-Burman.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1. Materiais.....	8
3.1.1. Microrganismo.....	8
3.2. Procedimento Experimental.....	9
3.2.1. Obtenção de suspensão de levedura recombinante para imobilização.....	9
3.2.2. Estudo da imobilização e da composição por meio do planejamento Plackett Burman.....	9
3.2.3. Fermentação com células imobilizadas.....	12
3.3. Métodos analíticos.....	14
3.3.1. Concentrações finais de açúcares, etanol, glicerol e xilitol.....	14
3.4. Procedimentos de cálculo.....	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
4.1. Influência dos componentes suplementados no desempenho da fermentação.....	15
4.2. Avaliação das concentrações de etanol.....	17
4.3. Experimentos do planejamento experimental.....	19

4.4. Experimentos finais (comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central)	24
5. CONCLUSÕES.....	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Aparato para imobilização celular e confecção dos beads	10
Figura 3.2	Cápsulas em processo de cura após imobilização celular	11
Figura 3.3	Mini-reatores lacrados, dotados de saída para o CO ₂ utilizados nos experimentos	13
Figura 4.1	Conversão ao longo do tempo nos experimentos de avaliação das concentrações de etanol	17
Figura 4.2	Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a produtividade volumétrica de etanol nos meios com e sem etanol	20
Figura 4.3	Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a seletividade em etanol nos meios com e sem etanol	21
Figura 4.4	Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre o rendimento global em etanol nos meios com e sem etanol	21
Figura 4.5	Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a conversão final nos meios com e sem etanol	21
Figura 4.6	Conversão ao longo do tempo nos experimentos finais comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Fatores e valores reais correspondentes aos níveis codificados empregados no planejamento Plackett-Burman	11
Tabela 3.2	Matriz PB12 para estudos de seleção de fatores	12
Tabela 4.1	Fatores e valores reais correspondentes aos níveis codificados empregados no planejamento Plackett-Burman dos experimentos iniciais	15
Tabela 4.2	Produtividade em etanol dos cultivos com meios suplementados	16
Tabela 4.3	Resultados dos experimentos do planejamento experimental em meio A (sem etanol)	19
Tabela 4.4	Resultados dos experimentos do planejamento experimental em meio B (com etanol, 70 g/L)	20
Tabela 4.5	Efeitos estatisticamente significativos para os fatores estudados sobre as diferentes respostas.	23
Tabela 4.6	Fatores e valores correspondentes empregados nos ensaios comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central	24
Tabela 4.7	Respostas de produtividade, seletividade, rendimento e conversão nos experimentos de comparação entre resultado do planejamento experimental e do ponto central	25

NOMENCLATURA

C_{etanol}	Concentração de etanol produzido	[g/L]
C_{Pf}	Concentração de etanol ao final da fermentação	[g/L]
C_{Pi}	Concentração de etanol no início do processo	[g/L]
C_{Sf}	Concentração final de açúcares totais	[g/L]
C_{Si}	Concentração inicial de açúcares totais	[g/L]
C_{xilitol}	Concentração final de xilitol	[g/L]
Q_p	Produtividade volumétrica em etanol	[g/L/h]
S	Seletividade em etanol	[-]
X	Conversão ao longo do tempo	[-]
X_f	Conversão final	[-]
Y_{P/S}	Rendimento global em etanol	[-]
ΔC_P	Variação de concentração de etanol ao final da batelada	[g/L]
ΔC_s	Variação de concentração de açúcares ao final da batelada	[g/L]
Δm	Variação de massa em determinado tempo da batelada	[g]
Δm_f	Variação de massa ao final da batelada	[g]
Δt_f	Tempo final do processo descontínuo	[h]

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Em decorrência do esgotamento de jazidas de combustíveis fósseis e dos impactos ambientais causados pela extração, produção e queimas destes, a obtenção de combustíveis a partir de fontes renováveis vêm ganhando espaço. Dentre os biocombustíveis, o bioetanol é uma alternativa interessante por ser uma fonte de energia limpa e sustentável (Gírio et al., 2010), que pode ser obtido a partir de matérias primas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas.

Tratando-se do Brasil, a fonte de biomassa com maior disponibilidade é a cana-de-açúcar. Em decorrência do elevado consumo dessa matéria-prima para a produção de etanol de primeira geração, cerca de 600 milhões de toneladas na safra 2016/2017 apenas na região centro-sul do Brasil (UNICA, 2018), mais de 90 milhões de toneladas de bagaço foram geradas, o qual foi principalmente utilizado para a geração de vapor e energia. Assim, o desenvolvimento de processos para a produção de etanol de segunda geração a partir da biomassa vegetal do bagaço de cana permitiria aumentar a produção desse combustível sem requerer maior área plantada (WASYLENKO e STEPHANOPOULOS, 2015).

O processo de produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos envolve as seguintes etapas: pré-tratamento, hidrólise, fermentação e destilação. Na fermentação, açúcares liberados na etapa de hidrólise são convertidos em etanol, e o mosto fermentado pode seguir para a destilação (DUBEY et al., 2016). Porém, para que o processo seja viável economicamente, deve ocorrer a fermentação de hexoses e pentoses provenientes das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa vegetal (SILVA et al., 2012), respectivamente.

A fermentação alcoólica de hexoses pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como ocorre na produção de etanol de primeira geração, é um processo consolidado. No entanto, as linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de fermentar as pentoses presentes em hidrolisados de hemicelulose (MUSSATO et al., 2012).

Graças a avanços alcançados na Biologia Molecular, estão disponíveis linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de fermentar misturas de glicose e xilose, com formação insignificante de xilitol e glicerol e conversão completa dos açúcares. A linhagem GS1.11-26, obtida a partir da levedura industrial “Ethanol Red”, alcançou produtividade de 2,4 g/Lh em etanol e rendimento próximo do teórico (DEMEKE et al., 2013) quando cultivada em mistura de glicose e xilose, contendo 36 g/L de cada. A menor produtividade em etanol, em comparação com a alcançada em glicose (aproximadamente 5,0 g/Lh), se deve principalmente ao fluxo mais lento de assimilação de xilose (1,1 g xilose/g_{cels}h), que corresponde a 2/5 do fluxo de assimilação glicose pela mesma levedura. Com um fluxo de assimilação de xilose de 1,32 g_{xilose}/g_{cels}h, linhagens

recombinantes derivadas da levedura industrial PE-2 produziram 23 g/L de etanol a partir de 50 g/L de xilose, apresentando produtividade em etanol de 1,25 g/Lh (SANTOS et al. 2016). Os valores apresentados para as leveduras industriais descritas nos trabalhos de Santos et al. (2016) e Demeke et al. (2013b) são similares aos melhores resultados relatados em *review* sobre o assunto publicado recentemente (KWAK e JIN, 2017)

Apesar do excelente trabalho realizado pelos especialistas em Biologia Molecular na construção de leveduras recombinantes, o desenvolvimento de processos competitivos para a produção de etanol 2G a partir de resíduos lignocelulósicos depende também da Engenharia de Bioprocessos. Neste sentido, identificam-se como principais gargalos tecnológicos a operação dos biorreatores com alta carga de levedura e a utilização de hidrolisados de hemicelulose concentrados como meio de fermentação, sendo ambos requisitos essenciais para o aumento da produtividade em etanol. Porém, nestas condições de operação, as leveduras são expostas a compostos tóxicos presentes nos hidrolisados e a altas concentrações de etanol, que afetam o seu desempenho (CASPETA et al., 2015). No âmbito do projeto temático “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas” (Processo 2016/10.636-8), no qual o presente Trabalho de Graduação se insere, tanto técnicas de Engenharia Evolutiva como estratégias inovadoras baseadas na Engenharia de Bioprocessos vêm sendo exploradas. Dentre essas estratégias, destaca-se a imobilização das células de levedura em cápsulas de alginato.

Neste estudo, é abordada a imobilização celular por encapsulamento, a qual, de acordo com Covizzi (2007), Najafpour (2004) e Milessi (2017), apresenta vantagens em relação a outros tipos de imobilização, como, por exemplo, a possibilidade de operação contínua em reatores de leito fixo contendo elevada carga de células, com elevado ganho em produtividade em etanol (MILESSI, 2017).

Milessi (2017) estudou a produção de etanol 2G em reator de leito fixo operado continuamente, utilizando a levedura recombinante *S. cerevisiae* T18-HAA1 imobilizada em cápsulas de alginato. Em seus resultados, é mostrado que após 10 tempos de residência houve queda de viabilidade celular devido à longa exposição das células à concentração de etanol no efluente (~30 g/L). Este, dentre outros resultados de Milessi (2017), reforçam a necessidade de desenvolvimento de soluções para lidar com o efeito da exposição contínua das células a concentrações de etanol, mesmo que moderadas.

A literatura relata que modificações na composição do meio de cultivo ou nas condições de cultivo podem contribuir para melhorar a resistência das células ao etanol, tais como a adição

de glicerol (YAMAOKA, KURITA E KUBO, 2014; REVIN et al., 2018) e ácido oleico (YOU et al., 2002) ao meio de cultivo.

Com base nas informações levantadas acima, este trabalho de graduação se propõe a avaliar a influência das condições de imobilização e da suplementação das cápsulas com nutrientes sobre o desempenho fermentativo de levedura geneticamente modificada capaz de assimilar xilose, em condições de exposição prolongada ao etanol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biocombustíveis e Bioetanol

O crescimento da população mundial acarretou aumento significativo na demanda global de energia, gerando a necessidade de desenvolvimento de novas tecnologias para a obtenção de energia, além do consumo de combustíveis fósseis. Dessa forma, o esgotamento das jazidas de combustíveis fósseis e os impactos causados pela exploração destes, faz com que os estudos e aplicações de geração de energia a partir de fontes renováveis ganhem cada vez mais atenção no cenário atual.

Um exemplo importante de energia produzida a partir de fontes renováveis é o bioetanol, produzido em larga escala no Brasil. A produção de bioetanol é realizada em três macroetapas: a obtenção dos açúcares fermentescíveis, a fermentação dos açúcares e a separação e purificação do etanol produtos, normalmente através do processo de destilação, retificação e desidratação (MUSSATO et al., 2010).

O bioetanol é o biocombustível mais amplamente utilizado atualmente e seu uso afere muitos benefícios ecológicos, econômicos e sociais, pois agrega menores emissões de carbono na atmosfera quando em comparação à queima de combustíveis fósseis, além de ser proveniente de uma fonte renovável (cana de açúcar, no caso do Brasil), e poder ser produzido a partir de resíduos industriais, como um resultado do processamento comum da cana de açúcar no Brasil (AGUILAR-RIVERA, 2007).

Além de seu uso direto como combustível, o bioetanol é ainda empregado como aditivo para a gasolina, o que pode resultar em uma grande redução dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera (GUO, 2006). O etanol é utilizado para aumentar o nível de octanagem da gasolina, uma vez que possui elevado teor de oxigênio (35% m/m) e dessa forma confere ao combustível final uma combustão mais limpa (GOLDEMBERG; COELHO; GUARDABASSI, 2008; GÍRIO et al., 2010).

Dependendo da matéria prima e do processo de produção utilizados, o bioetanol pode ser de primeira ou segunda geração. As matérias primas utilizadas em sua produção podem ser açucaradas (cana de açúcar, por exemplo), amiláceas (milho e trigo) e lignocelulósicas (madeira e palha) (JOHN, et al., 2011), sendo que para o uso de matéria lignocelulósica é necessária uma etapa adicional de pré-tratamento para liberação dos açúcares fermentescíveis, o que não é necessário no caso de matéria-prima açucarada ou amilácea (NIGAM; SINGH, 2011).

Dessa forma, o bioetanol de primeira geração consiste no etanol produzido a partir da fermentação de açúcares livres presentes no colmo da planta (NAIK et al., 2010). Para o etanol de segunda geração, a diferenciação do processo é a fermentação da biomassa lignocelulósica, que tem seus polímeros constituintes transformados em açúcares fermentescíveis nas etapas de pré-tratamento e sacarificação e convertidos em etanol por meio da fermentação (RUBIN, 2008).

Para a produção de etanol de segunda geração é imprescindível a utilização de uma levedura capaz de metabolizar eficientemente xilose, a fim de tornar o processo produtivo viável economicamente.

Algumas cepas de leveduras selvagens possuem a capacidade de fermentar naturalmente xilose a etanol, como *Scheffersomyces* (*Pichia*) e *Candida* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; SLININGER et al., 1982), porém possuem produtividade e rendimento em etanol a partir de xilose baixos quando comparados com a fermentação de glicose. Dessa forma, vários tem sido os esforços para gerar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de assimilar xilose. Graças a avanços alcançados na Biologia Molecular, estão disponíveis linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de fermentar misturas de glicose e xilose, com formação insignificante de xilitol e glicerol e conversão completa dos açúcares. A linhagem GS1.11-26, obtida a partir da levedura industrial “Ethanol Red”, alcançou produtividade de 2,4 g/Lh em etanol e rendimento próximo do teórico (DEMEKE et al., 2013) quando cultivada em mistura de glicose e xilose, contendo 36 g/L de cada. A menor produtividade em etanol, em comparação com a alcançada em glicose (aproximadamente 5,0 g/Lh), se deve principalmente ao fluxo mais lento de assimilação de xilose (1,1 g xilose/g_{celsh}), que corresponde a 2/5 do fluxo de assimilação glicose pela mesma levedura. Com um fluxo de assimilação de xilose de 1,32 g xilose/g_{celsh}, linhagens recombinantes derivadas da levedura industrial PE-2 produziram 23 g/L de etanol a partir de 50 g/L de xilose, apresentando produtividade em etanol de 1,25 g/Lh (SANTOS et al. 2016). Os valores apresentados para as leveduras industriais descritas nos trabalhos de Santos et al. (2016) e Demeke et al. (2013b) são similares aos melhores resultados relatados em *review* sobre o assunto publicado recentemente (KWAK e JIN, 2017).

O etanol de segunda geração apresenta grande potencial econômico, mas sua aplicação em larga escala ainda se encontra em desenvolvimento. Apesar dos gargalos para alcançar maior viabilidade econômica deste processo, o etanol de segunda geração é um biocombustível promissor, uma vez que é proveniente de uma matéria-prima com grande disponibilidade, baixo custo e que não compete por terras cultiváveis com a produção de alimentos (NIGAM; SINGH, 2011; CHANDEL et al., 2012).

Além dos benefícios sociais e ambientais, a produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço da cana de açúcar é uma alternativa para aumentar a rentabilidade e melhorar o desempenho financeiro da produção de etanol de primeira geração nas usinas.

2.2. Efeito inibidor do etanol sobre o metabolismo celular

Apesar do excelente trabalho realizado pelos especialistas em Biologia Molecular na construção de leveduras recombinantes, o desenvolvimento de processos competitivos para a produção de etanol 2G a partir de resíduos lignocelulósicos depende também da Engenharia de Bioprocessos. Neste sentido, identificam-se como principais gargalos tecnológicos a operação dos biorreatores com alta carga de levedura e a utilização de hidrolisados de hemicelulose concentrados como meio de fermentação, sendo ambos requisitos essenciais para o aumento da produtividade em etanol. Porém, nestas condições de operação, as leveduras são expostas a compostos tóxicos presentes nos hidrolisados e a altas concentrações de etanol, que afetam o seu desempenho (CASPETA et al., 2015).

Milessi (2017) em sua tese de doutorado conduziu ensaios em leito fixo operado continuamente com levedura recombinante *S. cerevisiae* T18-HAA1 imobilizada em cápsulas de alginato. Mesmo com a imobilização celular, uma estratégia que se destaca entre as estudadas com a finalidade de promover a tolerância celular a inibidores presentes no meio, seus resultados mostram que após 10 tempos de residência houve queda de viabilidade celular devido à longa exposição das células à concentração de etanol no efluente (~30 g/L). Este, dentre outros resultados de Milessi (2017), reforçam a necessidade de desenvolvimento de soluções para lidar com o efeito da exposição das células a concentrações de etanol, mesmo que moderadas.

De acordo com Ansanay-Galeote (2001), o etanol presente em elevadas concentrações é altamente tóxico para o crescimento e metabolismo celular, tendo então um efeito inibitório que resulta em lentidão nas fermentações.

A literatura relata que, além das estratégias de imobilização com esta finalidade, modificações na composição do meio de cultivo ou nas condições de cultivo podem contribuir

para melhorar a resistência das células ao etanol, tais como a adição de glicerol (YAMAOKA, KURITA E KUBO, 2014; REVIN et al., 2018) e ácido oleico (YOU et al., 2002) ao meio de cultivo.

2.3. Imobilização

A imobilização tem sua origem nos estudos sobre imobilização enzimática, que tinham como objetivo simplificar o uso dessas enzimas como catalisadores das reações, uma vez que estas reações, além de complexas, envolviam cofatores e coenzimas de custo elevado (Milessi, 2017). Tendo como finalidade a simplificação do uso das enzimas, a imobilização permitia, de forma mais viável economicamente, a separação e reutilização das enzimas quando comparada a outras estratégias de separação e purificação (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999; BAI et al., 2008).

Para aplicação e ampliação de escala, de acordo com Silva et al. (2007), o método de imobilização deve ser de fácil execução, econômico e preservar as propriedades catalíticas desejadas. Ainda de acordo com Pradella (2001), o suporte utilizado não deve ser tóxico para as células, deve ter alta capacidade de retenção, pouca sensibilidade às condições mecânicas (tensão de cisalhamento), deve ser ambientalmente seguro ou reciclável e possuir alta difusividade de substratos e produtos. Deve ainda não reagir com os componentes do meio e ser insolúvel sob as condições de processo (SILVA et al., 2007). Dentre os suportes utilizados para imobilização celular podemos citar polímeros naturais como alginato, K-carragenana e pectina; polímeros sintéticos como poliacrilamida e poliuretano; e ainda materiais inorgânicos como sílica, zircônia e vidro (PRADELLA, 2001).

Para a escolha do método de imobilização e suporte, devem ser consideradas as características do microrganismo e as condições de condução do processo, uma vez que não existe um método de imobilização ou um suporte universal. Dentre os métodos apresentados, a imobilização celular por aprisionamento em polímeros naturais se destaca por se tratar de um método simples e que permite uma retenção celular eficiente sem perda de atividade catalítica (CARVALHO, 2000; SARROUH, 2009), sendo a imobilização celular em gel de alginato ainda capaz de proteger as células das forças de cisalhamento e promover estabilidade especial a pH's, temperatura e inibidores (KUMAR; SINGH; PAL, 2009).

O procedimento de imobilização em gel de alginato de cálcio consiste na adição de uma suspensão de alginato de sódio com células a uma solução contendo cátions divalentes (por

exemplo, o cloreto de cálcio), resultando na formação de cápsulas com células imobilizadas (MILESSI, 2017).

Além das vantagens apresentadas da imobilização celular em alginato de cálcio, é mostrado na literatura que as condições de imobilização, em especial a concentração de alginato e o diâmetro das cápsulas formadas podem também influenciar na tolerância ao etanol (IDRIS; SUZANA, 2006; NAJAFPOUR; YOUNESI; KU ISMAIL, 2004).

2.4. Suplementação do meio fermentativo

A literatura relata que modificações na composição do meio de cultivo ou nas condições de cultivo podem contribuir para melhorar a resistência das células ao etanol, tais como a adição de glicerol (YAMAOKA, KURITA E KUBO, 2014; REVIN et al., 2018) e ácido oleico (YOU et al., 2002) ao meio de cultivo.

De acordo com Yamaoka et al. (2014), o glicerol apresenta grande potencial como suplemento a combater os efeitos inibidores conferidos pelo etanol ao metabolismo celular, pois o glicerol é o metabólito-chave das leveduras, além de ser um importante protetor do estresse celular.

Em relação à suplementação do meio fermentativo com ácido oleico, no trabalho de You et al. (2003) observamos que a tolerância de *S. cerevisiae* ao etanol é dependente da concentração de ácido oleico contido no meio. Em seus estudos de suplementação do meio com ácidos graxos insaturados, foi possível concluir que o ácido oleico é o ácido graxo insaturado mais eficaz para superar os efeitos tóxicos do etanol no cultivo de células de levedura (YOU et al., 2002), confirmando suas hipóteses de que a tolerância ao etanol conferida pela suplementação do meio com ácido oleico tem sua origem na incorporação do ácido oleico na membrana celular, resultando em uma diminuição compensatória na fluidez da membrana, que neutraliza os efeitos de fluidificação do etanol.

2.5. Planejamento Plackett-Burmann

O planejamento Plackett-Burman é recomendado para estudos com elevado número de variáveis (RODRIGUES E IEMMA, 2005) uma vez que reduz o número de ensaios a serem realizados e permite estimar os efeitos mais significativos e as variáveis mais relevantes. Este método de planejamento experimental tem sua origem em 1946, tendo sido proposto por Robin L. Plackett e J. P. Burman com o objetivo de encontrar a dependência entre alguma quantidade medida e uma série de variáveis independentes, possibilitando assim o estudo do efeito de variáveis

independentes em conjunto a partir da definição da quantidade de fatores a serem testados, dos níveis dos fatores e dos centros (PLACKETT E BURMAN, 1946).

Em experimentos de *screening* de componentes de meio de cultivo, o planejamento Plackett-Burman é amplamente utilizado. No estudo de Pizato et al. (2015), o método foi utilizado para avaliar as variáveis mais significativas no meio de cultivo para produção de biomassa e ácido láctico em culturas de *Lactobacillus rhamnosus* e os *Lactobacillus acidophilus*. Um planejamento Plackett-Burman com doze ensaios e com três repetições no ponto central foi avaliado para verificar a influência de sete variáveis estudadas, sendo elas temperatura, agitação do meio, pH, Tween-80(g/L), concentração de fonte de carbono (g/L), concentração de fonte de nitrogênio (g/L) e concentração de fosfato de potássio (g/L). Como variáveis respostas foram avaliadas a produção de ácido láctico e produção de biomassa em 48 h de fermentação, sendo identificadas como as variáveis significativas neste estudo somente a temperatura e a concentração de nitrogênio.

Outro exemplo da aplicação do desenho experimental de Plackett-Burman é o estudo de Fonseca (2015) de otimização da produção de lipases em cultivo submerso utilizando leveduras. Fonseca (2015) utilizou o delineamento Plackett-Burman para identificar dez variáveis significativas (pH, agitação, sulfato de amônio, peptona, triton X-100, Tween 20, azeite de oliva, extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato monopotássico) na produção de lipases por duas linhagens de leveduras, possibilitando a identificação de agitação, pH e concentração de sulfato de amônio como variáveis significativas.

Dessa forma, o planejamento experimental Plackett-Burman se apresenta como uma excelente técnica de *screening* de muitas variáveis, em especial *screening* de componentes de meios de cultivo, como observado na literatura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Microrganismo

Todos os experimentos foram realizados com a linhagem geneticamente modificada da levedura *S. cerevisiae* MDS130, gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Johan M. Thevelein (KU Leuven e NovelYeast, Bélgica). A linhagem MDS130 apresenta desempenho superior ao da linhagem GSE16-T18 HAA1 (MILESSI, 2017) em hidrolisados lignocelulósicos. Foi obtida a partir de modificações genéticas e evolução adaptativa de linhagens anteriores,

buscando obter cepas mais robustas e resistentes a inibidores., A construção das linhagens está detalhadamente descrita nos trabalhos de Demeke et al. (2013a,b), Meijnen et al.(2016) e Liao e colaboradores (2020).

3.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.2.1. Obtenção de suspensão de levedura recombinante para imobilização

As suspensões de células de *S. cerevisiae* MDS130 foram obtidas conforme descrito por Milessi (2017). Inicialmente, uma alça da cultura estoque foi estriada em meio YPXD 2% - ágar, composto por 10 g/L de xilose, 10 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, suplementado com 1,5 % (m/v) de ágar. As placas foram incubadas a 30 °C e o inóculo foi preparado pela transferência de uma colônia para 10mL de meio YPXD 2%, contendo 1mg/mL de ampicilina. Após cultivo em incubadora rotatória por 200 rpm e 35°C pelo tempo necessário até atingir DO (densidade óptica) entre 2,5 a 5,0, um volume definido do pré-inóculo na fase exponencial de crescimento foi transferido para frascos de 1L contendo 250 mL do mesmo meio, os quais foram cultivados em incubadora rotatória a 30°C e 200 rpm até a suspensão alcançar densidade ótica igual a aproximadamente 4, na fase exponencial de crescimento. As suspensões finais foram centrifugadas a 4500 rpm por 20 min para obtenção da biomassa que foi imobilizada, conforme procedimento descrito a seguir.

3.2.2. Estudo da imobilização e da composição do meio por planejamento Plackett Burman

Para a identificação dos fatores que influenciam a tolerância ao etanol empregou-se o planejamento de experimentos Plackett-Burman, recomendado para estudos com elevado número de variáveis (RODRIGUES E IEMMA, 2005). Foram selecionados tanto fatores relacionados à imobilização (diâmetro das cápsulas e concentração de alginato) como fatores relacionados à suplementação do meio (presença ou não de glicerol, ácido oleico, peptona e extrato de levedura como suplementos). Todos os experimentos descritos a seguir foram realizados em parceria e sob supervisão da Doutoranda Caroline Lopes Perez.

A imobilização foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Silva (2013) e Milessi (2017). A biomassa concentrada obtida em 3.3.1 após a centrifugação foi adicionada na proporção de 10 % (m/m) a uma solução contendo alginato de sódio, suplementada com diferentes compostos nas diferentes concentrações previstas, conforme definido pela metodologia de

planejamento experimental adotada reproduzida abaixo. A suspensão resultante foi então gotejada em solução de coagulação contendo CaCl_2 0,25M para obtenção das cápsulas. Diferentes vazões de bombeamento da suspensão e da corrente de ar que auxilia na liberação das gotas foram empregadas para obter cápsulas com os diâmetros médios desejados e previstos no planejamento experimental (1, 3 e 5 mm). A Figura 3.1 mostra o aparato experimental utilizado para obtenção das cápsulas. Ao final da imobilização, as cápsulas foram recolhidas por peneiramento e mantidas a 5°C por pelo menos 12 h em meio contendo o dobro das concentrações de cada componente do meio fermentativo a ser utilizado para cura (Figura 3.2).

Figura 3.1 – Aparato para imobilização celular e confecção dos *beads*



Fonte: Acervo pessoal

1 – Béquer contendo suspensão de biomassa concentrada adicionada ao alginato de sódio e suplementada com diferentes compostos nas concentrações previstas no planejamento experimental; 2 – Mangueira de silicone para escoamento da suspensão; 3 – Bomba peristáltica; 4 – Suporte universal com garra para suporte da mangueira; 5 – Ponteira para auxílio do gotejamento nos diâmetros previstos no planejamento experimental; 6 – Placa de Petri contendo solução coagulante de CaCl_2 ; 7 – Células imobilizadas (cápsulas) em solução coagulante.

Figura 3.2 – Cápsulas em processo de cura após imobilização celular



Fonte: Acervo pessoal

Foram executados 30 experimentos de acordo com o planejamento Plackett-Burman, recomendado para *screening* em estudos envolvendo muitas variáveis (RODRIGUES e IEMMA, 2014). A Tabela 3.1 apresenta os valores reais das 7 variáveis a serem estudadas correspondentes aos níveis codificados (-1), (+1) e (0). A Tabela 3.2 mostra a estrutura do planejamento, o qual é baseado na matriz PB12 com o acréscimo de 3 pontos centrais para determinação do erro puro, totalizando 15 ensaios (RODRIGUES e IEMMA, 2014).

Tabela 3.1 – Fatores e valores reais correspondentes aos níveis codificados empregados no planejamento Plackett-Burman

	x1	x2	x3	x4	x5	x6
-1	1	1	0	0	0	0
0	2	3	40	20	3	2,5
+1	3	5	80	40	6	5

x1 – variável codificada representando a fração mássica de alginato de sódio na solução de preparação das cápsulas (%); x2 – variável codificada representando o diâmetro médio das cápsulas (mm); x3 – variável codificada representando a concentração de peptona na solução de preparação das cápsulas (g/L); x4 – variável codificada representando a concentração de extrato de levedura na solução de preparação das cápsulas (g/L); x5 – variável codificada representando a fração mássica de glicerol na solução de preparação das cápsulas (%); x6 – variável codificada representando a fração mássica de ácido oleico (1mM) na solução de preparação das cápsulas (%).

Tabela 3.2 – Matriz PB12 para estudos de seleção de fatores

ENSAIOS	x1	x2	x3	x4	x5	x6	VI1	VI2	VI3	VI4	VI5
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

A análise estatística foi realizada por meio do cálculo dos efeitos utilizando o software Protimiza (<https://experimental-design.protimiza.com.br/>). Como respostas foram avaliados os seguintes índices de desempenho: conversão, produtividade volumétrica global em etanol, rendimento global em etanol e seletividade. O nível de significância (p-valor) foi estimado usando o teste t de Student, apresentado no diagrama de Pareto. Foram considerados como fatores significativos aqueles que apresentassem valores acima 90% de nível de confiança.

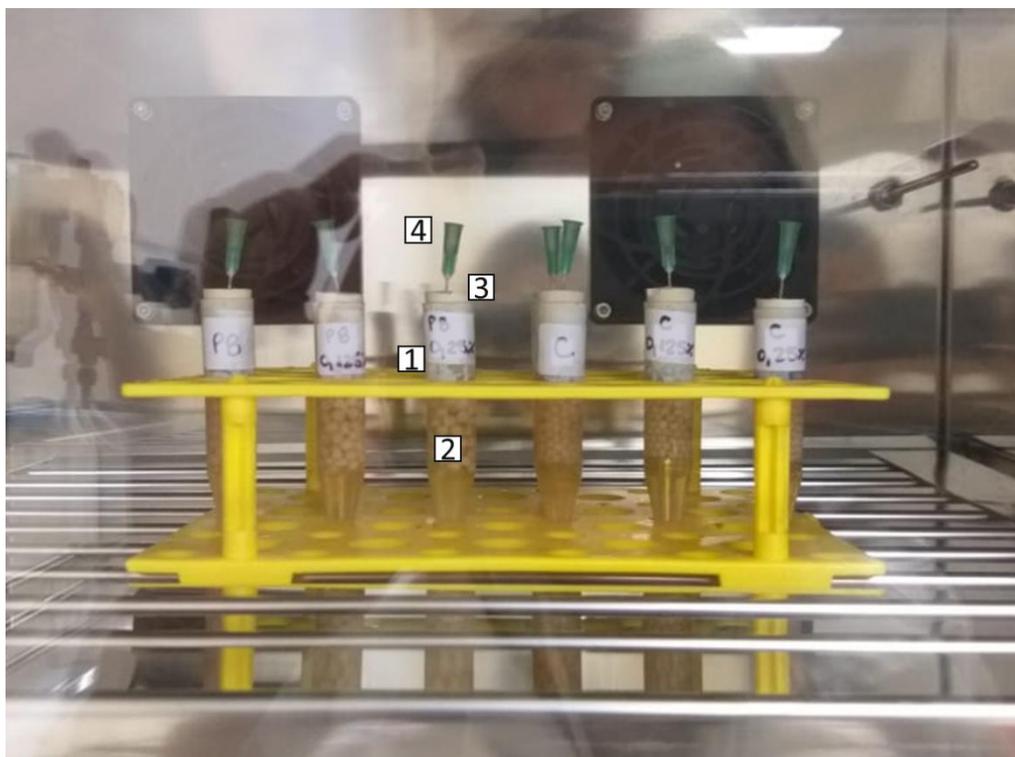
3.2.3. Fermentação com células imobilizadas

Todos os ensaios fermentativos foram realizados em meio YPX 2% (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de xilose), com exceção dos experimentos finais que foram realizados em meio YPDX com concentrações de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 100 g/L de glicose e 200 g/L de xilose. Além disso, os ensaios do planejamento experimental foram realizados em meio A, sem adição inicial de etanol, e em meio B, com a adição de etanol 70 g/L ao meio, com a mesma composição do meio YPX 2 %.

As fermentações foram realizadas em mini-reatores lacrados, dotados de saída para o CO₂ (MILESSI, 2017), de 8 mL de volume útil, contendo 3 mL do meio fermentativo e 3 mL de cápsulas já curadas, preparadas nas condições previstas pelo planejamento experimental (Tabela 3.2), sob temperatura de 35°C em incubação estática.

As fermentações foram acompanhadas a partir dos dados de produção de CO₂, determinada pela perda de massa do mini-reator (Figura 3.3), coletada por pesagens feitas periodicamente em balança analítica, de acordo com o procedimento utilizado por Milesi, 2017. A diferença entre a massa inicial e a medida em cada tempo fornece a massa de gás carbônico liberada. Em todos os ensaios, foi incluído um mini-reator extra como controle, contendo o mesmo volume total (sem células imobilizadas), para monitoramento da perda de massa por evaporação e correção da perda de massa total. Esse modo de acompanhamento do processo não exige retirada de amostras e, portanto, apresenta a vantagem de não alterar a condição anaeróbia estabelecida ao longo das fermentações. As curvas de liberação de CO₂ dos experimentos realizados foram comparadas em tempo real e os experimentos foram continuados em bateladas sucessivas até que fosse observada alteração nos perfis. Ao final de cada fermentação, as cápsulas foram separadas por peneiramento e o sobrenadante filtrado em membrana de 0,22 µm e congelado a -20°C para a determinação da concentração final de açúcares, glicerol, xilitol e etanol (item 3.3.2).

Figura 3.3 – Mini-reatores lacrados, dotados de saída para o CO₂ utilizados nos experimentos



Fonte: Acervo pessoal

1 – Mini-reator de 8 mL de volume útil; 2 – Conteúdo de 3 mL de meio fermentativo e 3 mL de células imobilizadas; 3 – Rolha de vedação do mini-reator para impedir o contato do conteúdo com o ar; 4 – Agulha para a saída do CO₂ produzido ao longo da fermentação.

3.3. Métodos analíticos

3.3.1. Concentrações finais de açúcares, etanol, glicerol e xilitol

Ao final de cada batelada as concentrações de açúcares (xilose e glicose), etanol, glicerol e xilitol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo Waters e2695 equipado com detectores de índice de refração e UV-visível. Foram utilizadas a coluna Sugar-PakTMI (300×6,5 mm) e água ultrapura como fase móvel num fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de 80°C.

3.4. Procedimentos de cálculo

Para avaliação dos ensaios fermentativos foram acompanhados os índices de desempenho de produtividade, seletividade, rendimento em etanol e conversão, com procedimentos de cálculo semelhantes aos utilizados por Milessi (2017) para avaliação dos resultados. Assim, a produtividade volumétrica em etanol (Q_p [g/L/h]) foi calculada pela equação 1:

$$Q_p = \frac{C_{pf} - C_{pi}}{\Delta t_f} \quad (1)$$

Onde C_{pf} é a concentração de etanol ao final da fermentação [g/L], C_{pi} é a concentração de etanol no início do processo [g/L] e Δt_f é o tempo final do processo descontínuo [h].

A seletividade em etanol foi calculada pela Eq. (2) a partir da concentração de etanol produzido (C_{etanol} [g/L]), calculada como diferença entre inicial e final, em relação a concentração de xilitol ao final de cada fermentação ($C_{xilitol}$ [g/L]).

$$S = \frac{C_{etanol}}{C_{xilitol}} \quad (2)$$

Para o cálculo de rendimento global em etanol foi utilizada a Eq. (3):

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{C_{pf} - C_{pi}}{C_{Si} - C_{Sf}} \quad (3)$$

Onde C_{pf} é a concentração de etanol ao final da fermentação [g/L], C_{pi} é a concentração de etanol no início do processo [g/L], C_{Sf} é a concentração de substrato ao final da fermentação [g/L] e C_{Si} é a concentração de substrato no início do processo [g/L].

Para a conversão final (X_f), os cálculos foram feitos de acordo com a Eq. (4):

$$X_f = \frac{C_{Si} - C_{Sf}}{C_{Si}} \times 100\% \quad (4)$$

Onde C_{Si} é a concentração de açúcares totais no tempo inicial [g/L] e C_{Sf} é a concentração de açúcares totais no caldo fermentado ao final da batelada [g/L] obtidas a partir de análise em cromatografia líquida de alta eficiência.

Por fim, para os cálculos de conversão ao longo do tempo, foi utilizada a equação a seguir:

$$X = \frac{\Delta m}{\Delta mf} \times Xf \quad (5)$$

Onde Xf é a conversão final calculada como mostrado acima, Δm é a variação de massa em determinado tempo da batelada em decorrência da liberação de CO_2 e Δmf é a variação de massa ao final da batelada em decorrência da liberação de CO .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Influência dos componentes suplementados no desempenho da fermentação

Durante a preparação dos beads para a realização dos experimentos foi constatada dificuldade de preparação da suspensão. Como as suspensões preparadas em alginato de sódio já contêm alta carga de células, a adição de outros componentes em altas concentrações, particularmente o glicerol e o ácido oleico, dificulta muito a homogeneização da suspensão e até a solubilização dos componentes presentes no extrato de levedura e na peptona. Os experimentos iniciais para aferição do aparato foram feitos a partir do ponto central do planejamento Plackett-Burman com níveis previstos inicialmente representados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Fatores e valores reais correspondentes aos níveis codificados empregados no planejamento Plackett-Burman dos experimentos iniciais

	x1	x2	x3	x4	x5	x6
-1	1	1	0	0	4	0
0	2	3	40	20	10	15
+1	3	5	80	40	16	30

x1 – variável codificada representando a fração mássica de alginato de sódio na solução de preparação das cápsulas (%); x2 – variável codificada representando o diâmetro médio das cápsulas (mm); x3 – variável codificada representando a concentração de peptona na solução de preparação das cápsulas (g/L); x4 – variável codificada representando a concentração de extrato de levedura na solução de preparação das cápsulas (g/L); x5 – variável codificada representando a fração mássica de glicerol na solução de preparação das cápsulas (%); x6 – variável codificada representando a fração mássica de ácido oleico (1mM) na solução de preparação das cápsulas (%).

Por essa razão, optou-se por realizar o estudo da influência dos componentes suplementados utilizando concentrações menores do que as previstas inicialmente no planejamento (Tabela 4.1) para o ácido oleico e para o glicerol. As concentrações de alginato (2%), extrato de levedura (20 g/L) e peptona (40 g/L) foram mantidas como previsto inicialmente no planejamento, mas as frações mássicas de glicerol foram alteradas para 0, 3 e 6% (m/m) e de ácido oleico para 0, 2,5 e 5% (m/m) no planejamento experimental.

As demais concentrações empregadas nos experimentos complementares estão reproduzidas na Tabela 4.2, juntamente com os resultados obtidos em termos de produtividade em etanol.

O ensaio C1, usado como referência, foi conduzido com meio fermentativo YPDX 2% (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 10 g/L e xilose 10g/L) e apresentou produtividade em etanol igual a 1,61 g/L.h. Os demais experimentos realizados com meios suplementados pelos diferentes componentes apresentaram produtividade igual ou superior à observada em C1.

A partir dos resultados apresentados na Tabela 4.2, nota-se que a peptona foi o aditivo que mais contribuiu para o aumento da produtividade em etanol, com produtividade em etanol do ensaio C4 45% maior do que a produtividade do ensaio C1, seguida do ácido oleico e do extrato de levedura. A suplementação do meio com glicerol 6% m/m não contribuiu para o aumento da produtividade, ao contrário do observado por Revin et al. (2018). O efeito positivo da peptona já era esperado, considerando-se que ela é rica em carboidratos e assim significa maior substrato disponível para a fermentação. Da mesma forma, o extrato de levedura, por conter proteínas e aminoácidos, contribuiu para o aumento da produtividade.

Tabela 4.2 – Produtividade em etanol dos cultivos com meios suplementados

ENSAIO	Suplementação e concentração no meio	Produtividade (g/L.h)	%
C1(duplicata)	-	1,61±0,15	-
C2	Glicerol 6% m/m	1,60	-
C3	Ácido oleico 5% m/m 2,06 28	2,06	28
C4	Peptona 40g/L	2,34	45
C5	Extrato de levedura 20g/L	2,01	25

Concentrações empregadas nos experimentos complementares, realizados com beads de 3mm com concentração de alginato 2%.

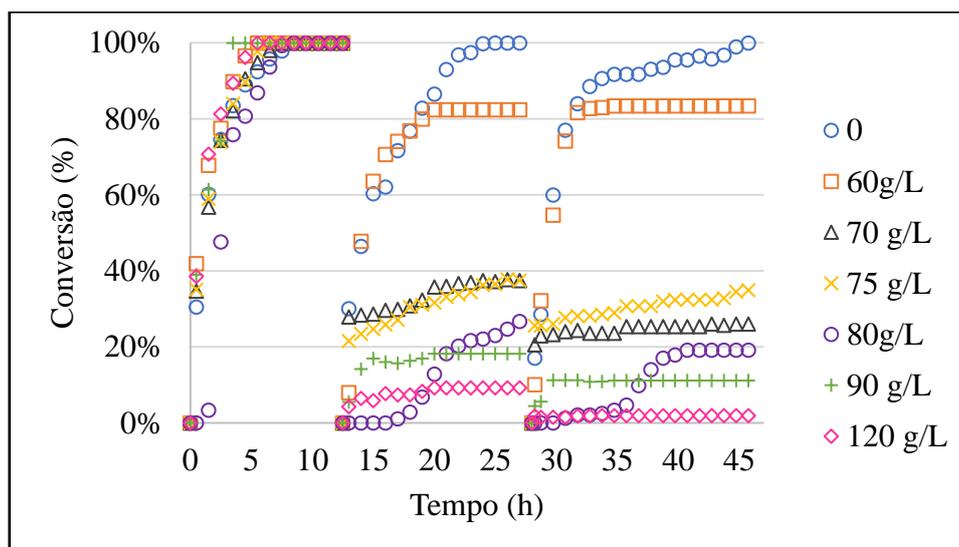
Verificou-se também que não houve efeito inibidor dos componentes extrato de levedura, peptona, glicerol e ácido oleico nas concentrações testadas e que essas concentrações viabilizaram a confecção das micro-cápsulas sem dificuldades.

4.2. Avaliação das concentrações de etanol

Em experimentos preliminares deste estudo, com a realização de fermentações com concentrações iniciais de etanol menores que 40g/L, observou-se longo tempo de fermentação até que a diferença entre os perfis de fermentação em meio com e sem etanol inicial fosse percebida. Dessa forma, com a finalidade definir a concentração de etanol a ser usada no meio B (com etanol) nos experimentos do planejamento experimental de modo permitir mais rapidamente a diferenciação entre os perfis de fermentação para avaliação do efeito da exposição prolongada a altas concentrações de etanol na fermentação, foram realizados experimentos com 7 concentrações iniciais de etanol diferentes.

As concentrações testadas foram de 0, 60, 70, 75, 80, 90 e 120 g/L de etanol e as demais condições experimentais como descritas no procedimento experimental, chegando-se aos resultados apresentados na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Conversão ao longo do tempo nos experimentos de avaliação das concentrações de etanol



Fonte: Acervo pessoal

A partir das conversões mostradas na Figura 4.1 observa-se que nos meios com concentração de etanol inicial de 90 e 120 g/L houve grande queda de conversão já na segunda batelada, sendo a conversão final 18% para o meio com 90g/L de etanol inicial e 9% para o meio com 120 g/L, embora na primeira batelada de ambas atingiu-se 100% de conversão. Esses resultados mostram que as respectivas concentrações iniciais de etanol possuem efeito rápido sobre o desempenho fermentativo das células.

Para o meio com 80 g/L de etanol inicial, o mesmo é observado na terceira batelada, quando a conversão final atingida é 19%. Já para os meios com 70 e 75 g/L, pode-se dizer que a queda na conversão final é atingida apenas após a ocorrência da terceira batelada, uma vez que na terceira batelada para estes meio as conversões finais são de 26% e 35%, respectivamente. Já para os meios sem e com 60 g/L de etanol inicial, observa-se que mesmo após 45 horas de fermentação não há grande queda de conversão, mostrando que não houve efeito inibitório da fermentação celular significativo nos dois meios, já que no meio sem suplementação com etanol a conversão ao final da terceira batelada é 100% e no meio com 60 g/L de etanol inicial é de 83%.

Sendo assim, foi determinado o uso da concentração de 70 g/L de etanol para o meio B a ser utilizado nas fermentações do planejamento experimental, pois, como observado, foi uma concentração inicial de etanol que permitiu a observação de alteração nos perfis de conversão após exposição prolongada e repetição em até três bateladas, sem que houvesse grande queda de conversão logo na primeira batelada, possibilitando a observação de efeitos positivos ou negativos das suplementações a serem realizadas nos experimentos do planejamento experimental.

4.3. Experimentos do planejamento experimental

Conforme mostram as Tabelas 3.1 e 3.2, as condições do planejamento experimental foram seguidas nos 15 experimentos previstos, a fim de se realizar uma análise estatística para definir quais foram as suplementações que favoreceram significativamente a fermentação sob exposição prolongada de etanol.

Para os experimentos realizados, foram avaliadas quatro variáveis resposta: produtividade volumétrica de etanol (Q_p [g/L.h]), seletividade em etanol (S [g_{et}/g_{xil}]), rendimento global em etanol (Y_p/s [g_{et}/g_{xil}]) e conversão final (X_f [%]), calculados conforme descrito em 3.5. Os principais resultados obtidos para as 4 respostas selecionadas são apresentados nas Tabelas 4.3 (meio A, sem etanol) e 4.4 (meio B, suplementado com etanol). Para a identificação dos fatores que exercem efeitos significativos sobre as respostas produtividade, seletividade, rendimento e conversão, foi feita análise estatística utilizando o software Protimiza (<https://experimental->

design.protimiza.com.br/). Os principais resultados da análise estatística são apresentados nos gráficos de Pareto (Figuras 4.2 a 4.5) para cada resposta, em ambos os meios estudados.

Vale ressaltar que, para alguns ensaios, os resultados obtidos para rendimento global em etanol foram maiores que o valor teórico encontrado na literatura de 0,51 gramas de etanol por grama de xilose, o que se deve a presença de peptona no meio, que por ser um suplemento rico em carboidratos, significa maior substrato disponível para a fermentação.

Tabela 4.3 – Resultados dos experimentos do planejamento experimental em meio A (sem etanol)

Ensaio	Batelada I				Batelada II			
	Qp (g/l.h)	S (get/gxil)	Yp/s (get/gxil)	X _f (%)	Qp (g/l.h)	S (get/gxil)	Yp/s (get/gxil)	X _f (%)
1	0,46	1,47	0,27	91,94	-	-	-	-
2	0,63	8,89	0,57	98,74	0,63	7,92	0,89	96,47
3	0,76	9,46	0,69	94,79	0,67	7,27	0,78	94,57
4	0,65	1,69	0,39	90,93	-	-	-	-
5	0,82	9,23	0,74	94,33	0,70	12,18	0,89	96,68
6	0,50	3,51	0,34	86,63	-	-	-	-
7	0,49	3,72	0,33	82,51	-	-	-	-
8	0,60	3,43	0,46	91,19	-	-	-	-
9	0,61	3,57	0,46	91,83	-	-	-	-
10	0,24	1,35	0,14	93,32	-	-	-	-
11	0,23	1,57	0,15	91,68	-	-	-	-
12	0,61	3,84	0,46	92,18	-	-	-	-
13	0,66	6,11	0,37	93,62	0,66	4,18	0,19	98,44
14	0,70	5,82	0,39	96,13	0,61	4,20	0,20	98,75
15	0,62	5,31	0,34	97,56	0,62	3,97	0,20	98,81

Tabela 4.4 – Resultados dos experimentos do planejamento experimental em meio B (com etanol, 70 g/L)

Ensaio	Batelada I				Batelada II			
	Qp (g/l.h)	S (get/gxil)	Yp/s (get/gxil)	X _f (%)	Qp (g/l.h)	S (get/gxil)	Yp/s (get/gxil)	X _f (%)
1	0,26	0,52	0,26	59,34	-	-	-	-
2	0,22	3,69	0,27	100,00	0,62	2,73	0,30	93,40
3	0,27	5,90	0,33	100,00	0,63	2,49	0,26	82,42
4	0,23	0,60	0,28	51,60	-	-	-	-
5	0,46	5,87	0,56	97,29	0,51	1,26	0,31	68,23
6	0,41	3,18	0,71	37,30	-	-	-	-
7	0,22	0,78	0,36	40,87	-	-	-	-
8	0,36	2,77	0,47	54,39	-	-	-	-
9	0,25	1,70	0,59	38,34	-	-	-	-
10	0,05	0,25	0,16	25,34	-	-	-	-
11	0,15	0,98	0,23	49,59	-	-	-	-
12	0,39	2,46	0,53	58,83	-	-	-	-
13	0,16	3,02	0,38	75,37	0,27	1,26	0,15	68,43
14	0,18	3,11	0,37	87,16	0,24	0,91	0,12	71,41
15	0,17	2,98	0,37	85,62	0,24	0,82	0,10	71,32

Figura 4.2 – Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a produtividade volumétrica de etanol nos meios com e sem etanol

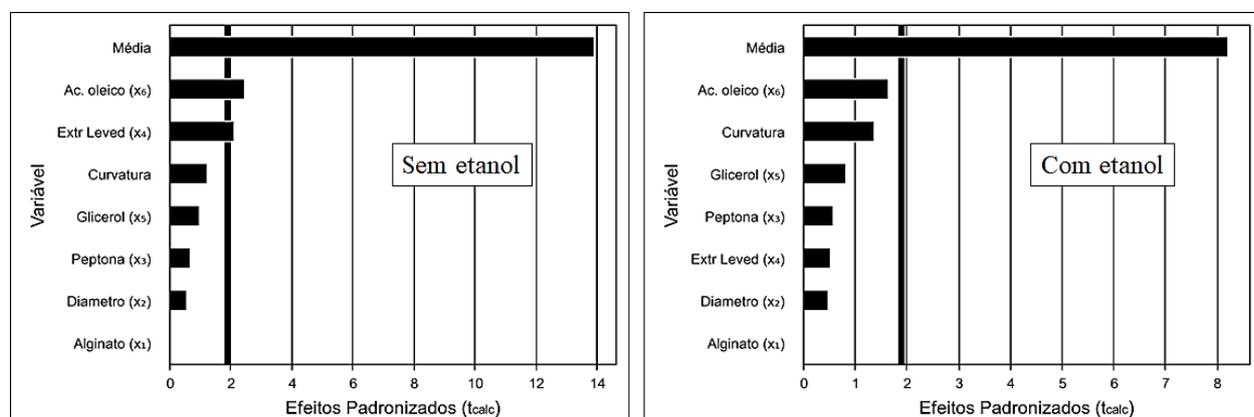


Figura 4.3 – Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a seletividade em etanol nos meios com e sem etanol

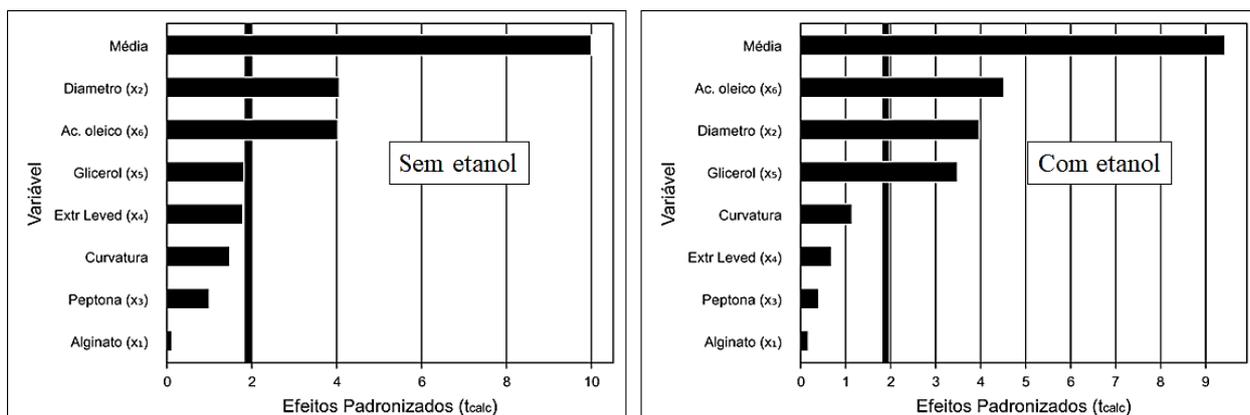


Figura 4.4 – Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre o rendimento global em etanol nos meios com e sem etanol

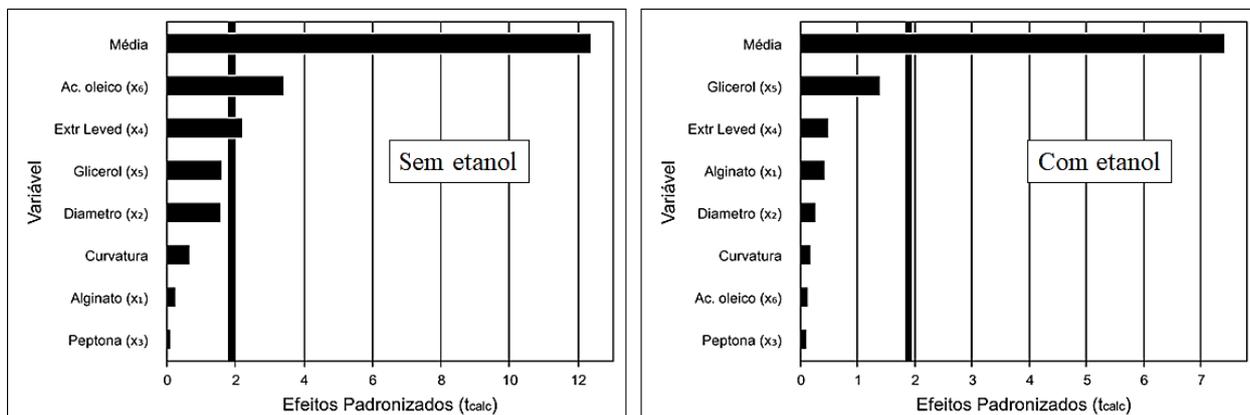
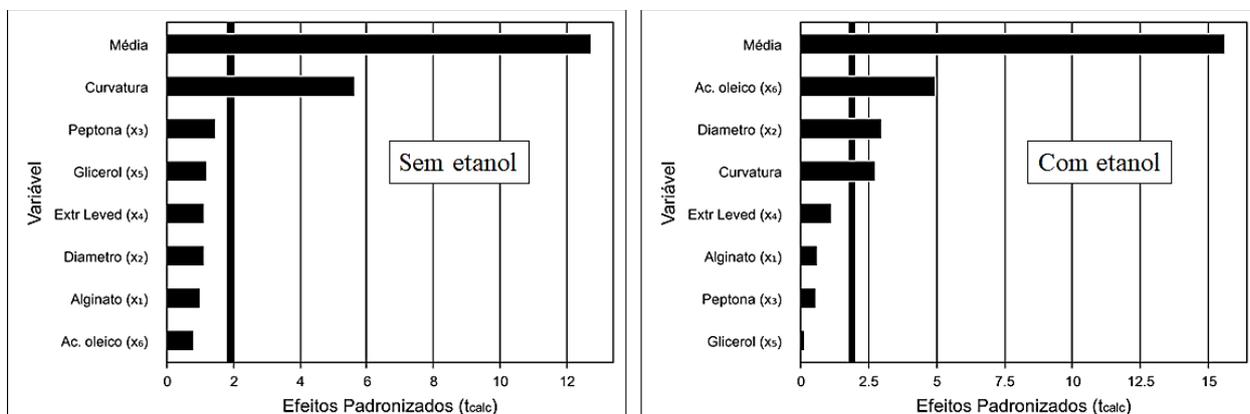


Figura 4.5 – Diagramas de Pareto de efeito das variáveis sobre a conversão final nos meios com e sem etanol



De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 4.2 e 4.4, os fatores ácido oleico e extrato de levedura apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre as respostas produtividade volumétrica e rendimento global em etanol, para os experimentos realizados sem adição inicial de etanol. Conforme mostra o Tabela 4,5, o efeito do ácido oleico foi negativo, o que significa que a adição de ácido oleico não favoreceu as respostas. Já a adição de extrato de levedura mostrou efeito positivo e, portanto, contribuiu para aumento de ambas as respostas. Nenhum fator apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a produtividade e sobre o rendimento global para os experimentos realizados com suplementação de etanol.

Para a seletividade (Figura 4.3), nos experimentos sem adição de etanol, o diâmetro e o ácido oleico mostraram efeitos estatisticamente significativos. Podem ainda ser considerados efeitos estatisticamente significativos dos fatores glicerol e extrato de levedura, já que o p-valor ficou muito próximo de 0,1. Nos experimentos com suplementação de etanol, os fatores estatisticamente significativos foram ácido oleico, diâmetro e glicerol. A partir do Tabela 4,5, constata-se que o aumento do diâmetro e a adição de glicerol (em ambos os estudos) assim como a adição de extrato de levedura (estudos sem adição de etanol) favorecem a seletividade, enquanto a adição de ácido oleico novamente apresenta um efeito negativo em ambos os estudos.

Por fim, para a variável conversão final (Figura 4.5), o diagrama para o meio sem suplementação com etanol mostra que nenhuma variável apresentou efeito estatisticamente significativo. Já, para os estudos realizados com o meio enriquecido com etanol inicial, novamente os fatores diâmetro e ácido oleico apresentaram efeitos estatisticamente significativos sobre essa resposta, sendo que a conversão é favorecida com o aumento do diâmetro (Tabela 4,5), mas não pela adição de ácido oleico.

O efeito de curvatura (Tabela 4.5) foi estatisticamente significativo apenas para a resposta conversão (Figura 4.5), em condições de suplementação ou não por etanol. Isso significa que o mínimo ou o máximo em conversão se encontra dentro da região estudada (diâmetro entre 1 e 5 mm, na ausência de ácido oleico). Para as demais respostas, o efeito de curvatura não foi estatisticamente significativo (Figuras 4.2 a 4.4), o que indica que as respostas não alcançaram o máximo nas condições estudadas (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Outro resultado interessante revelado pela análise estatística é que a peptona não apresentou efeito significativo sobre nenhuma resposta, o que sugere que esse componente pode ser retirado do meio de cultivo sem comprometer o desempenho na produção de etanol, contribuindo para diminuir o custo do processo.

Dessa forma, para as variáveis de concentração de alginato, de glicerol e de extrato de levedura foram obtidos resultados de acordo com o encontrado na literatura. Para a concentração

de alginato, observou-se a partir da análise estatística que a variável não apresentou efeito significativo para nenhuma das respostas analisadas, podendo ser considerada a menor concentração testada, de 1% (m/m) de alginato no preparo das cápsulas, como a melhor condição para a variável em questão, o que pode ser relacionado à maior facilidade de penetração de substrato e produto para dentro das cápsulas e para o retorno ao meio fermentativo (NAJAFPOUR, YOUNESI E ISMAIL, 2004). Para o glicerol a melhor condição encontrada foi de 6% (m/m) e para o extrato de levedura foi de 40g/L, o que pode significar presença de efeito protetor conferido às células pelo glicerol e pelo extrato de levedura quando sob efeito de estresse (REVIN et al., 2018).

Tabela 4.5 – Efeitos estatisticamente significativos para os fatores estudados sobre as diferentes respostas

Resposta	Diâmetro das cápsulas	Ácido oleico	Extrato de levedura	Glicerol	Curvatura
Produtividade (sem ad. de etanol)	NS	- 0,19	0,17	NS	NS
Seletividade (sem ad. de etanol)	3,50	- 3,49	1,55	1,56	NS
Seletividade (com ad. de etanol)	2,02	-2,29	NS	1,77	NS
Rendimento (sem ad. de etanol)	NS	-0,23	0,15	NS	NS
Conversão (sem ad. de etanol)	-166	NS	NS	NS	NS
Conversão (sem ad. de etanol)	22,9	-37,8	NS	NS	46,6

NS – não significativo

Em relação ao resultado obtido para a variável diâmetro, mesmo que o aumento do diâmetro tenda a aumentar as restrições a transferência de massa interna à cápsula (NEDOVIC et al., 2001), existe a hipótese de que seja formada uma camada de sacrifício, fazendo com que células internas sejam protegidas do estresse do meio por células mais externas da cápsula (LEI et al., 2007), o que seria possível apenas em diâmetros maiores de cápsulas de alginato.

Para o ácido oleico, obteve-se que a sua suplementação ao meio de acordo com os experimentos realizados implicou em piora dos resultados de desempenho da fermentação, não indo de acordo com o encontrado na literatura de que o ácido oleico seria eficaz em superar efeitos de toxicidade do etanol na fermentação celular partindo da hipótese de que ácido oleico é incorporado na membrana lipídica das células (YOU et al., 2002).

Dessa forma, os resultados da análise estatística sugerem que o desempenho da levedura sob exposição prolongada ao etanol em altas concentrações é influenciado apenas por três fatores: o aumento do diâmetro, o aumento da concentração de extrato de levedura e o aumento da concentração de glicerol. Assim, pode ser identificada uma condição de estudo promissora para o desempenho caracterizada por produção de cápsulas com 1% (m/m) de alginato e diâmetro de 5 mm e suplementação do meio com 40 g/L de extrato de levedura e 6% (m/m) de glicerol, sem adição de peptona e de ácido oleico. No caso dos fatores que não apresentaram efeitos significativos (concentração de alginato e peptona) ou que apresentaram efeitos significativos, mas negativos (ácido oleico), optou-se pela escolha da menor concentração estudada, já que as respostas analisadas não são afetadas por esses fatores, de acordo com a análise estatística.

4.4. Comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central

Foram realizados ensaios para comparação entre o resultado da fermentação com cápsulas nas condições do ponto central do planejamento experimental e nas condições identificadas como mais promissoras de acordo com a análise estatística. A Tabela 4.6 detalha as condições estudadas, sendo denominados como PB o experimento conduzido sob as condições mais promissoras identificadas pela análise estatística e como C o experimento conduzido nas condições do ponto central do planejamento experimental.

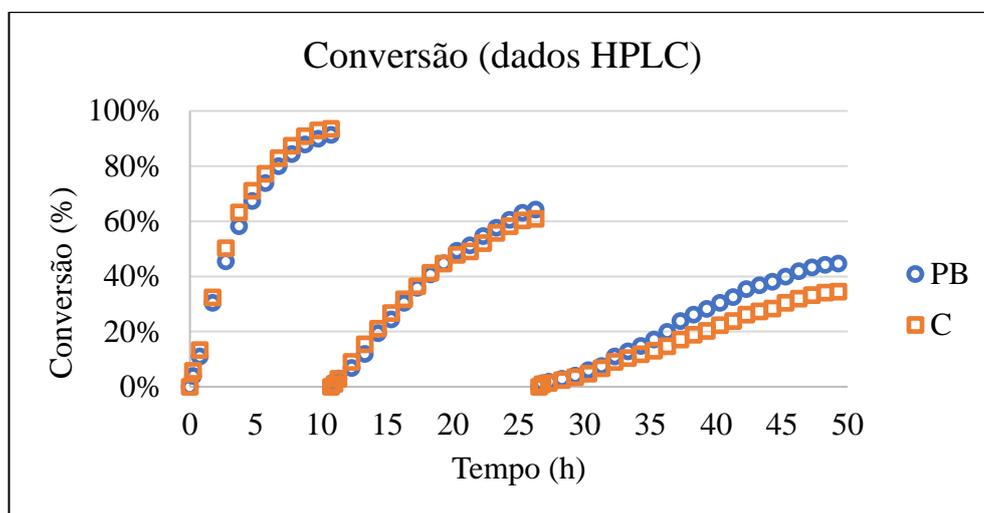
Tabela 4.6 - Fatores e valores correspondentes empregados nos ensaios comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central

Ensaio	Alginato	Diâmetro	Peptona	Ext. Levedura	Glicerol	Ác. Oleico
PB1	1%	5 mm	0	40 g/L	6%	0
C1	2%	3 mm	40 g/L	20 g/L	3%	2,50%

Analisando a Figura 4.6, observa-se que os perfis de conversão são muito semelhantes nas bateladas I e II, apresentando diferença significativa apenas na terceira batelada, sendo a conversão final nas condições PB 30% maior que em C. Isso indica que as condições de imobilização e suplementação definidas a partir do resultado da análise estatística apresentam vantagem em relação à condição do ponto central em situação de exposição prolongada à alta concentração de etanol, visto que na primeira batelada foram obtidos 100 g/L de etanol para PB e 103 g/L para C e ao final da terceira a 60 e 62 g/L respectivamente. Vale ressaltar que se trata de uma condição superdimensionada em termos de concentração de etanol quando comparada a uma situação

industrial, indicando que em condicionais mais próximas a esta provavelmente haveria a possibilidade de maior número de repetições.

Figura 4.6 - Conversão ao longo do tempo nos experimentos finais comparação entre resultado do planejamento experimental e ponto central



Fonte: Acervo pessoal

Na Tabela 4.7 pode-se observar os resultados calculados com valores obtidos a partir dos resultados de cromatografia líquida de alta eficiência, a partir dos quais confirma-se que a conversão foi realmente maior na terceira batelada no caso do experimento realizado sob as condições PB.

Tabela 4.7 – Respostas de produtividade, seletividade, rendimento e conversão nos experimentos de comparação entre resultado do planejamento experimental e do ponto central

Batelada	Ensaio	Qp (g/l.h)	S (get/gxil)	Yp/s (get/gxil)	X (%)
Batelada I	PB	9,36	10,46	0,50	91,35
	C	9,60	12,78	0,50	93,47
Batelada II	PB	3,90	12,94	0,41	64,24
	C	3,91	17,38	0,43	60,81
Batelada III	PB	1,84	18,65	0,45	44,62
	C	1,94	23,31	0,61	34,44

Ainda na tabela 4.7, é possível observar que não só as conversões finais são semelhantes para os ensaios PB e C nas bateladas I e II, mas também os resultados de produtividade, seletividade e rendimento em etanol. Já na terceira batelada, é surpreendente que, apesar de melhor

conversão final que o ensaio C, o ensaio PB obteve valores inferiores de produtividade, seletividade e rendimento em etanol em relação aos valores de C. No entanto a diferença é pouco significativa quando comparada a diferença entre as conversões finais.

Em relação à viabilidade celular analisada ao longo dos ensaios, não foram obtidos resultados significativos que pudessem ser analisados como respostas dos ensaios quando comparados com os resultados de produtividade, seletividade, rendimento e conversão apresentados acima.

Sendo assim, a partir dos resultados apresentados, observa-se que as condições de imobilização definidas a partir da análise estatística apresentam vantagens quando em condição de exposição prologada à alta concentração de etanol.

5. CONCLUSÕES

Os estudos realizados permitiram alcançar os objetivos propostos. A influência do diâmetro das cápsulas e da composição da solução de alginato de sódio utilizada na encapsulação da levedura assim como da suplementação da solução de alginato de sódio com peptona, extrato de levedura, lipídeos (ácido oleico) e glicerol foi estudada utilizando o planejamento PB sobre a tolerância das células ao etanol. Ao contrário do relatado na literatura, a suplementação com peptona e ácido oleico não contribuíram para melhorar o desempenho das fermentações. Porém, o aumento do diâmetro das cápsulas e a suplementação com extrato de levedura e glicerol apresentaram efeitos significativos sobre as respostas avaliadas (conversão, produtividade, seletividade e rendimento em etanol). A partir dos resultados fornecidos pela análise estatística, foram identificadas as condições mais promissoras (1% m/m de alginato, diâmetro de 5 mm, 40 g/L de extrato de levedura e 6% m/m de glicerol, sem adição de peptona e ácido oleico). Os experimentos conduzidos em meio sintético nessas condições apresentaram conversão final superior à condição do ponto central, em meio isento de peptona, após 50 h de exposição a concentrações de etanol de 100 g/L. Portanto, a metodologia proposta foi eficiente na identificação dos principais fatores que contribuem para aumentar a tolerância ao etanol. Estudos complementares são necessários para otimizar a concentração de extrato de levedura e para avaliar o desempenho da fermentação conduzida nas condições mais promissoras em hidrolisados concentrados de hemicelulose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSANAY-GALEOTE, V. et al. **Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae***. *Biotechnology Letters*, v. 23, n. 9, p. 677–681, 2001.
- AGUILAR-RIVERA, N. **Bioetanol de la caña de azúcar**. *Avances en Investigación Agropecuaria*, vol. 11, núm. 3, p. 25-39, 2007.
- 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.
- CASPETA, L.; CASTILLO, T.; NIELSEN, J. **Modifying Yeast Tolerance to Inhibitory Conditions of Ethanol Production Processes**. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 3, p. 1–15, 2015.
- CARVALHO, A.F.A.; NETO, P.O.; SILVA, D.F.; PASTORE, G.M. **Xylooligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis**. *Food Research International*, v.51, 75-85, 2013.
- CHANDEL, A.K; SILVA, S.S.; SINGH, O. V. **Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production**. *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, n. September, 2012.
- COVIZZI, L.G. **Seleção de um Suporte Sintético para imobilizar células do *Botryosphaerla rhodina* e comparação da produção de lacase por células livres e imobilizadas**. 90 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2007.
- DEMEKE, M. M.; DRIETZ, H.; LI, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; MUTTURI, S.; DEPREZ, S.; ABT, T. D.; BONINI, B. M.; LIDEN, G.; DUMORTIER, F.; VERPLAETSE, A.; BOLES, E.; THEVELEIN, J. M. **Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering**. *Biotechnology for Biofuels*, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2013a.
- DEMEKE, M.M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. **Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production**. *Biotechnology for Biofuels*, v.6, p.120, 2013b.

DUBEY, R.; JAKEER, S.; GAUR, N. A. **Screening of natural yeast isolates under the effects of stresses associated with second-generation biofuel production.** Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 121, n. 5, p. 509–516, 2016.

Departamento de Economia e Estatística, ÚNICA. **Relatório Final Safra 2017/2018 - Região Centro-Sul Do Brasil.** Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=102>>. Acesso em 6 de junho de 2018.

FONSECA, A. A. C. **Otimização da produção de lipases em cultivo submerso utilizando leveduras do cerrado tocantinense.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Palmas, 2015.

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.

GUO, G. L. et al. **Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition.** Enzyme and Microbial Technology, v. 45, n. 2, p. 80–87, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. **Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*.** Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 108, n. May, p. 147–177, 2007.

IDRIS, A.; SUZANA, W. **Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*.** Process Biochemistry, v. 41, n. 5, p. 1117–1123, 2006.

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.

KUMAR, A.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. **Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*.** Bioresource Technology, v. 100, n. 13, p. 3293–3297, 2009.

- KWAK, S.; JIN, Y. S. **Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective.** *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.
- LIAO, Y. et al. **A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production.** *Science*, v. 367, n. 6484, p. 1385–1390, 2020.
- MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificadas imobilizadas.** Tese doutorado. PPG-EQ/UFSCar, 2017.
- 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.
- 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
- NEDOVIC, V.A.; OBRADOVIC, B.; LESKOSEK-CUKALOVIC, I.; TRIFUNOVIC, O; PESIC, R.; BUGARSIKI, B. V. **Electrostatic generation of alginate microbeads loaded with brewing yeast.** *Process Biochemistry*, v.37, p.17-22, 2001.
- NIGAM, P.S.; SINGH, A. **Production of liquid biofuels from renewable resources.** *Progress in Energy and Combustion Science*, v.37, p.52-68, 2011.
- PIZATO, S.; OGRODOWSKI, C. S.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C. **Screening de variáveis para a produção de biomassa e ácido lático utilizando planejamento Plackett-Burman.** *J. Bioen. Food Sci*, v 02, 2015.
- PLACKETT, R. L., & BURMAN, J. P. **The Design Of Optimum Multifactorial Experiments.** *Biometrika*, 33(4), p. 305–325, 1946.
- 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*, v.2., 2001.

REVIN, V.; ATYKYAN, N.; LYOVINA, Y.; USHKINA, V. **Effect of ultraviolet radiation on physiological and biochemical properties of yeast *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation of ultradispersed starch raw material.** *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 31, p. 61–66, 2018.

RODRIGUES, I. M.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos.** Campinas: Caso do Pão, 2005.

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

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

ROSENFELD, C.; KNIPPLE, D. C. **Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content.** *Applied and environmental microbiology*, v. 69, n. 3, p. 1499, 2003.

SANTOS, J. C.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A. **Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate.** *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 53, n. 42, p. 16494–16501, 2014.

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.

SILVA, C.R.; ZANGIROLAMI, T.C.; RODRIGUES, J.P.; MATUGI, K.; GIORDANO, R.C.; GIORDANO, R.L.C. **An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor.** *Enzyme and Microbial Technology*, v.50, p.35-42, 2012.

SLININGER, P. J. et al. **Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 24, n. 2, p. 371–384, 1982

WASYLENKO, T. M.; STEPHANOPOULOS, G. **Metabolomic and ¹³C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase.** *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, n. 3, p. 470–483, 2015.

YAMAOKA, C.; KURITA, O.; KUBO, T. **Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation.** Microbiological Research, v.169, p.907-914, 2014

YOU, K. M.; ROSENFELD, C.; KNIPPLE, D. C. **Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content.** Applied and environmental microbiology, v. 69, n. 3, p. 1499, 2003.