

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 23/02/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

São José do Rio Preto

2018

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz

São José do Rio Preto

2018

Trinca, Natália Righetti Rocha.

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 / Natália Righetti Rocha Trinca. -- São José do Rio Preto, 2018

130 f. : il., tabs.

Orientador: Crispin Humberto Garcia Cruz

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biotecnologia. 2. Etanol. 3. Glicose. 4. Fermentação. 5. Levedos.
I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 661.722

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Natália Righetti Rocha Trinca

Conversão de glicose e xilose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e *Pachysolen tannophilus* CCT 1891.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Concentração – Ciência e Tecnologia de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia Cruz
UNESP - São José do Rio Preto/SP

Prof. Dr. Marcos de Lucca Júnior
IFSP - Barretos/SP

Prof^a Dr^a Vidiany Aparecida Queiroz Santos
UTFPR – Pato Branco/PR

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – São José do Rio Preto/SP

Prof^a Dr^a. Marília Gonçalves Cattelan
UNESP – São José do Rio Preto/SP

São José do Rio Preto

23 de fevereiro de 2018

“(…) O mundo precisa saber a verdade, passado não volta, futuro não temos e o hoje não acabou, por isso ame mais, abrace mais, pois não sabemos quanto tempo temos pra respirar. Fale mais, ouça mais, vale a pena lembrar que a vida é curta demais”

Música Verdades do Tempo - Thiago Brado

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estarão ao meu lado: meus pais Simone e Fernando e minha irmã Michelle.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais esta conquista em minha vida, por sempre iluminar meu caminho e guiar meus passos. Obrigada por me fazer ser uma pessoa tão abençoada e cheia de luz. A fé move montanhas.

Ao meu orientador Prof. Dr. Crispin que, com tanta paciência, me orientou durante todos esses anos. Obrigada por tentar me fazer acreditar que sou capaz e por enxergar coisas boas em meus trabalhos. Obrigada por todo apoio, principalmente na fase final do Doutorado. Da mesma maneira que agradei no Mestrado, obrigada por me fazer rir mesmo quando eu queria chorar (que não foram poucas vezes).

Não existem palavras suficientes para agradecer meus pais Simone e Fernando e minha irmã Michelle por todo amor incondicional e suporte para que eu alcançasse mais esta vitória. Vocês sabem o quanto me esforcei para chegar até aqui. Só tenho a agradecer vocês por todo o apoio e carinho. Vocês são meus exemplos de vida e minha base, não sei como agradecer tudo que vocês fizeram, fazem e são para mim. Me desculpem por todos esses anos de ausência. Amo muito vocês, meus parceiros. Pai... subi mais um degrau.

Ao Diego, meu amor, meu amigo e meu companheiro, obrigada por estar ao meu lado todos esses anos. Obrigada por tornar minha vida mais leve, por me ouvir e não me deixar desistir do Doutorado, você foi peça fundamental para que eu chegasse até aqui, foi você que me aturou em todos os meus dias de estresse, tristeza e desespero.

À minha família agradeço, em especial, ao meu avô Rocha, minha avó Alice, William, Fátima (sogra) e Álvaro pela força e torcida. Com muito carinho agradeço aos meus anjos da guarda, avó Elza (*In memoriam*) e avô João (*In memoriam*) que sei que nunca deixarão de estarem presentes em meus pensamentos, memórias e em meu coração.

Ao Padre Sidnei que sempre torceu e orou por mim e que foi instrumento de Deus como um anjo da guarda em minha vida. Obrigada por fazer parte desta história.

Aos amigos que já tinha e aos que adquiri ao longo destes anos: Mirian (querida companheira de Doutorado, almoço e natação), Juliana Ferreira, Daiane, Aline, Amandinha, Pedro, Sidnei, Txomin e clube da “Luluzinha” (Heloisa, Letícia, Bruna e Melissa), obrigada por tornarem esta caminhada mais alegre com nossos encontros e conversas. Em especial agradeço a Talita, minha amiga querida que me ensinou que é possível formar uma família mesmo buscando o sucesso profissional, te admiro muito

como mulher, profissional e mãe. Obrigada por sempre me ouvir e me aconselhar da melhor maneira possível.

A todos os professores e funcionários do IBILCE por todo suporte e conhecimento passado. Agradeço à Tânia que, além de toda ajuda prestada, se tornou uma amiga muito querida.

Aos professores que fizeram parte das bancas de qualificação e defesa Prof. Dr. Marcos de Lucca Júnior, Profª Drª Vidiany Aparecida Queiroz Santos, Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, Profª Drª. Marília Gonçalves Cattelan e Profª Drª Fernanda Maria Pagane Guerreschi Ernandes. Obrigada por todas as críticas que enriqueceram meu trabalho.

Aos alunos de Iniciação Científica Thaís Monteiro e Matheus Medeiros que me ajudaram nos experimentos e no meu crescimento profissional.

Aos alunos ingressantes de 2016 do curso de Graduação em Engenharia de Alimentos do IBILCE, por terem sido minhas cobaias ao longo do ano de 2017 nas disciplinas de Microbiologia de Alimentos I e II, obrigada pela paciência e por me ensinarem como ser uma professora melhor a cada dia.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara pelas análises de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução.

Espero não ter me esquecido de ninguém, por isso, a todos que me ajudaram e me apoiaram direta ou indiretamente minha eterna gratidão.

RESUMO

O etanol pode ser obtido pela conversão de açúcares como a glicose e a xilose por diferentes micro-organismos. Empregar dois ou mais micro-organismos que assimilem estes açúcares e utilizar o método de imobilização celular em um determinado suporte tem se mostrado eficaz na produção de etanol comparado com a monocultura com células livres. Diante disto, o objetivo do presente trabalho foi comparar a produção de etanol entre células livres e imobilizadas em casca de soja em diferentes condições da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e verificar a cofermentação destes três micro-organismos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e xilose como simulação da produção de etanol de segunda geração. Para isto foram realizadas fermentações com os três micro-organismos, em monocultura, em meios de cultivo contendo glicose para a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* e em meios contendo xilose para a levedura *P. tannophilus* utilizando células livres e imobilizadas por ligação a superfície em casca de soja. Variou-se condições de cultivo como pH, temperatura, velocidade de agitação e concentração inicial de açúcar. Todas as fermentações ocorreram em 15 horas e foram realizadas análise para verificar crescimento celular, consumo de açúcar, produção de etanol e coeficiente de rendimento. Após estes experimentos, selecionaram-se as condições que proporcionaram maior coeficiente de rendimento para cada micro-organismo e foi realizado cultivo com cada micro-organismo retirando-se alíquotas a cada hora de fermentação para verificar o melhor tempo. A partir destas informações foram realizados dois tipos de cofermentações em diferentes meios de cultivo, para os quais foram variadas as concentrações de glicose e xilose. Realizou-se o reciclo celular da monocultura e da cofermentação. Para os três micro-organismos em monocultura o maior rendimento foi obtido utilizando o método de imobilização celular. Com a levedura *S. cerevisiae* o maior rendimento foi de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$ nas condições de $35 \text{ }^\circ\text{C}$, estático, concentração inicial de açúcar de 60 g.L^{-1} e pH 5,5. No reciclo desta levedura obteve-se maior rendimento ($0,37 \text{ g.g}^{-1}$) no ciclo 11. Utilizando a bactéria *Z. mobilis* foi alcançado um rendimento de $0,39 \text{ g.g}^{-1}$ nas condições de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, estático, concentração inicial de açúcar de 90 g.L^{-1} e pH 5,5. O reciclo promoveu uma aumento do rendimento para $0,49 \text{ g.g}^{-1}$ no ciclo 5. Com a levedura *P. tannophilus* o maior rendimento obtido foi de

0,44 g.g⁻¹ nas condições de 35 °C, velocidade de agitação de 100 rpm, concentração inicial de açúcar de 60 g.L⁻¹ e pH 4,5. No reciclo o maior rendimento foi de 0,38 g.g⁻¹ no ciclo 5. Na cofermentação, o qual inoculou-se a levedura *S. cerevisiae*, seguida da bactéria *Z. mobilis* e da levedura *P. tannophilus* no meio de cultura com 40% de xilose e 60% de glicose, foi obtido o maior rendimento (0,19 g.g⁻¹) e no reciclo da cofermentação ocorreu um maior rendimento de 0,31 g.g⁻¹ no ciclo 3. A imobilização celular proporcionou um aumento do rendimento da produção de etanol para a levedura *S. cerevisiae* e para a bactéria *Z. mobilis* a partir da glicose e, esta foi necessária para obtenção de etanol com a levedura *P. tannophilus*. O reciclo da cofermentação forneceu aumento no coeficiente de rendimento no terceiro ciclo.

Palavras-chave: Imobilização celular. Casca de soja. Cofermentação. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

Ethanol can be obtained by the conversion of sugars such as glucose and xylose by different microorganisms. Employing two or more microorganisms that assimilate these sugars and use the cellular immobilization method in a given support has been shown to be effective in the production of ethanol compared to free-cell monoculture. The objective of the present work was to compare the ethanol production between free and immobilized cells in soybean hull under different conditions of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, bacterium *Zymomonas mobilis* CCT 4494 and the yeast *Pachysoles tannophilus* CCT 1891 and verify the co-fermentation of these three microorganisms in culture medium containing different concentrations of glucose and xylose as simulation of the production of second generation ethanol. Fermentations have been carried out with the three microorganisms, in monoculture, in culture media containing glucose for the yeast *S. cerevisiae* and the bacteria *Z. mobilis* and in media containing xylose for the yeast *P. tannophilus* using free cells and immobilized by surface connection in soybean hull. The experimental conditions pH, temperature, stirring speed and initial sugar concentration have been varied. All fermentations occurred in 15 hours and analyzes were performed to verify cell growth, sugar consumption, ethanol production and yield. After these experiments, the conditions that provided the highest yield for each microorganism were selected and experiments have been carried out using each microorganism, removing aliquots at each hour to verify the best time. Thus, two types of co-fermentations have been carried out in different culture media, whose concentrations of glucose and xilose have been varied. Cellular recycling of monoculture and co-fermentation has been carried out. For the three monoculture cultivation the highest yield has been obtained using the cellular immobilization method. For *S. cerevisiae*, the highest yield was 0.44 g.g^{-1} under the conditions of $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, static, initial sugar concentration of 60 g.L^{-1} and pH 5.5. In the recycling of this yeast the higher yield (0.37 g.g^{-1}) has been obtained in cycle 11. Using the *Z. mobilis* a yield of 0.39 g.g^{-1} has been achieved under conditions of $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, static, initial sugar concentration of 90 g.L^{-1} and pH 5.5. The recycle promoted an increase in yield to 0.49 g.g^{-1} in cycle 5. For *P. tannophilus* the highest yield was 0.44 g.g^{-1} under the conditions of $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$, stirring speed of 100 rpm, initial sugar concentration of 60 g L^{-1} and pH 4.5. In the recycle the highest yield was 0.38 g.g^{-1} in cycle 5. In the co-fermentation, *S.*

cerevisiae has been inoculated, followed by *Z. mobilis* and *P. tannophilus* in the culture medium combining 40% of xylose and 60% of glucose, the highest yield obtained was 0.19 g.g⁻¹ and in the recycle of the co-fermentation the higher yield was 0.31 g.g⁻¹ in cycle 3. The cellular immobilization provided an increase in ethanol production yield for *S. cerevisiae* and *Z. mobilis* from glucose and the cellular immobilization was necessary to obtain ethanol using *P. tannophilus* from xylose. The recycling of co-fermentation provided an increase in the coefficient of yield in the third cycle.

Keywords: Cell immobilization. Soybean Hulls. Alcoholic Fermentation. Co-fermentation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura geral do resíduo lignocelulósico.....	24
Figura 2	Estrutura da fração de lignina.....	25
Figura 3	Componentes presentes na fração de hemicelulose.....	26
Figura 4	Estrutura linear da fração de celulose.....	26
Figura 5	Via metabólica para obtenção de etanol a partir de glicose.....	29
Figura 6	Via metabólica para obtenção de etanol a partir de xilose.....	30
Figura 7	Classificação do sistema de imobilização celular.....	37
Figura 8	Classificação dos suportes para imobilização enzimática e celular..	38
Figura 9	Fluxograma geral dos experimentos realizados para cada micro-organismo com células livres e células imobilizadas em casca de soja.....	46
Figura 10	Fluxograma da cofermentação I e da cofermentação II.....	47
Figura 11	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	56
Figura 12	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	57
Figura 13	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas temperaturas e concentração inicial de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	59

Figura 14	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	60
Figura 15	Produção de etanol com células imobilizadas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
Figura 16	Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
Figura 17	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	67
Figura 18	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	71
Figura 19	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	72
Figura 20	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	74
Figura 21	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	75
Figura 22	Produção de etanol com células imobilizadas da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	77
Figura 23	Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	78

Figura 24	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	81
Figura 25	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	86
Figura 26	Produção de etanol com diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	87
Figura 27	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células livres da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	89
Figura 28	Coeficiente de rendimento do etanol produzido em diferentes condições de pH e velocidade de agitação com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> nas temperaturas e concentrações iniciais de açúcar de 30 °C e 60 g.L ⁻¹ (A), 30 °C e 90 g.L ⁻¹ (B), 35 °C e 60 g.L ⁻¹ (C) e 35 °C e 90 g.L ⁻¹ (D).....	90
Figura 29	Produção de etanol com células imobilizadas da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	92
Figura 30	Produção de etanol e açúcar residual do reciclo das células mobilizadas em casca de soja da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> .	93
Figura 31	Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) da imobilização das células da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	96
Figura 32	Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação I.....	99
Figura 33	Glicose residual, xilose residual e produção de etanol da cofermentação II.....	101
Figura 34	Produção de etanol do reciclo da cofermentação.....	105

Figura 35	Glicose residual, xilose residual e produção de etanol dos ciclos separados da cofermentação.....	106
Figura 36	Desprendimento celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i> e da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i> em cada ciclo do reciclo da cofermentação.....	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Quantidade das frações de celulose e hemicelulose em diferentes resíduos.....	27
Tabela 2	Quantidade de glicose e xilose em diferentes resíduos lignocelulósicos.....	28
Tabela 3	Composição (g.L ⁻¹) dos meios de cultura utilizados para armazenamento e crescimento das leveduras e da bactéria.....	42
Tabela 4	Condições de crescimento de cada micro-organismo.....	42
Tabela 5	Composição (g.L ⁻¹) do meio semissintético utilizado para fermentação.....	43
Tabela 6	Condições de fermentação durante 15 horas utilizando diferentes parâmetros.....	45
Tabela 7	Meios de cultura utilizados nas co-fermentações com diferentes concentrações de xilose e glicose.....	48
Tabela 8	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
Tabela 9	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	65
Tabela 10	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	69
Tabela 11	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da bactéria <i>Zymomonas mobilis</i>	79
Tabela 12	Açúcar consumido e crescimento celular das fermentações com tempo fixo de 15 horas com células livres e imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	83
Tabela 13	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico, crescimento celular e produtividade do reciclo com células imobilizadas em casca de soja da levedura <i>Pachysolen tannophilus</i>	94

Tabela 14	Coeficiente de rendimento e rendimento teórico das cofermentações I e II.....	102
Tabela 15	Crescimento celular dos micro-organismos na cofermentação I e II dos três meios de cultura.....	103
Tabela 16	Coeficiente de rendimento, rendimento teórico e produtividade dos ciclos fermentativos da cofermentação.....	107

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2. OBJETIVOS	21
2.1. Geral	21
2.2. Específicos.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
3.1. Produção de Etanol.....	22
3.2. Micro-organismos Produtores de Etanol	30
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
3.2.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	32
3.2.3. <i>Pachysolen tannophilus</i>	33
3.3. Cofermentação.....	34
3.4. Imobilização Celular.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1. Micro-organismos e Meios de Cultivo	41
4.1.1. Micro-organismos.....	41
4.1.1.1. Meios de Armazenamento e Crescimento	42
4.2. Resistência ao Etanol.....	42
4.3. Fermentação.....	43
4.3.1. Meio de Cultura	43
4.3.2. Células Livres	43
4.3.3. Células Imobilizadas.....	44
4.3.4. Condições da Fermentação	44
4.3.4.1. Fermentação Com Tempo Fixo	44
4.3.4.2. Determinação do Melhor Tempo de Fermentação	47
4.3.5. Reciclo dos Micro-organismos Separados	47
4.3.6. Cofermentação.....	47
4.3.6.1. Reciclo Utilizando Cofermentação.....	48
4.4. Métodos Analíticos.....	48
4.4.1. Crescimento Celular	48
4.4.2. Açúcares Redutores	49

4.4.3. Análise de Glicose	49
4.4.4. Etanol.....	50
4.4.5. Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG)	50
4.5. Cálculo Parâmetros Cinéticos.....	50
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
5.1.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas.....	52
5.1.2. Determinação do Tempo	61
5.1.3. Reciclo.....	63
5.1.3.1. Fotografias Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).....	66
5.2. <i>Zymomonas mobilis</i>	68
5.2.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas.....	68
5.2.2. Determinação do Tempo	76
5.2.3. Reciclo.....	77
5.2.3.1. Fotografias de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).....	80
5.3. <i>Pachysolen tannophilus</i>	82
5.3.1. Experimento com Tempo Fixo de 15 horas.....	82
5.3.2. Determinação do Tempo	91
5.3.3. Reciclo.....	92
5.3.3.1. Fotografias da Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG).....	94
5.4. Cofermentação.....	97
5.4.1. Reciclo da Cofermentação.....	104
6. CONCLUSÕES	109
REFERÊNCIAS	110
APÊNDICES	124

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Para a produção do etanol de segunda geração é necessário quebrar os resíduos lignocelulósicos e liberar os açúcares presentes utilizando métodos físicos, químicos ou biológicos. Esta quebra libera açúcares de cinco e seis carbonos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, micro-organismos muito empregados e estudados para produção de etanol, não são capazes de assimilar os açúcares de cinco carbonos quando não modificadas geneticamente. Para isto, o estudo de micro-organismos que utilizem pentoses para produção de etanol é de suma importância.

A cofermentação, cocultura ou consórcio são nomes dados ao método de utilizar diferentes micro-organismos em um único cultivo. Neste processo podem-se utilizar dois ou mais micro-organismos, os quais podem ser inoculados juntos ou em sequência. Empregar a cofermentação em sequência traz as vantagens de se poder aplicar as melhores condições de temperatura, velocidade de agitação, pH, entre outras condições para cada micro-organismos. Contudo é necessário que o micro-organismo em sequência seja resistente aos produtos produzidos pelo micro-organismo anterior.

A glicose é o açúcar universal consumido por quase 100% das células vivas. A levedura *Pachysolen tannophilus* tem destaque pelo fato de ter sido a primeira levedura a ser descoberta capaz de converter xilose a etanol naturalmente. Por isso utilizar esta levedura juntamente com outros micro-organismos pode possibilitar o aumento no rendimento de etanol.

A imobilização celular é outro método que pode ser utilizado para melhorar e aumentar a produção de etanol. Este método baseia-se em reter células de micro-organismos em diferentes suportes, assim como é empregado para imobilização de enzimas. Existem diversos suportes que podem ser aplicados na imobilização celular e um desses suportes é o próprio material lignocelulósico, que se empregado como suporte, a produção de etanol de segunda geração se torna uma alternativa para reduzir a quantidade de resíduos descartados incorretamente. Pode-se utilizar vários resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar, casca de soja, casca de arroz, bucha vegetal, entre outros, desde que estes resíduos sejam porosos para reter maiores quantidades de células, já que, nestes casos, a imobilização ocorre por adsorção na superfície do suporte.

Este método além de melhorar a produção de etanol e simplificar o processo por promover fácil separação da célula com o meio reativo sem precisar, em alguns casos, de centrifugação, permite reutilizar as células imobilizadas em fermentações consecutivas, nas quais as células no suporte são recolhidas e transferidas para um novo meio de cultivo. Também conhecido como reciclo, este procedimento permite utilizar as mesmas células, o qual reduz o tempo de reativação celular e diminui a possibilidade de possíveis contaminações por micro-organismos indesejáveis e consequente redução na aplicação de antibióticos no meio de processo.

Com isto, o estudo de diferentes micro-organismos, bem como a aplicação de cofermentação e imobilização celular é necessário para melhorar a produção de etanol de segunda geração pela utilização dos diferentes tipos de açúcares e promover um maior rendimento de etanol. Portanto, este estudo teve por objetivo Comparar a produção de etanol entre células livres e imobilizadas em casca de soja em diferentes condições da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602, da bactéria *Zymomonas mobilis* CCT 4494 e da levedura *Pachysolen tannophilus* CCT 1891 e verificar a cofermentação destes três micro-organismos em meio de cultura contendo diferentes concentrações de glicose e xilose como simulação da produção de etanol de segunda geração.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados promissores para produção de etanol de segunda geração utilizando células imobilizadas em casca de soja e o reciclo da cofermentação com os três micro-organismos imobilizados em casca de soja.

A maior produção e o maior coeficiente de rendimento dos três micro-organismos utilizados em monocultura com tempo fixo de 15 horas ocorreram utilizando células imobilizadas. Para a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Z. mobilis* a imobilização celular forneceu um aumento tanto na produção quanto no coeficiente de rendimento de etanol, e para a levedura *P. tannophilus* a imobilização celular foi necessária para obtenção de uma maior produção de etanol a partir de xilose em comparação com os experimentos com células livres.

O reciclo realizado com a bactéria *Z. mobilis* proporcionou um aumento no rendimento em comparação com o maior rendimento obtido no experimento com tempo fixo de 15 horas e o obtido no experimento da determinação do tempo de fermentação. Para a levedura *P. tannophilus* com o reciclo celular foi possível aumentar o coeficiente de rendimento quando comparado com o experimento da determinação do tempo.

Com as micrografias tiradas na análise de Microscopia Eletrônica de Alta Resolução (MEV-FEG) foi observada a afinidade da levedura *S. cerevisiae* e da bactéria *Z. mobilis* com a casca de soja, suporte utilizado para imobilização celular. Para a levedura *P. tannophilus* a afinidade foi menor que os outros dois micro-organismos utilizados no trabalho.

Foram obtidos coeficientes de rendimento próximos para as duas cofermentações e nos três meios de fermentação com diferentes concentrações de glicose e xilose utilizadas, portanto a alteração da ordem de inoculação da *S. cerevisiae* e da *Z. mobilis* não influenciaram na produção de etanol pela cofermentação. A utilização do reciclo para a cofermentação promoveu aumento no rendimento de etanol no terceiro ciclo.

REFERÊNCIAS

- ABATE, C.; CALLIERI, D.; RODRÍGUEZ, E.; GARRO, O. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, p. 580-583, 1996.
- AITA, C.; GIACOMINI, S. J. Decomposição e liberação de nitrogênio de resíduos culturais de plantas de cobertura de solo solteiras e consorciadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 601-612, 2003.
- ALBANO, M. **Comparação da Produção de Celulases e Xilanases por Fungos Filamentosos em Fermentação Submersa e Estado Sólido**. 2012. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2012.
- ARAÚJO, R. P. C.; RAMALHO, L. M. P.; ARAÚJO, M. T. B.; ALMEIDA, J. C. S. Determinação do consumo de glicose “*in vitro*” pelos micro-organismos presentes na saliva total de humanos. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 21, p. 71-83, 1994.
- ARIYAJAROENWONG, P.; LAOPAIBOON, P.; LAOPAIBOON, L. Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation processes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 49, p. 79-84, 2015.
- AZEVEDO, V. Q. **Caracterização e rendimento de hidrólise e fermentação de biomassa orundo, palha e casca de arroz**. 2015. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.
- BALAGURUNATHAN, B.; TAN, L.; ZHAO, H. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for acetaldehyde overproduction using pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 109, p. 58-65, 2018.

BARATTI, J. C.; BU'LOCK, J. D. *Zymomonas mobilis*: a bacterium for ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 4, p. 95-115, 1986.

BAUER, A. W.; KIRBY, V. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEHERA, S.; MOHANTY, R. C.; RAY, R. C. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.). **Applied Energy**, v. 87, p. 2352-2355, 2010.

BENINI, K.C.C.C. **Desenvolvimento e caracterização de compósitos poliméricos reforçados com fibras lignocelulósicas: HIPS/fibras da casca de coco verde e bagaço de cana de açúcar**. 2011. 124f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia do Campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2011.

BENIWAL, A.; SAINI, P.; KOKKILIGADDA, A.; VIJ, S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for acetaldehyde overproduction using pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. **LWT – Food Science and Technology**, v. 87, p. 553-561, 2018.

BONASSA, G.; SCHNEIDER, L. T.; CREMONEZ, P. A.; OLIVEIRA, C. J.; TELEKEN, J. G.; FRIGO, E. P. Optimization of first generation alcoholic fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 31, n. 3, p. 313-320, 2015.

BRAVO, R. V.; CAMACHO, R. F.; SÁNCHEZ, V. S.; CASTRO, V. M. The influence of the initial concentrations of glucose and yeast extract on the ethanolic fermentation by *Pachysolen tannophilus*. **Collection of Czechoslovak Chemical Communications**, v. 55, p. 854-866, 1990.

BRAVO, V.; CAMACHO, F.; SÁNCHEZ, S.; CASTRO, E. Influence of the concentrations of D-xylose and yeast extract on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, p. 566-571, 1995.

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

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010. 138f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P. B.; RECH, R.; AYUB, M. A. Z. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4675-4683, 2011.

CASTRO, A. M.; PEREIRA JUNIOR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v. 33, p. 181-188, 2010.

CAZETTA, M. L.; CLLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SCARMINO, I. S. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2824-2828, 2007.

CHEN, M.; ZHAO, J.; XIA, L. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1381-1285, 2009.

COIMBRA, M. C. **Produção de etanol utilizando cascas de banana e laranja por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pichia stipitis***. 2015. 125p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2015.

COIMBRA, M. C.; DUQUE, A.; SAÉZ, F.; MANZANARES, P.; GARCIA-CRUZ, C. H.; BALLESTEROS, M. Sugar production from wheat straw biomass by alkaline extrusion and enzymatic hydrolysis. **Renewable Energy**, v. 86, p. 1060-1068, 2016.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Cana-de-açúcar. **Acompanhamento da Safra Brasileira**, v. 4, p. 1-81, 2017.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Immobilization of microbial cells and their biotechnology applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 28, p. 143-160, 2007.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food Biotechnology**, v.14, p.79-97, 2000.

CUNHA, A. A.; SILVA, S. S.; CARVALHO, W.; SANTOS, J. C. Use of PVA-gel immobilized cells: a new strategy for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse hydrolysate. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, p. 61-70, 2005.

DAGNINO, E. P.; CHAMORRO, E. R.; ROMANO, S. D.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Optimization of the acid pretreatment of Rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 363-368, 2013.

DAVIS, L.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of *Zymomonas*-based ethanol production from a hydrolysed waste starch stream. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 809-814, 2006.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; JESUS, C. D. F.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL FILHO, R. M.; BONOMI, A. Improving second generation ethanol production through optimization of first generation production process from sugarcane. **Energy**, v. 43, p. 246 - 252, 2012.

DiMARCO, A. A.; ROMANO, A. H. D-Glucose Transport System of *Zymomonas mobilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 49, p. 151-157, 1985.

ERNANDES, F. M. P. G. **Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis***. 2009. 145 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2009.

FERREIRA, V. F.; ROCHA, D. R.; SILVA, F. C. Potencialidade e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, p. 623-638, 2009.

FERREIRA, J. **Produção de levana e bioetanol utilizando cascas de banana por *Zymomonas mobilis***. 2013. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2013.

FERREIRA, J. **Produção de bioetanol utilizando cascas de banana, maracujá e coco verde por co-fermentação de *Zymomonas mobilis* e *Pachysolen tannophilus***. 2017. 117 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2017.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FU, N.; PEIRIS, P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1091-1097, 2008.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 210-217, 2009.

GENISHEVA, Z.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A. Evaluation the potential of wine-making residues and corn cobs as support materials for cell immobilization for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 979-985, 2011.

GEORGES, F. **Caracterização da palha de cana-de-açúcar do Rio Grande do Sul e de seus produtos de pirólise**. 2011. 120f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in a immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v. 36, p. 503-509, 2011.

GIRISUTA, B.; DUSSAN K.; HAVERTY, D.; LEAHY, J. J.; HAYES, M. H. B. A kinetic study of acid catalysed hydrolysis of sugar cane bagasse to levulinic acid. **Chemical Engineering Journal**, v. 217, p. 61-70, 2013.

GÖKGÖZ, M.; YIGTOGLU, M. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on to modified carboxymethylcellulose for production of ethanol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, p. 849-857, 2011.

GOMES, D. G.; GUIMARÃES, P. M. R.; PEREIRA, F. B.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Plasmid-mediate transfer of *FLO1* into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation-sedimentation. **Bioresource Technology**, v. 108, p. 162-168, 2012.

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.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 993-943, 1994.

HARNER, N. K.; BAJWA, P. K.; HABASH, M. B.; TREVORS, J. T.; AUSTIN, G. D.; LEE, H. Mutants of the pentose-fermenting yeast *Pachysolen tannophilus* tolerant to hardwood spent sulfite liquor and acetic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 105, p. 29-43. 2014.

HAVERTY, D.; DUSSAN, K.; PITERINA, A. V.; LEAHY, J. J.; HAYES, M. H. B. Autothermal, single-stage, peracetic acid pretreatment of *Miscanthus x giganteus* for the rapid fractionation of its biomass components into a lignin/hemicelluloses-rich liquor and a cellulose-digestible pulp. **Bioresource Technology**, v. 109, p. 173-177, 2012.

HICKERT, L. R.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified Rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 112-116, 2013.

JEFFRIES, T. W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 213-218, 1981.

JUNG, S. J.; KIN, S. H.; CHUNG, I. M. Comparison of lignin, cellulose, and hemicelluloses contents for biofuels utilization among 4 types of lignocellulosic crops. **Biomass and Bioenergy**, v. 83, p. 322-327, 2015.

KARAGÖZ, P.; ÖZKAN, M. Ethanol production from wheat straw by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture in batch and continuous system. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 286-293, 2014.

KASAVI, C.; FINORE, I.; LAMA, L.; NICOLAUS, B.; OLIVER, S. G.; ONER, E. T.; KIRDAR, B. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 230-238, 2012.

KAUR, H. R. P. Fermentation of wheat straw hydrolyzate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*: a comparison of batch and continuous culture systems. **Biological Wastes**, v. 30, p. 301-308, 1989.

KEATING, J. D.; ROBINSON, J.; COTTA, M. A.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD, S. D. An ethanologenic yeast exhibiting unusual metabolism in the fermentation of lignocellulosic hexose sugars. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 31, p. 235-244, 2004.

KIRDPONPATTARA, S.; PHISALAPHONG, M. Bacterial cellulose-alginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 103-109, 2013.

KO, J. K.; UM, Y.; WOO, H. M.; KIM, K. H.; LEE, S. M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. **Bioresource Technology**, v. 209, p. 290-296, 2016.

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.

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

LEE, K. J.; SKOTNICKI, M. L.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters**, v. 3, p. 291-296, 1981.

MA, K.; RUAN, Z.; SHUI, Z.; WANG, Y.; HU, G.; HE, M. Open fermentative production of fuel ethanol from food waste by an acid-tolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis*. **Bioresource Technology**, v. 203, p. 295-302, 2016.

MAJIDAN, P.; TABATABAEI, M.; ZEINOLABEDINI, M.; NAGHSHBANDI, M. P.; CHISTI, Y. Metabolic engineering of microorganisms for biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 3863-3885, 2018.

MARX, S.; NDABA, B.; CHIYANZU, I.; SCHABORT C. Fuel ethanol production from sweet sorghum bagasse using microwave irradiation. **Biomass and Bioenergy**, v. 65, p. 145-150, 2014.

MATHEW, A. K.; CROOK, M.; CHANEY, K.; HUMPHRIES, A. C. Comparison of entrapment and biofilm mode of immobilisation for bioethanol production from oilseed rape straw using *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biomass & Bioenergy**, v. 52, p. 1-7, 2013.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; TULI, D. K. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.010>.

MOREIRA, L. R. S. **Xilanases produzidas por *Aspergillus terreus*: Caracterização, degradação de biomassa lignocelulósica e efeito de compostos fenólicos**. 2013. 297f. Tese (Doutorado) – Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biociência**, n. 28, p. 34-39, 2002.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 286-274, 2006.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogy method for determination of glucose. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 153, p. 375-380, 1944.

NORTON, S.; D'AMORE, T. Physiological effects of yeast cell immobilization: applications for brewing. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 365-375, 1994.

OFORI-BOATENG, C.; LEE, K. T. An oil palm-based biorefinery concept for cellulosic ethanol and phytochemicals production: Sustainability evaluation using exergetic life cycle assessment. **Applied Thermal Engineering**, v. 62, p. 90-104, 2014.

PACHECO, A. M.; GONDIM, D. R.; GONÇALVES, L. R. B. Ethanol Production by Fermentation Using Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* in Cashew Apple Bagasse. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 209-217, 2010.

PATLE, S.; LAL, B. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 596-602, 2008.

POÇAS, E. C.; BUZATO, J. B.; CELLIGOI, M. A. P. C.; CAMILIOS NETO, D. Application of Loofa Sponge (*Luffa cylindrica*) as Carrier for Invertase Immobilization for Invert Sugar Syrup Production. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, p. 53-58, 2004.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré- tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. 2007. 180f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

RAMBO, M. K. D. **Caracterização de resíduos lignocelulósicos por espectroscopia NIR aliada à quimiometria para a obtenção de insumos químicos**. 2013. 182f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.

RESBROS, M.; ROSENBERG, M.; SLOUKAL, R.; KRISTOFÍKOVÁ, L. High efficiency ethanol fermentation by entrapment of *Zymomonas mobilis* into LentiKats®. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, p. 412-416, 2005.

RODRIGUEZ, E.; CALLIERI, D.A.S. High yield conversion of sucrose into ethanol by a flocculent *Zymomonas* sp. isolated from sugarcane juice. **Biotechnology Letters**, v. 8, p. 745-748, 1986.

ROGERS, P. L.; LEE, J.; TRIBE, D. E. Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 165-170, 1979.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, v. 32, p. 117-156, 2009.

SAHARAN, R. K; SHARMA, S. C. FTIR spectroscopy and biochemical investigation of ethanol stressed yeast *Pachysolen tannophilus*. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 85-89, 2011.

SANTOS, J. R. A.; GUSMÃO, N. B.; GOUVEIA, E. R. Seleção de linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* com potencial desempenho para a produção de etanol em condições adversas de temperatura e agitação. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 75-80, 2010.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, V. A. Q. **Avaliação de suportes para imobilização de *Zymomonas mobilis* CCT 4494 visando à produção de etanol e levana**. 2013. 116f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2013.

SANTOS, L. D.; SOUZA, M. B.; GUIDINI, C. Z.; RESENDE, M. M.; CARDOSO, V. L.; RIBEIRO, E. J. Continuous ethanol fermentation in tower reactors with cell recycling using flocculent *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1725-1729, 2015.

SANTOS, V. A. Q.; CRUZ, C. H. G. *Zymomonas mobilis* immobilized on loofa sponge and sugarcane bagasse for levan and ethanol production using repeated batch fermentation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, p. 407-418, 2017.

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**. 2009. 185f. Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SATHESH-PRABU, C. MURUGESAN, A. G. Potential utilization of sorghum field waste for fuel ethanol production employing *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2788-2792, 2011.

SINGH, A.; SHARMA, P.; SARAN, A. K.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488-493, 2013.

SINGH, L. K.; MAJUMDER, C. B.; GHOSH, S. Development of sequential-co-culture system (*Pichia stipitis* and *Zymomonas mobilis*) for bioethanol production from Kans grass biomass. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 150-157, 2014.

SKOTINICKI, M. L.; LEE, K. J.; TRIBE, D. E.; ROGERS, P. L. Comparison of Ethanol Production by Different *Zymomonas* Strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, p. 889-893, 1981.

SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 5-15, 1987.

SMILEY, K. L.; BOLEN, P. L. Demonstration of D-xylose Redutase and D-xylitol dehydrogenase in *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 4, p. 607-610, 1982.

SOARES, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 1-18, 2011.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Journal of Biological Chemistry**, v. 195, p. 19-22, 1952.

SOUTO, F.; CALADO, V.; PEREIRA JUNIOR, N. Carbon fiber from lignin: a literature review. **Revista Matéria**, v. 20, p. 100-114, 2015.

SPENCER-MARTINS, I. Transport of sugars in yeast: implications in the fermentations of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 51-57, 1994.

STEPANOV, N.; EFREMENKO, E. Immobilised cells of *Pachysolen tannophilus* yeast for ethanol production from crude glycerol. **New Biotechnology**, v. 34, p. 54-58, 2017.

TESFAW, A.; ASSEFA, F.. Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. **International Scholarly Research Notices**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

UNREAN, P.; SRIENC, F. Continuous production of ethanol from hexoses and pentoses using immobilized mixed cultures of *Escherichia coli* strains. **Journal of Biotechnology**, v. 150, p. 215-223, 2010.

VÉLEZ, H. A. V. **Estudo do ultrassom de potência no pré-tratamento do material lignocelulósico de resíduos da bananeira**. 2015. 108p. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto/SP, 2015.

WILLAERT, R; BARON, G. V. Gel entrapment and micro-encapsulation: methods, applications and engineering principles. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 12, p. 5-205. 1996.

WILLAERT, R. **Cell immobilization and its applications in biotechnology: current trends na future prospects**. In _____ Fermentation Microbiology and Biotechnology. Ed. Taylor & Francis, p. 287-362, 2007.

WINKELHAUSEN, E.; VELIEKOVA, E.; AMARTEY, S. A.; KUZMANOVA, S. Ethanol Production Using Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in Lyophilized Cellulose Gel. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 2214-2220, 2010.

YAHAMASHITA, Y.; KUROSUMI, A.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, p. 314-319, 2008.

YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. **Journal of Biotechnology**, v. 129, p. 415-420, 2007.

YUVADETKUN, P.; REUNGSANG, A.; BOONMEE, M. Comparison between free cells and immobilized cells of *Candida shehatae* in ethanol production from rice straw hydrolysate using repeated batch cultivation. **Renewable Energy**, v. 115, p. 634-640, 2018.

ZANIN, G.M.; MORAES, F.F. **Enzimas imobilizadas**. In_____ Enzimas como agentes biotecnológicos. Ed. SAID S. E PIETRO R.C. Ed Legis Summa, p. 35-86, 2004.

ZHANG, L.; LANG, Y.; WANG, C.; NAGATA, S. Promoting effect of compatible solute ectoine on the ethanol fermentation by *Zymomonas mobilis* CICC10232. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 642-646, 2008.

ZHANG, B.; SUN, H.; LI, J.; WAN, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y. High-titer-ethanol production from cellulosic hydrolysate by anengineered strain of *Saccharomyces cerevisiae* during an in situ removalprocess reducing the inhibition of ethanol on xylose metabolism. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 967-972, 2016.

ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1156-1161, 2008.

ZHAO, L.; YU, J.; ZHANG, X.; TAN, T. The ethanol tolerance of *Pachysolen tannophilus* in fermentation on xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p. 378-385, 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.

ZIKELI, F.; TERS, T.; FACKLER, K.; SREBOTNIK, E. LI, J. Wheat straw lignin fraction and characterization as lignin-carbohydrate complexes. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 309-317, 2016.

ZIMBARDI, A. L. R. L. **Produção e caracterização bioquímica de enzimas lignocelulolíticas fúngicas e sua aplicação na sacarificação de biomassa lignocelulósica**. 2014. 203f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.