

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESEMPENHO DE LEVEDURAS QUE METABOLIZAM
XILOSE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL EM HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

Tatiane Passa Lozano Fugita

Bióloga

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

DESEMPENHO DE LEVEDURAS QUE METABOLIZAM
XILOSE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL EM HIDROLISADO
HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

Tatiane Passa Lozano Fugita

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária).

JABOTICABAL - SÃO PAULO - BRASIL

Dezembro de 2010

F957d Fugita, Tatiane Passa Lozano
Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção
de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana / Tatiane
Passa Lozano Fugita. – Jaboticabal, 2010
vii, 60 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Banca examinadora: Adilson Roberto Gonçalves, Marco Antonio
de Castro e Souza
Bibliografia

1. Hidrólise de Bagaço. 2. Fermentação Etanólica. 3. Materiais
Lignocelulósico. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 664.642:66.093.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

TATIANE PASSA LOZANO FUGITA – nasceu aos 15 de Novembro de 1985, na cidade de Monte Alto, estado de São Paulo. Em Agosto de 2004 ingressou no curso de Bacharelado em Biologia na Pontifícia Universidade Católica do Paraná, recebendo o título de Bacharel em Biologia em Agosto de 2008. Ingressou no curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) da FCAV – UNESP em Agosto do mesmo ano, e obtendo o título de mestre em Microbiologia (Microbiologia Agropecuária) em **Dezembro** de 2010.

"Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e se tornar autor da própria história.
É atravessar deserto fora de si, mas ser capaz de encontrar um oásis no recôndito da sua alma.

É agradecer a Deus a cada manhã o milagre da vida."

(Augusto Cury)

Ao meu amado marido Fabricio.

Por acreditar em mim e me apoiar em minhas decisões.

Por ter me escolhido para compartilhar a vida.

Por nosso amor, nosso companheirismo, nossos sonhos...

Por estar em minha vida, e me fazer a pessoa mais feliz.

Pelo presente e pelo futuro que nos espera.

*"O amor é quando a gente mora um no outro"
(Mário Quintana)*

Aos meus amados pais Pedro e Marta .

Por se preocuparem com minha educação e meu futuro.

Por me ensinarem os caminhos certos, e me ajudarem nessa caminhada.

Pelo amor incondicional.

Obrigada por me darem a vida e a alegria de viver.

Ao meu irmão André.

Por ter sido forte e estar entre nós.

Pelo carinho, amor e amizade.

AMO VOCÊS MAIS QUE TUDO!!!

Dedico e Ofereço

AGRADECIMENTOS

-A Deus, por tudo, por todos, pela vida...

-Ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV/UNESP, por proporcionar a realização do mestrado.

-Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

-A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, por aceitar me orientar, por me acolher em seu laboratório, pela idéia inicial desse trabalho, pelos muitos ensinamentos, pela amizade, pelas oportunidades e paciência.

-Ao Prof. Dr. Miguel Angelo Mutton, pelo bom humor sempre, e por acreditar que as coisas darão certo.

-A Profa. Maria das Graças de Almeida Felipe, pela paciência, pelos muitos ensinamentos, pela co-orientação, por me acolher em Lorena e fazer de tudo para que aqueles dias fossem os melhores possíveis.

-A Usina Bonfim (COSAN), por ceder o bagaço utilizado no experimento..

-Ao técnico do laboratório, o corinthiano Sérgio, por ser amigo sempre, conselheiro, pessoa do bem que vibra a cada vitória.

-Aos amigos conquistados no Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Alcool, todos, sem exceção, meu muito obrigada pelas risadas, pela ajuda, e por existirem e fazerem nossos dias mais divertidos.

-A todos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e de minha formação. Muito obrigada!

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
RESUMO.....	ii
SUMMARY.....	iii
1.INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1.Cana-de-açúcar	3
2.2.Bagaço de cana-de-açúcar.....	3
2.3.Biomassa lignocelulósica.....	3
2.4.Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal.....	5
2.5.Conversão de biomassa a etanol.....	6
2.6.Etanol.....	8
2.7.Obtenção de açúcares a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar...	9
2.8.Fermentação etanólica.....	10
2.9.Metabolismo de xilose em leveduras.....	11
2.10.Leveduras metabolizadoras de xilose.....	12
2.11.Compostos inibidores da fermentação.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1.Matéria-prima.....	15
3.2.Determinação da composição do bagaço de cana-de-açúcar.....	15
3.3.Obtenção, caracterização, concentração e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.....	15

3.4. Seleção dos microrganismos.....	17
3.5. Crescimento de massa celular.....	19
3.6. Meios para seleção das leveduras.....	20
3.7. Condução das Fermentações.....	20
3.8. Métodos Analíticos.....	21
3.8.1. Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar.....	21
3.8.2. Determinação das concentrações de açúcares (xilose, glicose) e ácido acético no hidrolisado, e produção de etanol e xilitol.....	21
3.8.3. Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado.....	22
3.8.4. Determinação do pH do hidrolisado.....	22
3.8.5. Viabilidade Celular.....	22
3.9. Análise estatística.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	24
4.1. Características do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar	24
4.2. Primeira etapa do experimento.....	26
4.3. Segunda etapa do experimento.....	37
5. CONCLUSÕES.....	52
6. REFERÊNCIAS.....	53

DESEMPENHO DE LEVEDURAS QUE METABOLIZAM XILOSE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA

RESUMO - Objetivou-se avaliar a produção de etanol por leveduras assimiladoras de xilose, usando como substrato hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Foram realizados dois experimentos, em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2x3, com 4 repetições. O primeiro fator analisado foram dois mostos (mosto proveniente do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana e mosto sintético), e o segundo três estirpes de levedura (J10, J19.1 e CG). No primeiro experimento empregou-se o hidrolisado original, obtido após hidrólise da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar e no segundo utilizou-se o hidrolisado concentrado, com maiores concentrações de açúcares. Foram analisadas o consumo dos açúcares, a produção de etanol e de ácido acético e a viabilidade celular e o brotamento das leveduras. Observou-se que as três cepas estudadas produziram etanol a partir da xilose e glicose, sendo que a J10 apresentou maior produção. Também houve produção de ácido acético nas fermentações em que o hidrolisado foi empregado como mosto. A viabilidade celular e o índice de brotamento das leveduras não foram influenciados pelos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Fermentação Etanólica, Hidrólise de Bagaço, Materiais Lignocelulósico

PERFORMANCE OF XYLOSE-METABOLIZING YEASTS TO ETHANOL PRODUCTION FROM SUGARCANE BAGASSE HEMICELLULOSIC HYDROLYSATE

SUMMARY - The objective of this research was evaluate the ethanol production by xylose-fermenting yeasts, using as substrate hemicellulosic hydrolysate from sugarcane bagasse. Two experiments were conducted, in a 2 x 3 factorial as a completely randomized design. Treatments corresponded to the musts (sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sintetic must) and three yeasts strains (CG, J10 and J19.1). Analyses were performed in four replications. In the first experiment, original hydrolysate, obtained after hydrolyse of the hemicellulosic fraction from sugarcane bagasse and in the second, the concentrate hydrolysate (with high sugars concentration) were used. Sugars consumption, ethanol and acetic acid production and yeast viability and buds rate. Results shown that the three yeasts strains produce ethanol from xylose metabolism, and J10 strain presents high ethanol yield. Also, there was acid acetic production during fermentations process when hydrolysate was used as a must. Cellular viability and bud rates were not affected by treatments.

KEYWORDS: Bagasse Hydrolisys, Ethanolic Fermentation, Xylose

1. INTRODUÇÃO

O aproveitamento de diferentes biomassas vegetais como fontes de energia renovável, embora não venha substituir o petróleo em sua totalidade, contribuirá para diminuir a utilização de combustíveis fósseis com conseqüente redução dos impactos negativos ao ambiente causados pelo seu consumo. T tamanha importância torna a obtenção de energia uma estratégia para as nações de todo mundo. Ao mesmo tempo em que se busca ampliar a oferta e reduzir os custos, crescem as preocupações com a sustentabilidade e o meio ambiente.

Os materiais lignocelulósicos são fontes potenciais para a produção de etanol, sendo o bagaço de cana-de-açúcar considerado uma das mais utilizadas no Brasil. Esta matéria prima apresenta uma série de vantagens, tais como já se apresentar processada pelas moendas, disponibilidade em grandes quantidades e estar pronta para uso no local, reduzindo o custo do transporte, e por conseqüência o custo de produção de etanol por esta via.

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol derivado da cana-de-açúcar e o único país do mundo onde se integra totalmente a produção de açúcar e etanol na mesma planta, reduzindo custos de ambos os processos. Portanto, a integração do processo de hidrólise do bagaço nas usinas seria um passo importante e de fácil adaptação CAMARGO (2007). Na safra de 2010/2011 estima-se que serão produzidos 624,991 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 168,8 milhões de toneladas de bagaço CONAB (2010), sendo que para cada tonelada de cana, obtem-se aproximadamente 140kg de bagaço seco, composto por 43% de celulose, 25% de hemicelulose e 23% de lignina RODRIGUES (2007).

A primeira etapa do processo de produção de etanol a partir de bagaço de cana consiste na hidrólise da matéria-prima, disponibilizando os açúcares constituintes de suas frações celulósicas e hemicelulósicas representados pela glicose e xilose. A seguir, realiza-se uma destoxificação da fração hidrolisada para redução do teor de inibidores provenientes da etapa de hidrólise. A utilização de hidrolisados

hemicelulósicos no processo fermentativo requer a disponibilidade de microrganismos fermentadores de pentoses, em particular a xilose.

Assim, o presente estudo, objetivou avaliar o desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1.Cana-de-açúcar.

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma planta semi-tropical perene, suscetível, portanto, às mudanças climáticas anuais. As exigências climáticas da cultura canavieira podem diferir bastante segundo a finalidade: etanol, açúcar, aguardente ou forragem UDOP (2009).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar para a indústria de açúcar e etanol. Após a extração do caldo, da qual são produzidos o açúcar e o etanol, o bagaço que sobra é em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina e parte vendido para reduzir os problemas da crise no fornecimento de energia elétrica ARMAS & BIANCHI (1990).

Na safra de 2010/2011, estima-se que serão produzidos 624,991 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e 168,8 milhões de toneladas de bagaço CONAB (2010), sendo que para cada tonelada de cana, obtem-se aproximadamente 140kg de bagaço seco, composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina, na proporção aproximada de 40 a 50%, 20 a 30% e 25 a 30% respectivamente, variando em função do tipo de material. Esses compostos formam uma estrutura complexa e compacta, cujas características também dependerão do tipo de material a ser processado (bagaço ou palha de cana) APTA (2011).

2.2.Bagaço de cana-de-açúcar.

Na safra 10/11 o Brasil processou cerca de 624 milhões de toneladas de cana, produzindo ao redor de 168 milhões de toneladas de bagaço CONAB (2010). Toda cana-de-açúcar produzida no Brasil ainda apresenta potencial de produzir mais de 160 milhões de toneladas de palha e, provavelmente, somente 6% desse material

acompanhou os colmos de cana até a indústria sendo que o restante foi queimado ou permaneceu no campo CTC (2010).

2.3.Biomassa lignocelulosica

A biomassa lignocelulósica é composta de celulose, hemicelulose e lignina, além de outros componentes em menores quantidades. Apresentam características químicas semelhantes a da madeira, porém em diferentes quantidades percentuais, dependendo da espécie e condições de crescimento FENGEL & WEGENER (1989).

A celulose é um polissacarídeo linear, formado por unidades anidroglicosídecas interligadas por ligações β -glicosídicas de fórmula geral é $(C_6H_{10}O_5)^n$, em ligações glicosídicas 1, 4, formando a celobiose que se repete várias vezes na cadeia celulose GOLDSTEIN et al. (1978)

As hemiceluloses são encontradas no bagaço da cana-de-açúcar na proporção de 25 a 27% e quando sofrem hidrólise ácida podem ser decompostas em xilose, arabinose, ácido urônico e furfural PATURAU (1989).

As hemiceluloses ou polioses estão intimamente associadas à celulose e são compostas por diferentes unidades de açúcares formando cadeias ramificadas FENGEL & WEGENER (1989).

Estas diferentes unidades de açúcares são compostas por glicose, manose e galactose (hexoses) além da xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda apresentar quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses CANETTIERE (2004). O principal açúcar encontrado nas hemiceluloses do bagaço é a xilose. As concentrações, após hidrólise, para xilose, glicose e arabinose são respectivamente 20g/L, 4g/L e 1g/L MORAES (2008).

A lignina é a segunda macromolécula orgânica mais abundante dentre os materiais lignocelulósicos, representando 20 a 30% da massa total. É uma substância incorporada durante o crescimento vegetal, sendo composta basicamente de unidades fenilpropano que formam uma macromolécula tridimensional e amorfa FENGEL & WEGENER (1989).

No bagaço há várias substâncias químicas como terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, vários tipos de compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas, os quais podem ser extraídos usando solventes polares e apolares. Estes componentes variam em cada espécie de material lignocelulósico, representando aproximadamente 5-20% FENGEL & WEGENER (1989). A presença desses compostos pode levar a uma inibição do processo fermentativo, uma vez que esses podem ser tóxicos às leveduras.

2.4.Estrutura e ultraestrutura da parede celular vegetal.

A estrutura da parede celular vegetal é subdividida em paredes primária, secundária e terciária. Essas três camadas são compostas predominantemente por celulose com espessura da ordem de 5 μ m. As células são separadas pela lamela média, que é uma camada fina (máximo 1 μ m de espessura), composta por elevada concentração de lignina FENGEL & WEGENER (1989).

A celulose e as hemiceluloses predominam na região da parede celular enquanto a lignina se distribui por toda a estrutura, apresentando máxima concentração na lamela média. A distribuição da celulose, hemicelulose e lignina variam consideravelmente entre essas camadas FENGEL & WEGENER (1989).

A hemicelulose liga-se através de ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta. A presença da lignina em algumas paredes celulares fornece força adicional e resistência às pragas e doenças FENGEL & WEGENER (1989).

A celulose e a hemicelulose são fontes potenciais de açúcares fermentescíveis SREENATH & JEFFRIES (2000). A presença da lignina na parede celular, entretanto, impede a hidrólise enzimática dos carboidratos.

2.5.Conversão de biomassa a etanol.

O Brasil é praticamente o único país do mundo que integra totalmente a produção de açúcar e de etanol na mesma planta, reduzindo os custos de ambos os

processos. Sendo assim, integrar o processo de hidrólise do bagaço nas usinas seria um passo fácil e muito importante CAMARGO (2007).

Usando o bagaço, a palha, e tecnologias novas de conversão, a produção de etanol poderá aumentar entre 50 e 100% por hectare. Assim, pode-se pensar no Brasil produzindo 200 a 300 bilhões de litros de etanol por ano, de forma sustentável e mais barato do que qualquer outra fonte energética CAMARGO (2005).

Os benefícios da tecnologia de transformação da biomassa em etanol têm sido previamente indicados: segurança de energia aumentada, redução em emissões de gás que causam o efeito estufa, uso de recursos renováveis, fundação de indústrias de processos químicos, benefícios macroeconômicos para comunidades rurais e a sociedade como um todo KNAUF & MONIRUZZAMAN (2004). Apesar de todas essas vantagens, a comercialização e a aplicação difundida da utilização da biomassa lignocelulósica ocorre lentamente.

Pesquisas confirmam que as biomassas requerem processamento extensivo para a transformação em açúcares fermentescíveis, e posteriormente uma conversão biológica para produção de combustíveis e outros produtos químicos. A disponibilidade da biomassa, sua posição e transporte ao local do tratamento, as estratégias de pré-tratamento, os agentes hidrolíticos eficientes e a disponibilidade de microrganismos fermentativos, todos impactam nos custos para a fabricação do etanol KNAUF & MONIRUZZAMAN (2004).

Existem várias maneiras de converter o material celulósico a etanol. Uma delas é a conversão direta (DMC - *Direct Microbial Conversion*) onde todos os estágios da produção são interconectados: a síntese de celulase, a hidrólise enzimática e a fermentação. Este método se baseia na utilização de culturas de microrganismos que fermentam celulose diretamente a etanol. Em geral, a fermentação costuma ser lenta e ter baixo rendimento, o que provavelmente está relacionado à baixa resistência dos microrganismos a altas concentrações de etanol. Outra desvantagem é a geração de vários co-produtos, tais como ácidos acético e láctico SZCZODRAK & FIEDUREK (1996).

A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF- *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) é um processo que combina a hidrólise enzimática e fermentação em um só reator, evitando a inibição da celulase pela glicose resultante da hidrólise. Entretanto, este processo não evita a inibição causada pela celobiose, já que as leveduras industriais que fermentam glicose não conseguem fermentar celobiose. Esta abordagem leva a rendimento mais alto, menor tempo de fermentação e riscos menores de contaminação, devido à temperatura alta, presença de etanol e condições anaeróbicas. Apesar destas vantagens, a SSF tem alguns pontos negativos, entre eles as diferentes temperaturas ótimas para hidrólise (45-50°C) e fermentação (28-35°C) e a inibição dos microrganismos fermentativos e da celulase pelo etanol e por substâncias tóxicas vindas do pré-tratamento do material lignocelulósico SZCZODRAK & FIEDUREK (1996). Neste caso, o uso de pré-tratamento microbiano poderia melhorar o rendimento, já que minimiza a presença de substâncias tóxicas KELLER *et al.* (2003).

A abordagem que tem mostrado maior flexibilidade para controle das condições operacionais é a sacarificação seguida de fermentação, na qual os processos de hidrólise e fermentação ocorrem separadamente. No entanto, como os produtos da hidrólise enzimática inibem as enzimas, há limitação da taxa de sacarificação, levando a baixos rendimentos em etanol SZCZODRAK & FIEDUREK (1996).

Embora a taxa de hidrólise e a composição dos açúcares resultantes dependam do método de pré-tratamento/hidrólise e das circunstâncias empregadas, os constituintes principais dos hidrolisados são a glicose e xilose liberados da celulose e hemicelulose, respectivamente. A glicose obtida da hidrólise da celulose pode facilmente ser fermentada por microrganismos existentes como é feito atualmente. Entretanto, na hidrólise da fração hemicelulósica são extraídas hexoses, facilmente fermentadas, e pentoses, conhecidos como açúcares infermentescíveis. Conseqüentemente, as tecnologias de fermentação que utilizam as pentoses necessitam ser bem desenvolvidas para realçar a eficiência total do processo da conversão LEE (1997).

Microrganismos fermentadores que metabolizam as pentoses vêm sendo isolados e modificados geneticamente, mas o rendimento em etanol ainda não é

suficiente para tornar o processo economicamente atrativo. Diversos produtos de degradação, tais como o ácido fórmico, acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis, produzidos durante o pré-tratamento e a hidrólise, podem inibir o processo de fermentação e afetar rendimentos do etanol, devendo assim ser removidos ou suavizados PALMQVIST & HAHN-HAGERDAL (2000). Estudos realizados com *Escherichia coli* recombinante, apresentando resultados interessantes: com 120g/L de glicose ou lactose e meio de cultura, foram obtidas cerca de 56g/L de etanol FAPESP (2011).

2.6.Etanol.

O etanol é um dos produtos químicos orgânicos mais antigos produzido pela tecnologia tradicional, sendo que atualmente a maior produção ocorre em escala industrial RATNAM *et al.* (2005).

Além de ser uma fonte de energia renovável, apresenta outras vantagens, como a redução da dependência do petróleo externo e redução das alterações climáticas causadas pela poluição DEMIRBAS (2005); NILSSON (2009).

A estimativa da produção de cana-de-açúcar nacional para a safra 2010/2011 é de 595,89 milhões de toneladas, sendo que 56,71% será destinada à produção de etanol, ou seja, 27,39 bilhões de litros de etanol UNICA (2010).

Os métodos de produção de etanol podem ser divididos em dois grandes grupos: os que utilizam vias sintéticas, tais como a hidratação do etileno, hidratação direta (gás rico em etileno reage com H_2O) e produção a partir de acetileno; e os que se fundamentam em vias biotecnológicas responsáveis por cerca de 90% do etanol produzido mundialmente. A cana-de-açúcar e a beterraba correspondem a 60% dos processos biotecnológicos, sendo que o restante é derivado de grãos, principalmente amido de milho ZALDIVAR *et al.* (2001).

2.7.Obtenção de açúcares a partir da hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

A obtenção de açúcares a partir de materiais celulósicos pode ocorrer através dos processos de hidrólise ácida e enzimática. Ambos os processos precisam de um pré-tratamento para remoção da lignina e, em alguns casos, separação da hemicelulose. Esses processos podem ser físicos (picadores e moagem), físico-químicos (descompressão com vapor, amônia ou CO₂), químicos (ozônio, ácido diluído ou concentrado e alcalino) ou com solvente MACEDO & NOGUEIRA (2005).

Segundo RODRIGUES (2007), a hidrólise ácida é eficiente, com até 90% de recuperação de açúcares fermentescíveis, podendo gerar alguns produtos inibidores da fermentação (compostos fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), e os açúcares podem ser degradados devido ao tempo de hidrólise.

A hidrólise enzimática, de acordo com BASTOS (2007), é um processo que apresenta especificidade da reação, ausência de reações secundárias, ausência de formação de produtos secundários (inibidores da fermentação alcoólica) e reação em condições que não requerem altas pressões e temperaturas, ou ambientes corrosivos para os equipamentos. Entretanto, segundo CANETTIERE (2004), a cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam esse tipo de hidrólise um processo lento, pouco econômico e menos eficiente.

Durante a hidrólise são gerados dois tipos de açúcares: as pentoses e as hexoses. As pentoses são provenientes da hidrólise da fração hemicelulose, e as hexoses são geradas na degradação de parte das hemiceluloses e celulose. O xarope obtido após a hidrólise da celulose é usado para a fermentação etanólica, utilizando-se a levedura *S. cerevisiae* que converte hexoses em etanol RABELO (2007).

De acordo com CHANDEL *et al.* (2007) *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolan tannophilus* são os microrganismos mais promissores capazes de fermentarem não só as hexoses (açúcares compostos por 6 carbonos), mas também as pentoses (açúcares compostos por 5 carbonos).

SENDELIUS (2005) efetuou pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar, com temperaturas de 180, 190 e 205°C (5 ou 10 min.) e, posteriormente, impregnado com o gás dióxido enxofre a 2% ou ácido sulfúrico diluído (0,25g de ácido por 100g de bagaço seco). Após hidrólise enzimática (enzimas comerciais), verificou-se que a amostra pré-tratada a 190°C por 5 min., impregnada com 2% de SO₂ e hidrolisada apresentou a maior produção de glicose (96,3%); enquanto a amostra pré-tratada a 180°C por 5 min., impregnada com 2% de SO₂ e hidrolisada apresentou a maior produção de xilose (66,6%).

GONG & YEH (1999) através da hidrólise ácida, estudou a presença de xilose (18,6g/L), glicose (2,87g/L) e arabinose (2,04g/L), sendo estes os melhores resultados, quando tratados a 122°C, ácido nítrico a 6% durante 33 min. Foram testados tratamentos com concentrações de ácido nítrico de 2, 4 e 6%; nas temperaturas de 100, 122 e 128°C, respectivamente.

2.8 Fermentação etanólica.

A fermentação etanólica é um fenômeno bioquímico muito complexo que provoca a transformação do açúcar em etanol, gás carbônico, ácidos succínico, ácidos voláteis, ésteres LEHNINGER *et al.* (2000).

Segundo LEHNINGER *et al.*(2000), uma molécula de açúcar degradada pelo microrganismo através do processo de fermentação, produz duas moléculas de ATP contra 38 moléculas no processo da respiração. Em condição de aerobiose e baixa concentração de açúcar, uma grande quantidade de ácidos orgânicos formará o chamado ciclo de Krebs, e dois desses ácidos participam da constituição de uma série de aminoácidos. Além do etanol e gás carbônico, a fermentação também pode resultar em produtos secundários como polissacarídeos, lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e outros produtos, necessários à constituição da biomassa do microrganismo.

O etanol produzido durante a fermentação é dependente da quantidade de açúcares presentes no meio. O processo se inicia por meio da atuação da exoenzima invertase, a qual, por meio da hidrólise, transforma o açúcar (sacarose) em glicose e

frutose (monossacarídeos estruturais). Esses monossacarídeos serão absorvidos pela célula da levedura (aeróbio facultativo), que em condições de anaerobiose realizará a fermentação e em condições de aerobiose serão utilizados no processo de respiração da mesma AMORIM *et al.* (1996).

Ao trabalhar em condições adequadas de fermentação (mosto sintético), 5% do açúcar metabolizado pela levedura é desviado para rotas metabólicas alternativas, ou seja, para gerar produtos secundários, enquanto que 95% resultam em etanol. No entanto, nas indústrias pode se verificar que de 8 a 15% do açúcar geram produtos secundários; isso se deve a diversos fatores que afetam o processo AMORIM & LEÃO (2005).

2.9. Metabolismo de xilose em leveduras.

A utilização de xilose por leveduras é possível graças à capacidade que alguns destes microrganismos apresentam de metabolizar a xilose (Figura 1).

Uma vez no interior da célula, a xilose passa por duas reações de oxi-redução sendo convertida a xilitol e em seguida a xilulose, a qual sofre uma fosforilação para xilulose 5-fosfato. A conversão da xilose a xilitol é feita pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima desta via metabólica, sendo esta reação dependente da coenzima NADH ou NADPH JEFFRIES (1983). O xilitol formado pode então ser excretado ao meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, com a participação de NAD⁺ como coenzima SLININGER *et al.* (1987). A xilulose produzida é fosforilada pela enzima xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses WEEB & LEE (1990). Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeídos-3P, são metabolizados na glicolise (via Embden Meyerhof Parnas – EMP) sendo levados à piruvato, o qual pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, sendo neste processo, reoxidado o NADH resultantes da oxidação de gliceraldeído 3P.

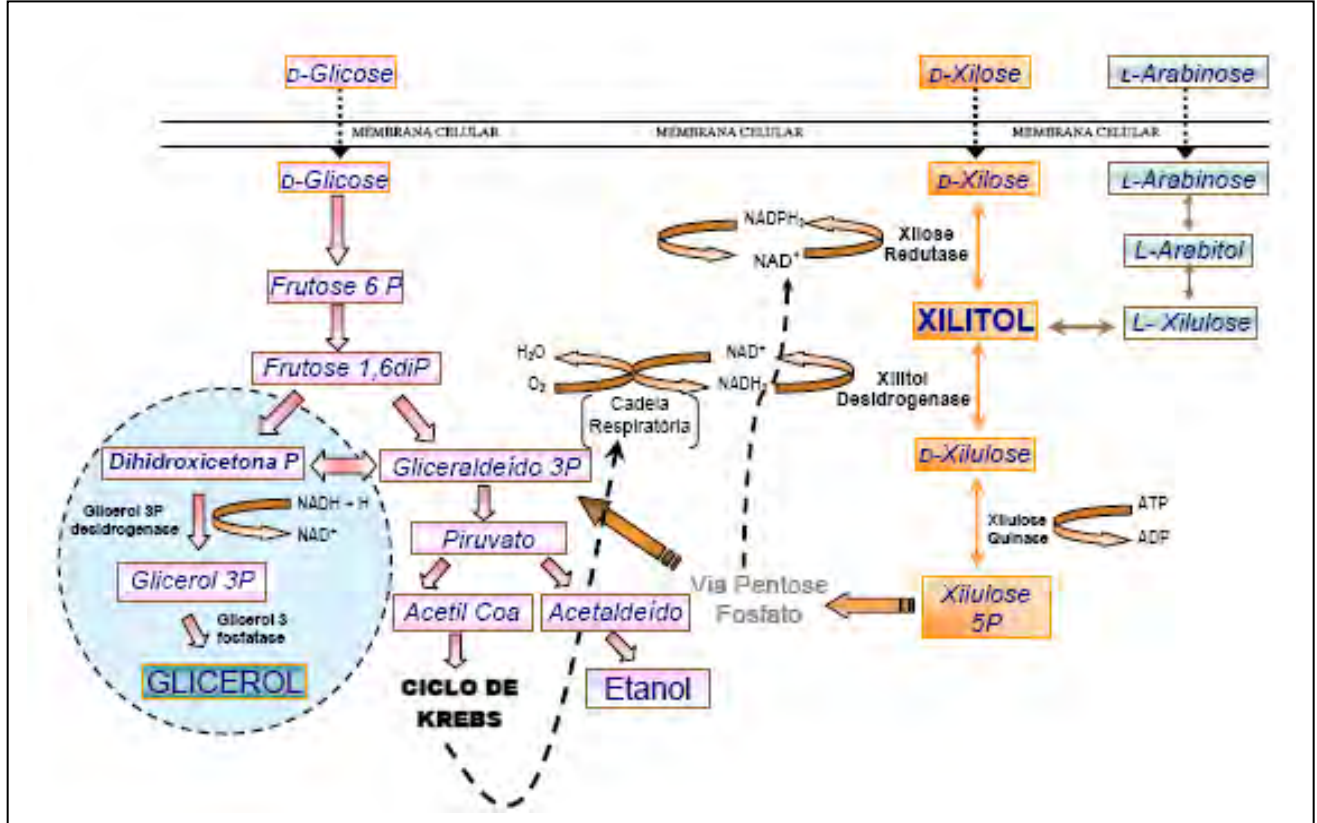


Figura 1: Fluxograma da via biotecnológica de obtenção de xilitol e etanol a partir dos açúcares glicose, xilose e arabinose ARRUDA (2007).

2.10. Leveduras metabolizadoras de xilose.

Para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, o microrganismo ideal deve ser capaz de metabolizar pentoses e hexoses CHENG *et al.* (2008).

A levedura *S. cerevisiae*, mais utilizada na fermentação alcoólica, é capaz de fermentar apenas hexoses em etanol. Sua inabilidade em fermentar xilose pode ser revertida através de artifícios tais como o uso de xilose isomerase exógena ou recombinação do DNA WALKER (1998).

O conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses ainda é limitado HAHN-HARGERDAL *et al.* (1994). Dentre as principais espécies que fermentam xilose, pode-se citar: *Pachysolen tannophilus* CHENG *et al.* (2008); *Kluyveromyces marxianus*

MARGARITIS & BAJPAI (1982), *Pichia stipitis* AGBOBBO *et al.* (2006); CANILHA *et al.* (2010), *Candida guilliermondii* FELIPE *et al.* (1995); ALVES *et al.* (1998); ARRUDA & FELIPE (2009), *Candida shehatae* CHANDEL *et al.* (2007), *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polimorpha* e *Schizosaccharomyces pombe* WALKER (1998).

Segundo WALKER (1998), existe alguns contrastes na fermentação industrial de pentoses a etanol, tais como a baixa tolerância ao etanol por leveduras fermentadoras de pentose. Também, a presença de glicose nos hidrolisados hemicelulósicos pode atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

Leveduras do gênero *Rhodotorula* são relatadas como metabolizadoras de xilose, mas não produtoras de etanol GONG *et al.* (1981); McMILAN (1993).

2.11. Compostos inibidores da fermentação.

Segundo CHANDEL *et al.* (2007) ao analisar os custos do processo de hidrólise, deve ser levado em consideração os compostos que inibem o crescimento dos microrganismos, formados pela hidrólise do material em questão.

Durante o processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação, tais como ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose; ácidos fórmicos e levulínicos, produtos da degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina; e furaldeídos ou aldeídos furanos, principalmente furfural e 5- hidroximetilfurfural, formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente MARTIN *et al.* (2007).

Segundo NARENDRANATH *et al.* (2001), a presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo resulta em um aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno.

Os compostos fenólicos podem inibir a bioconversão, inibindo a atividade enzimática, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a barreira seletiva HEIPIEPER *et al.* (1994).

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os microrganismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e inibem a síntese de RNA e proteínas SANCHEZ & BAUTISTA (1988); MODING *et al.* (2002).

De acordo com MARTIN & JONSSON (2003), a maioria das leveduras, inclusive as estirpes industriais, são suscetíveis a vários compostos inibidores derivados da hidrólise ácida e especialmente suscetíveis à presença de múltiplos inibidores.

Nos experimentos realizados por PESSOA JR. *et al.* (1997) foram determinados os teores de açúcares redutores pela metodologia de Somogyi-Nelson; enquanto xilose, glicose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foram quantificados por cromatografia líquida (HPLC). Ambas as metodologias utilizadas visavam caracterizar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. A hidrólise ácida foi realizada com uma concentração de 100mg de ácido sulfúrico por grama de massa seca a 40°C por 20 min. Os teores de açúcares redutores, xilose, glicose, furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético fosfórico (2, 4 e 6%) em proporção de 8g solução por grama de bagaço seco a 100°C e tempo de 0-30 min., foi observada maior quantidade de xilose, 17,7g/L de glicose e 2,1g/L de arabinose e, com relação aos compostos inibidores de microrganismos, foram quantificados 3,61g/L de ácido acético e 0,35g/L de furfural.

CHANDEL *et al.* (2007) ao realizar a hidrólise do bagaço a 140°C por 30 min. com diferentes concentrações do ácido clorídrico (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5%), verificaram que na concentração de 2,5% foi quantificada a maior produção de açúcares totais (30,29g/L), xilose (21,5g/L), arabinose (2,95g/L), e glicose (5,84g/L). No entanto, foi com a concentração de ácido que ocorreu a maior produção de compostos inibidores da fermentação como furanos (1,89g/L), compostos fenólicos (2,75g/L) e ácido acético (5,45g/L).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente pesquisa foi conduzida nos Laboratórios de Tecnologia do Açúcar e Álcool e Microbiologia das Fermentações do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP, e na Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Universidade de São Paulo – USP.

3.1. Matéria-prima.

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado neste experimento foi cedido pela Usina Bonfim (COSAN) – Guariba/SP, durante a safra 2009/2010.

Após coleta, o bagaço foi mantido em estufa com circulação de ar a 60°C até atingir massa constante. A umidade contida no bagaço de cana foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, em um aparelho à temperatura de 105°C durante 20 min. (ORION, modelo MB200) MORAES (2008).

3.2. Determinação da composição do bagaço de cana-de-açúcar.

Foram caracterizadas as principais frações quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina antes e após a hidrólise da fração hemicelulósica Van SOEST & ROBERTSON (1985).

3.3. Obtenção, caracterização, concentração e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana.

O bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à hidrólise ácida branda, na qual principal fração removida foi a hemicelulósica, em reator de aço inoxidável com capacidade para 100L. O reator foi carregado com 3,846kg de bagaço de cana-de-açúcar, 20L de água e 190mL de ácido sulfúrico MORAES (2008).

Foram realizados quatro ciclos de hidrólise, sob temperatura constante de 150°C durante 30 min., para se obter 80L de hidrolisado. A fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi obtida após filtração para separação da fração sólida, denominada celulignina.

Os hidrolisados foram misturados e homogeneizados, sendo a seguir avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) apresentando as seguintes características: Xilose- 17,80g/L; Glicose- 3,44g/L; Ácido Acético- 2,29g/L; Fenóis Totais- 1,8g/L. O valor do pH foi de 1,04, determinado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2 com correção de temperatura. A mistura foi armazenada em câmara fria a 4°C para posterior concentração.

A concentração do hidrolisado ocorreu em concentrador a vácuo, com capacidade útil de 30L, operando a 70±5°C. Após esse processo, o hidrolisado hemicelulósico concentrado foi avaliado por HPLC, apresentando as seguintes características: Xilose- 50,02g/L; Glicose- 9,87g/L; Ácido Acético- 0g/L; Fenóis Totais- 2,4g/L e pH- 1,34 (determinado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2 com correção de temperatura).

A destoxificação foi realizada segundo metodologia descrita por MARTON (2002). Primeiramente, empregando o método de overliming, foi ajustado o pH inicial do hidrolisado para pH 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), seguido pela sua diminuição até pH 4,0 utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido a processo de adsorção empregando 1% (m/v) de carvão ativo em incubadora a 50°C durante 30 min. Ao final de cada etapa de alteração de pH e adição de carvão, o hidrolisado foi centrifugado para a remoção do precipitado (Figura 2).

A seguir, o hidrolisado destoxificado foi suplementado com sulfato de amônio (0,1g/L) e fosfato de potássio (0,1g/L).

A partir das concentrações de xilose, glicose e arabinose presente no hidrolisado hemicelulósico original e concentrado, preparou um meio sintético, com as mesmas concentrações de açúcares, porém isento de compostos inibidores da fermentação.

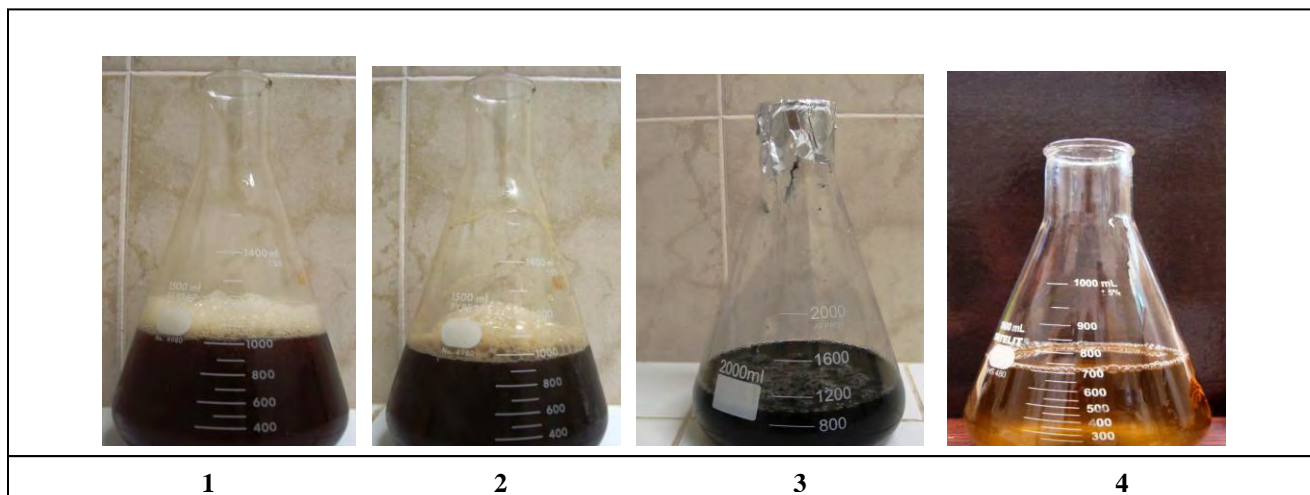


Figura 2: Processo de destoxificação do hidrolisado da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar (1- Adição de CaO \Rightarrow Centrifuga \Rightarrow 2- Adição de ácido fosfórico \Rightarrow Centrifuga \Rightarrow 3- Adição de carvão ativado \Rightarrow Centrifuga \Rightarrow 4- Hidrolisado destoxificado).

3.4. Seleção dos microrganismos.

As leveduras utilizadas foram obtidas através de uma cultura estoque, mantida à 4°C, sendo selecionadas as cepas J01, J03, J08, J10, J16, J19.1, J25, J70 e CG, proveniente do Banco de Leveduras do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e Etanol do Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Jaboticabal –SP, que segundo GUIDI (2000) apresentam habilidade em metabolizar xilose.

Para reativação das culturas, os inóculos foram transferidos assepticamente para um tubo de ensaio contendo 5mL do meio GYMP e mantidos por 72 hs a 30°C (GUIDI, 2000). Após este período foi realizada reativação com o mesmo meio, durante 24 hs a 30°C.

Para os testes de metabolização de xilose, foram distribuídos 2mL de meio basal para fermentação em tubos de ensaio contendo tubos de Durham invertidos. Em seguida realizou-se a esterilização dos mesmos através de autoclavagem por 15 min. à 121°C. A solução aquosa de xilose a 6% foi esterilizada por filtração em membrana

(Millipore), e adicionou-se 1mL aos 2mL do meio basal para fermentação já autoclavado (GUIDI, 2000).

A seguir inoculou-se 0,1mL de suspensões celulares das culturas provenientes do meio GYMP nos tubos para teste de metabolização. Os tubos foram mantidos à 28°C e agitados periodicamente, observando-se a formação de gás dentro dos tubos de Durham, por um período de até 21 dias.

Em função da formação de gás, a fermentação foi considerada:

(+) Forte: Completo preenchimento do tubo de Durham com gás, no prazo de 1 a 3 dias.

(+w) Fraca: Preenchimento parcial de gás

(+s) Lenta: Completo preenchimento do tubo após maior tempo.

(-) Negativa: Sem produção de gás.

Os resultados do teste de assimilação de xilose encontram-se na Tabela 1 e Figura 3.

As estirpes J10, J19.1, e CG, identificadas como *Rhodotorula glutinis*(J10); *Rhodotorula minuta*(J19.1) e *Candida guilliermondii*(CG), foram selecionadas porque apresentaram preenchimento completo do tubo de Durham com gás no prazo máximo de 3 dias.

Tabela 1: Leveduras empregadas no teste de assimilação de xilose.

LEVEDURAS	ASSIMILAÇÃO
J 01	+w
J 03	+w
J 08	-
J 10	+
J 19.1	+
J 16	+w
J 25	-
J 70	+w
C.G	+

(+) Forte: Completo preenchimento do tubo de Durham com gás, no prazo de 1 a 3 dias; (+w) Fraca: Preenchimento parcial de gás; (-) Negativa: Sem produção de gás.

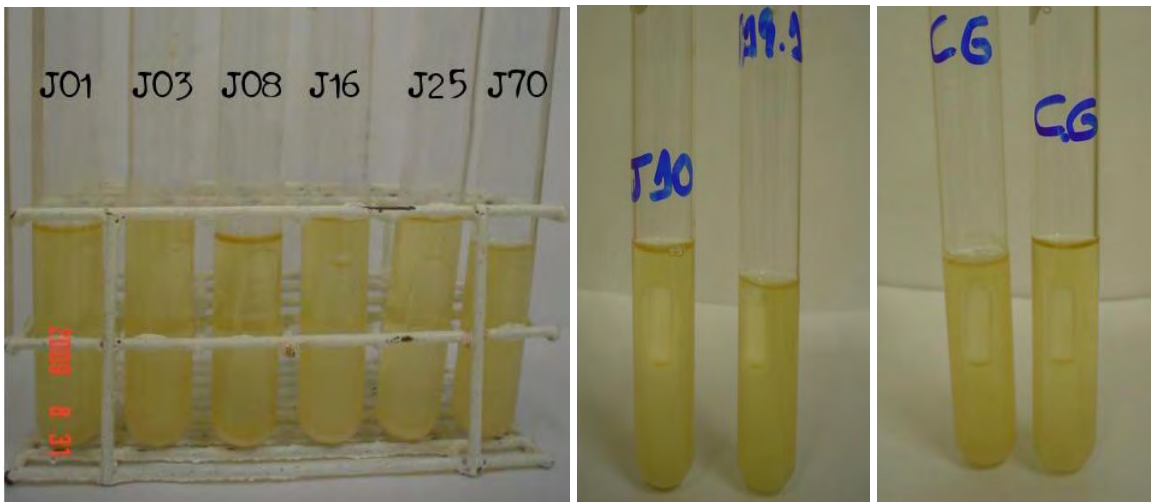


Figura 3: Teste de metabolização de xilose empregado nas estirpes J01, J03, J08, J16, J25, J70, CG, J10 e J19.1.

3.5.Crescimento de massa celular.

A partir de um tubo de ensaio estoque, transferiu-se os três inóculos selecionados assepticamente, com auxílio de uma alça de platina esterilizada por flambagem, para um erlenmeyer contendo 120mL de meio YM autoclavado (Figura 4). As culturas permaneceram em agitação a 160 rpm, por 48 hs a 30°C.

Em seguida, centrifugou-se o meio de cultura com o inóculo, descartando-se assim a fração líquida e recuperando-se a massa celular. Submeteu-se as leveduras a adaptação em ambiente com concentração crescentes de glicose, utilizando-se o meio YM com 2%, 4%, 6% e 8% durante 72 hs. Através de câmara de Neubauer LEE *et al.* (1981), observou-se a viabilidade celular, e após 72 hs recuperou-se a quantidade de massa celular suficiente para iniciar a fermentação, ou seja 10^7 UFC/mL.

3.6. Meios para seleção das Leveduras

- a) **Meio de GYMP para manutenção e reativação de culturas LODDER (1970)**
Glicose - 2,0g; Extrato de Levedura - 0,50g; Extrato de Malte - 1,00g; Fosfato de Sódio Monobásico - 0,20g; Ágar - 1,70g; Água Destilada - 100,00mL.

- b) **Meio basal para fermentação (WICKERHAM (1951) apud van der WALT & YARROW (1984) - Peptona - 0,75g; Extrato de levedura - 0,45g; Água destilada - 100,00mL.**

- c) **Meio basal de nitrogênio para teste de assimilação de fonte de carbono em meio líquido, concentrado 10 vezes (WICKERHAM & BURTON (1948); WICKERHAM (1951); LODDER & KREGER VAN-RIJ (1952) apud van der WALT & YARROW (1984)), testando xilose - Bacto Yeast Nitrogen Base - 6,70g; Xilose - 6,00g; Água destilada - 100,00mL**

- d) **Meio YM (Yeast Medium) para reativação das culturas - Peptona - 0,0075%; Extrato de Levedura - 0,0045%; Carboidratos - 2%; Água Destilada - 100 mL.**

3.7. Condução das fermentações.

O experimento foi conduzido em duas etapas. Na primeira etapa empregou-se o hidrolisado hemicelulósico original (Tabela 5) e hidrolisado hemicelulósico original sintético (Xilose- 17,5g/L e Glicose- 3,5g/L, porém livre de compostos inibidores) suplementado com 0,1g/L de Sulfato de Amônio e 0,1g/L de Fosfato de Potássio; na segunda etapa utilizou-se o hidrolisado hemicelulósico concentrado (Tabela 5) e hidrolisado hemicelulósico concentrado sintético (Xilose- 50,0g/L e Glicose- 9,35g/L e livre de compostos inibidores) suplementado com 0,1g/L de Sulfato de Amônio e 0,1g/L de Fosfato de Potássio.

As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 120mL de mosto, inoculado com células de leveduras na concentração de 10^7 UFC/mL. Os frascos foram mantidos sob agitação orbital 160 rpm a 30°C.

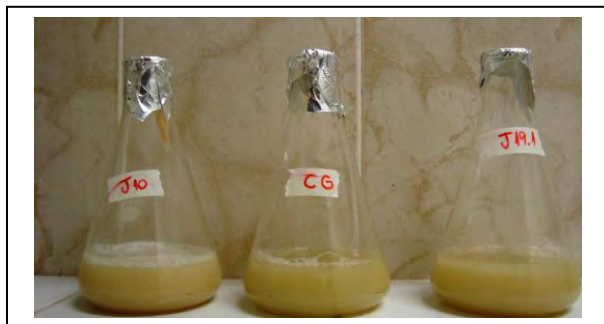


Figura 4: Obtenção de massa celular das estirpes J10, CG e J19.1 em meio YM.

3.8.Métodos analíticos

3.8.1.Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar.

A umidade contida no bagaço de cana-de-açúcar foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, à temperatura de 105°C durante 20 min. - ORION, modelo MB200 MORAES (2008).

3.8.2.Determinação das concentrações de açúcares (xilose, glicose) e ácido acético no hidrolisado, e produção de etanol e xilitol.

As concentrações dos açúcares (xilose, glicose), ácido acético, etanol e xilitol, foram determinadas através de Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters, Milford, MA) operado com coluna Biorad Aminex HPX-87H, empregando-se as seguintes condições: temperatura da coluna de 45°C, eluente, solução de H_2SO_4 0,005mol/L, fluxo de 0,6mL/min, volume da amostra injetada 20 μ L. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pack C18 (Millipore) e o eluente, antes do

uso, foi filtrado a vácuo em membrana Hawp 0,45 Millipore e em seguida desgaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 min. MORAES (2008).

As análises foram realizadas, após inoculação das leveduras, nos tempos 0, 6, 9 e 12 hs para a primeira etapa e 0, 36, 48 e 72 hs na segunda etapa do experimento.

3.8.3.Determinação da concentração de fenóis totais no hidrolisado.

A concentração de fenóis totais foi determinada através do método de Folin-Ciocalteu, utilizando-se 0,5mL de hidrolisado diluído dez vezes em metanol acidificado (1% HCl), 2,5mL de reativo de Folin-Ciocalteu e 2,0mL de carbonato de sódio 7,5%. A mistura foi incubada a 45°C por 15 min., e quantifica-se através da leitura em absorbância em espectrofotômetro a 765nm FOLIN & CIOCALTEAU (1927).

3.8.4.Determinação do pH do hidrolisado.

O pH foi determinado por leitura direta em medidor digital Digimed DMPH – 2 com correção de temperatura.

3.8.5.Viabilidade Celular.

Foram realizadas contagens de células em Câmara de Neubauer, utilizando Azul de Metileno Ringer como corante LEE *et al.* (1981). Os parâmetros microbiológicos avaliados foram: viabilidade celular das leveduras, viabilidade de brotos e índice de brotamentos, que foram calculados através das seguintes fórmulas:

Viabilidade Celular % = células vivas x 100/células vivas + mortas

Viabilidade de Brotos % = brotos vivos x 100/ brotos vivos + mortos

Índice de Brotamentos % = brotos vivos x 100/ células vivas + mortas

As determinações foram realizadas após a inoculação das leveduras nos tempos 0, 6, 9 e 12 hs para a primeira etapa e 0, 36, 48 e 72 hs na segunda etapa do experimento.

3.9. Análise Estatística.

Foram realizados dois experimentos em delineamento inteiramente casualizado, com esquema fatorial 2x3, utilizando-se 2 mostos (mosto proveniente do hidrolisado e mosto sintético), e 3 estirpes de leveduras, com 4 repetições.

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e à comparação entre as médias realizada pelo teste de Tukey BANZATTO & KRONKA (2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Os resultados obtidos para a composição do bagaço de cana utilizado nos experimentos estão apresentados na tabela 2. Verifica-se que os teores de celulose e hemicelulose da sua análise são compatíveis com os valores disponíveis na literatura, que é de 38 a 50% para celulose e 25 a 27% para hemicelulose RABELO (2007).

A lignina confere resistência mecânica às paredes celulares, permitindo a sustentação e o crescimento das plantas. É encontrada no bagaço de cana em concentrações de 20 a 30% RABELO (2007). Verifica-se que, no bagaço utilizado nos experimentos, a concentração de lignina encontrava-se abaixo do relatado (Tabela 2). Considerando-se que essa macromolécula vai sendo incorporada durante o crescimento do vegetal e que seus teores diminuem da base para o topo das plantas, é possível que esse bagaço seja proveniente de plantas jovens ou então da porção apical.

Tabela 2. Análise do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”.

Índices	Resultados (%)
Hemicelulose	29,85
Celulose	44,19
Lignina	9,36

Após a hidrólise, verificou-se redução na porcentagem de hemicelulose, e aumento das porcentagens de celulose e lignina (Tabela 3).

Tabela 3. Análise do Bagaço de cana-de-açúcar após hidrólise da fração hemicelulósica.

Índices	Resultados (%)
Hemicelulose	4,86
Celulose	63,93
Lignina	13,90

Os resultados obtidos para concentração de açúcares e ácido acético, nos quatro hidrolisados apontam para concentrações semelhantes (Tabela 4). A seguir procede-se a mistura dos hidrolisados homogeneizando-se e analisando-se o hidrolisado obtido (Tabela 5).

Tabela 4: Concentração de açúcares, ácido acético e valor de pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida diluída.

	Hidrolisado1	Hidrolisado 2	Hidrolisado 3	Hidrolisado 4
Xilose (g/L)	17,14	16,19	18,87	16,34
Glicose (g/L)	3,25	2,73	3,77	3,47
Ácido Acético (g/L)	2,12	1,91	2,49	1,72
pH	1.13	1,30	0.92	0.91

Tabela 5: Concentração de açúcares, ácido acético, fenóis e pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana homogeneizado e destoxificado obtido por hidrólise ácida diluída.

	CONCENTRAÇÃO	
	Hidrolisado	Hidrolisado Concentrado
Xilose (g/L)	17,80	47,71
Glicose (g/L)	3,44	9,87
Ácido Acético (g/L)	2,29	0,0
pH	1.04	1,34
Fenóis (g/L)	1,8	2,4

Verifica-se da análise dos resultados a predominância de xilose em relação aos demais açúcares, reduzida concentração de ácido acético e baixos valores de pH. Esses resultados são semelhantes aos observados em outros trabalhos empregando diferentes fontes de biomassas, tais como: bagaço de cana RODRIGUES (2007), palhas de cevada MORAES (2008) e de arroz SILVA (2007).

O processo de concentração a vácuo do hidrolisado homogeneizado resultou no aumento dos teores dos açúcares, além da redução de ácido acético, favorecendo a realização do processo fermentativo (Tabela 5). Este resultado é similar aos obtidos por RODRIGUES *et al.*(2001), pesquisa realizada com bagaço de cana e de SILVA (2007), utilizando palha de arroz. Esse comportamento era esperado, pois sob condições de baixos valores de pH, o acetato apresenta-se na forma de ácido molecular, sendo portanto volátil. Os resultados obtidos nesta pesquisa foram próximos aos reportados por SILVA (2007), que quando concentrou o hidrolisado obtido a partir de palha de arroz, observou redução de 75% na concentração de ácido acético. Verificou-se que a concentração não ocorreu de maneira uniforme para todos os componentes, uma vez que xilose, glicose e compostos fenólicos foram concentrados em 2,68, 2,87 e 1,33 vezes, respectivamente.

Verificou-se ainda um aumento no pH do hidrolisado após o processo de concentração (Tabela 5). Este pode ser devido à eliminação do ácido acético durante esse processo.

Tem-se que este foi benéfico considerando-se a qualidade do material, objetivando sua caracterização como mosto a ser fermentado.

4.2.Primeira etapa do experimento – hidrolisado hemicelulósico original e sintético.

Nesta etapa do experimento foram estudados os hidrolisados hemicelulósico original, e hidrolisado hemicelulósico original sintético, cujas características foram apresentadas na Tabela 5 e no item 3.7.

A concentração de glicose nos dois meios encontrava-se baixa, e foi consumida totalmente pelas leveduras nas primeiras 6 hs (Figuras 5 e 6), quando empregou-se como mosto o hidrolisado hemicelulósico; enquanto foi consumida mais lentamente quando empregou-se mosto sintético. Considerando-se que as concentrações de glicose nos dois meios eram iguais, provavelmente algum componente presente no hidrolisado, como por exemplo algum íon, pode ter favorecido esse consumo. Esse rápido consumo de glicose também já foi observado em hidrolisados de bagaço de cana (CHENG et al., 2008), palha de trigo CANILHA *et al.* (2005) e cevada MORAES (2008).

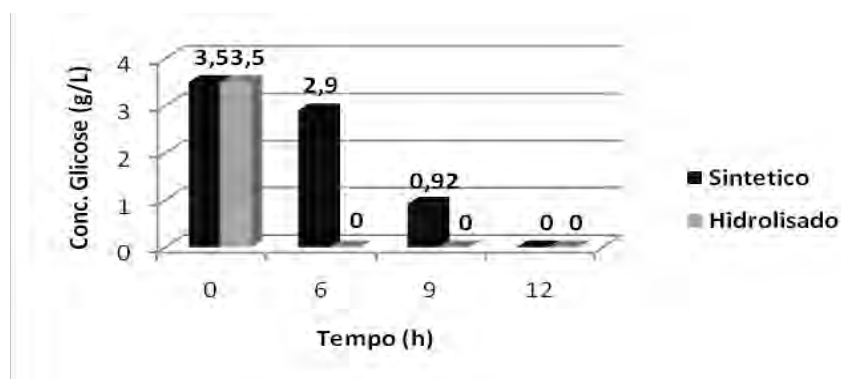


Figura 5: Consumo de glicose durante o período de 12 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

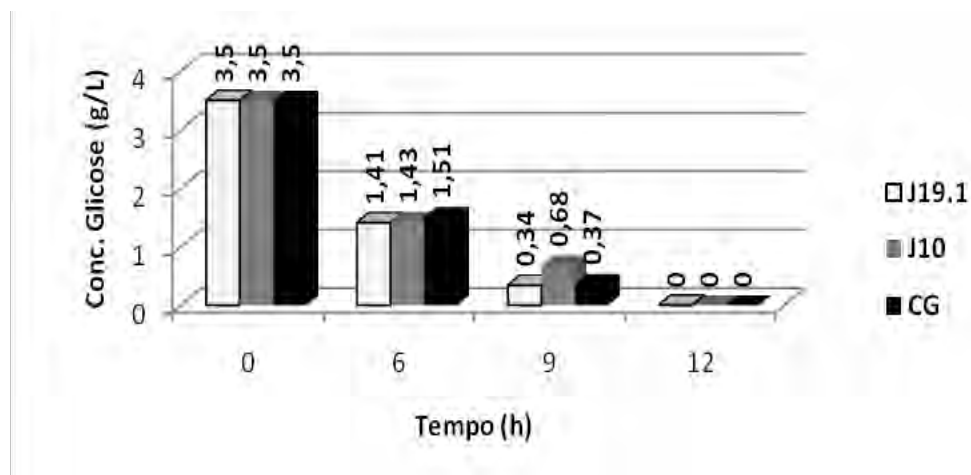


Figura 6: Consumo de glicose pelas estirpes CG, J10 e J19.1, durante o período de 12hs.

Verificou-se maior concentração de xilose nos meios, quando comparado à glicose. Isto deve-se ao fato de que as condições utilizadas para hidrolisar a fração de hemicelulose não foram fortes o suficiente para quebrar as ligações da celulose e liberar glicose no meio, assim as quantidades de glicose presentes no hidrolisado corresponde às quantidades originais do meio (Tabela 6 e 7).

Tabela 6: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as concentrações de xilose, ácido acético e etanol, empregando-se como mosto o hidrolisado hemicelulósico original.

Causas de variação	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
A - leveduras			
CG	5,53A	1,36B	1,19 ^a
J10	5,56A	2,10A	1,10 ^a
J19.1	5,59A	2,16A	1,12 ^a
F	0,46 ^{ns}	21,25 ^{**}	0,55 ^{ns}
DMS	0,15	0,33	0,24
B - períodos			
0	17,5A	0,00B	0,00B
6	1,57B	2,47A	1,46 ^a
9	1,56B	2,47A	1,67 ^a
12	1,60B	2,55A	1,43 ^a
F	23707,80 ^{**}	124,75 ^{**}	92,23 ^{**}
DMS	0,20	0,43	0,30
INTERAÇÃO			
A X B	0,40 ^{ns}	2,41 [*]	1,93 ^{ns}
CV	3,22	20,69	24,29

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Tabela 7: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as concentrações de glicose, xilose, ácido acético e etanol, empregando-se o mosto sintético original.

Causas de variação	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
A - leveduras				
CG	1,82A	5,42A	0,07A	1,34 ^a
J10	1,93A	5,47A	0,05A	1,11 ^a
J19.1	1,75A	5,45A	0,04A	1,32 ^a
F	0,24 ^{ns}	0,28 ^{ns}	1,80 ^{ns}	1,84 ^{ns}
DMS	0,64	0,15	0,03	0,33
B - períodos				
0	3,50A	17,50A	0,00C	0,00B
6	2,90A	1,41B	0,00C	1,56 ^a
9	0,92B	1,47B	0,16A	1,88 ^a
12	0,00C	1,41B	0,06B	1,59 ^a
F	59,05 ^{**}	24327,88 ^{**}	58,80 ^{**}	59,94 ^{**}
DMS	0,81	0,20	0,04	0,30
INTERAÇÃO				
A X B	0,29 ^{ns}	1,76 ^{ns}	1,88 ^{ns}	0,93 ^{ns}
CV	40,41	3,27	62,60	30,29

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Para consumo de xilose pelas leveduras observa-se que apresentaram comportamento semelhante tanto no meio sintético quanto no hidrolisado, sendo que as leveduras não diferiram entre si com relação ao consumo desse açúcar, que foi metabolizado em sua grande maioria nas primeiras 6 hs de fermentação (Figuras 7 e 8).

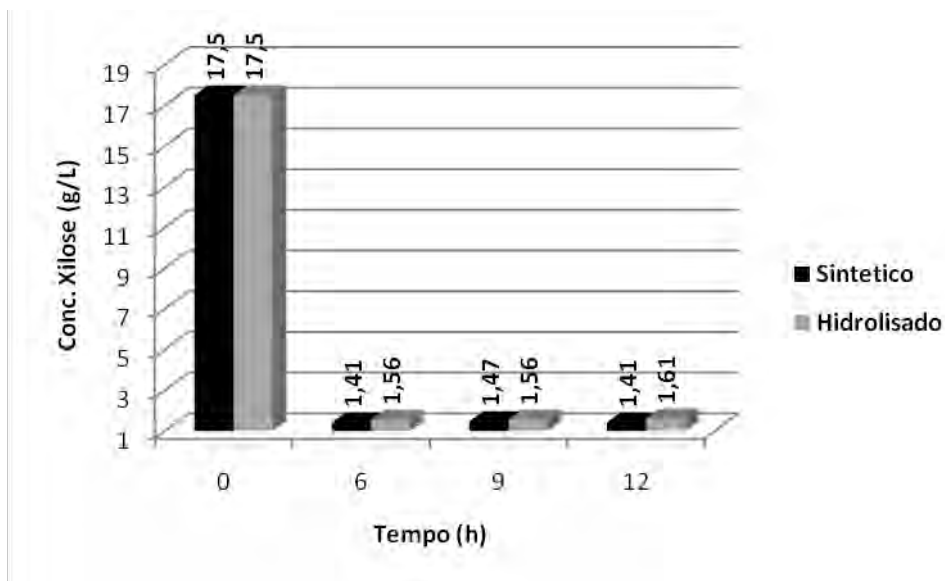


Figura 7: Consumo de xilose durante o período de 12 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

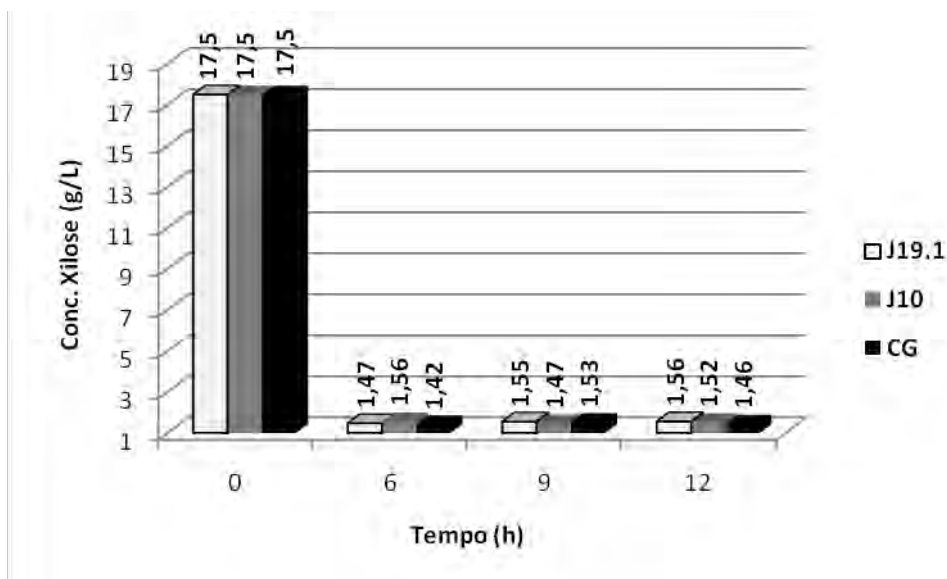


Figura 8: Consumo de xilose pelas estirpes CG, J10 e J19.1, durante o período de 12hs.

Houve maior produção de etanol no meio sintético, tendo seu pico de produção no tempo 9 hs (Tabelas 6 e 7 e Figuras 9 e 10). Observa-se porem, que após o pico de produção, ocorre uma redução da concentração de etanol. Alguns pesquisadores

relatam que essa redução deve-se à dois fatores: ao consumo pelas leveduras, utilizando-o como fonte de carbono após o esgotamento do meio ou pela evaporação de etanol KIPPER, (2009); CANILHA *et al.* (2010). SILVA *et al.* (2004) atribuem essa redução às condições de anaerobiose ou limitação de oxigênio, que causam um desbalanço redox, o qual interfere com a produção de xilitol e dos subprodutos (etanol e/ou glicerol). Nesse ensaio, provavelmente houve consumo de etanol como fonte de carbono pelas leveduras, e não perda significativa por evaporação, uma vez que os frascos eram devidamente fechados, mantendo apenas um pequeno orifício para eliminação do CO₂.

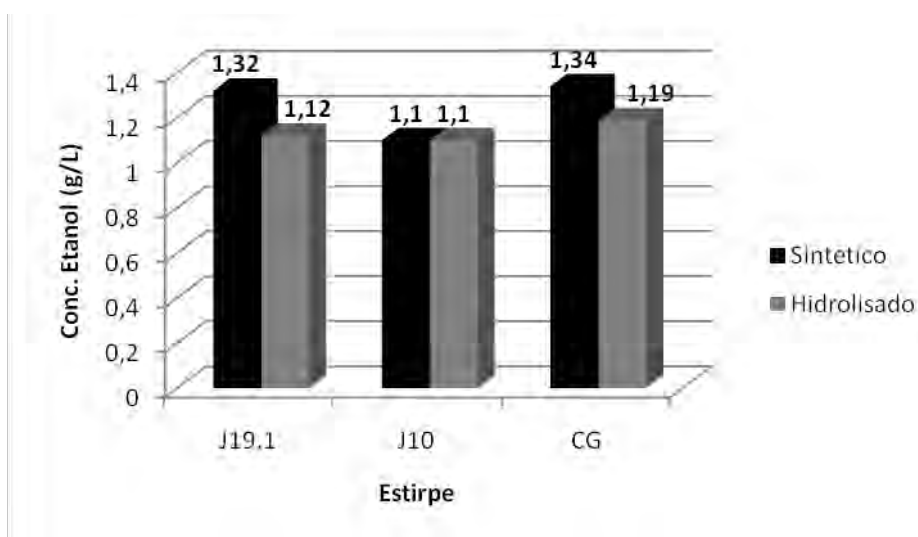


Figura 9: Produção de etanol pelas leveduras CG, J10 e J19.1, durante o período de 12 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

KIPPER (2009), em seus experimentos empregando *P. tannophilus*, observou que o ápice da produção de etanol ocorreu após 24 hs de fermentação, sendo que a redução na concentração foi observada com 48 hs. Comportamento semelhante foi observado no presente estudo, quando trabalhou com concentrações menores e respectivamente tempos reduzidos.

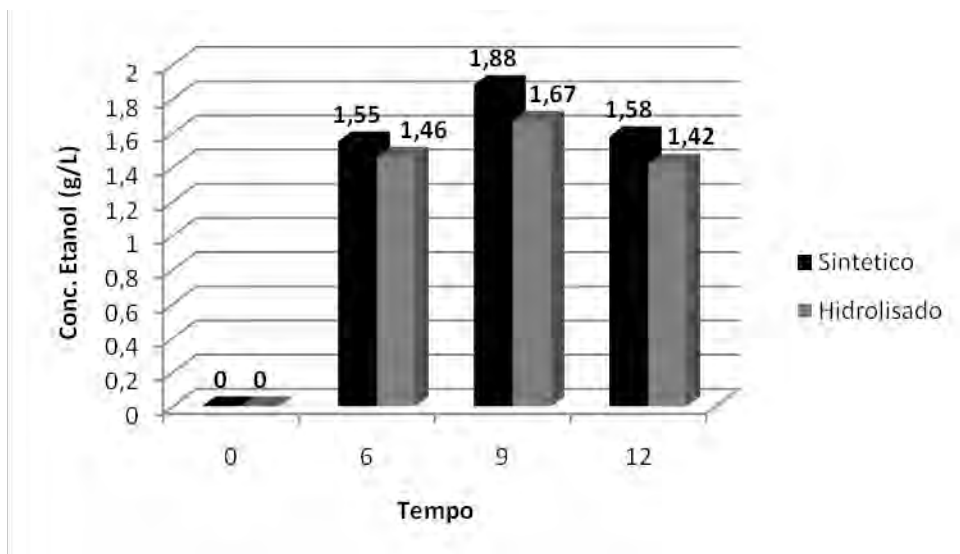


Figura 10: Produção de etanol durante o período de 12 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

A concentração de etanol obtida no presente ensaio foi baixa, com teores entre 1 e 2g/L, próximos aos obtidos por KIPPER (2009), que apresentou produção de 0,205% de etanol. Esses valores são resultantes da baixa concentração de açúcares disponibilizada no mosto, assim, considerando-se que as leveduras desdobram os açúcares através do processo de fermentação, verifica-se que os teores de etanol quantificados foram baixos, na faixa de 1,42g/L a 1,88g/L.

Observou-se também produção de ácido acético ao decorrer da fermentação, sendo que no meio sintético este aumento foi insignificante (Tabela 7), porém no meio hidrolisado original o aumento foi progressivo (Tabela 6 e Figuras 11 e 12). O aumento da concentração desse ácido pode ter ocorrido por ocasião da utilização do etanol como substrato pelas leveduras WALKER (1998). Nesse processo, o etanol é convertido em acetaldeído e este em acetato; ou ainda diretamente em ácido acético por processos de oxidação.

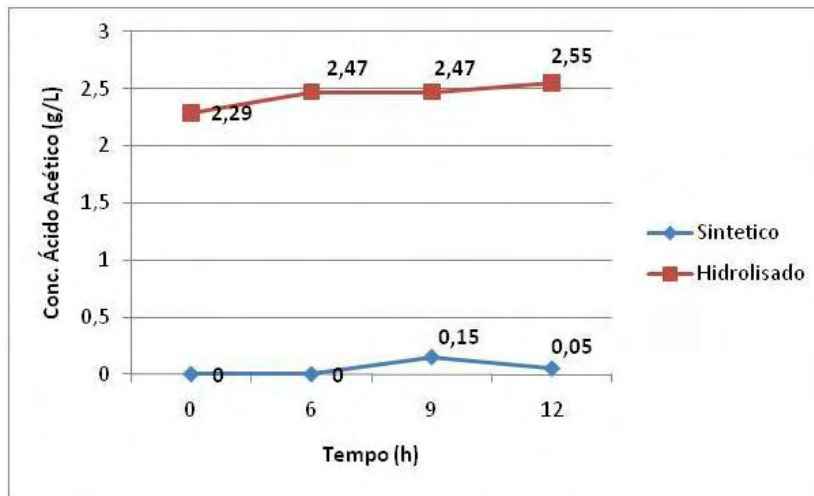


Figura 11: Concentração de ácido acético nas fermentações com os meios hidrolisado e sintético, durante o período de 12 hs.

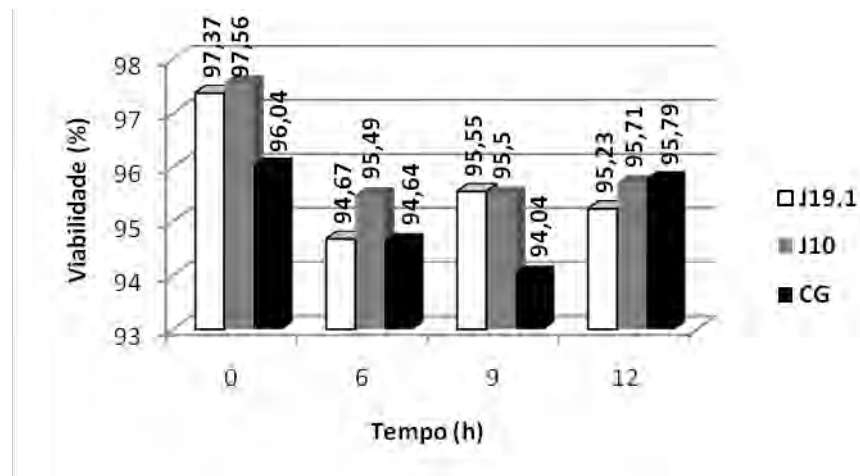


Figura 12: Viabilidade celular das estirpes CG, J10 e J19.1, durante o período de 12hs.

Segundo FELIPE *et al.* (1995) concentrações abaixo de 3,0g/L não foram prejudiciais à bioconversão de xilose em xilitol durante fermentação de meio de cultivado por *C. guilliermondii*, sendo assim os resultados obtidos favoráveis, já que o pico de ácido acético não foi superior a 2,55g/L.

ALVES *et al.* (1998), trabalhando com produção de xilitol a partir de hidrolisados de bagaço de cana, observou a assimilação de ácido acético pela cepa *C. guilliermondii*

FTI 20037, porém não houve relatos da síntese desse composto, que geralmente é produzido através da conversão de etanol a ácido acético pela bactéria acetobacter, contaminante presente nas fermentações etanólicas.

A viabilidade celular de leveduras encontrava-se acima de 94%, com mais de 92% de brotos viáveis (Tabelas 8 e 9 e Figura 13). Verificou-se uma pequena redução da viabilidade das células a partir de 6 hs de fermentação, o que pode ter ocorrido em função do esgotamento do meio. Entretanto, essa redução não prejudicou o processo, uma vez que durante toda a fermentação manteve-se acima de 92%. Resultados similares foram verificados para viabilidade de brotos de leveduras (Tabelas 8 e 9 e Figura 14).

Tabela 8: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as análises microbiológicas, empregando-se como mosto o hidrolisado hemicelulósico original.

Causas de Variação	Viabilidade Celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de Brotos (%)
A - leveduras			
CG	94,53A	41,10A	96,88 ^a
J10	95,84A	40,50A	94,62 ^a
J19.1	94,99A	38,07A	95,14 ^a
F	0,44 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,89 ^{ns}
DMS	3,48	8,37	4,35
B - períodos			
0	98,20A	42,03A	92,76B
6	92,34B	39,38A	93,61B
9	94,47AB	39,11A	95,82AB
12	95,48AB	39,04A	100,00A
F	4,38 [*]	0,26 ^{ns}	4,94 ^{**}
DMS	4,43	10,65	5,54
INTERAÇÃO			
A X B	0,11 ^{ns}	0,41 ^{ns}	1,19 ^{ns}
CV	4,24	24,29	5,27

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Tabela 9: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as análises microbiológicas, empregando-se o mosto sintético original.

Causas de Variação	Viabilidade Celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de Brotos (%)
A -leveduras			
CG	95,73A	38,56A	97,50 ^a
J10	96,29A	38,54A	98,46 ^a
J19.1	96,43A	36,74A	97,27 ^a
F	0,76 ^{ns}	1,30 ^{ns}	1,18 ^{ns}
DMS	1,46	3,17	2,00
B - períodos			
0	95,79AB	43,19A	98,35 ^a
6	97,53A	36,71B	97,93 ^a
9	95,60B	36,57B	96,92 ^a
12	95,68AB	35,31B	97,78 ^a
F	3,59*	11,24**	0,80 ^{ns}
DMS	1,86	4,04	2,55
INTERAÇÃO			
A X B	0,50 ^{ns}	2,85*	1,63 ^{ns}
CV	1,76	9,68	2,37

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

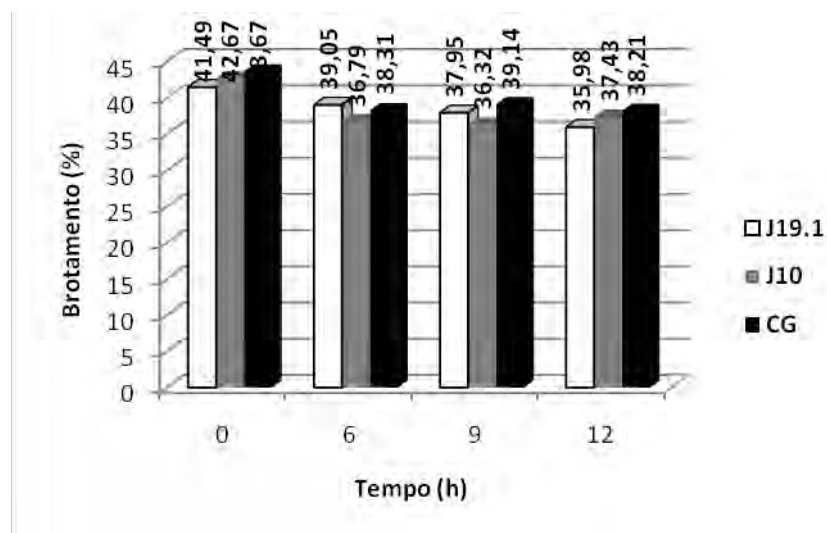


Figura 13: Índice de brotamentos das estirpes CG, J10 e J19.1, durante o período de 12 hs.

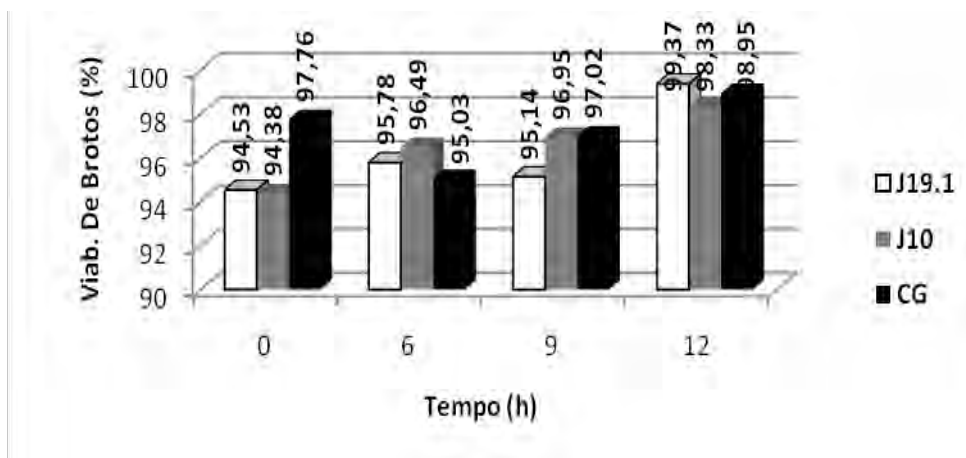


Figura 14: Viabilidade de brotos das estirpes CG, J10 e J19.1, durante o período de 12hs.

O índice de brotamento das leveduras permaneceu elevado durante todo o processo (Figura 15). AMORIM *et al.* (1996) relatam que a porcentagem ideal de brotamentos em um processo fermentativo deve variar entre 5 a 15%. A alta porcentagem de brotamentos após 6 hs de fermentação pode ser justificada pela baixa concentração de açúcares no meio fermentativo. Segundo WALKER (1998), devido ao Efeito Crabtree que algumas leveduras desenvolvem, em condições de baixa concentração de açúcares, ocorrendo favorecimento do processo de respiração e assim multiplicando-se em maiores taxas.

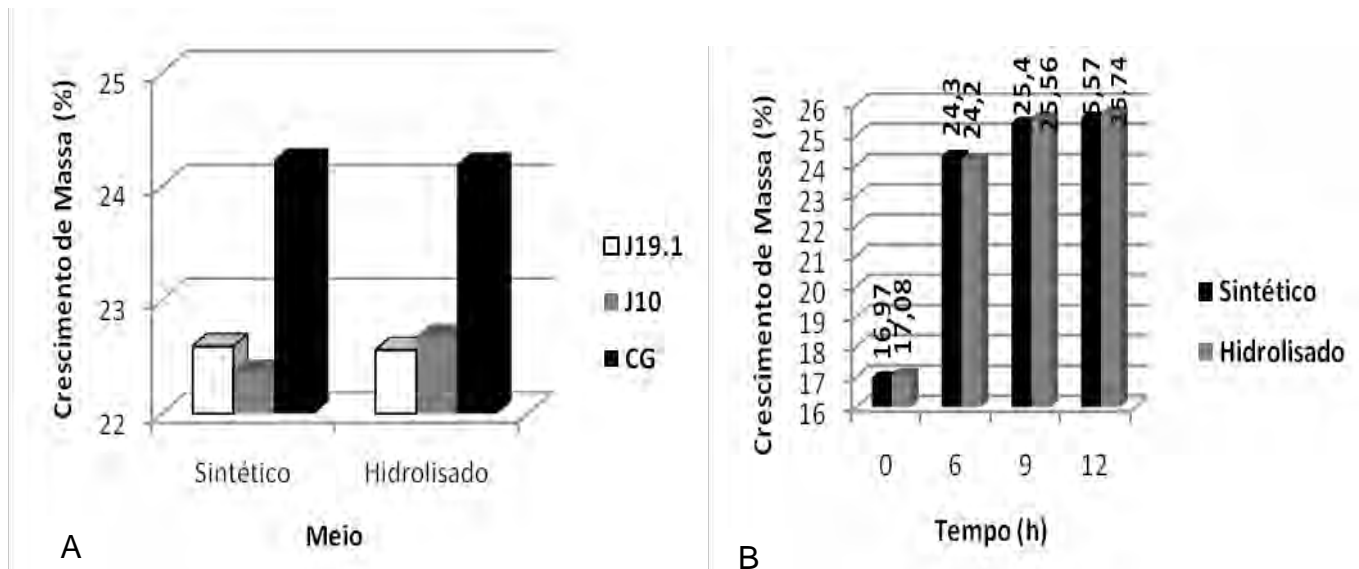


Figura 15. Crescimento de massa celular. **15A.** Crescimento de massa celular das cepas J10, J19.1 e CG em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana. **15B.** Crescimento de massa celular em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana durante o período de 12 hs.

4.3.Segunda Etapa do Experimento – Hidrolisado Hemicelulósico Concentrado e Sintético.

Nesta etapa do experimento foram estudados os hidrolisados hemicelulósico concentrado, e hidrolisado hemicelulósico concentrado sintético, cujas características foram apresentadas na Tabela 5 e no item 3.7.

Pode-se observar que quando as leveduras foram inoculadas tanto no mosto sintético quanto no mosto hidrolisado consumiram xilose de modo semelhante, nas primeiras 36 hs de cultivo (Tabelas 10 e 11 e Figura 16). De acordo com TOIVARI *et al.* (2001), a conversão de xilose a etanol, quando se utiliza a levedura *S. cerevisiae* (recombinante), ocorre até que a concentração residual esteja ao redor de 10g/L, devido à uma limitação no metabolismo desse microrganismo.

Tabela 10: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as concentrações de xilose, arabinose, ácido acético e etanol, empregando-se como mosto o hidrolisado hemicelulósico concentrado.

Causas de Variação	Xilose (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
A - leveduras			
CG	12,27A	3,24A	1,25 ^a
J10	12,27A	2,29A	1,59 ^a
J19.1	12,27A	3,23A	1,29 ^a
F	0,19 ^{ns}	0,09 ^{ns}	3,23 ^{ns}
DMS	0,03	0,35	0,36
B - períodos			
0	47,71A	0,00C	0,00C
36	0,46B	4,56A	2,30 ^a
48	0,46B	4,48A	2,06 ^a
72	0,44B	3,97B	1,15B
F	5575348,73 ^{**}	344,71 ^{**}	75,25 ^{**}
DMS	0,04	0,45	0,46
INTERAÇÃO			
A X B	1,13 ^{ns}	0,88 ^{ns}	1,39 ^{ns}
CV	0,28	12,53	30,25

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Tabela 11: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as concentrações de, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético e etanol, empregando-se o mosto sintético concentrado.

Causas de Variação	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Ácido Acético (g/L)	Etanol (g/L)
A - leveduras				
CG	12,87A	2,19A	0,032A	1,24 ^a
J10	12,82B	2,24A	0,041A	0,97 ^a
J19.1	12,83B	2,23A	0,046A	1,23 ^a
F	10,26 ^{**}	0,02 ^{ns}	1,39 ^{ns}	1,07 ^{ns}
DMS	0,03	0,70	0,02	0,51
B - períodos				
0	50,00A	0,00C	0,00C	0,00C
36	0,52B	3,67A	0,078A	2,12 ^a
48	0,45C	3,49A	0,052B	1,49AB
72	0,40D	1,72B	0,028B	0,98B
F	7026550,85 ^{**}	53,64 ^{**}	24,48 ^{**}	27,27 ^{**}
DMS	0,04	0,90	0,03	0,65
INTERAÇÃO				
A X B	12,57 ^{**}	32,30 ^{**}	3,66 ^{**}	2,99 [*]
CV	0,25	36,71	58,90	51,78

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

A concentração de glicose no mosto encontrava-se relativamente baixa (Figura 17), da ordem de 9,35g/L, e foi consumida nas primeiras 36 hs de fermentação. Este fato é resultante da glicose ser fonte de carbono universal, para a grande maioria dos microrganismos. Segundo SCHIRMER-MICHEL *et al.* (2008), nas primeiras 24 hs de cultivo as hexoses (glicose e maltose) são esgotadas, seguidas por xilose e posteriormente arabinose. Esta ordem de consumo para monossacarídeos foi relatada também por PARAJÓ *et al.* (1998).

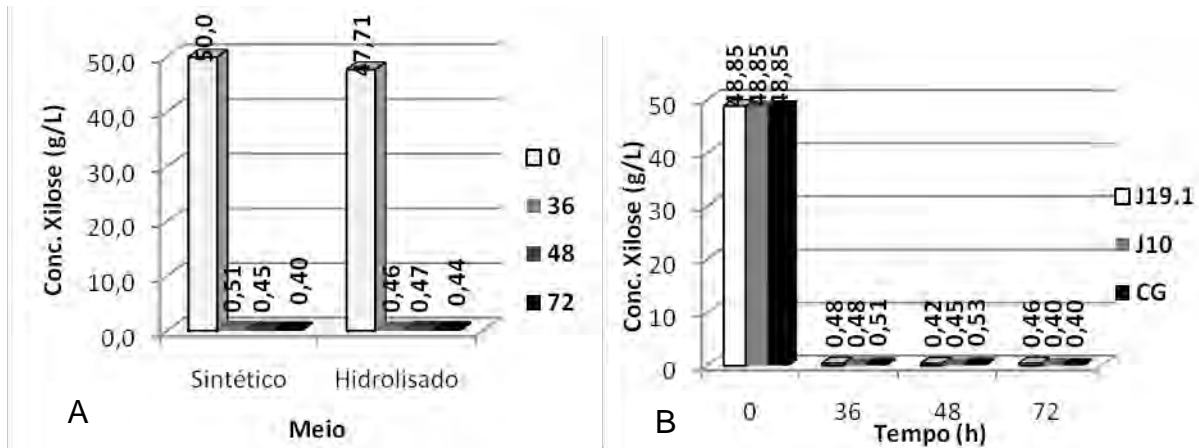


Figura 16: Consumo de xilose (g/L). **16A.** Consumo de xilose durante o período de 72hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana. **16B.** Consumo de xilose pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 hs.

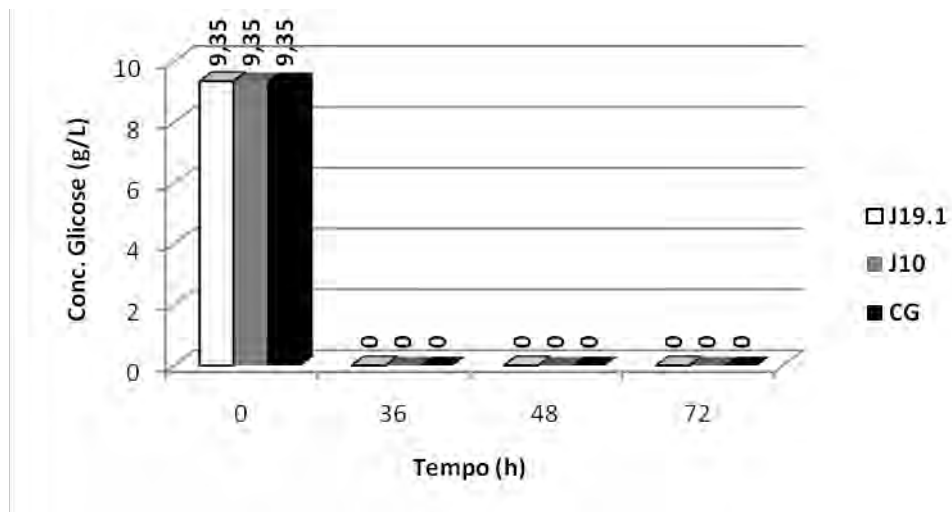


Figura 17: Consumo de glicose pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72hs.

A produção de xilitol foi constatada somente no meio sintético (Tabela 11 e Figuras 18 e 19), ocorrendo produção nas primeiras 36 hs. Pode-se observar que a

produção de xilitol ocorreu entre 36 e 48 hs de fermentação, sendo este consumido após esse período. A produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* em fermentações empregando como mosto hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada foi verificada por MORAES (2008), quando utilizada as mesmas condições de hidrólise do presente estudo, o autor obteve produtividade volumétrica de 0,76g/L.h.

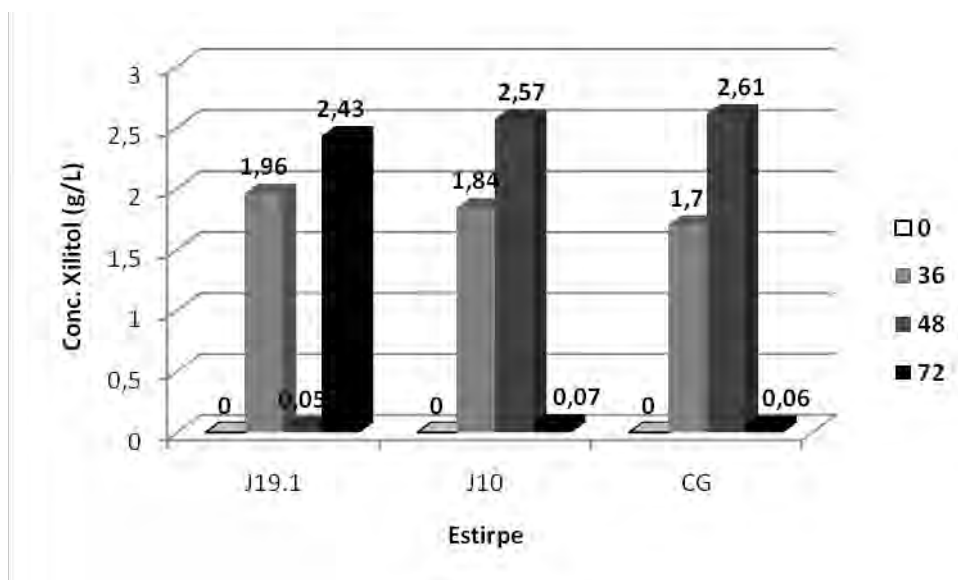


Figura 18: Produção de xilitol pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 hs.

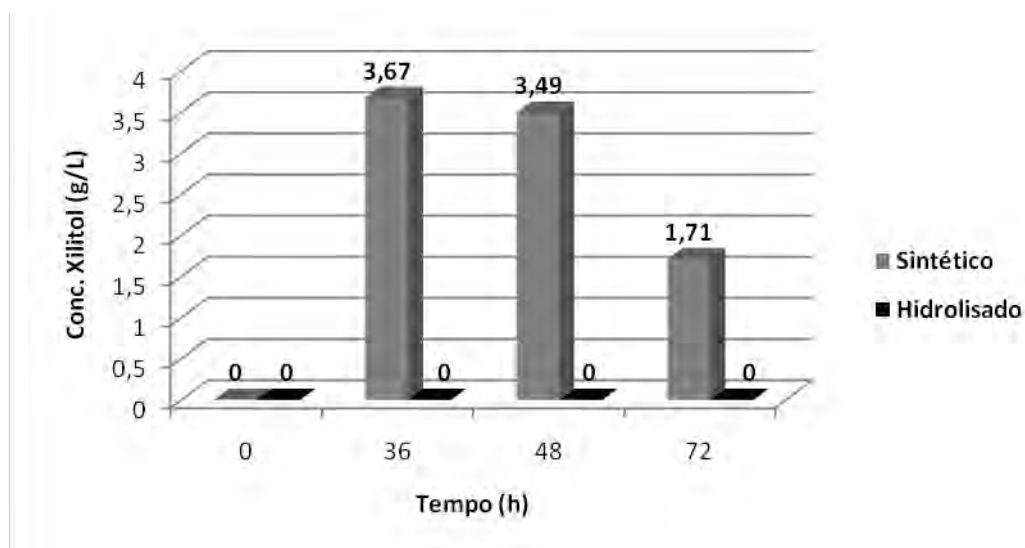


Figura 19: Produção de xilitol durante o período de 72 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

Considerando-se que o xilitol é um produto intermediário da via de fermentação da xilose e fonte de carbono para algumas espécies de leveduras, este pode ter sido produzido no meio hidrolisado original e consumido pelas leveduras para produção de etanol. Também, no meio sintético, as leveduras podem ter metabolizado os açúcares por diferentes vias metabólicas, produzindo o etanol a partir da glicose e o xilitol a partir da xilose.

A avaliação da capacidade e desdobramento dos substratos e produção de etanol (g/L) pode ser avaliada através da Figura 20. Verificou-se maior produção de etanol quando as leveduras foram inoculadas em mosto hidrolisado (Figura 20), sendo que a maior produção ocorreu com 36 hs de fermentação (Figura 21), não havendo diferença estatística entre as cepas, apesar de a literatura relatar que leveduras do gênero *Rhodothorula* não são produtoras de etanol GONG *et al.* (1981).

Observou-se para as três cepas, que o pico de produção de etanol ocorreu após 36 hs de fermentação, e em seguida houve um decréscimo na sua concentração (Figura 20).

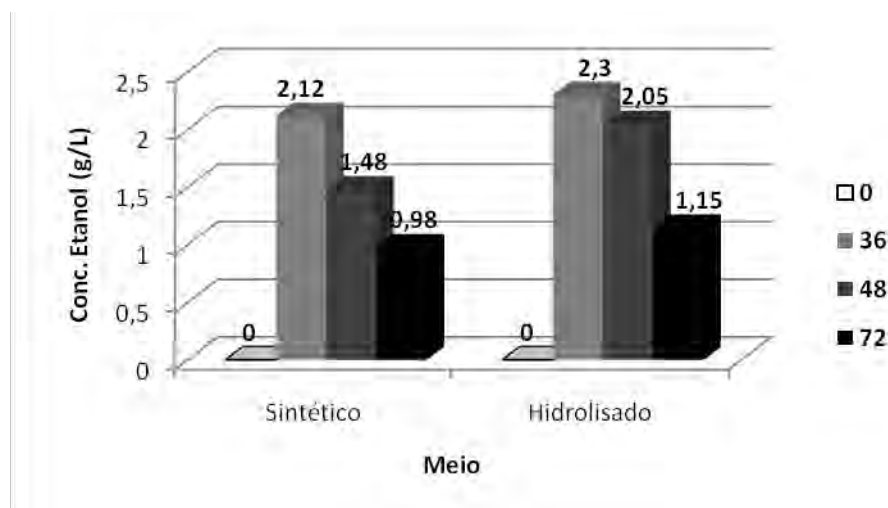


Figura 20: Produção de etanol durante o período de 72 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

A produção de etanol por leveduras e o decréscimo da sua concentração ao longo das fermentações tem sido constatada em outras pesquisas que empregaram hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida diluída como

substrato para o processo, utilizando as leveduras *C. guilliermondii* FTI 20037 ARRUDA (2007) e *P. stipitis* DSM 3651 CANILHA *et al.* (2010).

SILVA (2007), trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, com concentração de 60g/L, suplementado com 3g/L de extrato de levedura, atingiu produção média de 15,5g/L de etanol, após 120 hs de cultivo, sendo que o presente estudo apresentou produção máxima de 2,33g/L sem nenhuma suplementação do mosto.

Segundo KIPPER (2009), em pesquisas com a levedura *Pachysolen tannophilus* o ápice da produção de etanol em meio hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar ocorreu após 24 hs de fermentação, resultando em concentração de 0,216% de etanol no vinho. A partir de 48 hs essa concentração foi reduzida, uma vez que provavelmente o microrganismo passou a utilizar o etanol como fonte de carbono, em função do esgotamento de açúcares do meio.

Nesse ensaio, esse comportamento foi observado a partir de 36 hs de fermentação (Figuras 20 e 21).

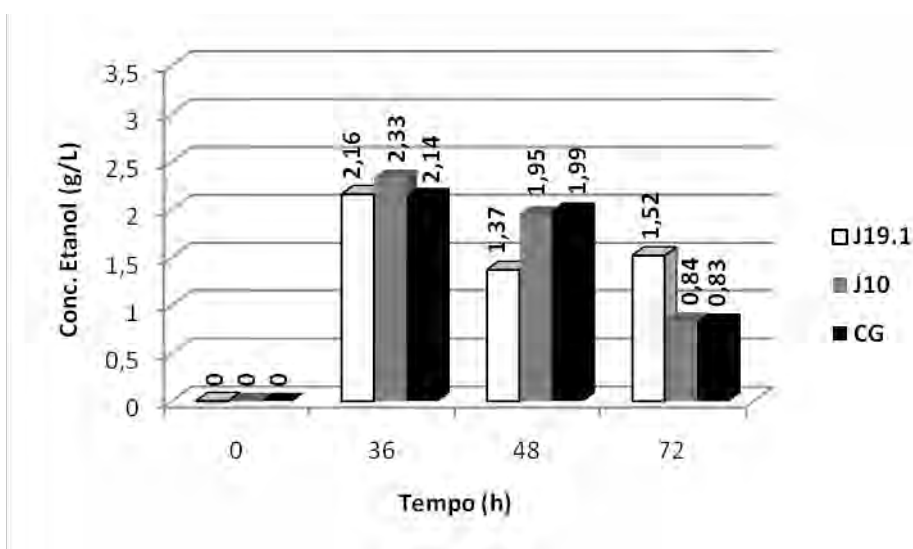


Figura 21: Produção de etanol pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72hs.

SILVA *et al.* (2004) relatam que, em condições de anaerobiose ou limitação de oxigênio, ocorre um desbalanço redox, ou ainda, em função do esgotamento de

açúcares do meio, as leveduras podem utilizar o etanol como fonte de carbono, explicando a redução desse composto após 36 hs de fermentação.

Houve produção de ácido acético durante as fermentações (Figuras 22 e 23), sendo consideravelmente maior quando empregou-se o hidrolisado como mosto. As concentrações encontradas variaram entre 1,85 a 2,38g/L, provavelmente ocorreu a partir de compostos presentes no mosto hidrolisado a partir do metabolismo do microrganismo. Segundo McMillan (1993), juntamente com o etanol, durante a fermentação pode ocorrer a formação de outros produtos, como acetato, acetona, 2,3-butanediol, butanol, butirato, formato, isopropanol, lactato, 1,2-propanediol (propilenoglicol), e/ou succinato. Este mesmo autor afirma que a quantidade e o tipo do co-produto formado variam com o microrganismo e de acordo com a composição do meio de cultivo. Também, o aumento da concentração desse ácido pode ter ocorrido por ocasião da utilização do etanol como substrato pelas leveduras, por ocasião da conversão do etanol em acetaldeído, e este em acetato WALKER (1998); ou em ácido acético por processos de oxidação

Considerando-se a concentração de ácido acético presente no mosto hidrolisado, esta pode ser considerada inibitória do processo fermentativo, uma vez que afetou a produção de etanol e a viabilidade das leveduras (Figuras 22, 23, 24 e 25). FELIPE *et al.* (1995) relataram que quando a levedura *C. guilliermondii* foi utilizada para a produção de xilitol, valores de ácido acético menores ou iguais a 3,0g/L não foram considerados inibitórios para leveduras inoculadas no processo fermentativo. Analisando o gráfico, podemos levar em consideração que as leveduras utilizadas nesse processo fermentativo metabolizaram açúcares para a produção de ácido acético, porém estes açúcares devem estar intimamente ligados a outros compostos presentes no hidrolisado concentrado, visto que no mosto sintético não houve essa produção.

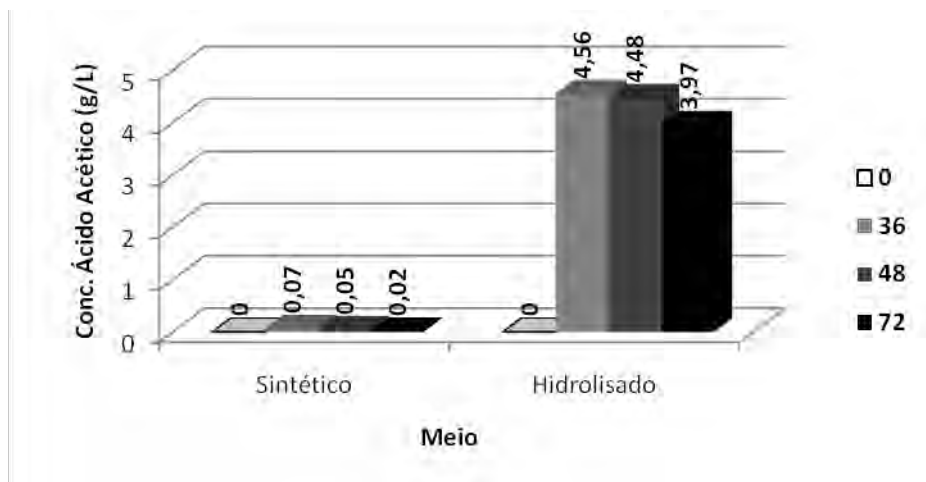


Figura 22: Produção de ácido acético durante o período de 72 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

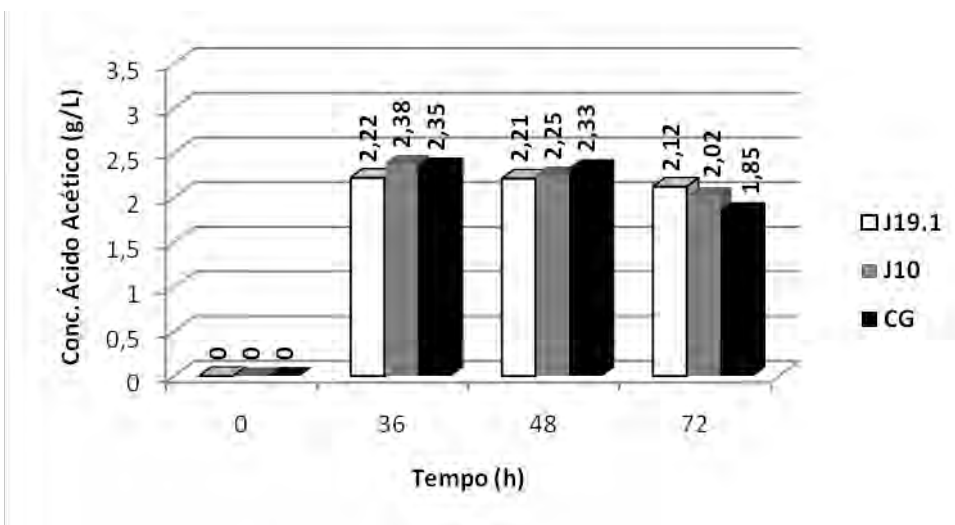


Figura 23: Produção de ácido acético pelas cepas J10, J19.1 e CG durante o período de 72 hs.

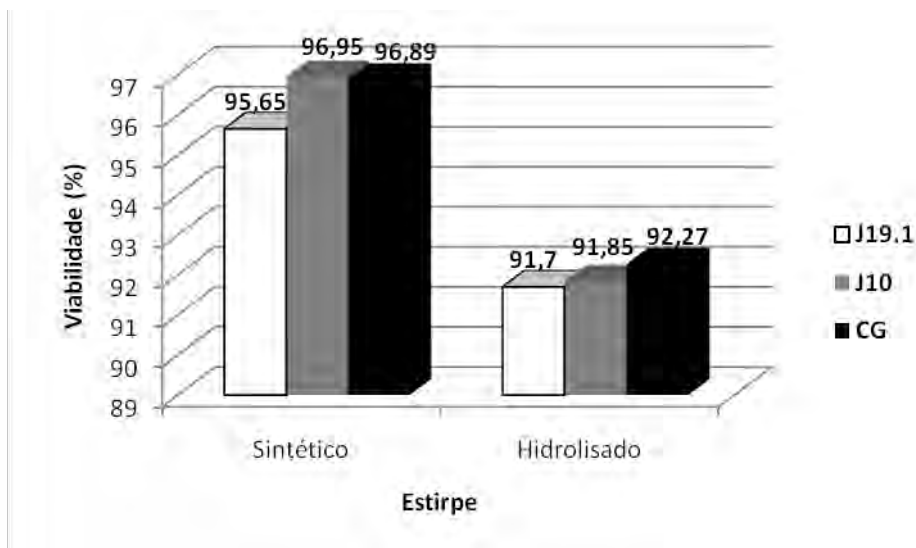


Figura 24: Viabilidade celular das leveduras CG, J10 e J19.1, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

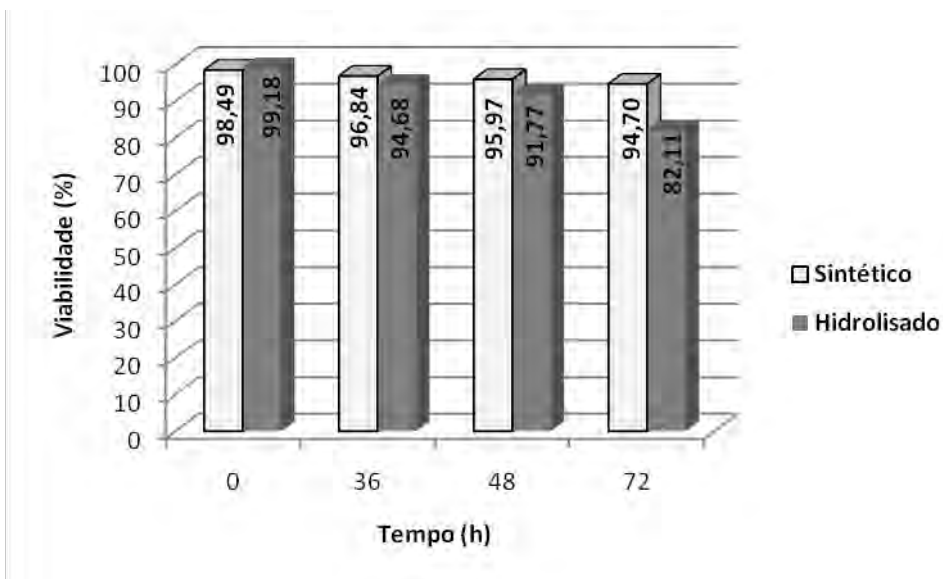


Figura 25: Viabilidade celular das leveduras durante o período de 72 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

A viabilidade celular das leveduras apresentou-se na acima de 90% no tempo inicial (0 hs), sendo maior que 95% no mosto sintético (Tabelas 12 e 13 e Figuras 24 e 25). Nos dois mostos, houve redução da viabilidade celular das três cepas no decorrer do processo fermentativo (Figura 24). A queda na viabilidade celular está associada a

diversos fatores, tais como escassez de açúcares, nutrientes e presença de compostos inibidores AMORIM *et al.* (1996). Comportamento semelhante foi observado para o índice de brotamentos e viabilidade de brotos (Tabelas 12 e 13), que, apesar de elevados ao longo da fermentação, apresentaram redução significativa no decorrer das 72 hs.

Tabela 12: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as análises microbiológicas, empregando-se como mosto o hidrolisado hemicelulósico concentrado.

Causas de Variação	Viabilidade Celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de Brotos (%)
A - leveduras			
CG	92,27A	37,71A	95,33 ^a
J10	91,86A	37,65A	95,28 ^a
J19.1	91,70A	39,25A	95,38 ^a
F	1,22 ^{ns}	1,22 ^{ns}	0,00 ^{ns}
DMS	0,92	0,92	2,86
B - períodos			
0	99,18A	42,89A	100,00A
36	94,69B	40,35AB	97,67 ^a
48	91,78C	37,63B	93,47B
72	82,11D	31,95C	90,17B
F	550,38 ^{**}	14,55 ^{**}	20,89 ^{**}
DMS	1,17	4,68	3,64
INTERAÇÃO			
A X B	3,25 [*]	0,97 ^{ns}	0,82 ^{ns}
CV	1,16	11,15	3,47

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Tabela 13: Resultado da análise de variância (teste de F) e comparação de médias pelo teste de Tukey (5% de probabilidade) para as análises microbiológicas, empregando-se o mosto sintético concentrado.

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de Brotos (%)
A - leveduras			
CG	96,89A	44,35AB	97,58B
J10	96,95A	42,39B	99,30 ^a
J19.1	95,66B	47,96A	99,78 ^a
F	4,96*	6,33**	7,18**
DMS	1,14	3,88	1,49
B - períodos			
0	98,50A	49,94A	99,77 ^a
36	96,84B	47,53AB	100,00A
48	95,97BC	42,70BC	99,22 ^a
72	94,70C	39,42C	96,56B
F	17,58**	13,32*	10,08**
DMS	1,45	4,94	1,89
INTERAÇÃO			
A X B	1,32 ^{ns}	1,07 ^{ns}	2,35 ^{ns}
CV	1,36	10,00	1,75

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

ns = não significativo

* = significativo ao nível de 5%

** = significativo ao nível de 1%

Ao longo das 72 hs de fermentação, verificou-se também uma redução mais acentuada na viabilidade celular, de brotos e índice de brotamentos das leveduras quando utilizou-se o meio hidrolisado (Figuras 26, 27, 28 e 29). Esse comportamento foi observado para todas as estirpes e pode ter ocorrido em função da presença de compostos inibidores, resultantes do processo de hidrólise, tais como fenóis, furfural, hidroximetilfurfural e derivados da lignina CANILHA *et al.* (2005), que provavelmente não foram totalmente eliminados durante o processo de destoxificação.

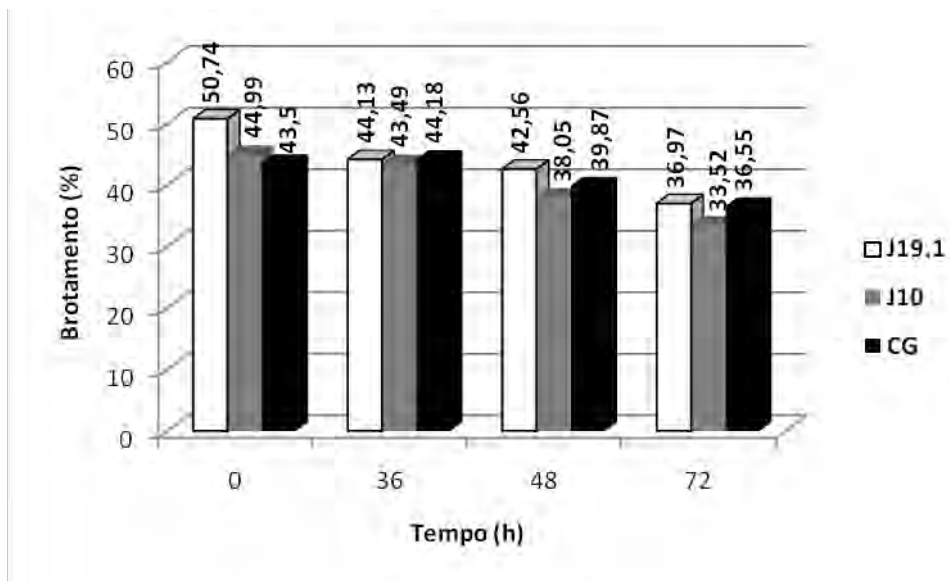


Figura 26: Índice de brotamentos das leveduras CG, J10 e J19.1, durante o período de 72 hs.

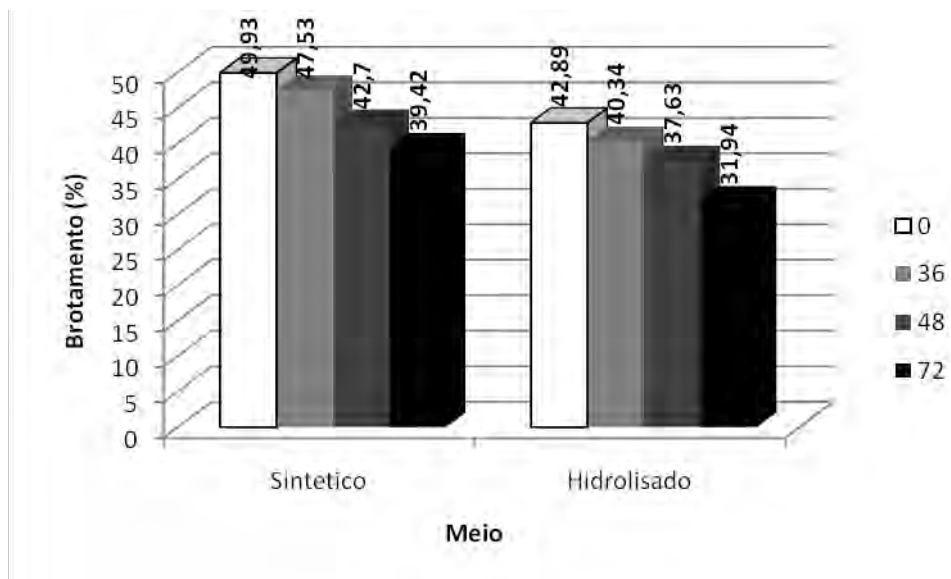


Figura 27: Índice de brotamento das leveduras durante o período de 72 hs, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana.

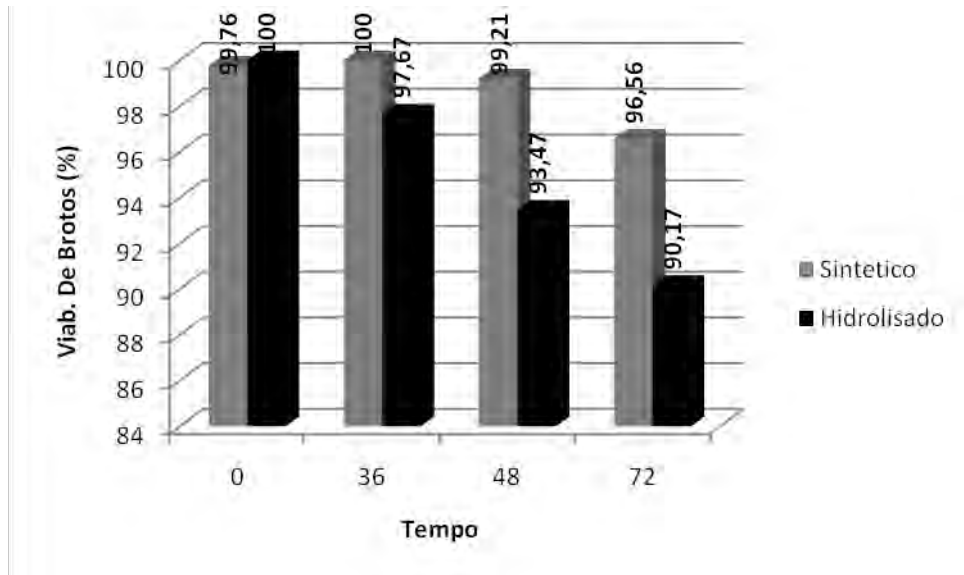


Figura 28: Viabilidade de brotos das leveduras em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana, no período de 72 hs.

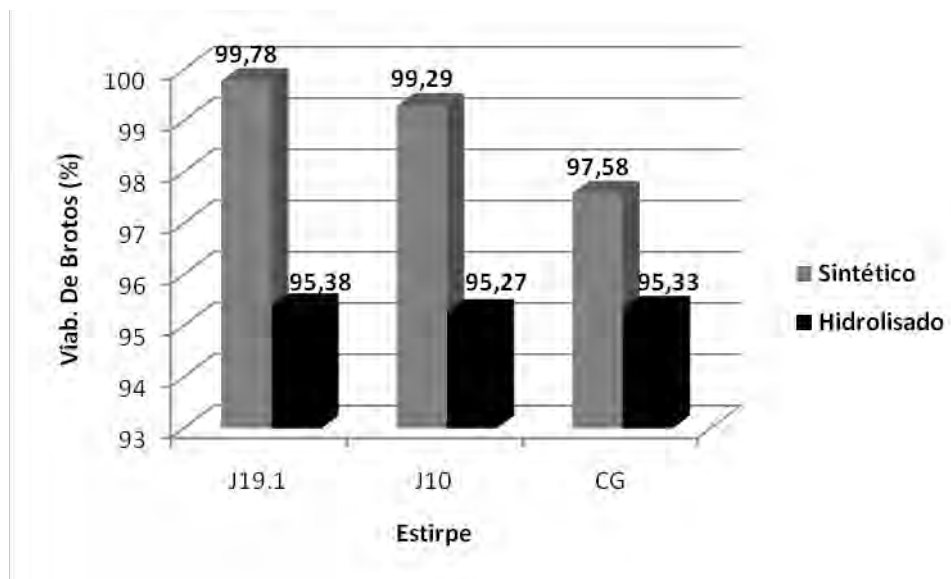


Figura 29: Viabilidade de brotos das leveduras CG, J10 e J19.1, em mosto sintético e hidrolisado de bagaço de cana

De uma maneira geral, observou-se que a estirpe J10 apresentou melhor desempenho na produção de etanol quando comparada às cepas J19.1 e CG.

Com base nos resultados obtidos, pode-se constatar que as cepas *R. glutinis*(J10); *R. minuta*(J19.1) e *C. guilliermondii*(CG), produziram etanol a partir da xilose, porém em baixa concentração.

Essa pesquisa vem de encontro à necessidade de técnicas e processos para a utilização dos hidrolisados celulósicos, com quaisquer tipos de hidrólise, para utilização de novas fontes de açúcares na produção de etanol, visando aproveitar os resíduos agroindustriais. Sendo assim, novas pesquisas devem ser conduzidas, para estudar a cinética de consumo de açúcares e produção de etanol, utilizando maiores concentrações de açúcares, ou ainda enriquecendo o mosto com nutrientes, para avaliar o potencial fermentativo desses microrganismos, visando melhorar o processo de produção de etanol de segunda geração. Da mesma maneira, considerando-se que a *S. cerevisiae* é o referencial para fermentações etanólicas, a introdução da mesma isolada ou em co-cultura com outras leveduras em testes de fermentação a partir de hidrolisados com outras leveduras poderá auxiliar no aspecto de consumo da glicose.

5. CONCLUSÕES

- As leveduras CG (*C. guilliermondii*), J10 (*R. glutinis*) e J19.1 (*R. minuta*) produziram etanol a partir da xilose, tendo a estirpe J10 destacado-se pela maior produção.
- O pico de produção de etanol ocorreu nas primeiras 36 hs de fermentação.
- O processo de concentração do hidrolisado resulta em maior produção de etanol.
- A ausência de inibidores presentes no hidrolisado favoreceu o processo de produção de etanol.
- Através da concentração e destoxificação foi possível eliminar o ácido acético presente no hidrolisado, favorecendo assim o metabolismo das leveduras.
- A concentração de fenóis foi eliminada parcialmente através da destoxificação, sendo menos prejudicial para os microrganismos.
- Os açúcares presentes no mosto foram totalmente consumidos, porém há presença de outros açúcares não identificados neste estudo que podem ter favorecido na produção de etanol e xilitol.

6. REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M. WENGER, K.S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2333-2336, 2006.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p.89-98, 1998.
- AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. *Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia*, 1ª. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comercio de Livros Ltda., 2005.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool – controle e monitoramento**. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, 1996, 93p.
- APTA – **Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios**. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br> Acesso em: 10 de Janeiro de 2011.
- ARMAS, C. M., BIANCHI, E. Aporte energético da indústria em usina sucro-alcooleira: viabilidade econômica. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v.8, n.5/6, p.41-45, 1990.
- ARRUDA, P.V. *Efeito do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura Candida guilliermondii FIT20037*. Lorena, 2007. 75p. (Dissertação de Mestrado, EEL, USP).
- ARRUDA P. V.; FELIPE M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 58, p.274-278, 2009.
- BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p.5-38, 2007.
- BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação Agrícola**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006, 237p.
- CAMARGO, P. D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista**

Brasileira de Engenharia Química, p. 18-21, agosto 2005.

CAMARGO, P. D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 18-21, 2007.

CANETTIÈRE, E.V. *Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto*. Guaratinguetá, 2004, 146p. (Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia, UNESP).

CANILHA, L.; CARVALHO, W. ; FELIPE, M. G. A. ; ALMEIDA E SILVA, J.B. ; GIULIETTI, M. Ethanol production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. **Applied Biotechnology**, n. 161, p.84-92, 2010.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A. Estratégia de preparação do inoculo para bioprodução de xilitol utilizando hidrolisado de palha de trigo. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 117-120, março de 2005.

CHANDEL, A. K.; RAJEEV, K.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n.10, p. 1947-1950, 2007.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, p.105-109, 2008.

CONAB – **Compania Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 15.jun. 2010.

CTC. **Centro de Tecnologia Canavieira**. Disponível em: <http://www.ctcanavieira.com.br/site> . Acesso em 19.mar.2010.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, v. 27, n.4, p.327-337, 2005.

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.fapesp.br> Acesso em: 10 de Janeiro de 2011.

FELIPE, M. G. A., VIEIRA, D.C., VITOLO, M., SILVA, S.S., ROBERTO, I.C., Mancilha, I.M. Effect of acetic acid on xylose cultivation by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n.3, p. 171–177, 1995.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 613p., 1989.

FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n.2, p.627-50, 1927.

GONG, C.S.; CHEN, L.F.; FLINCKINGER, M.C.; CHIANG, L.C.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.41, n.2, p.430-436, 1981.

GONG, L., YE, H. T. H. Identification of the activating and conjugating enzyme of the NEDD conjugation pathway. **Journal of Biocatalysis**, v. 274, p.12036–12042, 1999.

GUIDI, R. H. *Caracterização, classificação e determinação de marcadores genético moleculares de estirpes e leveduras contaminantes do processo fermentativo*. Jaboticabal, 2000. (Dissertação de Mestrado, FCAV, UNESP).

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 933-943, 1994.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWEL, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 409-615, 1994.

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

KELLER, F. A., HAMILTON, J. E., NGUYEN, Q. A. Microbial pretreatment of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105/108, p.27-41, 2003.

KIPPER, P. G. *Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus**. Rio Claro, 2009. 100p. (Dissertação de Mestrado, IB, UNESP).

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, K. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, n.1263, p. 147-150, 2004.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v.56, p.1-24, 1997.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n.11 (1981).

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2000, 839 p.

LODDER, J. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Amsterdam: North Holland Publishing Co, 1385p., 1970.

MACEDO, I. C., NOGUEIRA, L. A. H. Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos. 2005. **Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil**, p.141.

MARGARITIS, A.; BAJPAI, P. Direct fermentation of D-xylose to ethanol by *Kluyveromyces fragilis* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.44, n.5, p.1039-1041, 1982.

MARTÍN,C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 1267, 2007.

MARTIN, C.; JONSSON, L.J. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and *Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p.386–395, 2003.

MARTON, J. M. *Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol*. Lorena, 2002. 105p. (Dissertação de Mestrado, FAENQUIL, USP).

McMILLAN, J.D. **Xylose fermentation to ethanol: a review**. NREL, Golden, CO, 1993, 53p.

MODING, T., LIDEN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemistry Journal**,v.363, p.769–776, 2002.

MORAES, E. J. C. Estudo de Viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada. Lorena, 2008. 157p. (Tese de Doutorado, FAENQUIL, USP).

NARENDRANATH, N.V.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.71-177, 2001.

NILSSON, A. Control of fermentation of lignocellulosic hydrolysate. Disponível em: <<http://www.chemeng.lth.se/exjobb/010.pdf>>. Acesso em: 12.mar.2009.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74, p.17-24, 2000.

PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M.,. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 203–212, 1998.

PATURAU, J.M. **By-Products of Sugar Cane Industry**, 3rd Edition, Elsevier, Amsterdam, 1989.

PESSOA JÚNIOR, A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.03, p. 291-297, 1997.

RABELO, S. C. *Avaliação de Desempenho do Pré-tratamento com Peróxido de Hidrogênio Alcalino para a Hidrólise Enzimática de Bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado, UNICAMP).

RATNAM, B.V.V.; RAO, S.S.; RAO, M. D.; RAO, M. N.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 399- 404, 2005.

RODRIGUES, F. A. *Avaliação da Tecnologia de Hidrólise Ácida de Bagaço de Cana*. Campinas, 2007. (Dissertação de Mestrado, UNICAMP).

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; VITOLO, M.; SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898–2904, 2001.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p.315–318, 1988.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SENDELIUS, J. *Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production*. Suécia, 2005. 80p.(Dissertação de Mestrado, Lund University).

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v.72, n. 3, p. 253-260, 2000.

SZCZODRAK, J., FIEDUREK, J. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v.10, n. 5/6, p.367-375, 1996.

SILVA, J. P. A. *Estudo da produção de etanol por Pichia stipitis empregando hidrolisado de palha de arroz*. Lorena, 2007. 144p. (Dissertação de Mestrado, FAENQUIL, USP).

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

TOIVARI, M.H., ARISTIDOU, A., RUOHONEN, L., PENTTILLA, M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (XKS1) and oxygen viability. **Metabolism Engineering**, v. 3,p. 236–249, 2001.

UDOP. **União dos Produtores de Bioenergia**. Disponível em: <http://www.udop.com.br>. Acesso em: 13.out.2010.

UNICA. **União da Indústria de Cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.unica.com.br> >. Acesso em: 22.jul. 2010.

Van SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. R. **Analysis of forages and fibrous foods: a laboratory manual for animal science**. Illaca: Coronell University, 1985. 202p.

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: John Wiley, p.157-158 e p.350,1998.

WALT, V. D.; YARROW, D. Methods for isolation, maintenance, classification and identification of yeasts.1984, p 45-104. In N. J. W. Kreger van-Rij (ed.) **The yeasts: a taxonomic study**, 3rd ed. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1082 p.

WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexose in pentose fermenting yeast. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685-697, 1990.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.56, p. 17-34, 2001.