



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LINHAGEM DE LEVEDURA QUANTO AO CRESCIMENTO E
FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MEIOS SINTÉTICOS COM PENTOSE
E HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

CRISTINA MARTINI

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do *Campus* de Rio
Claro, Universidade Estadual
Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor
em Microbiologia Aplicada

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
LINHAGEM DE LEVEDURA QUANTO AO CRESCIMENTO E
FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MEIOS SINTÉTICOS COM PENTOSE
E HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

CRISTINA MARTINI

Orientadora: Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo

Co-Orientadora: Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

Tese apresentada ao Instituto de
Biociências do *Campus* de Rio Claro,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Microbiologia
Aplicada.

547.29 Martini, Cristina
M386i Isolamento, identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar / Cristina Martini. - Rio Claro, 2014
121 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: sâmia maria tauk-tornisielo
Coorientador: sandra regina ceccato antonini

1. Fermentação. 2. Meyerozyma guilliermondii. 3. Pentoses. 4. Hidrolisado. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

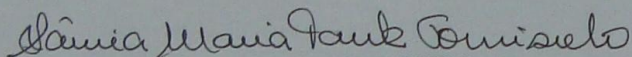
TÍTULO: ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM DE LEVEDURA QUANTO AO CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO UTILIZANDO MEIOS SINTÉTICOS COM PENTOSE E HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

AUTORA: CRISTINA MARTINI

ORIENTADORA: Profa. Dra. SAMIA MARIA TAUKE TORNISIELO

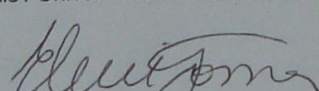
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

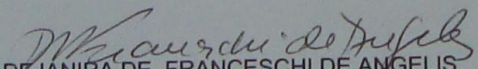


Profa. Dra. SAMIA MARIA TAUKE TORNISIELO

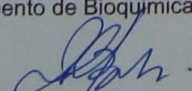
Centro de Estudos Ambientais / Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho


Profa. Dra. ELENI GOMES

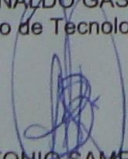
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto


Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS

Departamento de Bioquímica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro


Prof. Dr. REINALDO GASPARE BASTOS

Departamento de Tecnologia Agro-Industrial e Sócio-Economia Rural / UFSCar - Campus Araras - SP


Prof. Dr. ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA

Departamento de Agroindústria Alimentos e Nutrição / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Usp

Data da realização: 24 de março de 2014.

Dedico este trabalho

Aos meus três amores, meus pais Antonio F. Martini e Ida Maria Ferrazzo Martini e a minha doce e amada irmã Beatriz Martini, por estarem ao meu lado constantemente, com um amor infinito, sem igual, sempre transmitindo energias positivas, e não medindo esforços para a realização desse sonho.

À minha Co-orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pelo voto de confiança, apoio e muita compreensão no decorrer desses quatro anos e principalmente por sua fundamental dedicação para o desenvolvimento deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus

pelo dom da vida, por estar sempre presente em meu caminho, o grande autor e consumidor da minha fé, me dando forças para vencer as barreiras encontradas e me fazendo acreditar a cada dia que minhas fronteiras estão muito além do que meus olhos possam enxergar.

À minha Orientadora Profa. Dra. Sâmia Maria Tauk-Tornisielo, pela orientação e oportunidade de poder compartilhar de seus conhecimentos, pela confiança, dedicação, amizade e carinho durante toda trajetória. Sou muito grata à senhora, por ter depositado toda sua confiança em sua última orientada (que honra!) e na sua ex-orientada, hoje minha Co-orientadora, Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini.

Agradeço em especial à minha Co-Orientadora Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, pela amizade, confiança, paciência, apoio e dedicação, pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho, e principalmente pela sua orientação, não apenas no doutorado, mas desde 2006, quando iniciei o mestrado sob sua orientação. Professora, muito obrigada pela oportunidade concedida a mim de fazer parte do seu grupo de trabalho e por proporcionar a concretização deste sonho.

Aos meus pais Antonio Francisco Martini (DKV) e Ida Maria Ferrazzo Martini (LELA) por todo amor, carinho e apoio incondicional. Literalmente presentes em todos os momentos do doutorado, acordando de madrugada para me acompanhar em algumas análises, ajudando a anotar resultados, embrulhando placas, esterilizando material, enfim, se propuseram a aprender inúmeras coisas para poder me ajudar sempre com carinho e bom humor, foi muito divertido e engraçado os momentos vividos no laboratório. AMO MUITO VOCÊS!!

À minha querida irmã Beatriz Martini, por estar sempre presente em minha vida, me dando força, carinho e sempre vendo o lado bom da vida, me fazendo rir nos

momentos difíceis e ajudando a vencer os obstáculos. Muito obrigada de coração por inúmeras vezes ter me ajudado no laboratório.

Aos meus avós maternos Carmem e Giovanni Ferrazzo (*in memorian*), que mesmo distantes, porém presentes em meus pensamentos me fortalecem, com a energia da paz, amor e coragem.

Aos meus avós paternos João e Domingas Martini (*in memorian*), que me protegem, iluminam, transmitem esperança, coragem e amor.

A minha tia Neca e a prima Bete, sempre presentes nos momentos importantes, comemorando a formatura de Engenharia Agrônômica, assistindo a defesa da Dissertação de Mestrado e acompanhando a trajetória do Doutorado.

Às tias “corujas” Neca, Iraídes e Ivanilde e aos primos Bete, Luizinho, Berto, Alexandre, Débora e Sandra, pelo apoio e torcida constante.

À minha querida amiga Vania Taís Chieregatto (*in memorian*), pelos meus melhores momentos de descontração, amizade, bagunça e carinho. Saudades eternas!

Aos meus queridos médicos Dr. Dalton José Balloni e Dr. José Eduardo Decico, que por meio dos tratamentos, me proporcionaram uma vida melhor e me ensinaram a conviver e superar as dores da artrite psoriática.

Ao Thiago Trevisan, pelo carinho, amizade, apoio, e muita paciência nos momentos finais e tensos.

À professora e amiga Profa. Dra. Márcia Maria Rosa Magri, por todas as conversas, conselhos e prestatividade ímpares.

À Profa. Dra. Silvana Perissatto Meneghin, pelo apoio, respeito e amizade.

À amiga e parceira de todas as horas Carolina Brito Codato, pela paciência, atenção e carinho, que desde o meu mestrado, esteve presente e conseguiu me aguentar

nas mais inusitadas situações, sempre me aconselhando e dando força. A sua colaboração neste trabalho, nunca vou esquecer.

À AMIGA Afra Vital, pelo apoio, atenção e conselhos. A sua amizade é muito especial.

Manifesto a minha gratidão à todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) – UFSCar, que contribuíram de forma direta ou indiretamente para realização deste trabalho, Ângelo (Técnico), Ana Paula, Ana Silvia, Anna Lívia, Ariane, Carol Zica, Gabriele, Gisele Rocha, Guilherme, João (Técnico), Letícia, Michel, Renato Corrêa, Rodolfo, Vanda, Vitória Gattis e Yubis. Em especial à nossa querida e amada Técnica Lúcia Piccolo (Lucinha), sempre atenciosa e solícita em toda minha trajetória.

Aos técnicos do Laboratório de Simulação Tecnológica (LAST) - UFSCar, Cidinho e Renato, ao estagiário Rafael, a Zilda e à professora Teca, pela colaboração nas barulhentas horas de separação do bagaço de cana e nos momentos de extração do caldo do hidrolisado.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC) - UFSCar, Prof. Dr. Reinaldo Bastos e aos orientados Daniela e Luiz Felipe, pela atenção e por serem tão solícitos.

Ao pessoal da EEL – USP, Lorena-SP, Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, aos seus orientados Túlio Lima, Rafael Cunha de Assis Castro, em especial ao Bruno Guedes, que não mediu esforços para me ajudar, obrigada pela atenção e por serem tão caprichosos com as amostras do HPLC.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada) – UNESP, que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos.

Ao INCT-Bioetanol FAPESP (2008/5798-6) / CNPq (574002/2008-1) e à Capes, pelo apoio financeiro à pesquisa e concessão de bolsas.

“Quero a liberdade de andar pelo mundo
E seguir sem destino feito um andarilho
E buscar respostas e encontrar o rumo
Que me tire ou me leve para o desatino
Quero a liberdade de pássaros voando
Mas a segurança de um vagão no trilho
Quero emoções sublimes afluindo
E sensações que só eu poderei sentir
Quero a liberdade de amantes insanos
E envelhecer sem ver passar os anos
Não ter hora para comer nem para dormir
Quero ir a praia e me sentar na areia
Ouvir o barulho do mar, contar estrelas
Jogar os pesos fora e depois sorrir
Olhar para o céu e desvendar a incrível teia
Do que foi, será e está por vir
Quero encontrar, desencontrar minha raiz
Quero adormecer em seu ombro quente
E acordar brincando de ser feliz.”

**(Grande Amiga De Infância & Escritora Piracicabana, Profa. Dra. Célia Regina Ferrari
Faganello – Universidade Federal Do Sul Da Bahia).**

RESUMO

A procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses é um dos desafios frente às dificuldades na tecnologia da produção de etanol de segunda geração. Além disso, a utilização de resíduos lignocelulósicos para tal fim requer uma etapa de hidrólise para a despolimerização da fração hemicelulósica. O emprego de ácidos tem sido utilizado frequentemente devido ao baixo custo e alta eficiência. Inibidores, no entanto podem também ser liberados juntamente com os açúcares, ocasionando inibição da atividade fermentativa das leveduras. Neste contexto, este estudo teve por objetivo realizar o isolamento de linhagens de leveduras de fontes naturais (caldo, bagaço e rizosfera de cana-de-açúcar, e palha de milho), a avaliação presuntiva da capacidade de fermentação de pentoses (D-xilose e L-arabinose) e a identificação da linhagem selecionada, a qual foi avaliada quanto à habilidade de crescimento e fermentação de pentoses utilizando meio sintéticos em diferentes condições ambientais assim como hidrolisados ácidos de bagaço de cana-de-açúcar. Dentre 350 isolados, 39 apresentaram atividade fermentativa de arabinose (56,4%) ou xilose (38,5%) ou ambas (5,1%). Uma das linhagens que apresentou fermentação tanto de arabinose quanto de xilose (código 311), isolada de caldo de cana-de-açúcar, foi identificada por meio da amplificação da região D1/D2 do gene 26S e da região ITS do DNA ribossomal como sendo da espécie *Meyerozyma guilliermondii*. Esta linhagem foi avaliada quanto à influência da fonte de carbono (glicose, xilose ou arabinose), pH (3,5; 4,5; 5,5) e temperatura (30 °C, 35 °C, 40 °C) sobre o crescimento, e à influência do pH (4,5; 5,5) e temperatura (30 °C, 35 °C) sobre a fermentação de xilose em concentrações variando de 40 g/L a 100 g/L em meios sintéticos. A variação nos valores de pH e temperatura não resultou em diferenças na velocidade específica de crescimento de *M. guilliermondii* quando crescida em 20 g/L de arabinose, xilose ou glicose. Nos ensaios fermentativos, o aumento na concentração de glicose não contribuiu para o aumento na produção de álcool. Um máximo de 1,5 g/L de álcool foi produzido a partir de 40 g/L de xilose a 30 °C, pH 5,5, em 96 horas de fermentação. Os resultados também revelaram que a linhagem de levedura utilizada foi capaz de crescer em temperaturas de 35 °C – 40 °C e pH de 3,5 – 4,5, o que a torna apropriada para aplicação industrial. O hidrolisado de bagaço de cana foi caracterizado quanto aos açúcares e inibidores presentes, analisando-se as amostras logo após a hidrólise ácida, após a concentração por evaporação para atingir 40 g/L de açúcares redutores, e após a detoxificação do hidrolisado concentrado. Os resultados mostraram que a xilose foi o açúcar liberado em maior

quantidade, seguida por arabinose e glicose. A concentração do hidrolisado por evaporação resultou em uma diminuição significativa do teor de furfural, um importante inibidor da fermentação, no entanto, os demais inibidores e os açúcares apresentaram aumento na concentração, como esperado. A detoxificação realizada por aumento do pH e adição de carvão ativado resultou em diminuição expressiva na concentração dos inibidores, com perda de 8% na concentração de glicose, enquanto para a xilose e arabinose houve perda de 10,5% e 32%, respectivamente. Os hidrolisados detoxificados e não-detoxificados, com ou sem suplemento nutricional, foram utilizados para os testes fermentativos com a levedura *M. guilliermondii*, em pH 5,5, 150 rpm de agitação, a 30 °C. Os resultados mostraram que a adição de extrato de levedura (3 g/L) teve efeito significativo sobre o consumo das pentoses pela levedura *M. guilliermondii* e a produção de etanol e xilitol. Houve maior produção de biomassa nos hidrolisados detoxificados. A linhagem de levedura utilizada foi capaz de consumir glicose, xilose e arabinose, provavelmente nesta ordem preferencial, além de ácido acético, promovendo detoxificação biológica. Apesar da detoxificação e da suplementação terem aumentado a produtividade em etanol (de 0,023 para 0,04 g/L.h), os resultados obtidos para *M. guilliermondii* são ainda muito baixos. Há necessidade de prosseguir com o trabalho de otimização das condições ambientais e do meio de cultura para a obtenção de melhores resultados, visando contribuir para o segmento do etanol de segunda geração.

Palavras-chave: *Meyerozyma guilliermondii*, pentoses, fermentação, hidrolisado, detoxificação, bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

The search for new yeast species able to ferment pentoses is one of the challenges towards the difficulties involving the technology on the production of second generation ethanol. Besides, the usage of lignocelulosic residues demands a step of hydrolysis for the depolymerization of the hemicelulosic fraction. Acids have been used frequently due to the low cost and high efficiency. However, inhibitors may also be released along with the sugars, inhibiting the fermentative activity of the yeasts. In this context, this study aimed to isolate yeast strains from natural sources (sugar cane juice, bagasse and rhizosphere, and corn straw), the presumptive evaluation of the pentose fermentation ability and the identification of the selected strain, which was evaluated regarding the ability to grow and ferment pentose by using synthetic media under different environmental conditions as well as acid hydrolysates obtained from sugar cane bagasse. Among 350 isolates, 39 displayed fermentative activity of arabinose (56.4%) or xylose (38.5%) or both (5.1%). One of the yeast strains that showed both arabinose and xylose fermentation (number 311), isolated from sugar cane juice, was identified by the amplification of D1/D2 region of the 26S gene and ITS region from the ribosomal DNA as *Meyerozyma guilliermondii*. This strain was evaluated regarding the influence of the carbon source (glucose, xylose or arabinose), pH (3.5; 4.5; 5.5) and temperature (30 °C, 35 °C, 40 °C) upon the growth, and the influence of pH (4.5; 5.5) and temperature (30 °C, 35 °C) upon the fermentation of xylose in concentrations ranging from 40 g/L to 100 g/L in synthetic media. Varying initial pH values and temperatures of incubation did not result in differences in the specific growth rate of *M. guilliermondii* when growing in 20 g/L arabinose, xylose or glucose. In fermentation assays, the increase in the xylose concentration did not bring about a higher alcohol production. A maximum of 1.5 g/L of alcohol was produced from 40 g/L xylose at 30 °C, pH 5.5 in 96 hours of fermentation. The results also revealed that the yeast strain is able to grow in temperature as high as 35 °C-40 °C and pH as low as 3.5-4.5, which makes this strain suitable for industrial application. The bagasse hydrolysate was characterized regarding the sugars and inhibitors by evaluating the samples right after the acid hydrolysis, after the concentration by evaporation to reach 40 g/L of reducing sugars, and after the detoxification of the concentrated hydrolysate. The results showed that xylose was the sugar released in higher quantity, followed by arabinose and glucose. The concentration of hydrolysate by evaporation resulted in a significant decrease in the furfural content, an important fermentation inhibitor, however, the other inhibitors and sugars presented increase in the concentration, as expected.

The detoxification carried out by pH increase and addition of active charcoal resulted in expressive decrease in the inhibitor concentration, with loss of 8% in the glucose content, while for xylose and arabinose the losses were 10.5% and 32%, respectively. The detoxified and non-detoxified hydrolysates, with or without nutrition supplement, were utilized for the fermentative tests with the yeast *M. guilliermondii*, in pH 5.5, 150 rpm of agitation, at 30 °C. The results showed that the addition of yeast extract (3 g/L) had significant effect over the consumption of pentoses by *M. guilliermondii*, and over the ethanol and xylitol production. There was an increased biomass production in detoxified hydrolysates. The selected yeast strain was able to consume glucose, xylose and arabinose, probably in this preference rank, besides acetic acid, promoting biological detoxification. Despite of the detoxification and the supplementation have increased the ethanol productivity (from 0.023 to 0.04 g/L.h), the results obtained for *M. guilliermondii* are still low. The optimization of environmental conditions and culture medium must proceed aiming better results and to contribute to the segment of second generation ethanol.

Keywords: *Meyerozyma guilliermondii*, pentoses, fermentation, hydrolysates, detoxification, sugar cane bagasse.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1	22
Figura 1. Alternativas para a bioprodução de etanol.	25
Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo de D-xilose.	33
 Capítulo 2	 44
Figura 1. Local de coleta da palha de milho no CCA - Campus Araras-UFSCar.	49
Figura 2. Levedura 311 (isolada de caldo de cana) em tubo de cultivo com meio contendo xilose como única fonte de carbono. A seta indica a bolha formada no interior do tubo de Durham.	51
Figura 3. Número de leveduras (UFC/g) isoladas de bagaço de cana-de-açúcar utilizando meio seletivo contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono.	53
Figura 4. Número de leveduras (UFC/g) isoladas de rizosfera de bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho utilizando meio seletivo contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono.	54
Figura 5. Relatório obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov para a sequência de nucleotídeos da região ITS do DNA ribossomal da linhagem 311.	56
Figura 6. Relatório obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov para a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal da linhagem 311.	57
 Capítulo 3	 63
Figura 1. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do meio de crescimento cultivado com <i>M. guilliermondii</i> , a 30 °C, 150 rpm de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde= meio com xilose.	70

Figura 2. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do 71
meio de crescimento cultivado com *M. guilliermondii*, a 35 °C, 150 rpm
de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em
vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde=
meio com xilose.

Figura 3. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do 72
meio de crescimento cultivado com *M. guilliermondii*, a 40 °C, 150 rpm
de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em
vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde=
meio com xilose.

Figura 4. Diagrama de Pareto para estimar os efeitos da temperatura 74
(fator 1) e do pH (fator 2) sobre a velocidade específica de crescimento
de *M. guilliermondii* crescendo em meio sintético com arabinose (A),
glicose (B) ou xilose (C) a 20 g/L.

Figura 5. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético 76
contendo xilose como única fonte de carbono, a 30 °C, pH 4,5, a 150
rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L),
◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

Figura 6. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético 77
contendo xilose como única fonte de carbono, a 30 °C, pH 5,5, a 150
rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L),
◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

Figura 7. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético 78
contendo xilose como única fonte de carbono, a 35 °C, pH 4,5, a 150
rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L),
◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

Figura 8. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético 79
contendo xilose como única fonte de carbono, a 35 °C, pH 5,5, a 150
rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L),
◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

Capítulo 4 82

Figura 1. Quantificação dos açúcares nas amostras de hidrolisado de 90
bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado foi concentrado por
evaporação em banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares
redutores. A detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de
carvão ativado.

Figura 2. Quantificação dos inibidores nas amostras de hidrolisado de 91
bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado foi concentrado por
evaporação em banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares
redutores. A detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de
carvão ativado.

Figura 3. Frascos contendo bagaço após hidrólise ácida, à esquerda, e 92
hidrolisado concentrado (H) e hidrolisado concentrado e detoxificado
(HD), à direita. O hidrolisado foi concentrado por evaporação em
banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares redutores. A
detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de carvão
ativado.

Capítulo 5 99

Figura 1. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, 105
não-detoxificado e sem adição de suplemento, pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm,
utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

Figura 2. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, 106
não-detoxificado e com adição de suplemento (3 g/L de extrato de
levedura), pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M.*
guilliermondii.

Figura 3. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, 107
detoxificado e sem adição de suplemento, pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm
utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

Figura 4. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, 108
detoxificado e com adição de suplemento (3 g/L de extrato de
levedura), pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M.*
guilliermondii.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1	22
Tabela 1. Composição lignocelulósica de alguns resíduos agroindustriais.	26
Capítulo 3	63
Tabela 1. Valores de velocidade específica de crescimento (μ , em h^{-1}) de <i>M. guilliermondii</i> crescendo em meio sintético com arabinose, xilose ou glicose (20 g/L) como única fonte de carbono, em diferentes valores de pH inicial e temperaturas de incubação, durante 72 horas, sob agitação de 150 rpm.	73
Capítulo 5	99
Tabela 1. Valores de produtividade e rendimento de etanol nas fermentações conduzidas com hidrolisados detoxificados e não-detoxificados, com e sem adição de suplemento (extrato de levedura), utilizando-se a levedura <i>M. guilliermondii</i> .	116

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	21
Capítulo 1: REVISÃO DA LITERATURA	22
1. Produção de Etanol no Brasil	23
2. Matérias-Primas Utilizadas na Bioprodução de Etanol	25
3. Hidrólise de materiais lignocelulósicos	30
4. Fermentação dos hidrolisados	32
a) Aeração	34
b) pH	35
c) Temperatura	35
d) Concentração de Substrato	36
e) Concentrações de Etanol	36
5. Referências	37
Capítulo 2: ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE	44
Capítulo 3: AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM DE LEVEDURA <i>Meyerozyma guilliermondii</i> EM MEIOS SINTÉTICOS CONTENDO XILOSE E ARABINOSE COMO ÚNICAS FONTES DE CARBONO EM DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS	63
Capítulo 4: CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA	82
Capítulo 5: AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	99
CONCLUSÕES FINAIS	121

1. INTRODUÇÃO

No início do século XX, o bioetanol no Brasil tem sido produzido por processos de fermentação alcoólica industrial utilizando caldo de cana-de-açúcar ou melaço como meio de cultivo. No final desse século, o custo do petróleo se elevou, estimulando o desenvolvimento de novas tecnologias de fermentação para produção de biocombustível a partir da cana-de-açúcar, de forma eficiente e econômica, assegurando possíveis substitutos para a gasolina como uma alternativa à importação de petróleo.

O Programa Nacional do Álcool (Proálcool) foi criado no ano de 1975, por meio do decreto nº 76.593, devido à crise mundial do petróleo e a redução do preço do açúcar. O Brasil então iniciava uma estratégia de produção de um biocombustível para substituir a gasolina, um produto de custo elevado e escasso. O etanol é considerado uma alternativa ao combustível fóssil destinado ao transporte. A produção de etanol e a combustão não contribuem para a quantidade total de dióxido de carbono na atmosfera, sendo que a emissão e a toxicidade de etanol são menores do que a de petróleo.

Atualmente, questões como sustentabilidade, preservação do meio ambiente e busca por fontes energéticas renováveis, tem sido desafios para a comunidade científica e para maior conscientização mundial a respeito das mudanças climáticas globais, impulsionando o bioetanol como combustível renovável viável. Consequentemente, a cana ganhou importância como matéria-prima da bioenergia. Em culturas de cana-de-açúcar, a imobilização de CO_2 por meio da fotossíntese em conjunto com a biomassa da fermentação alcoólica, permite a produção de um combustível líquido limpo e de alta qualidade que contém 93 % da energia original encontrada no açúcar.

A necessidade urgente de se buscar novas fontes de combustíveis, principalmente aquelas que não agravam os sérios problemas ambientais já existentes, é decorrente da crescente demanda mundial por energia. Os resíduos vegetais, como bagaço de cana-de-açúcar, constituem matéria-prima alternativa

para a produção de etanol celulósico, denominado etanol de segunda geração, por se tratar de um material amplamente disponível, de baixo custo e gerado em grande volume pela agroindústria.

Os materiais lignocelulósicos representam uma das maiores fontes de energia renovável e de carbono da Terra. A lignocelulose é uma matéria-prima muito interessante para a produção de etanol combustível, devido a sua disponibilidade em grandes quantidades a baixo custo, por se tratar de resíduos agroindustriais como palhas, bagaços e cascas. Estes são provenientes da produção agrícola, beneficiamento de cereais, entre outras transformações produzidas com esses recursos naturais. O material lignocelulósico é constituído de compostos orgânicos, como polissacarídeos, celulose, hemicelulose e lignina. A constituição desse material depende do vegetal de origem, do processamento, da região, da idade e período do ano no momento da colheita e do material. No caso de resíduos agrícolas como bagaço e palha de cana-de-açúcar, cascas de arroz, frutas, estes são caracterizados por serem abundantes, renováveis, potenciais para produção de biocombustíveis, não comprometendo a segurança alimentar, além de serem fundamentais na diminuição dos impactos ambientais.

Os processos biotecnológicos que utilizam os materiais lignocelulósicos exigem na maioria das vezes, etapas preliminares de preparação, mediante hidrólise química ou enzimática, para a liberação das frações celulósicas ou hemicelulósicas, na forma de mono ou oligossacarídeos. O alto teor de pentoses, principalmente a D-xilose, na fração hemicelulósica desses materiais tem a efetiva aplicação em processos de bioconversão.

A hidrólise ácida é o mecanismo mais estudado para a conversão da celulose e da hemicelulose em seus açúcares constituintes. Nesse processo podem ser utilizados ácidos concentrados ou diluídos. Dependendo da matéria-prima processada, os produtos das reações químicas hidrolíticas do material lignocelulósico constituem as hexoses (glicose, galactose e manose), as pentoses (xilose e arabinose), lignina, ácido acético, metanol, dentre outros, em proporções variáveis.

Os problemas da hidrólise ácida acontecem em função das altas temperaturas e condições ácidas empregadas neste procedimento, produzindo substâncias como 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácidos alifáticos e

compostos fenólicos, os quais atuam restritivamente na fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos, podendo inibir o crescimento celular diminuindo assim a atividade enzimática e biológica das células microbianas, quando os hidrolisados forem usados como meio de cultivo em bioconversões. Para contornar este problema, os hidrolisados são submetidos a processos de detoxificação, por meio de etapas de remoção química, física ou biológica, as quais reduzem total ou parcialmente os compostos inibidores formados após a hidrólise ácida.

A produção eficiente de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos requer que o micro-organismo fermentador tenha a capacidade de utilizar não apenas a glicose, mas também os outros açúcares liberados pela hidrólise química e ou enzimática desse material, como xilose e arabinose.

Bactérias e leveduras fermentam pentoses, e dentre as leveduras destacam-se as espécies *Pichia stipitis*, *Pachysolen tanophilus*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida guilliermondii*, *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces/Dekkera naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polymorpha* e *Schizosaccharomyces pombe*. A capacidade de aplicação dessas espécies é limitada devido à baixa tolerância ao etanol e aos compostos gerados durante a etapa de pré-tratamento e da hidrólise da hemicelulose. Ademais, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose em hidrolisados hemicelulósicos pode promover uma diminuição no consumo de xilose, por preferência metabólica ou, além disso, atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

Neste contexto, em vista dos diversos desafios enfrentados na produção de etanol de segunda geração, na busca por maior eficiência e menor custo de produção, o presente trabalho teve por objetivo realizar o isolamento de leveduras de fontes naturais (caldo, bagaço e rizosfera de cana-de-açúcar), a seleção e a identificação de isolados fermentadores de pentoses, prosseguindo com o estudo da viabilidade de crescimento e fermentação em meios sintéticos a base de pentoses e em hidrolisados ácidos obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Este trabalho pretende contribuir na perspectiva de utilização de novas linhagens de leveduras com potencial de produção de etanol a partir de hidrolisados, de levantar os principais problemas decorrentes do uso destes substratos e propor procedimentos mais efetivos que resultem em melhorias no processo fermentativo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Realizar o isolamento e seleção de linhagens de leveduras para fermentação de pentoses a partir de hidrolisado de cana-de-açúcar, visando a produção de etanol de segunda geração.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar, selecionar e identificar leveduras de fontes naturais como caldo de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho e rizosfera de cana de-açúcar com capacidade de fermentar pentoses;
- Otimizar as condições de crescimento e fermentação da linhagem de levedura selecionada (*Meyerozyma guilliermondii*) utilizando meios sintéticos contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono;
- Obter e caracterizar o hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar quanto à presença de inibidores e concentração de açúcares, antes e após etapa de detoxificação;
- Avaliar o efeito da detoxificação e da adição de suplemento nutritivo sobre a produção de etanol e outros parâmetros da fermentação pela levedura selecionada (*Meyerozyma guilliermondii*) utilizando hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar.

Capítulo 1
REVISÃO DA LITERATURA

1. Produção de Etanol no Brasil

O Proálcool (Programa Nacional do Álcool) foi criado com a crise do petróleo, em 14 de novembro de 1975, por meio do decreto nº 76.593 e possibilitou uma grande expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Seu objetivo era estimular a produção do álcool e atender as necessidades do mercado interno e externo.

O Proálcool foi criado para diminuir a dependência ao petróleo com a utilização de etanol, possibilitando ao Brasil ser produtor e exportador de álcool no mundo com o desenvolvimento promovido (FAIRBANKS, 2003; SOMAVILLA; GOMES NETO, 2009). Em termos tecnológicos, o Proálcool proporcionou a modernização técnica das usinas produtoras de etanol, assim como do sistema de distribuição do bicomcombustível e do setor agrícola a ele ligado, dessa maneira impulsionando o desenvolvimento dos motores para a utilização do etanol como combustível e dos motores *Flex Fuel*, utilizados para qualquer mistura etanol-gasolina, tornando o Brasil referência mundial (SCHMIDELL et al., 2001; SOMAVILLA; GOMES NETO, 2009).

Devido ao desenvolvimento não baseado nos preceitos da sustentabilidade e a exploração irracional dos combustíveis fósseis, bem como a perspectiva de aumento do preço do petróleo, esforços têm sido feitos para desenvolver fontes alternativas de energia. Nesse contexto, os biocombustíveis como o etanol, o biodiesel e o biogás podem ser usados para diminuir o uso de gasolina e óleo diesel e, conseqüentemente minimizar os impactos ambientais (COSTA et al., 2014).

As fontes de energia renováveis caracterizam-se, em termos gerais, pela sua disponibilidade descentralizada, por apresentarem uma capacidade de auto-regeneração em curtos períodos de tempo e pelos reduzidos impactos ambientais decorrentes da sua utilização. A procura pelos recursos energéticos endógenos poderá dar um importante contribuição para a redução do consumo de energia fóssil, com reflexos diretos sobre os preocupantes impactos ambientais a si associados, permitindo assim a melhoria da qualidade do ar, da saúde das populações, bem

como a redução/controle da importante e crescente poluição industrial e urbana, com respectivas implicações para o aquecimento global (PEDRO, 2013).

A iminente ameaça do aquecimento global juntamente com a diminuição das reservas de petróleo bruto a nível mundial e a crescente demanda de energia, implica na necessidade urgente de substituir os combustíveis fósseis por biocombustíveis verdes (TOQUERO; BOLADO, 2014). Combustíveis à base de biomassa, como o bioetanol, fornecem uma alternativa promissora, uma vez que sua energia já está incluída no ciclo global do carbono, o que implica em uma diminuição significativa na liberação de dióxido de carbono (KARAGÖZ et al., 2012).

O Brasil utiliza a cana-de-açúcar para a produção de etanol enquanto os Estados Unidos e a Europa utilizam principalmente amido de milho, amido de trigo e cevada. O etanol brasileiro é mais competitivo que o produzido nos Estados Unidos e na Europa devido ao processo ser rápido, fácil e com baixo custo quando comparado aos demais. Por exemplo, no melaço da cana-de-açúcar, não há necessidade de uma hidrólise prévia do substrato (sacarose), que pode ser quebrado pela levedura responsável pelo processo de fermentação. Mas no caso de materiais ricos em amido é necessário quebrar as cadeias deste carboidrato, uma vez que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* não consegue utilizá-lo. Dessa maneira, grandes concentrações de enzimas amilolíticas, como glucoamilase e α -amilase, devem ser adicionadas ao processo a fim de realizar a hidrólise enzimática do amido para obter o xarope de glicose que é convertido a etanol pelas leveduras em processo de fermentação (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; BALAT, 2011).

A demanda mundial por etanol combustível tem se expandido de forma muito rápida e esta deverá aumentar no futuro próximo, principalmente nos países mais desenvolvidos e naqueles de maior consumo de combustíveis automotivos. Isto se deve à combinação dos seguintes fatores: adoção de estratégias para a diminuição/limitação das emissões dos gases precursores do efeito estufa, conforme demandado para alguns países pelo Protocolo de Kyoto; substituição do MTBE (Éter Metil Terc-Butilico) como aditivo da gasolina (para aumento da octanagem do combustível e como aditivo oxigenado) devido ao impacto ambiental associado ao uso desta substância; diminuição da dependência de derivados de petróleo na matriz energética; e incentivos à agricultura e às indústrias locais (PIACENTE, 2006).

O aumento da demanda pelo álcool combustível e as previsões de crescimento continuado estão impulsionando o setor a realizar novos investimentos na área agrícola e industrial com o objetivo de expandir a capacidade de produção e atender a demanda futura pelo combustível (MOUTTA, 2009).

2. Matérias-Primas Utilizadas na Bioprodução de Etanol

O uso de etanol como combustível não só se apresenta como uma alternativa tecnicamente apropriada, mas também possui importância ecológica por ser este um combustível cujo processo de combustão gera baixas emissões de poluentes e, levando em consideração sua característica renovável, não contribui para o desbalanceamento no ciclo do carbono (OLIVEIRA, 2010).

O etanol é produzido industrialmente a partir de matérias-primas açucaradas e amiláceas, como o caso do caldo extraído da cana-de-açúcar-de-açúcar, usado no Brasil, ou do amido produzido a partir de milho, usado nos Estados Unidos (FAIRBANKS, 2003). Na Figura 1 é apresentado um diagrama de blocos para a obtenção de etanol a partir de diferentes matérias-primas, no qual podem ser observadas etapas comuns entre os processos.

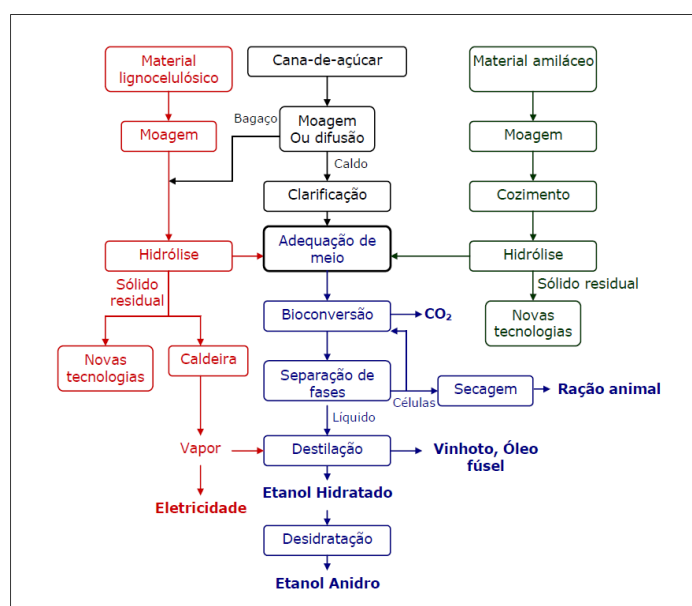


Figura 1. Alternativas para a bioprodução de etanol. **Fonte:** Adaptado de PEREIRA Jr. (1991).

As tendências evidenciam o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento de resíduos agroindustriais como os materiais lignocelulósicos, denominados biomassas, com o objetivo de diminuir os custos associados às matérias-primas, que podem atingir 2/3 do custo total da produção, e incrementar os níveis de produtividade sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo. Deste modo, investiga-se o aproveitamento de biomassas como palhas, bagaço, folhas e resíduos de exploração madeireira entre outros, que são constituídos por açúcares que podem ser liberados utilizando diferentes processos físicos ou químicos, sendo esta uma etapa crucial no processo (PEREIRA JR; COUTO; SANTA ANNA, 2008).

A composição básica dos materiais lignocelulósicos depende do vegetal de origem e, no caso de resíduos agroindustriais, da região, idade e período do ano no momento da colheita do material. Os principais componentes dos materiais lignocelulósicos são celulose e hemicelulose, constituindo estruturas duras e fibrosas infiltradas por outra estrutura formada por alcoóis aromáticos conhecida como lignina, ocorrendo ainda a existência de cinzas e outros componentes classificados como extrativos em pequenas quantidades (RODRIGUES, 2007). A Tabela 1 exibe a composição lignocelulósica de alguns resíduos agroindustriais.

Tabela 1. Composição lignocelulósica de alguns resíduos agroindustriais.

Biomassa Residual	Composição (%)				
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas
Bagaço de cana	33-36	28-30	18-20	4-6	2-4,8
Palha de arroz	32-37	19-24	9-13	4-5	12-18
Sabugo de milho	34-36	16-24	15-19	2-6	2-4
Palha de trigo	30-33	22-28	14-18	3-7	3-7
Palha de sorgo	34-36	25-26	25-26	X	X
Jornal impresso	40-45	25-40	18-30	X	X
Madeiras	~50	~20	15-20	Até 10	Até 5

Fontes: Olsson; Hähn-Hagerdal (1996); Pandey et al. (2000); Sun; Cheng (2002).

Atualmente, o etanol é praticamente produzido a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas (cana-de-açúcar, milho, trigo) sendo comumente chamado

de etanol de primeira geração. A futura expansão, contudo, deverá ser baseada no etanol de segunda geração, ou seja, produzido a partir de materiais lignocelulósicos, caso dos resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar. Estes são caracterizados por serem abundantes e renováveis, e com grande potencial para produção de biocombustíveis, não comprometendo a segurança alimentar e o suprimento de combustível, além de serem fundamentais na diminuição dos impactos ambientais (CHO et al., 2009; DIAS et al., 2010; GALBE; ZACCHI, 2010).

Apesar dos materiais lignocelulósicos apresentarem grande potencial para a obtenção de diversos produtos de valor agregado significativo, seu aproveitamento de forma economicamente viável ainda consiste em desafios para a biotecnologia, devido à elevada resistência, necessidade de tratamentos prévios, às vezes sob condições drásticas, para a obtenção de açúcares fermentescíveis (MOUTTA, 2009).

A celulose é a macromolécula mais abundante na natureza e constitui cerca de 40 – 50 % dos materiais vegetais. Sua característica fibrosa atribui à celulose, rigidez e resistência ao estresse. Sua principal função é como componente estrutural em plantas. Geralmente está entrelaçada com uma variedade de polissacarídeos formados por unidades de monossacarídeos, como a glicose, e frequentemente impregnada com lignina (MOUTTA, 2009).

A celulose é o constituinte básico da parede celular vegetal. É um homopolissacarídeo de ocorrência natural composto por unidades de D-glucose unidas por meio de ligações glicosídicas do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) (β -D-glucana), sendo encontrado em todos os grupos vegetais (CAMPBELL, 2000; BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

A celulose apresenta regiões altamente ordenadas, sendo essas cristalinas e áreas menos ordenadas, denominadas amorfas, onde as cadeias apresentam uma orientação randomizada. As forças responsáveis pela estabilidade das regiões cristalinas são basicamente o resultado de um grande número de ligações de hidrogênio inter e intramoleculares. No entanto, diversas fibrilas elementares se associam formando cristalitos de celulose. Posteriormente, quatro desses agregados cristalinos se unem por meio de uma monocamada de hemicelulose, resultando na microfibrila de celulose. A celulose amorfa, devido a sua maior área superficial, é mais suscetível à hidrólise enzimática que a forma ordenada ou cristalina. No entanto, complexos enzimáticos produzidos por vários microrganismos têm se

mostrado capazes de catalisar a hidrólise de celulose, tanto cristalina quanto amorfa, em açúcares solúveis (MARTINS, 2005).

A hemicelulose é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante nos vegetais, presente em todas as camadas da parede celular, mais concentrado principalmente nas camadas primária e secundária, entrelaçada com as fibras de celulose. Considerada a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta (FENGEL; WEGENER, 1989), consiste, em sua maior parte, de pentoses e hexoses formadas por uma variedade de unidades de açúcar como xilose, manose, arabinose e outros constituintes menores que são classificados como compostos orgânicos e inorgânicos (SALAZAR; SILVA; SILVA, 2005).

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por pentoses, hexoses ou ácidos urônicos. A xilose é o maior componente da hemicelulose na maioria das plantas, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana (polímero de xilose) e xiloglicana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose). Segundo GÓMEZ (1985) e SILVA et al. (2009), outros polímeros também são encontrados fazendo parte da hemicelulose, tais como glicomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglicomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e D-arabinose).

Segundo Ramos (2003), estruturalmente as hemiceluloses são mais parecidas com a celulose do que com a lignina e são depositadas na parede celular em um estágio anterior à lignificação. A sua estrutura apresenta ramificações e cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado.

A lignina é responsável pela rigidez da parede celular dos vegetais, funcionando como agente permanente de ligação entre as células, conferindo resistência ao impacto, compressão e dobra (LEMOS, 2001). É um composto bastante estável, insolúvel em solventes orgânicos ou mesmo em ácido sulfúrico concentrado a quente, além disso, é resistente ao ataque químico, enzimático e microbiano, impedindo a penetração de agentes externos capazes de destruir as células (LARSSON et al., 1999).

Segundo Bidlak; Malone; Benson (1992) e Martins (2005), a lignina é um polímero amorfo com estrutura tridimensional muito complexa e baseada em três precursores monoméricos aromáticos: os álcoois coniferílico, sinapílico

p-cumarílico, variando a proporção desses monômeros entre diferentes espécies de plantas. Esta macromolécula orgânica está presente na madeira em cerca de 20 % a 30 %, agindo como material adesivo, como agente de enrijecimento e como barreira contra degradação enzimática e/ou microbiana da parede celular.

Dentre os resíduos lignocelulósicos destaca-se o bagaço de cana-de-açúcar, especialmente pelas grandes quantidades geradas nas usinas durante a obtenção do suco deste vegetal. Assim como a palha, o bagaço compõe-se, em média, de 28% do peso da cana-de-açúcar, ou seja, a cada tonelada de cana-de-açúcar processada, 280 kg de bagaço de cana com 50 % de umidade são gerados (LAMONICA, 2005).

A integração energética das usinas unida à existência de processos de monomerização eficientes (já existentes), e a substituição de parte do bagaço queimado por outros materiais como palha, permitiria uma disponibilidade de bagaço próxima a 78 % do obtido no processo de moagem. Esse maior excedente poderia ser destinado às etapas de pré-tratamento e posterior transformação em substâncias de maior interesse, aumentando a produtividade das indústrias sem acréscimos nas áreas de plantio. Estima-se que o bagaço excedente, se fosse utilizado para a produção de etanol, permitiria duplicar a produção no Brasil (PEREIRA, 2006; SOARES; ROSSELL, 2007).

O uso do bagaço apresenta uma série de vantagens, tais como, de se apresentar processado após a passagem pelas moendas, disponibilidade em grandes quantidades e estar pronto para uso no local, diminuindo o custo do transporte, e por consequência o custo de produção de etanol por esta via (FUGITA, 2010). Além disso, o bagaço da cana-de-açúcar se destaca por ser produzido no próprio território nacional, não havendo, em consequência, o risco de sofrer grandes alterações no preço por causa do dólar (KIIPPER, 2009).

Após a cana-de-açúcar ser moída e atingir o último terno da moenda, o bagaço torna-se praticamente um pó formado de partículas e fibras de vários tamanhos. A porção mais rígida dessa mistura é rica em lignina e oriunda da parte externa do caule, sendo praticamente seca. O material menos rígido e úmido deriva do interior da planta (REYNOL, 2009). De acordo com Dias (2012), essa é a melhor parte para entrar no processo de produção de etanol, por possuir menor teor de lignina e ser rica em celulose.

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).

3. Hidrólise de materiais lignocelulósicos

Para produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar é necessário que ocorra a transformação da celulose e hemicelulose em seus monômeros (glicose e xilose) e subsequente conversão dos mesmos em bioetanol. A celulose, entretanto, encontra-se muito protegida pela lignina. Torna-se necessário, portanto, realizar um pré-tratamento para a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos (BAUDEL, 2007).

Os métodos de pré-tratamento podem ser físicos (picadores, moagem, térmico), químicos (ozônio, ácidos diluídos ou concentrados, alcalino, solventes), ou uma combinação entre eles (KIIPPER, 2009). Os tratamentos físicos geralmente são empregados como um primeiro estágio na abertura da rede lignocelulósica para daí se aplicar um tratamento hidrolítico químico sendo ácido ou alcalino, ou biológico com enzimas ou células (GALBE; ZACCHI, 2007).

O pré-tratamento da matéria prima é considerado uma etapa crítica na produção de bioetanol, por promover grande impacto sobre todas as outras etapas do bioprocessamento, tendo influência sobre a fermentação, recuperação de produto, tratamento do efluente e a demanda energética ao longo do processamento. De acordo com Galbe e Zacchi (2007), para um pré-tratamento ser considerado efetivo, deve apresentar algumas características, como resultar em alta extração de açúcares; ter um baixo custo de capital e operacional; e permitir alta digestibilidade da celulose. No caso de subsequente hidrólise enzimática, o pré-tratamento deve ter uma baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário, além de produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que serão tóxicos ao biocatalisador.

A hidrólise é um processo utilizado para a despolimerização da fração hemicelulósica em materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2005). Em geral, a hidrólise ácida é conduzida com ácidos minerais como ácido sulfúrico ou ácido clorídrico em concentrações na faixa de 1 a 5 %, temperaturas em torno de 150 °C e pressões de até 10 atm. Neste processo, a temperatura e a concentração do ácido são fatores cruciais na formação de compostos tóxicos. Temperaturas menores podem ser mais adequadas quanto à formação de inibidores, entretanto, podem acarretar diminuição do rendimento de extração dos açúcares. De outra forma, temperaturas acima de 160 °C geram altas quantidades de açúcares e compostos inibidores (SUN; CHENG, 2002; MOUTTA, 2009).

Segundo Herrera et al. (2002), o mecanismo reacional da hidrólise ácida de materiais hemicelulósicos pode ser descrito pelas seguintes etapas:

1. difusão dos prótons através da matriz lignocelulósica úmida;
2. protonação do oxigênio da ligação éter entre os monômeros de açúcar;
3. quebra da ligação éter e geração de um carbocátion como intermediário;
4. solvatação do carbocátion com água;
5. regeneração do próton e cogeração do monômero de açúcar, oligômero ou polímero, dependendo da ligação éter rompida;
6. difusão dos produtos na fase líquida (se for permitida, por sua forma e tamanho) e,
7. reinício do processo a partir do passo 2.

A hidrólise enzimática é um processo que apresenta especificidade da reação e ausência de formação de produtos secundários. É um processo que não requer altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007). A proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina, no entanto, tornam este tipo de hidrólise um processo lento e pouco econômico (CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; CARVALHO JR, 2004). Além disso, aspectos operacionais relacionados ao elevado tempo (48-72 horas), bem como o elevado custo das enzimas, têm acarretado incertezas quanto à viabilidade econômica do processo (SANDERSON, 2010).

4. Fermentação dos hidrolisados

Quando celulose e hemicelulose são hidrolisadas, uma mistura de monossacarídeos pode ser produzida. Os açúcares predominantes liberados são xilose, glicose e, em concentrações bem menores, arabinose, galactose e manose. Quando micro-organismos são expostos a essa mistura de açúcares, ocorre a fermentação. A D-xilose pode ser degradada visando a produção de etanol, por diferentes espécies de leveduras, fungos filamentosos e bactérias naturalmente ocorrentes e/ou recombinantes. As bactérias, entretanto, possuem baixa tolerância ao etanol e fungos filamentosos possuem baixas produtividades (PEREIRA JR, 1991).

Muitas leveduras utilizam a xilose diretamente, mas a capacidade de produção de etanol é muito limitada. Entre os gêneros que possuem capacidade de fermentar xilose estão *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Kluyveromyces*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Schizosaccharomyces*. As espécies *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Pichia stipitis* são indicadas, na literatura, como as mais aptas a alcançar altos rendimentos de fermentação alcoólica a partir de xilose (McMILLAN, 1993; BALAT; BALAT; ÖZ, 2008).

Toivola et al. (1984) identificaram *P. stipitis* como uma das espécies que produzem etanol a partir de xilose com melhores rendimentos e produtividades. No entanto, *P. stipitis* é sensível aos ácidos orgânicos, incluindo o ácido acético, compostos que diminuem o crescimento celular e a produção de etanol e que estão presentes em hidrolisados hemicelulósicos.

O metabolismo de xilose na etapa inicial pode ocorrer de duas formas: na presença da enzima xilose isomerase, predominante em bactérias, que realiza a conversão da D-xilose em D-xilulose, sendo facilmente convertida em xilulose-5-fosfato. Dessa maneira, esta entra na via Pentose-Fosfato (PPP) gerando frutose-6-fosfato, a qual é convertida em piruvato por meio da glicólise. Na segunda forma, predominante em leveduras, fungos filamentosos e outros eucariotos, a D-xilose é catalisada pela xilose redutase gerando xilitol, o qual por meio da xilitol desidrogenase, é convertido em xilulose-5-fosfato, que segue também via PPP e, em seguida, via glicólise até gerar piruvato. Em leveduras, na ausência de oxigênio,

o piruvato é reduzido a etanol e CO_2 (JACKSON; NICOLSON, 2002; JEFFRIES, 2006). A Figura 2 apresenta um esquema simplificado do metabolismo de D-xilose.

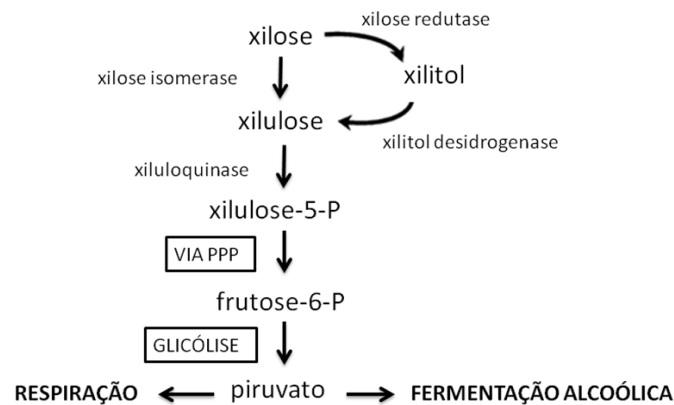


Figura 2. Esquema simplificado do metabolismo de D-xilose. **Fonte:** Adaptado de JACKSON; NICOLSON (2002).

Nas leveduras, o metabolismo de xilose é parcialmente regulado pela disponibilidade de oxigênio. A enzima xilose redutase (XR) tem maior afinidade por NADPH do que por NADH, enquanto xilitol desidrogenase (XDH) utiliza somente NAD⁺. Essa diferença de especificidade ao cofator resulta em um acúmulo de NADP⁺ e NADH devido a um desequilíbrio de reciclagem de co-fatores que ocorre sob condições de respiração reduzida, provocando a inibição da atividade de XDH, o que em leveduras fermentadoras de xilose, contribui significativamente para o aumento da formação de xilitol e diminuição da produção de etanol (JEFFRIES, 2006; CHU; LEE, 2007).

Sob condições anaeróbias, o NADPH pode ser regenerado por meio de frutose-6-fosfato na via PPP e através das enzimas NADP-dependentes, isocitrato desidrogenase e aldeído desidrogenase, minimizando o acúmulo de NADP⁺. Entretanto, não é possível produzir a regeneração de NADH a NAD⁺ por meio da fermentação alcoólica, e o sistema de transferência de elétrons é incapaz de realizar a reoxidação pela respiração devido aos baixos níveis de O_2 . A regeneração de NAD⁺ pela reação de XDH pode ser efetuada por meio da redução de diidroxiacetona a glicerol, no entanto, a formação de glicerol não é considerada

ideal, visto que desvia o carbono da produção de etanol (JEFFRIES, 2006; CHU; LEE, 2007).

A composição do meio favorável ao processo e as condições da fermentação são de extrema importância para a obtenção de melhores resultados, além da escolha de um micro-organismo apropriado para o processo de fermentação. Os parâmetros mais relevantes ao processo de fermentação alcoólica a partir de xilose serão apresentados a seguir (OLIVEIRA, 2010).

a) Aeração

Na fermentação alcoólica de xilose por leveduras, o suprimento de oxigênio é um dos fatores ambientais mais importantes, influenciando o crescimento celular, o rendimento, a produção de etanol e a formação de produtos. Dessa maneira, a vazão de aeração é determinante na quantidade de carbono utilizada pela célula para crescimento celular ou formação de etanol, existindo um nível de oxigenação que levaria ao alto rendimento e produtividade em etanol, coincidentes com baixo rendimento em biomassa (RIZZI et al., 1989; SCHNEIDER, 1989).

Esse comportamento foi confirmado para *P. stipitis* quando Guebel et al. (1991) verificaram a impossibilidade de melhorar a produção de biomassa e a formação de produto com um único valor de taxa de transferência de oxigênio (OTR), sendo apropriado um processo aeróbio para o crescimento celular e condições microaeróbias para maximizar a produtividade em etanol. De certo modo, adicionalmente, tanto para a levedura mencionada como para *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*, tem se reportado baixo requerimento de oxigênio para obter uma máxima produção de etanol e, em caso contrário acúmulo de xilitol ou reassimilação do mesmo (HÄHN-HAGERDAL et al., 1991).

A oxigenação é necessária para manter o balanço redox nas diferentes reações envolvidas na degradação de xilose e na manutenção do micro-organismo. Além disso, trabalhos tem demonstrado que é necessária uma oxigenação adequada para o transporte eficaz de xilose e também para algumas funções mitocondriais (SKOOG; JEPSSON; HÄHN-HAGERDAL, 1992).

Segundo Zhang et al. (2011) tem sido relatado que *Kluyveromyces marxianus* CBS712 pode assimilar xilose, mas a sua capacidade de produzir etanol a partir dessa pentose é acoplada à aeração.

b) pH

As variações de pH afetam fortemente os rendimentos em etanol. O pH ótimo para o crescimento e/ou produção de etanol é função direta do micro-organismo estudado. As discrepâncias no comportamento do micro-organismo em função do pH e os valores ótimos, reportados na literatura, podem ser atribuídos a outras condições de processo, ao tipo de controle de pH e/ou a metodologia empregada para o cálculo de parâmetros comparativos (DU PREEZ, 1994; KASTNER et al., 1996).

Estudos mostram que para *P. stipitis* CBS 7126, o intervalo está entre 4,5 e 6,0, sendo este último valor de pH o mais apropriado (SLININGER et al., 1990). No caso de *P. tannophilus*, altas produtividades são possíveis numa faixa entre 2,5 e 5,0 (SLININGER et al., 1985). Para *C. shehatae* CBS 2779 tem sido reportada uma produtividade volumétrica máxima utilizando um intervalo de pH entre 4,0 e 5,0 (DU PREEZ; BOSH; PRIOR, 1986a).

c) Temperatura

Estudos realizados em fermentação com *P. stipitis* CBS 7126, demonstraram que, em um intervalo de temperatura entre 30 °C e 32 °C, obtém-se a máxima concentração de etanol. As fermentações que utilizam tanto *P. stipitis* como *C. shehatae* CBS 2779, apresentam uma acentuada diminuição na formação de produto com o aumento de temperatura a valores acima do ótimo (30 °C), assim como diferentes intervalos ótimos de produção para etanol e xilitol, sendo a formação dessa última substância mais sensível aos aumentos de temperatura (BARBOSA et al., 1990).

É importante destacar que a temperatura ótima do processo não depende somente da linhagem, mas também do substrato utilizado (glicose e/ou xilose), sua concentração e da presença de outros compostos (OLIVEIRA, 2010).

d) Concentração de Substrato

Segundo Roberto et al. (1991), em investigações com *P. stipitis*, a levedura é inibida em fermentações com concentrações iniciais de xilose entre 76 g/L e 99 g/L, sendo o rendimento em etanol afetado para concentrações acima de 145 g/L. Em estudos realizados com *P. stipitis* Y7124, verificou-se que o rendimento em etanol permanecia constante entre 20 e 110 g/L. Embora não tenha sido verificado acúmulo de xilitol em concentrações acima dos 110 g/L, tem se reportado rendimentos gradativamente menores (LAPLACE et al., 1991).

Segundo DU Preez; Bosh; Prior (1986b), o acúmulo de xilitol durante fermentações com leveduras obedece mais as condições ambientais, como a disponibilidade de oxigênio e alta densidade celular do que a concentração inicial de substrato.

Outros autores relataram que a levedura *P. stipitis* CBS 5773 apresenta uma diminuição no rendimento em etanol de 0,41 para 0,39 g/g, quando aumentada a concentração de xilose de 50 para 200 g/L (SLININGER et al., 1985). No caso da linhagem *P. stipitis* CBS 5774, concentrações entre 80 e 100 g/L de xilose foram relatadas como as melhores para a bioconversão de xilose em etanol, mas constatou-se uma diminuição drástica nos valores dos parâmetros de fermentação para concentrações acima de 150 g/L (ANTUNES, 1997).

e) Concentrações de Etanol

Para viabilizar a destilação do meio fermentado e alcançar altos níveis de produção, a tolerância das leveduras ao etanol é de vital importância. Porém, essa tolerância difere para cada linhagem de levedura, sendo afetada pelas condições de cultivo, e especialmente, pela temperatura (DU PREEZ; BOSH; PRIOR, 1987).

Em estudos realizados com *P. stipitis* NRRL Y7124, verificou-se tolerância ao etanol dependente da fonte de carbono (glicose ou xilose). Essa relação entre a tolerância e a fonte de carbono foi estudada a partir do crescimento e a atividade da ATPase presente na membrana plasmática para cultivos com glicose ou xilose, sendo melhores as atividades apresentadas em processos realizados utilizando a hexose (MEYRIAL et al., 1995). Com essa mesma linhagem, em estudos para

avaliar o efeito do etanol, observou-se que na medida em que aumenta a concentração desse produto no meio, o rendimento em xilitol aumenta linearmente e, conseqüentemente, apresenta-se uma diminuição proporcional no rendimento em etanol (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1988; JEFFRIES et al., 2007).

Fermentações realizadas com várias linhagens de *C. shehatae* e com *P. stipitis* Y633 (CBS 7126), conduzidas em batelada alimentada com baixo nível de oxigenação, o crescimento celular foi sensível ao efeito inibitório do etanol adicionado. As linhagens *P. stipitis* Y633 (CBS 7126), *C. shehatae* CSRI Y633 e *C. shehatae* CSRI Y492, apresentaram-se como as melhores produtoras, alcançando concentrações entre 44 e 47 g/L de etanol (DU PREEZ; VAN DRIESSEL; PRIOR, 1989).

5. REFERÊNCIAS

- ANTUNES, J. C. **Bioconversão de D-xilose a etanol por células de *Pichia stipitis***. 1987. 105p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos)- Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 1997.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p.858-875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H.; ÖZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.34, p.551-573, 2008.
- BARBOSA, M. F. S.; LEE, H.; SCHNEIDER, H.; FORSBERG, C. W. Temperature mediated changes of D-xylose metabolism in the yeast *Pachysolen tannophilus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.72, p.35-40, 1990.
- BASTOS, V. D. **Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias**. **BNDES Setorial**, n.25, p.5-38, 2007.
- BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise. In: WORKSHOP TECNOLÓGICO SOBRE HIDRÓLISE PARA PRODUÇÃO DE ETANOL, v.3, 2007, Campinas. **Anais...** Campinas: UNICAMP, 2007.
- BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v.72, p.51-56, 1992.
- CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. Porto Alegre: ArtMed, 2000. p.428-430.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; CARVALHO JR, J. A. **Hidrolisis acida de biomasa: optimizacion de la extraccion de xilosa a partir de residuos de *Eucalyptus grandis***. Congresso Internacional sobre azucar y derivados de La cana – Diversification, 2004. CD, Havana-Cuba, 14–18 de junio, 2004.

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

CHO, D.H.; LEE, Y.J.; UM, Y.; SANG, B.I.; KIM, Y.H. Detoxication of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.83, p.1035-1043, 2009.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**, v.25, p.425–441, 2007.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira (2013). Segundo Levantamento, agosto de 2013. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em 20 novembro 2013.

COSTA, A. G.; PINHEIRO, F. G. C.; SANTOS, A. B.; SANTAELLA, S. T.; LEITÃO, R. C. Geração de metano a partir de resíduos lignocelulósicos oriundos da produção do biocombustível : Revisão. **Revista DAE**, n.194, p.36-51, 2014.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Continuous production of ethanol from glucose, xylose and arabinose mixture by a flocculant strain of *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v.10, n.10, p.752-730, 1988.

DIAS, M. O. S.; CUNHA, M. P.; MACIEL-FILHO, R.; BONOMI, A.; JESUS, C. D. F.; ROSSEL, C. E. V. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.52, p 1551-1554, 2010.

DIAS, V. Diversificação da cana-de-açúcar traz boas perspectivas para o setor no país. União da indústria da cana-de-açúcar, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/opiniaio/show.asp?msgCode={08232023-10F4-4624-8410-9AAE30D15B12}>. Acesso em 20 maio 2012.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, n.11, p.944-956, 1994.

DU PREEZ, J. C.; BOSH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: Effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v.8, n.6, p.360-364, 1986a.

DU PREEZ, J. C.; BOSH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida Shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.3-4, n.23, p.228-233, 1986b.

DU PREEZ, J. C.; BOSH, M.; PRIOR, B. A. Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.521-525, 1987.

DU PREEZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.53-58, 1989.

FAIRBANKS, M. Álcool: Tecnologia amplia oferta e reduz custo do álcool. Revista: Química e Derivados, n. 417, 2003. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista>. Acesso 20 julho 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultra structure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2010.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v.108, p.41-65, 2007.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. In: CORTEZ, L. A. B. **Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Blucher-FAPESP, 2010. 954p.

GÔMEZ, C. H. R. J. **Sacarificação da hemicelulose do bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus***. 1985. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 1985.

GUEBEL, D. V.; CORDENONS, A.; NUDEL, B. C.; GIULIETTI, A. M. Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology Letters**, v.14, n.12, p.1193-1198, 1991.

HÄHN-HAGERDAL, B.; LINDEN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.28-29, p.131-144, 1991.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIST, S. J.; RAMÍREZ, J.A.; VÁSQUES, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v.510, p.01-08, 2002.

JACKSON, S.; NICOLSON, S. W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.131, p.613–620, 2002.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.320–326, 2006.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v.25, n.3, p.319-326, 2007.

KARAGOZ, P., ROCHA, I.V., OZKAN, M., ANGELIDAKI, I. Alkaline peroxide pretreatment of rapeseed straw for enhancing bioethanol production by same vessel saccharification and Co-fermentation. **Bioresource Technology**, v.104, p. 349–357, 2012.

KASTNER, J. R.; AHMAD, M.; JOJNES, W. J.; ROBERTS, R. S. Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentation by *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.45, p.224-228, 1996.

KIIPPER, P. G. **Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus***. 2009. 102p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009.

LAMONICA, H. M. Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana. In: SEMINÁRIO BIOELETRICIDADE, 3. 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra, 2005. Disponível em: http://www.inee.org.br/download/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf. Acesso 25 novembro 2009.

LAPLACE, J. M.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: process considerations in relation to ethanol tolerance. **Biotechnology Letters**, v.13, p.445-450, 1991.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JEONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.77–79, p.91–103, 1999.

LEMOES J. L. S. **Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana**. 2001. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, UFRJ, 2001.

MARTINS, L. F. **Caracterização do complexo celulásico de *Penicillium echinulatum***. 2005. 139p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

McMILLAN, J. D. **Xylose fermentation to ethanol: A review**. Springfield: National Technical Information Service, 1993.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; ROMIEU, C.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A. M. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Pichia stipitis* grown on D-xylose or on D-glucose. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.17, p.535-540, 1995.

MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando a utilização em processos de produção de bioetanol**. 2009.101f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – USP, Lorena – SP – Brasil. 2009.

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimatização de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 2010. 109p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

OLSSON, L; HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microbial Technology**, v.18, p.312-331, 1996.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P. E.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v.74, n.1, p.69-80, 2000.

PEDRO, N. C. R. M. **Avaliação do potencial de produção de etanol de 2ª geração a partir dos resíduos das podas do olival**. 2013. 190p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2013.

PEREIRA Jr., N. **Investigation of D-xylose fermenting yeasts**. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry, The University of Manchester, U.K, 1991.

PEREIRA JR., N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. In: Pereira Jr., N. (Ed.). **Series on biotechnology**, v.2, p.47, 2008.

PEREIRA, R. E. **Avaliação do potencial nacional de geração de resíduos agrícolas para produção de etanol**. 2006. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

PIACENTE, E. A. **Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol**. 2006. 57p. Dissertação (Mestrado em Planejamento de Sistemas Energéticos) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2006.

RAMOS, L. P. The chemistry involved in steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v.26, n.6, p.863-871, 2003.

REYNOL, F. Bagaço de qualidade. Cana Oeste, 2009. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/34232/bagaco-de-qualidade/>. Acesso 24 julho 2010.

RIZZI, M.; KLEIN, C.; SCHULTZE, C.; BUI-THANH, N.; DELLWEG, H. Xylose fermentation by yeasts. 5. Use of ATP balances for modeling oxygen limited growth and fermentation with the yeast *Pichia stipitis* with xylose as a carbon source. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, p.509-514, 1989.

ROBERTO, I. C.; LACIS, L. S.; BARBOSA, M. F. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v.26, p.15-21, 1991.

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana**. 2007. 160p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SALAZAR, R. F. S.; SILVA, G. L. P.; SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 6, 2005. Campinas, Brasil.

SANDERSON, K. Biofuels. **Nature**, v.474, n.7352, p.12-14, 2010.

SCHNEIDER, H. Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, p.1-40, 1989.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. S.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial: Engenharia bioquímica**. v.2. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001, 541p.

SKOOG, K.; JEPPSSON, H.; HÄHN-HAGERDAL, B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. Scientific Note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.34-35, p.369-375, 1992.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v.32, p.661-671, 2009.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.35, p.727-731, 1990.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; OKOS, M. R.; LADISCH, M. R. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentration. **Biotechnology Letters**, v.7, p.431-436, 1985.

SOARES, P. A.; ROSSELL, C. E. V. Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv. São Paulo: NAIPPE - USP, 2007. (Nova Série, v. 3). Disponível em: http://www.naippe.fm.usp.br/arquivos/livros/Livro_Naippe_Vol3.pdf . Acesso em 07 dezembro 2013.

SOMAVILLA, C.; GOMES NETO, E. H. Etanol e as células combustíveis. Disponível em: <http://www.celulaacombustivel.com.br>. Acesso 20 agosto 2009.

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

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermuda grass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p.1599-1606, 2005.

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v.47, p.1221-1223, 1984.

TOQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p.68-76, 2014.

ZHANG, B.; ZHANG, L.; WANG, D.; GAO, X.; HONG, J. Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.38, n.12, p. 2001–2010, 2011.

Capítulo 2

ISOLAMENTO, SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE

RESUMO

A procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses é um dos desafios frente às dificuldades na tecnologia da produção de etanol de segunda geração. As fontes naturais de materiais lignocelulósicos podem ser reservatórios de linhagens com potencial de assimilação e fermentação de pentoses. Este estudo teve por objetivo realizar o isolamento de linhagens de leveduras de fontes naturais (caldo, bagaço e rizosfera de cana-de-açúcar, e palha de milho), a avaliação presuntiva da capacidade de fermentação de pentoses (D-xilose e L-arabinose) e a identificação da linhagem selecionada. Para o isolamento, foi utilizada a técnica da diluição em série e plaqueamento em meio sintético contendo a pentose como única fonte de carbono. Dentre 350 isolados, 39 apresentaram atividade fermentativa de arabinose (56,4 %) ou xilose (38,5 %) ou ambas (5,1 %). Uma das linhagens que apresentou fermentação tanto de arabinose quanto de xilose (código 311), isolada de caldo de cana-de-açúcar, foi identificada por meio da amplificação da região D1/D2 do gene 26S e da região ITS do DNA ribossomal como sendo da espécie *Meyerozyma guilliermondii*. Esta linhagem foi selecionada para os testes posteriores de crescimento e fermentação de xilose e arabinose em meios sintéticos e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, sob diferentes condições ambientais.

Palavras-chave: *Meyerozyma guilliermondii*, pentoses, xilose, arabinose, bagaço de cana-de-açúcar, palha de milho, rizosfera, caldo de cana-de-açúcar.

1. INTRODUÇÃO

A xilose é a pentose predominante na biomassa lignocelulósica e o segundo carboidrato mais abundante na natureza (MATSUSHIKA et al., 2009). No entanto, a geração de bioetanol a partir dessa biomassa depende da eficiente metabolização da pentose D-xilose pelos biocatalisadores, as leveduras (NAKAMURA et al., 2008). Dessa maneira, a xilose torna-se uma alternativa para produção de etanol combustível a partir da sua fermentação (JEFFRIES, 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada com sucesso na produção industrial de etanol de primeira geração a partir da cana-de-açúcar e melaço no Brasil, sendo capaz de fermentar hexoses rápida e eficientemente, exibe alta tolerância ao etanol, a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação. Esta espécie, no entanto é incapaz de fermentar celobiose e pentoses como a xilose, que estão presentes em grande quantidade em hidrolisados da biomassa lignocelulósica (STAMBUK et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2009).

Desde os anos 80 a habilidade de leveduras em fermentar xilose tem sido descrita, como em 1983, quando Du Preez e Walt descreveram *Candida shehatae* como uma nova espécie fermentadora de xilose (DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983). Atualmente sabe-se que outras espécies de leveduras como *Candida succiphila*, *Candida jeffriesii*, *Candida intermedia*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus*, *Hansenula polymorpha*, *Debaryomyces hansenii*, também fermentam xilose produzindo etanol com diferentes graus de rendimento (HÄHN-HAGERDAL et al., 1994; TAVARES et al., 2000; GÁRDONYI et al., 2003; STAMBUK et al., 2003; NGUYEN et al., 2006; JEFFRIES et al., 2007).

Foram descritas duas espécies novas de leveduras fermentadoras de xilose, como a *Spathaspora passalidarum*, uma levedura isolada do intestino de besouros presentes em madeira (NGUYEN et al., 2006) e *Spathaspora arborariae*, uma levedura isolada a partir de madeira em decomposição em duas diferentes localidades do Brasil (CADETE et al., 2009). Ambas as espécies são reconhecidas pela capacidade de fermentar xilose e produzir etanol, tendo potencial para

produção de biocombustível a partir de material vegetal, além de serem tolerantes aos compostos inibidores gerados a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica (CUNHA-PEREIRA et al., 2011).

Organismos geneticamente modificados com capacidade de fermentação de pentoses incluem a levedura *S. cerevisiae* e as bactérias *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* (SKOOG; HÄHN-HAGERDAL, 1988).

Dentre as principais espécies de leveduras fermentadoras de xilose, *P. stipitis* é considerada a mais promissora, uma vez que é capaz de converter a maior parte dos açúcares presentes nos hidrolisados hemicelulósicos em etanol. No entanto a utilização em larga escala destas leveduras é dificultada pela sua baixa tolerância ao hidrolisado e etanol, além da incapacidade de fermentar xilose a um pH baixo (STAMBUK et al., 2008).

Neste contexto, torna-se interessante a procura por novas espécies de leveduras capazes de fermentar pentoses, e as fontes naturais de materiais lignocelulósicos podem ser reservatórios de linhagens com alto potencial. O presente trabalho teve como objetivo o isolamento de leveduras de materiais lignocelulósicos (bagaço de cana e palha de milho) assim como de ambientes relacionados, como solo de rizosfera de cana e caldo de cana. Após o isolamento, as linhagens foram testadas quanto à habilidade de fermentar pentoses, identificadas e selecionadas para as etapas posteriores de otimização de meio de cultura sintético e hidrolisados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolamento e seleção de leveduras de fontes naturais

2.1.1. Isolamento de leveduras de bagaço de cana-de-açúcar

Foram realizadas coletas de bagaço de cana-de-açúcar em duas usinas localizadas no município de Araras, em diferentes períodos: Usina Santa Lúcia, cinco amostras em 15 de dezembro de 2009, quatro amostras em 30 de abril de 2010 e quatro amostras em 05 de outubro de 2010; e na Usina São João, cinco

amostras em 20 de maio de 2010 e quatro amostras no dia 06 de novembro de 2010.

Foram diluídos 10 g de cada amostra em 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) estéril em Erlenmeyer de 250 mL, os quais foram submetidos à agitação a 150 rpm, 30 °C por 35 minutos. Em seguida, foram realizadas diluições em série até 10^{-3} . A partir de cada diluição foi transferido 0,1 mL para placas de Petri contendo 6,7 g/L YNB - YEAST NITROGEN BASE com aminoácidos e sulfato de amônio (Difco®) + 20 g/L xilose ou 20 g/L arabinose. O inóculo foi distribuído sobre os meios com o auxílio da alça de Drigalsky. Aos meios de cultura foram adicionados os antibióticos ampicilina e ácido nalidixico na concentração de 50 mg/L.

As placas em (duplicatas) de cada amostra contendo os devidos meios e as alíquotas semeadas foram incubadas a 30 ± 2 °C por cinco dias. Após este período, foi realizada a contagem das colônias de leveduras, as quais foram diferenciadas pelas características morfológicas de tamanho, cor, forma e textura. A partir de cada tipo morfológico foi selecionada uma colônia, da qual uma alçada de células foi estriada em placas com meio YM (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona, 10 g/L glicose, 20 g/L ágar) e incubadas a 30 ± 2 °C por cinco dias. As linhagens de leveduras purificadas foram cultivadas em tubos de cultivo contendo meio YM sólido inclinado (*slant*) a 30 ± 2 °C por 24 horas, sendo a seguir estocadas a 3-4 °C, para posterior realização dos testes de fermentação.

2.1.2. Isolamento de leveduras de palha de milho

Foi realizada uma coleta da palha de milho amontoada em frente a lavoura de milho, representada na Figura 1, localizada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de São Carlos/UFSCar, Araras, em 02 de julho de 2010, em número de 10 amostras, as quais foram reunidas e homogeneizadas para a formação de uma amostra composta. As palhas foram cortadas com tesoura esterilizada. Foram diluídos 10 g de cada amostra em 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl) estéril em Erlenmeyer de 250 mL. Os frascos foram submetidos à agitação a 150 rpm, 30 °C por 35 minutos. Em seguida, foram realizadas diluições em série até 10^{-3} . A partir de cada diluição foi transferido 0,1 mL para placas de Petri contendo 6,7 g/L YNB - YEAST NITROGEN BASE com aminoácidos e sulfato de

amônio (Difco®) + 20 g/L xilose ou 20 g/L arabinose. O inóculo foi distribuído sobre os meios com o auxílio da alça de Drigalsky. Aos meios de cultura foram adicionados os antibióticos ampicilina e ácido nalidixico na concentração de 50 mg/L.

As placas em (duplicatas) de cada amostra contendo os devidos meios e as alíquotas semeadas foram incubadas a 30 ± 2 °C por cinco dias. Posteriormente, foi realizada a contagem das colônias de leveduras, as quais foram diferenciadas pelas seguintes características morfológicas, de tamanho, cor, forma e textura. A partir de cada tipo morfológico foi selecionada uma colônia, da qual uma alçada de células foi estriada em placas com meio YM e incubadas a 30 ± 2 °C por cinco dias. As leveduras purificadas foram cultivadas em tubos de cultivo contendo meio YM sólido inclinado (*slant*) a 30 ± 2 °C por 24 horas, sendo a seguir estocadas a 3-4 °C, para posterior realização dos testes de fermentação. A Figura 1 mostra o local de coleta da palha de milho realizada no Centro de Ciências Agrárias/CCA- Campus Araras-UFSCar.



Figura 1. Local de coleta da palha de milho no CCA - Campus Araras- UFSCar

2.1.3. Isolamento de leveduras de rizosfera de cana-de-açúcar

Foram realizadas duas amostragens do solo da rizosfera da cana-de-açúcar em um canavial localizado na Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias – *campus* Araras, nos dias 16 de abril de 2010 e 05 de outubro de 2010. A amostragem foi realizada retirando-se a palha localizada na parte superior

do solo, e com a ajuda de um trado, foi coletado solo de 0 a 20 cm de profundidade. Foram coletadas 10 amostras de aproximadamente 100 g de solo cada, em áreas equidistantes dentro do talhão. Essas amostras foram colocadas em sacos plásticos esterilizados, amarrados com barbante, e armazenadas em caixas de isopor até o laboratório, onde foram peneiradas, reunidas e homogeneizadas para a formação de uma amostra composta. O solo foi armazenado a 4 °C até a análise (AZEREDO et al., 1998).

Para o isolamento das leveduras, 10 g de solo foram adicionados a 90 mL de solução salina (0,85 % NaCl), e os frascos agitados a 200 rpm por 15 minutos. Procedeu-se a diluição até 10^{-4} . A partir de cada diluição foi transferido 0,1 mL para placas de Petri contendo 6,7 g/L YNB - YEAST NITROGEN BASE com aminoácidos e sulfato de amônio (Difco®) + 20 g/L xilose ou 20 g/L arabinose. Aos meios de cultura foram adicionados os antibióticos ampicilina e ácido nalidíxico na concentração de 50 mg/L.

As placas em (duplicatas) de cada amostra foram incubadas a 30 ± 2 °C por cinco dias. No quinto dia foi realizada a contagem das colônias de leveduras obtidas. As colônias foram diferenciadas pelas características morfológicas.

A partir de cada tipo morfológico foi selecionada uma colônia da qual uma alçada de células foi estriada em meio YM e incubada a 30 ± 2 °C por cinco dias. As linhagens de leveduras purificadas foram cultivadas em tubos de cultivo contendo meio YM sólido inclinado (*slant*) a 30 ± 2 °C por 24 horas, sendo a seguir estocadas a 3-4 °C, para posterior realização dos testes de fermentação.

2.1.4. Isolamento de leveduras de caldo de cana-de-açúcar

As leveduras avaliadas pertencem ao banco de leveduras do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LAMAM, da Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Campus de Araras. As linhagens foram isoladas de caldo de diferentes variedades de cana e de diferentes partes do colmo de cana-de-açúcar em trabalho realizado por Martini (2009). Os isolados estão sendo mantidos em tubos de cultivo com o meio YPD (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 20 g/L de glicose, 20 g/L ágar) inclinado (*slant*), em geladeira a 4 °C e foram avaliados nos testes de fermentação de pentoses.

3. Testes de fermentação de pentoses

As leveduras foram testadas inicialmente quanto à habilidade em fermentar D-xilose e L-arabinose. Uma alçada de células de cada levedura isolada e purificada foi inoculada em tubo com 5 mL de meio YPD líquido e então, este foi incubado por 24 horas a 30 ± 2 °C. A partir de cada suspensão de levedura crescida em YPD, 0,1 mL foi retirado e inoculado em um tubo com 5 mL da seguinte solução basal esterilizada: 5 g/L de sulfato de amônio, 1 g/L de fosfato de potássio monobásico, 0,5 g/L de sulfato de magnésio, acrescido de 20 g/L de cada um dos açúcares (xilose ou arabinose), como única fonte de carbono, contendo tubo de Durham. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave a 120 °C por 10 minutos, a 1 atm pressão.

Os testes foram realizados em duplicatas e as leituras realizadas ao final de 10 dias. Um tubo com solução basal sem a fonte de carbono (açúcar) foi utilizado como padrão negativo em cada teste.

As leveduras que expressaram habilidade de fermentar xilose e/ou arabinose (formação de bolha no tubo de Durham, Figura 2) foram selecionadas para os testes posteriores de otimização do meio de cultura.

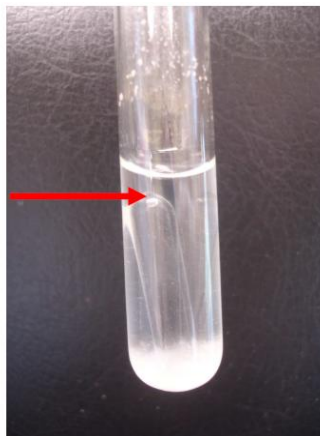


Figura 2. Levedura 311 (isolada de caldo de cana) em tubo de cultivo com meio contendo xilose como única fonte de carbono. A seta indica a bolha formada no interior do tubo de Durham.

4. Identificação da levedura selecionada

A linhagem 311, isolada de caldo de cana-de-açúcar, foi identificada por sequenciamento da região ITS e domínios D1/D2 do DNA ribossomal, após amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*). A reação PCR e o sequenciamento da região ITS foram realizados no Laboratório PANGENE – Pesquisas e Análises Genéticas, UNESP-Campus de Botucatu, sob a supervisão da Dra. Débora Colombi. A reação PCR e o sequenciamento dos domínios D1 e D2 do gene 26S foram realizados no Laboratório de Microbiologia - CEIS/Centro de Estudos de Insetos Sociais, UNESP-Campus de Rio Claro, sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca.

As sequências obtidas foram comparadas com as informações disponíveis no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por meio do programa Blast-N (ALTSCHUL et al., 1997) para verificação da identidade da linhagem sequenciada.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Isolamento e testes fermentativos de leveduras isoladas de fontes naturais

Os resultados obtidos quanto ao número de unidades formadoras de colônia por grama (UFC/g) de leveduras isoladas do bagaço da Usina Santa Lúcia e Usina São João estão representados na Figura 3. O número de leveduras que assimilaram arabinose como fonte de carbono foi semelhante à xilose; verificando-se altas contagens, permanecendo em torno de 10^6 leveduras/g de bagaço. Foram isoladas 147 culturas para testes de fermentação das pentoses, sendo 74 para arabinose e 73 para xilose. Os testes foram realizados em meio fermentativo com 20 g/L de açúcar (arabinose ou xilose), tendo sido selecionadas 11 leveduras fermentadoras de arabinose e 10 de xilose.

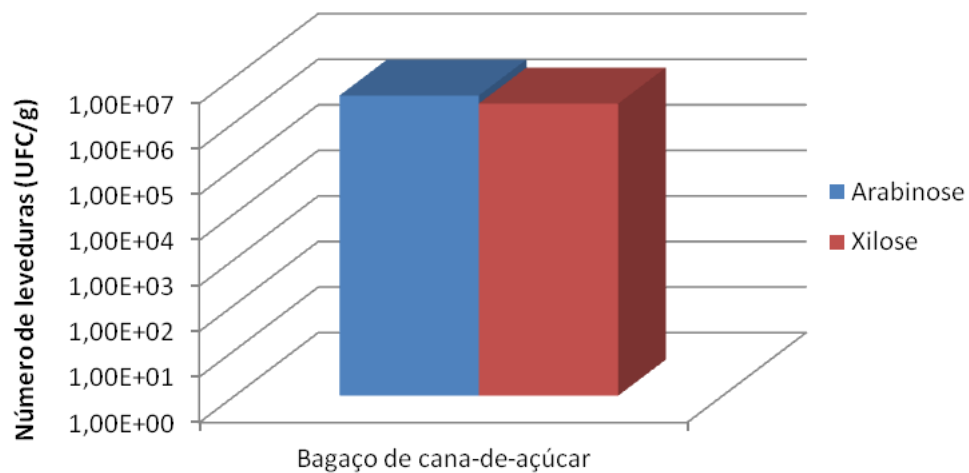


Figura 3. Número de leveduras (UFC/g) isoladas de bagaço de cana-de-açúcar utilizando meio seletivo contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono.

Foi realizado também o isolamento de linhagens de leveduras da palha de milho e da rizosfera de cana-de-açúcar. Na palha do milho os resultados demonstraram que o número de leveduras que assimilaram arabinose ou xilose como fonte de carbono foram semelhantes, em torno de 10^2 UFC/mL de leveduras (Figura 4). Destas foram isoladas 7 leveduras, sendo 4 assimiladoras de xilose e 3 de arabinose, as quais não apresentaram bolha no teste preliminar de fermentação.

O isolamento de leveduras da rizosfera de cana-de-açúcar demonstrou que o número de linhagens de leveduras que assimilaram arabinose ou xilose como fonte de carbono foi diferente entre si, em torno de 10^3 UFC/g para arabinose e 10^4 UFC/g para xilose (Figura 4). Destas foram isoladas 13 linhagens de leveduras, sendo 6 assimiladoras de arabinose e 7 de xilose. No teste preliminar de fermentação somente uma levedura apresentou resultado positivo para xilose.

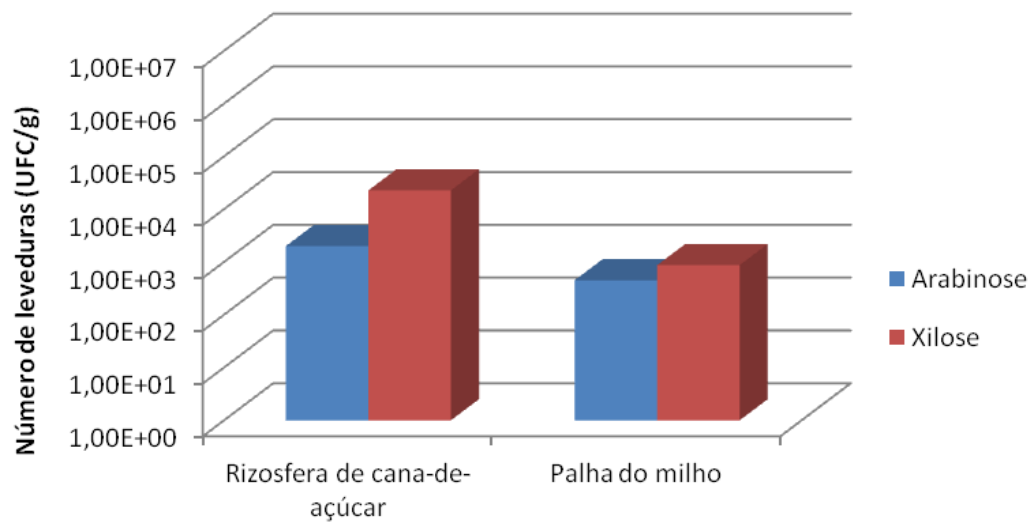


Figura 4. Número de leveduras (UFC/g) isoladas de rizosfera de bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho utilizando meio seletivo contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono.

Entre as leveduras isoladas do caldo de cana-de-açúcar testadas (183, cerca de 20% do banco de culturas) em meio líquido contendo arabinose ou xilose como únicas fontes de carbono, somente 17 (14; 311; 31; 326; 341; 381; 393; 396; 1^aC10L(B)4; 1^aC10N(B)5; 1^aC10P(N)7; 2^aC6L(3); 3^aC6L(2); 3^aC7D(6); 3^aC7L(2); 3^aC7N(1); F(N)8) apresentaram formação de bolhas no interior do tubo de Durham, 11 indicando fermentação do açúcar arabinose, 4 do açúcar xilose e 2 indicando fermentação de xilose e arabinose (14 e 311).

Rossi e Andrietta (2009) isolaram 70 linhagens de leveduras de amostras de bagaço de cana-de-açúcar utilizando três meios de cultura (WLN, YMA e Chromagar Candida) e apenas seis apresentaram capacidade fermentativa. Nenhum destes isolados foi capaz de fermentar xilose ou arabinose, sendo que um foi capaz de assimilar arabinose e dois a xilose. Esses autores obtiveram contagens de 10^5 a 10^7 UFC/g em média. Considerando-se que no presente trabalho foi utilizado meio seletivo, ou seja, contendo a pentose como única fonte de carbono, isolaram-se diretamente aquelas leveduras que assimilam estes açúcares, de forma que as contagens foram então bem superiores às encontradas por Rossi e Andrietta (2009). O número de leveduras capazes de metabolizar pentoses é grande, no

entanto, cerca de 1% somente é capaz de fermentar estes açúcares (HÄHN-HAGERDAL et al., 2007). Quanto mais leveduras capazes de assimilar xilose e arabinose forem isoladas, maiores as chances de se encontrar aquelas que fermentam as pentoses.

Em vista dos resultados obtidos para fermentação tanto de xilose quanto de arabinose, foi selecionada a linhagem 311 isolada de caldo de cana-de-açúcar para identificação e testes fermentativos posteriores.

5.2. Identificação da linhagem de levedura selecionada

Inicialmente a linhagem 311 (isolada de caldo de cana-de-açúcar) foi identificada por sequenciamento da região ITS do DNA ribossomal como *Pichia caribbica*, conforme relatório obtido no banco de dados do NCBI -National Center of Biotechnology Information (Figura 5). A espécie *Meyerozyma caribbica*, encontrada nos primeiros resultados, é sinônima de *Pichia caribbica* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005). Em seguida, a linhagem foi enviada para a UNESP-Rio Claro, sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, para amplificação e sequenciamento do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal. O relatório da análise desta sequência no NCBI está na Figura 6, que apontou as espécies *Meyerozyma guilliermondii* e *Pichia guilliermondii* com alta identidade à da linhagem aqui isolada.

Ambas as espécies, *P. caribbica* e *P. guilliermondii* fazem parte do mesmo clado genético e são indistinguíveis entre si por testes taxonômicos convencionais (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005). Nova et al. (2009) verificaram que a espécie *P. caribbica* foi a segunda levedura mais comum nos três alambiques estudados para produção de cachaça, independentemente do nível tecnológico dos mesmos, e apresentando produto de amplificação da região ITS com 600 bp. No entanto, sequenciamento do domínio D1/D2 das leveduras apresentando este ribotipo de 600 bp mostrou dois tipos de leveduras, identificadas como *P. caribbica* e *P. guilliermondii*.

Trabalho de Vaughan-Martini et al. (2005) descreveu *P. caribbica* como o estado ascospórico de *Candida fermentati* e *Candida guilliermondii* var. *carpophila* foi elevada à condição de espécie como *Candida carpophila*. Estes novos taxa, que são indistinguíveis com base nos critérios taxonômicos convencionais, diferem um

do outro e de *Pichia guilliermondii* pela baixa relação na sequência de bases de DNA, cariótipos eletroforéticos diferentes, e divergências nucleotídicas nos domínios D1/D2 da região 26S do DNA ribossomal. *P. caribbica* produz um, raramente dois, ascósporos em formato de saturno em ascos persistentes (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005).

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Genomic sequences							
JN183445.1	Meyerozyma caribbica isolate WM10.15 18S ribosomal RNA gene, par	965	965	100%	0.0	100%	
HQ909093.1	Meyerozyma caribbica strain KDLYC36-9 internal transcribed spacer	965	965	100%	0.0	100%	
HQ631010.1	Candida sp. 3 TMS-2011 voucher SC9d50p12-1 18S ribosomal RNA q	965	965	100%	0.0	100%	
HQ693781.1	Meyerozyma caribbica strain T38768-04 18S ribosomal RNA gene, pa	965	965	100%	0.0	100%	
FN428931.1	Pichia caribbica ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene (par	965	965	100%	0.0	100%	
HM044866.1	Candida sp. TCJ236 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; inter	965	965	100%	0.0	100%	
GU248264.1	Pichia caribbica strain XTWJX 18S ribosomal RNA gene, partial seque	965	965	100%	0.0	100%	
FM199963.1	Pichia caribbica 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2	965	965	100%	0.0	100%	
EU569001.1	Pichia caribbica isolate CNRMA 200700593 18S ribosomal RNA gene, i	965	965	100%	0.0	100%	
EU568913.1	Pichia caribbica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal t	965	965	100%	0.0	100%	
JQ425349.1	Meyerozyma caribbica strain AUMC 7262 18S ribosomal RNA gene, pa	961	1217	99%	0.0	100%	
JQ083436.1	Meyerozyma caribbica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; int	961	961	99%	0.0	100%	
JN255466.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-18 18S ribosomal RNA gene, parti	961	961	99%	0.0	100%	
JN255460.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-12 18S ribosomal RNA gene, parti	961	961	99%	0.0	100%	
JN255453.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-4 18S ribosomal RNA gene, partia	961	961	99%	0.0	100%	
HQ677912.1	Meyerozyma caribbica isolate NKD04 18S ribosomal RNA gene, partial	961	961	99%	0.0	100%	
JQ993381.1	Meyerozyma caribbica strain IWBT-Y836 18S ribosomal RNA gene, pa	959	959	100%	0.0	99%	
JQ760408.1	Saccharomycetes sp. genotype 371 isolate FL0737 internal transcrib	959	959	100%	0.0	99%	
JN255514.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-69 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255505.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-60 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255499.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-54 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255495.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-49 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255471.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-23 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255465.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-17 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255464.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-16 18S ribosomal RNA gene, parti	959	959	99%	0.0	100%	
JN255458.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-9 18S ribosomal RNA gene, partia	959	959	99%	0.0	100%	
JN255454.1	Meyerozyma sp. AL-V isolate AL-V-5 18S ribosomal RNA gene, partia	959	959	99%	0.0	100%	

Figura 5. Relatório obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov para a sequência de nucleotídeos da região ITS do DNA ribossomal da linhagem 311.

Sequences producing significant alignments:

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
GU373754.1	Meyerozyma guilliermondii strain PH-M16 26S ribosomal RNA gene, pa	1098	1098	100%	0.0	100%	
FJ972213.1	Pichia guilliermondii strain TY09 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1098	1098	100%	0.0	100%	
FJ432597.1	Pichia guilliermondii strain 4.2-2 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1098	1098	100%	0.0	100%	
EU833236.1	Pichia guilliermondii strain L3.1 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1098	1098	100%	0.0	100%	
DQ377634.1	Candida fermentati strain VTT C-04519 26S ribosomal RNA gene, par	1098	1098	100%	0.0	100%	
EU182216.1	Pichia guilliermondii strain Asuan 26S ribosomal RNA gene, partial seq	1098	1098	100%	0.0	100%	
EU188617.1	Pichia guilliermondii strain p 26S ribosomal RNA gene, partial sequenc	1098	1098	100%	0.0	100%	
EF063131.1	Pichia caribbica strain ACE11 26S ribosomal RNA gene, partial sequer	1098	1098	100%	0.0	100%	
AY894826.1	Candida fermentati strain EXOC5 26S ribosomal RNA gene, partial sec	1098	1098	100%	0.0	100%	
GU248265.1	Pichia caribbica strain XTWJX 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1092	1092	100%	0.0	99%	
AM159101.2	Candida sp. YS21 partial 28S rRNA gene, strain YS21	1088	1088	99%	0.0	100%	
JN544048.1	Meyerozyma caribbica strain 249 26S ribosomal RNA gene, partial ser	1086	1086	98%	0.0	100%	
DQ358868.2	Candida sp. YS47 26S ribosomal RNA gene, partial sequence	1086	1086	98%	0.0	100%	
AM159106.2	Candida sp. YS54 partial 28S rRNA gene, strain YS54	1086	1086	98%	0.0	100%	
FJ455111.1	Pichia guilliermondii strain 12-3 26S ribosomal RNA gene, partial sequ	1083	1083	99%	0.0	99%	
JQ398673.1	Meyerozyma guilliermondii strain L6D 26S ribosomal RNA gene, partial	1081	1081	98%	0.0	100%	
FM180531.1	Candida carpophila partial 26S rRNA gene, isolate H150K3	1081	1081	99%	0.0	99%	
FN398021.1	Pichia sp. MAR ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 26S rRNA gene(parti	1081	1081	100%	0.0	99%	
FJ15260.1	Pichia guilliermondii strain UN44 28S ribosomal RNA gene, partial sequ	1081	1081	100%	0.0	99%	
FJ15236.1	Pichia guilliermondii strain SN4 28S ribosomal RNA gene, partial sequ	1081	1081	100%	0.0	99%	
EU807915.1	Pichia guilliermondii strain F1004 26S ribosomal RNA gene, partial seq	1081	1081	100%	0.0	99%	
EU327094.1	Pichia guilliermondii strain TJY14a 26S ribosomal RNA gene, partial se	1081	1081	100%	0.0	99%	
AM911007.1	Pichia sp. YSF14 partial 26S rRNA gene, strain YSF14	1081	1081	100%	0.0	99%	
AM911006.1	Pichia sp. YSF8 partial 26S rRNA gene, strain YSF8	1081	1081	100%	0.0	99%	
EU177574.1	Pichia guilliermondii strain EQ 26S ribosomal RNA gene, partial sequer	1081	1081	100%	0.0	99%	
EU194461.1	Pichia guilliermondii isolate D25-1 26S ribosomal RNA gene, partial sei	1081	1081	100%	0.0	99%	
EF694600.1	Pichia guilliermondii strain H585 28S ribosomal RNA gene, partial sequ	1081	1081	100%	0.0	99%	
EF694597.1	Pichia guilliermondii strain H1020 28S ribosomal RNA gene, partial seq	1081	1081	100%	0.0	99%	

Figura 6. Relatório obtido no site www.ncbi.nlm.nih.gov para a sequência de nucleotídeos do domínio D1/D2 do gene 26S do DNA ribossomal da linhagem 311.

P. guilliermondii é amplamente distribuída na natureza, tendo sido isolada de exsudatos de várias árvores, insetos (ARAUJO et al., 1995; SIBIRNY, 1996), solo, plantas (CAPRIOTTI; RANIERI, 1964), atmosfera, água do mar (DIRIYE et al., 1993) e de alimentos processados (DIRIYE; SCORZETTI; MARTINI, 1993). Segundo Vaughan-Martini et al. (2005), estudos recentes de amostras classificadas como *P. guilliermondii* e seu anamorfo *C. guilliermondii* têm mostrado que se trata de um complexo geneticamente heterogêneo compreendendo várias taxa fenotipicamente indistinguíveis (BAI, 1996; SAN MILLA'N et al., 1997). Um deles, a recém-reintegrada espécie *C. fermentati* foi originalmente descrita como *Torula fermentati* (BAI, 1996). As comparações moleculares mostraram que as cepas formadoras de ascósporos representam o estado perfeito de *C. fermentati*. Além disso, as

comparações moleculares também mostraram que *C. guilliermondii* var. *carpophila* (MILLER; MRAK, 1953; PHAFF; MILLER, 1961), que tem sido considerada um sinônimo de *P. guilliermondii* (KURTZMAN, 1998), representa uma espécie distinta que está intimamente relacionada com ambas, *P. guilliermondii* e *C. fermentati* (VAUGHAN-MARTINI et al., 2005).

Além do trabalho anteriormente apresentado sobre o isolamento e a predominância de *P. caribbica* na fermentação para produção de cachaça (NOVA et al., 2009), verificou-se que esta espécie foi também estudada para controle da deterioração pós-colheita por *Rhizopus* em morangos (ZHAO et al., 2012). Os resultados desse estudo mostraram que a atividade antagônica de *P. caribbica* pode ser potencializada pela adição de trealose no meio, que pode oferecer grande potencial prático para reduzir as doenças de pós-colheita de morangos.

A eficiência da sacarificação química e enzimática do resíduo hemicelulósico do bagaço de *Agave tequilana* para produção de etanol por *P. caribbica* foi estudada por Luna et al. (2011). Nesse estudo, caracterizou-se a composição química do bagaço de *Agave tequilana*, que foi adicionalmente sacarificado e fermentado para produzir etanol. A levedura *P. caribbica* UM-5 foi utilizada para fermentar licores de açúcar a partir da hidrólise ácida e enzimática, gerando 8,99 g etanol/50 g de bagaço. Desta forma, o bagaço de *A. tequilana* pode ser utilizado como uma matéria-prima lignocelulósica para a produção de etanol e pode contribuir para a eliminação deste resíduo do meio ambiente.

No presente trabalho a linhagem selecionada 311 será considerada como *Meyerozyma guilliermondii*, conforme relatório gerado pela comparação de dados do sequenciamento dos domínios D1 e D2 do gene 26S, uma vez que a sequência deste gene pareceu ser capaz de distinguir entre as espécies *caribbica* e *guilliermondii* (NOVA et al., 2009).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora tenha sido testado um número considerável de linhagens de leveduras (350), a maioria tendo sido isolada de materiais lignocelulósicos a partir de meios seletivos contendo xilose ou arabinose como única fonte de carbono, somente

11 % das linhagens demonstrou capacidade de fermentação das pentoses. Dentre estas, uma linhagem com atividade de fermentação de ambas as pentoses foi identificada como *Meyerozyma guilliermondii* por biologia molecular e selecionada para os testes posteriores de otimização do meio de cultura e condições ambientais, visando a fermentação de pentoses em meios sintéticos e hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389–3402, 1997.
- ARAUJO, F. V.; SOARES, C. A.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, n.2, p.91-99, 1995.
- AZEREDO, L. A. I.; GOMES, E. A.; MENDONÇA-HAGLER, L. C.; HAGLER, A. N. Yeast communities associated with sugarcane in Campos, Rio de Janeiro, Brazil. **International Microbiology**, v.1, p.205-208, 1998.
- BAI, F.-Y. Separation of *Candida fermentati* com. nov. from *Candida guilliermondii* by DNA base composition and electrophoretic karyotyping. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, n.2, p.178–181, 1996.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v.9, p.1338-1342, 2009.
- CAPRIOTTI, A.; RANIERI, L. Yeasts in green house environment I. From soil, flowers and animals. **Archive Für Mikrobiologie**, v.48, p.325–331, 1964.
- CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; DE SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v.102, p. 4218-4225, 2011.
- DIRIYE, F. U.; GIANANTE, C.; SCORZETTI, G.; ZILLI, R. Indagine preliminare sulla ecologia dei lieviti delle acque del litorale Abruzzese. **Annale de la Faculte Agraria Perugia XLV**, p.339–345, 1993.

DIRIYE, F. U.; SCORZETTI, G.; MARTINI, A. Methods for the separation of yeast cells from the surfaces of processed, frozen foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.19, n.1, p.27–37, 1993.

DU PREEZ, J. C.; VANDER WALT, J. C. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v.5, p.357-362, 1983.

GÁRDONYI, M.; ÖSTERBERG, M.; RODRIGUES, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HÄHN-HAGERDAL, B. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.45-52, 2003.

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

HÄHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p. 937-953, 2007.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v.17, p.320-326, 2006.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v.25, p.319-326, 2007.

KURTZMAN, C.P. *Pichia* E.C. Hansen emend. Kurtzman. In: KURTZMAN, C. P.; Fell, J. W. (Ed.) **The yeasts - A taxonomic study**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1998. p.273–352

LUNA, J. S.; MONTOYA, A. J. C.; PACHECO, M. M. M.; AGUIRRE, C. R. C.; GARCIA, J. C. Efficient chemical and enzymatic saccharification of the lignocellulosic residue from *Agave tequilana* bagasse to produce ethanol by *Pichia caribbica*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.38, p.725-732, 2011.

MARTINI, C. **Avaliação dos aspectos microbiológicos do caldo de diferentes variedades e partes do colmo da cana-de-açúcar sob manejo orgânico**. 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2009.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, p.37-53, 2009.

MILLER, M. W.; MRAK, E. M. Yeasts associated with dried-fruit beetles in figs. **Applied Microbiology**, v.1, n.4, p.174–178, 1953.

NAKAMURA, N.; YAMADA, R.; KATAHIRA, S.; TANAKA, T.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Effective xylose/cellobiose co-fermentation and ethanol production by xylose-assimilating *S. cerevisiae* via expression of B-glucosidase on its cell surface.

Enzyme and Microbial Technology, v.43, p.233-236, 2008.

NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v.110, p.1232-1241, 2006.

NOVA, M. X. V.; SCHULER, A. R. P.; BRASILEIRO, B. T. R. V.; MORAIS JR, M. A. Yeast species involved in artisanal cachaça fermentation in three stills with different technological levels in Pernambuco, Brazil. **Food Microbiology**, v.26, p.460–466, 2009.

PHAFF, H. J.; MILLER, M. W. A specific microflora associated with the fig wasp, *Blastophaga psenes* Linnaeus. **Journal of Insect Pathology**, v.3, p.233–243, 1961.

ROSSI, R. A.; ANDRIETTA, M. G. S. Isolamento de leveduras de bagaço da cana-de-açúcar: propriedades em assimilação e fermentação de açúcares. In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 17., 2009, Natal. **Anais...** Natal: SINAIFERM, 2009.

SAN MILLA'N, R. M.; WU, L. C. ; SALKIN, I. F.; LEHMANN, P. F. Clinical isolates of *Candida guilliermondii* include *Candida fermentati*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.47, n.2, p.385–393, 1997.

SIBIRNY, A. A. *Pichia guilliermondii*. In: Wolf, K. (Ed.) **Nonconventional yeasts in biotechnology. A Handbook**. Berlin: Springer, 1996. p.255-275

SKOOG, K.; HÄHN-HAGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, p.66–80, 1988.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C.; FLOREZ-PRADO, M. L.; SOUTO-MAIOR, A.; BON, E. P. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v.67, p.918-926, 2008.

STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.105-108, p.255-263, 2003.

TAVARES, J. M.; DUARTE, L. C.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; GÍRIO, F. M. The influence of hexose addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v.26, p.743-747, 2000.

VAUGHAN-MARTINI, A.; KURTZMAN, C. P.; MEYER, S. A.; O'NEILL, E. B. Two new species in the *Pichia guilliermondii* clade: *Pichia caribbica* sp. nov., the ascosporic state of *Candida fermentati*, and *Candida cacophila* comb. nov. **FEMS Yeast Research**, v.5, p.463-469, 2005.

ZHAO, L.; ZHANG, H.; LI, J. ; CUI, J. ; ZHANG, X.; REN, X. Enhancement of biocontrol efficacy of *Pichia caribbica* to postharvest diseases of strawberries by addition of trehalose to the growth medium. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, p.3916-3932, 2012.

Capítulo 3

**AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO E FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM DE
LEVEDURA *Meyerozyma guilliermondii* EM MEIOS SINTÉTICOS CONTENDO
XILOSE E ARABINOSE COMO ÚNICAS FONTES DE CARBONO EM
DIFERENTES CONDIÇÕES AMBIENTAIS**

RESUMO

A composição do meio e as condições de cultivo exercem um efeito pronunciado sobre a fermentação da xilose, dependendo do micro-organismo/linhagem utilizada. Uma linhagem de levedura isolada de caldo de cana-de-açúcar e identificada como *Meyerozyma guilliermondii* foi avaliada quanto à habilidade de crescimento e fermentação de pentoses utilizando meio sintéticos em diferentes condições ambientais. Os ensaios foram realizados para avaliar a influência da fonte de carbono (glicose, xilose ou arabinose), pH (3,5; 4,5; 5,5) e temperatura (30 °C, 35 °C, 40 °C) sobre o crescimento da levedura; e a influência do pH (4,5; 5,5) e temperatura (30 °C, 35 °C) sobre a fermentação de xilose em concentrações variando de 40 g/L a 100 g/L. A variação nos valores de pH e temperatura não resultou em diferenças na velocidade específica de crescimento de *M. guilliermondii* quando crescida em 20 g/L de arabinose, xilose ou glicose. Nos ensaios fermentativos, o aumento na concentração de xilose (40 g/L para 100 g/L) não contribuiu para o aumento na produção de álcool. Um máximo de 1,5 g/L de álcool foi produzido a partir de 40 g/L de xilose a 30 °C, pH 5,5, em 96 horas de fermentação. Os resultados também revelaram que a linhagem de levedura utilizada foi capaz de crescer em temperaturas de 35 °C – 40 °C e pH de 3,5 – 4,5, o que a torna apropriada para aplicação industrial.

Palavras-chave: pentoses, etanol de segunda geração, crescimento, fermentação.

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais usado na fermentação etanólica devido à sua capacidade de crescer tanto em açúcares simples como em dissacarídeos, porém, não fermenta pentoses (KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009). Linhagens naturais de leveduras fermentadoras de xilose como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Kluyveromyces marxianus* são as mais exaustivamente estudadas e os organismos fermentadores de xilose mais eficientes (OLSSON; HÄHN-HAGERDAL, 1996; LALUCE et al., 2012). Elevados rendimentos de etanol a partir de pentoses são ainda um desafio, além do fato de que a levedura deve tolerar os inibidores liberados durante o processo de hidrólise do substrato (CHANDEL et al., 2011). Neste contexto, a pesquisa de leveduras nativas que fermentam açúcares de hidrolisados hemicelulósicos deve ser estimulada, assim como a utilização de técnicas de biologia molecular moderna para obter linhagens modificadas que possam fermentar pentoses e serem capazes de suportar os inibidores da fermentação.

Cadete et al. (2012) isolaram novas linhagens de leveduras fermentadoras de D-xilose da Floresta Amazônica Brasileira para produção de etanol ou xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Entre as novas espécies testadas, *Spathaspora passalidarum* apresentou os maiores rendimentos de etanol (0,31 g/g a 0,37 g/g) e produtividades (0,62 g/L.h a 0,75 g/L.h). Rao; BHADDRA; SHIVAJI (2008) isolaram linhagens de leveduras produtoras de etanol a partir de xilose de uma variedade de frutas deterioradas e cascas de árvores. Linhagens de *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Issatchenkia*, *Zygosaccharomyces*, entre outras, foram capazes de assimilar xilose e produzir 0,12 - 0,38 g de etanol por grama de xilose.

Meyerozyma guilliermondii é uma levedura amplamente distribuída nos ambientes, tendo sido isolada de árvores e exsudatos de insetos (ARAUJO et al., 1995; SIBIRNY, 1996), solo, plantas (CAPRIOTTI; RANIERI, 1964), atmosfera, água do mar, alimentos processados (DIRIYE et al., 1993), madeira podre (CADETE et al.,

2012) e suco de laranja deteriorado (GUO; DAI; ZHOU, 2012). Linhagens de *M. guilliermondii* tem demonstrado atividades antifúngica (LIMA et al., 2012; CODA et al., 2013) e de solubilização de fosfato (NAKAYAN et al., 2013) e são relatadas como boas produtoras de etanol a partir de xilose (SREENATH; JEFFRIES, 2000; RAO et al., 2004).

Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do pH e temperatura sobre o crescimento e fermentação de uma linhagem de levedura isolada do caldo de cana-de-açúcar e identificada como *Meyerozyma guilliermondii*, usando meio sintético com xilose e arabinose como únicas fontes de carbono, visando a utilização dessa linhagem em hidrolisados hemicelulósicos para produção de etanol de segunda geração.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Inóculo

A linhagem de *Meyerozyma guilliermondii* (denominada 311) foi isolada a partir de caldo de cana-de-açúcar (MARTINI, 2009) e inicialmente avaliada quanto à fermentação de pentoses pela produção de gás no tubo de Durham em meio contendo xilose e arabinose como fontes únicas de carbono. A linhagem foi identificada por meio da amplificação e sequenciamento dos domínios D1/D2 do gene 26S e da região ITS do DNA ribossomal. Os procedimentos quanto ao isolamento e identificação estão descritos no Capítulo 1. O isolado está sendo mantido em YPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L de glicose, 20 g/L de peptona, 20 g/L de ágar) em *slant* inclinado, a 4 °C.

2.2. Metodologia dos testes de crescimento e fermentação

2.2.1. Caracterização do crescimento de *M. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono, valores iniciais de pH e de temperaturas em meio sintético

O inóculo foi preparado por meio da inoculação de duas alçadas de células em 10 mL de meio de cultura YPD e incubando a 30 °C, por 12 horas (*overnight*) sob agitação de 160 rpm. Em seguida as células da levedura foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85 %), centrifugadas e diluídas até uma absorbância de 0,5 (a 600 nm). O meio de crescimento consistiu em 6,7 g/L de *YNB - YEAST NITROGEN BASE* com aminoácidos e sulfato de amônio (Difco®), e glicose ou arabinose ou xilose a 20 g/L de concentração final, em frascos do tipo erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de volume final e 10 % de inóculo (v/v). O pH inicial do meio de crescimento foi ajustado a 3,5, 4,5 ou 5,5 com HCl 1 mol/L. Os frascos foram incubados a 30, 35 ou 40 °C em um agitador a 150 rpm por 72 horas. Foram retiradas amostras a cada 12 horas para análises.

2.2.2. Caracterização da fermentação de *M. guilliermondii* em diferentes concentrações de xilose, valores iniciais de pH e temperaturas em meio sintético

O inóculo foi preparado por meio da inoculação de duas alçadas de células em 10 mL de caldo YPD e incubando por 12 horas (*overnight*) a 30 °C, sob agitação de 160 rpm. Em seguida as células de levedura foram lavadas com solução salina (NaCl 0,85 %), centrifugadas e adicionadas ao meio de cultura YPD para um novo ciclo de crescimento. Os procedimentos foram repetidos até uma concentração de 6 g/L de biomassa ser alcançada. O meio de fermentação consistiu de 5 g/L de fosfato hidrogenado de potássio, 1 g/L de cloreto de potássio, 1,5 g/L de cloreto de amônio, 1 g/L de sulfato de magnésio hepta-hidratado, 6 g/L de extrato de levedura e xilose como única fonte de carbono nas concentrações de 40; 60; 80 e 100 g/L, em frascos do tipo erlenmeyers de 500 mL com 200 mL de volume final e 10 % de inóculo (v/v). O pH inicial do meio de fermentação foi ajustado para 4,5 ou 5,5 com

HCl 1 mol/L. Os frascos foram incubados a 30 ou 35 °C em um agitador a 150 rpm por 120 horas. Foram retiradas amostras a cada 24 horas para análises.

2.3. Parâmetros analisados

A biomassa (g/L) foi determinada pela conversão dos valores de absorbância obtidos a 600 nm em um espectrofotômetro Bio-Mate® utilizando uma curva padrão de absorbância X biomassa seca (massa celular seca a 105 °C até peso constante). A velocidade específica de crescimento máxima (μ , em h^{-1}) foi determinada para cada combinação dos tratamentos (fonte de carbono X valores iniciais de pH X temperaturas de incubação) na região linear da curva de crescimento semilogarítmica. Nas amostras livres de células (centrifugadas a 4.000 rpm durante 5 minutos), o pH foi determinado em um medidor de pH digital; açúcares redutores, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), utilizando curvas padrões de xilose, arabinose e glicose, dependendo do meio de cultura utilizado; e a produção de álcool, após a destilação das amostras e determinação da concentração de álcool em um densímetro digital *Anton-Paar*.

Para avaliação estatística dos dados foram gerados Diagramas de Pareto visando a estimativa dos efeitos das variáveis nas velocidades específicas de crescimento máximas, ao nível de 5% de significância.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A linhagem de *M. guilliermondii* foi selecionada com base no resultado de produção de gás a partir de xilose e arabinose em tubo de cultivo com tubo de Durham, conforme descrito no Capítulo 2, e por esta razão foi então avaliada quanto a capacidade de crescimento e fermentação em meio sintético à base de pentoses em diferentes pH e temperaturas de incubação. O objetivo foi verificar o potencial desta levedura para uso em aplicações industriais visando o etanol de segunda geração.

À temperatura de 30 °C, verificou-se um efeito do pH do meio de cultura sobre o crescimento em diferentes fontes de carbono, pois em pH 3,5 o melhor

desempenho em produção de biomassa foi alcançado em meio com glicose, enquanto em pH 4,5 não há diferença entre glicose e xilose, e em pH 5,5 não há diferença entre as fontes de carbono. O pH final do meio de cultura apresentou pouca variação independentemente da fonte de carbono e pH inicial do meio. Houve sobra de açúcar redutor no meio de cultura em todos os experimentos, dentro do período de 72 horas de cultivo (Figura 1).

A 35 °C, o comportamento da linhagem de *M. guilliermondii* foi muito semelhante àquele apresentado a 30 °C, ou seja, mostrando crescimento mais expressivo em meio com arabinose em pH mais alto (pH 5,5). Em pH 3,5 ou 4,5, tanto a xilose quanto a glicose foram consumidas para produção de biomassa (Figura 2).

A 40 °C, o crescimento da levedura em meio com arabinose foi menor que em meio com glicose ou xilose, em quaisquer dos valores de pH avaliados. As curvas de crescimento em glicose e xilose não diferiram muito entre si. Embora a levedura tenha apresentado produção de biomassa menor em meio com arabinose, o consumo deste açúcar foi alto, comparado com o consumo de xilose e glicose, o que pode indicar a utilização da fonte de carbono para outras finalidades que não a de crescimento (Figura 3).

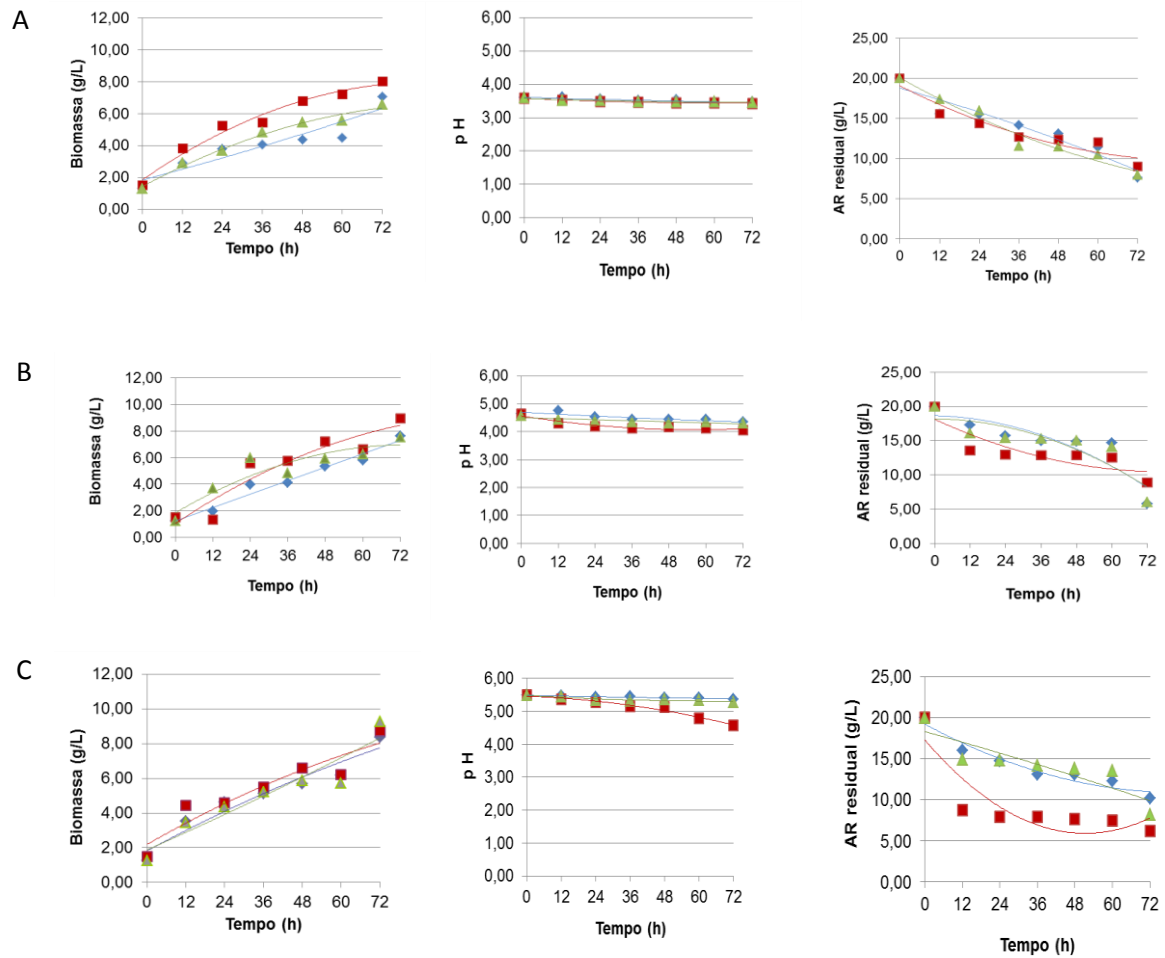


Figura 1. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do meio de crescimento cultivado com *M. guilliermondii*, a 30 °C, 150 rpm de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde= meio com xilose.

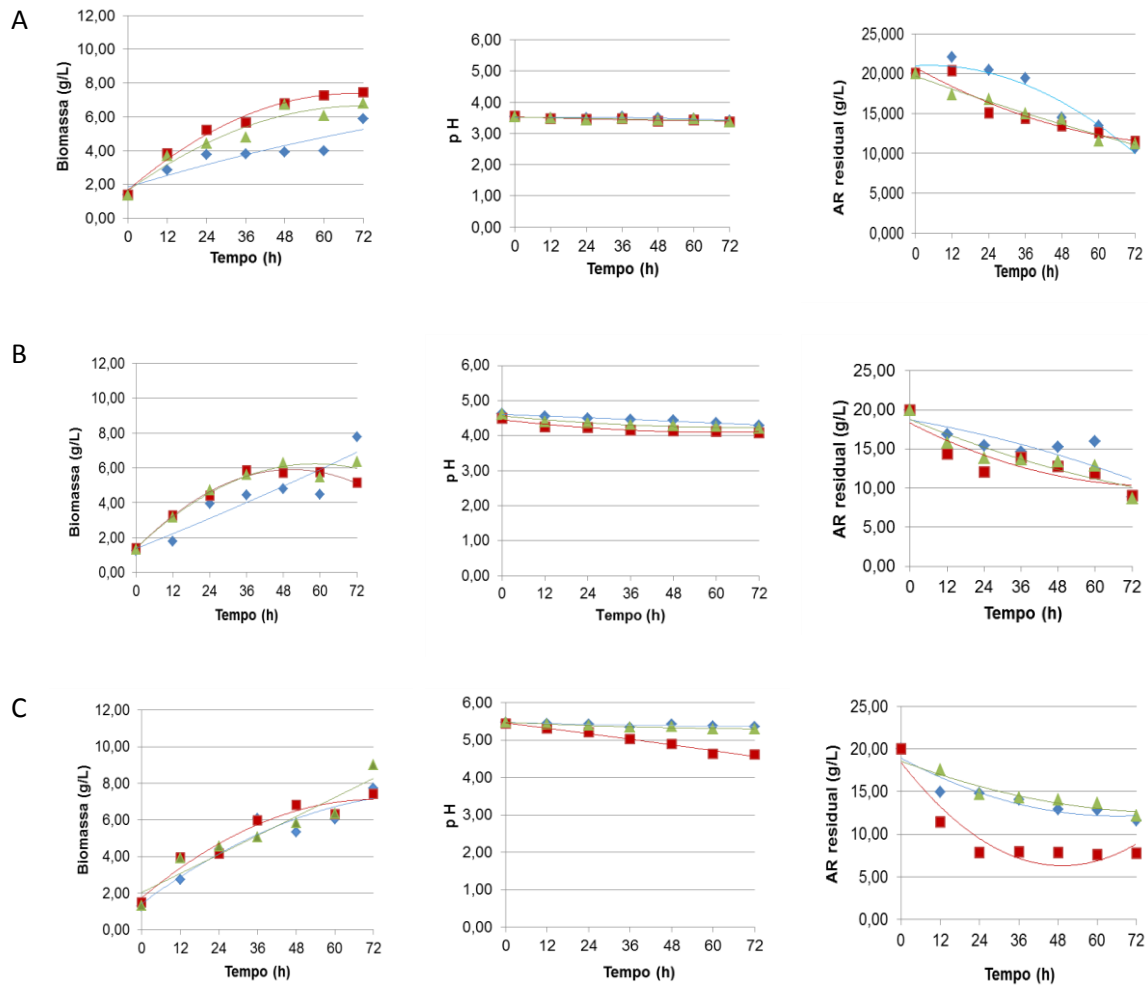


Figura 2. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do meio de crescimento cultivado com *M. guilliermondii*, a 35 °C, 150 rpm de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde= meio com xilose.

Embora tenham sido observadas diferenças no crescimento da levedura em decorrência da fonte de carbono utilizada, do pH inicial do meio de cultura e da temperatura de incubação, não houve efeito significativo destes parâmetros sobre a velocidade específica de crescimento (μ) da levedura. O diagrama de Pareto foi utilizado para representar os efeitos estimados do pH e da temperatura sobre o crescimento desta levedura em cada fonte de carbono. No intervalo dos valores utilizados, o pH inicial (3,5, 4,5 ou 5,5) ou temperatura de incubação (30 °C, 35 °C ou 40 °C) não apresentaram influência estatística ao nível de 5% de significância sobre a velocidade específica de crescimento (Tabela 1, Figura 4), apesar das diferenças

observadas nos valores das velocidades específicas de crescimento (variando de 0,006 a 0,028).

Fonseca; Spencer-Martins; Hahn-Hägerdal (2007) verificaram que uma linhagem de *Pichia guilliermondii* cresceu vigorosamente nas três fontes de carbono (glicose, arabinose e xilose) em culturas aeróbias, porém, os valores de μ foram cerca de dez vezes superiores, a 30 °C e 140 rpm de agitação. Os resultados aqui encontrados também mostraram que a linhagem de levedura é capaz de crescer em temperaturas elevadas como 35 °C – 40 °C e pH baixo como 3,5 - 4,5, tornando essa linhagem apropriada para a aplicação industrial.

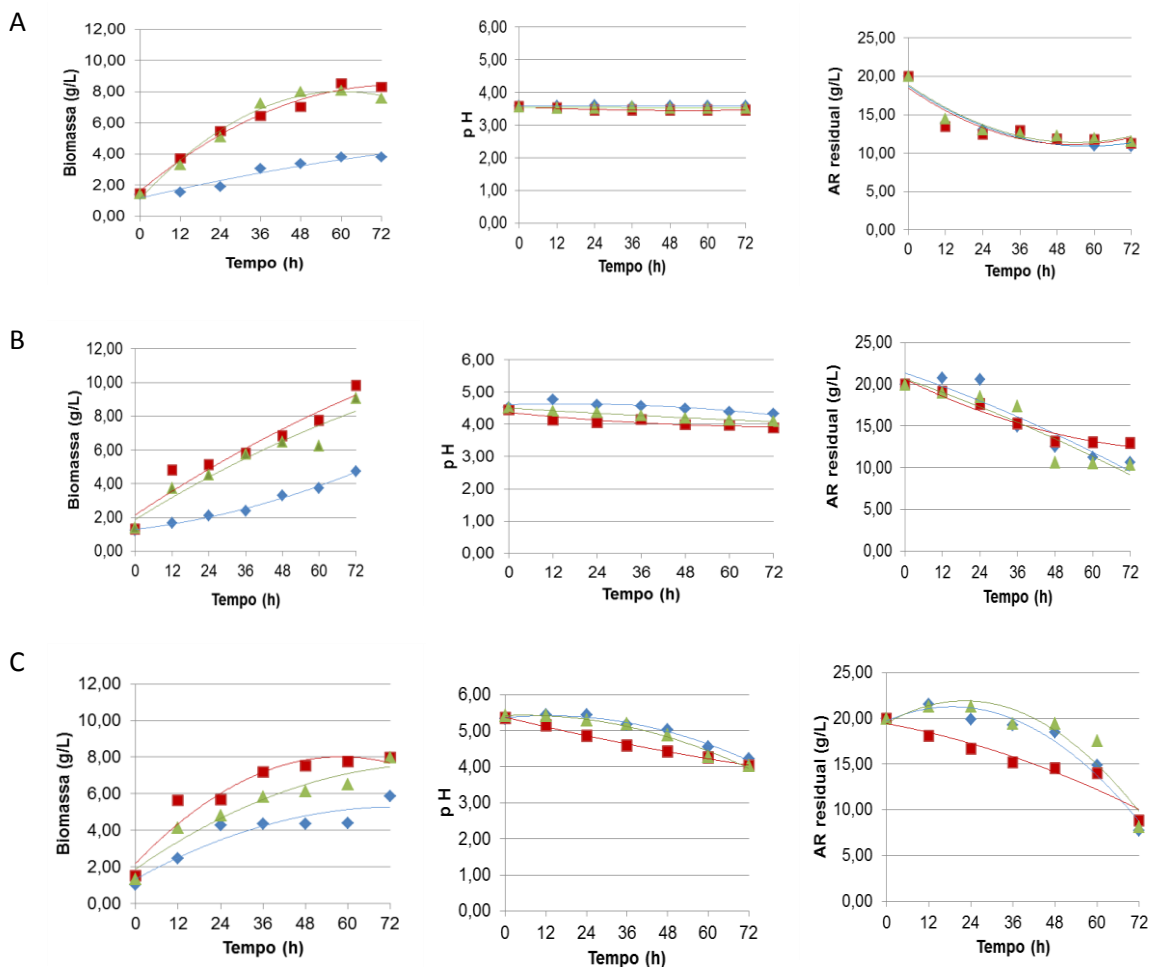


Figura 3. Biomassa (g/L), açúcar redutor residual (g/L) e pH final do meio de crescimento cultivado com *M. guilliermondii*, a 40 °C, 150 rpm de agitação, pH inicial 3,5 (A), 4,5 (B) e 5,5 (C). Legenda: em vermelho= meio com glicose; em azul= meio com arabinose; em verde= meio com xilose.

Tabela 1. Valores de velocidade específica de crescimento máxima (μ , em h^{-1}) de *M. guilliermondii* crescendo em meio sintético com arabinose, xilose ou glicose (20 g/L) como única fonte de carbono, em diferentes valores de pH inicial e temperaturas de incubação, durante 72 horas, sob agitação de 150 rpm.

		Velocidade específica de crescimento		
		$(\mu, \text{em h}^{-1})$		
Açúcar	pH inicial	Temperatura		
		30 °C	35 °C	40 °C
Arabinose	3,5	0,013	0,016	0,018
	4,5	0,025	0,025	0,018
	5,5	0,012	0,021	0,020
Glicose	3,5	0,011	0,010	0,015
	4,5	0,024	0,028	0,011
	5,5	0,012	0,011	0,006
Xilose	3,5	0,013	0,009	0,018
	4,5	0,012	0,018	0,014
	5,5	0,015	0,012	0,010

Considerando os resultados acima, foram realizados testes de fermentação em concentrações crescentes de xilose (40 g/L a 100 g/L), a 30 °C e 35 °C, e valores de pH inicial de 4,5 e 5,5, em meio sintético. Os resultados estão representados nas Figuras 5 a 8.

O aumento da concentração de xilose não proporcionou maior produção de álcool, não variando consideravelmente (1,0 - 1,5 g/L), independentemente da condição de temperatura e pH utilizado. No entanto, em pH 4,5 a 35 °C, o consumo de xilose foi maior em qualquer concentração de xilose comparando-se com os outros tratamentos de temperatura e de pH, mas não houve um aumento na formação de biomassa. Considerando-se a eficiência da conversão de açúcares em etanol, cerca de 10 % foram obtidos em condições de 40 g/L de xilose, a 30 °C, pH 5,5 em 120 horas de fermentação.

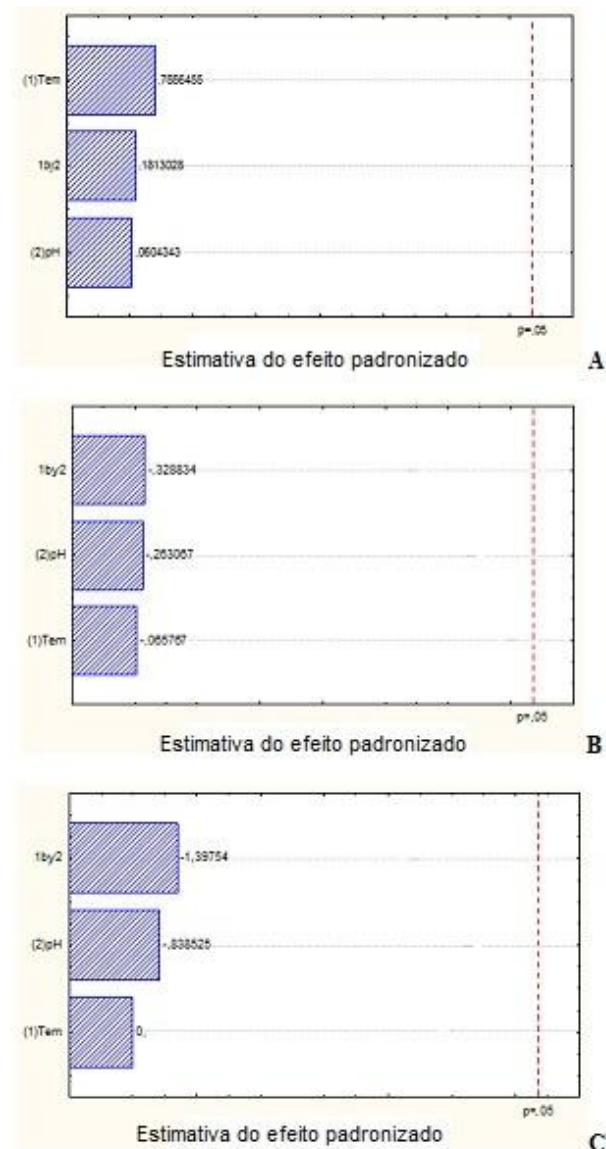


Figura 4. Diagrama de Pareto para estimar os efeitos da temperatura (fator 1) e do pH inicial (fator 2) sobre a velocidade específica de crescimento máxima de *M. guilliermondii* crescendo em meio sintético com arabinose (A), glicose (B) ou xilose (C) a 20 g/L.

Altas reduções de xilose (60 a 98 %) foram observadas com 40 g/L e 60 g/L de xilose em qualquer condição de pH e temperatura. Considerando que a produção de álcool foi baixa, a xilose consumida foi direcionada para a formação de biomassa, a qual foi elevada (produção maior que 20 g/L de biomassa).

A composição do meio e as condições de cultivo exercem um efeito pronunciado sobre a fermentação da xilose, dependendo do micro-organismo/linhagem utilizada. Além disso, a aeração é considerada o fator de maior importância que afeta a fermentação de xilose pelas leveduras (DU PREEZ, 1994).

Silva et al. (2011) verificaram que o aumento da agitação e da aeração diminuiu a produção de etanol por *Pichia stipitis*, sendo que a maior concentração de etanol (26,7 g/L) foi atingida em 250 rpm de agitação e aeração de 0,25 vvm.

Neste trabalho, foi utilizada uma incubadora com agitação de 150 rpm para os frascos erlenmeyers e provavelmente não foi forte o suficiente para produzir uma boa oxigenação. Como consequência, a produção de etanol foi muito baixa.

Cadete et al. (2012) apresentaram rendimentos de etanol elevados (3,1 a 18 g/L), mas o meio de fermentação consistia em 50 g/L de xilose, suplementado com extrato de levedura e peptona (10 e 20 g/L, respectivamente) em frascos agitados a 200 rpm, enquanto nos experimentos aqui realizados foi utilizado meio sintético (sais de fósforo, potássio, magnésio e nitrogênio) com xilose e suplementado com 6 g/L de extrato de levedura, a 150 rpm de agitação.

Silva et al. (2011) utilizaram um meio misto (90 g/L de xilose, 15 g/L de arabinose e 15 g/L de glicose) suplementado com uréia (2,3 g/L), sulfato de magnésio (1 g/L) e extrato de levedura (3 g/L), na obtenção de elevados rendimentos de etanol por *P. stipitis*. Com leveduras isoladas a partir de uma grande variedade de frutos apodrecidos e cascas de árvores, Rao; Bhaddra; Shivaji (2008) obtiveram produção de etanol dez vezes mais elevada a partir de 40 g/L de xilose, no entanto, o meio foi suplementado com extrato de levedura (5 g/L), peptona (20 g/L), sais de potássio, nitrogênio e magnésio, a 150 rpm de agitação. Silva et al. (2012) verificaram que a adição simultânea de uréia, sulfato de magnésio e extrato de levedura no meio de fermentação mostrou-se importante para a produção de etanol, diminuindo a conversão de substrato para massa celular.

A concentração inicial de células utilizada em nossos experimentos (6 g/L) foi maior do que aquelas realizadas por Cadete et al. (2012), Silva et al. (2011) e Agbogbo et al. (2006), os quais utilizaram 0,5, 1 e 2 g/L, respectivamente. Este é um parâmetro importante a ser padronizado para a fermentação das pentoses, pois para *Saccharomyces cerevisiae* em caldo de cana-de-açúcar, são exigidas altas concentrações de células para iniciar a fermentação (10-15 % p/v) (AMORIM et al., 2011).

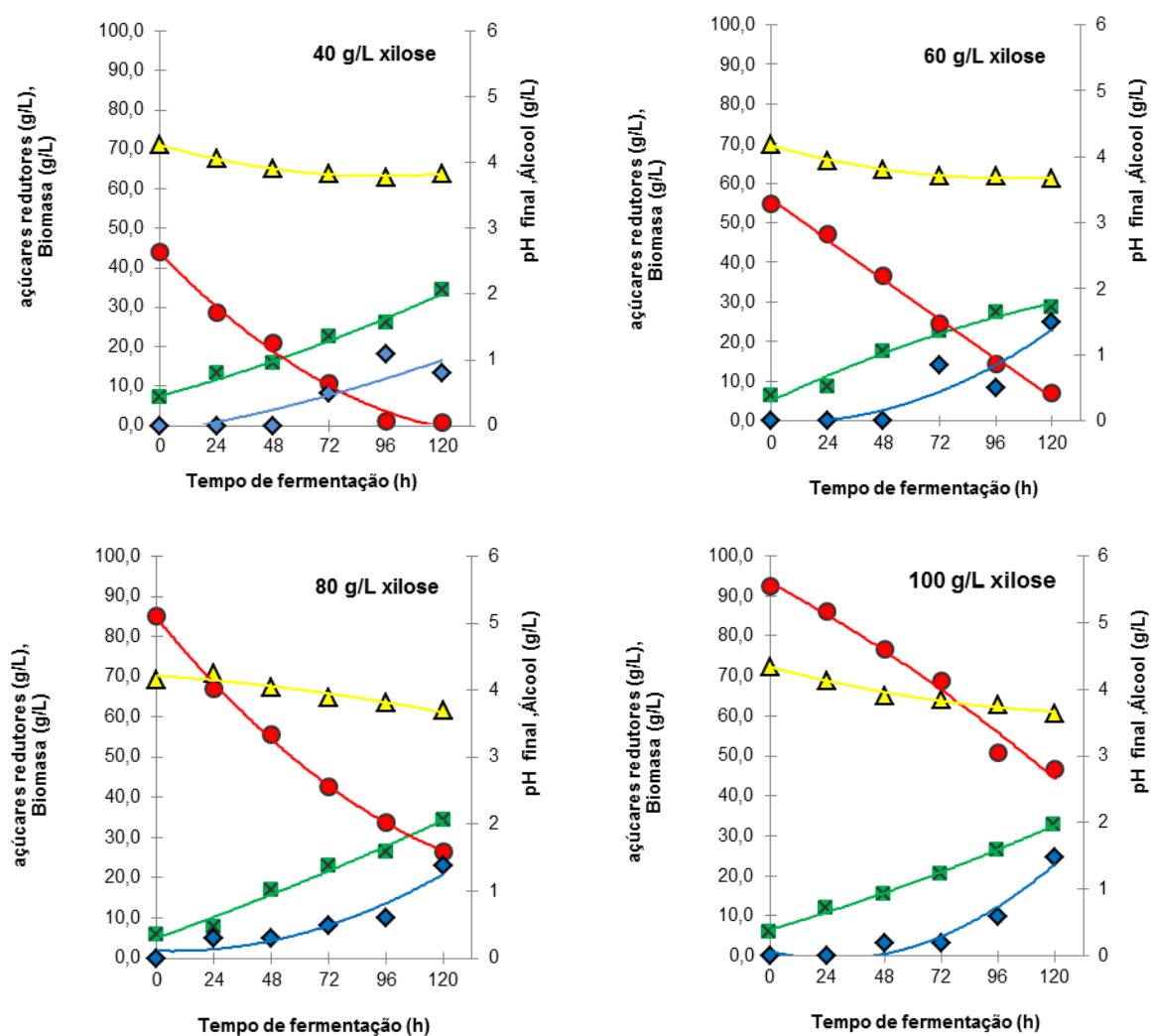


Figura 5. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo xilose como única fonte de carbono, a 30 °C, pH 4,5, a 150 rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L), ◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

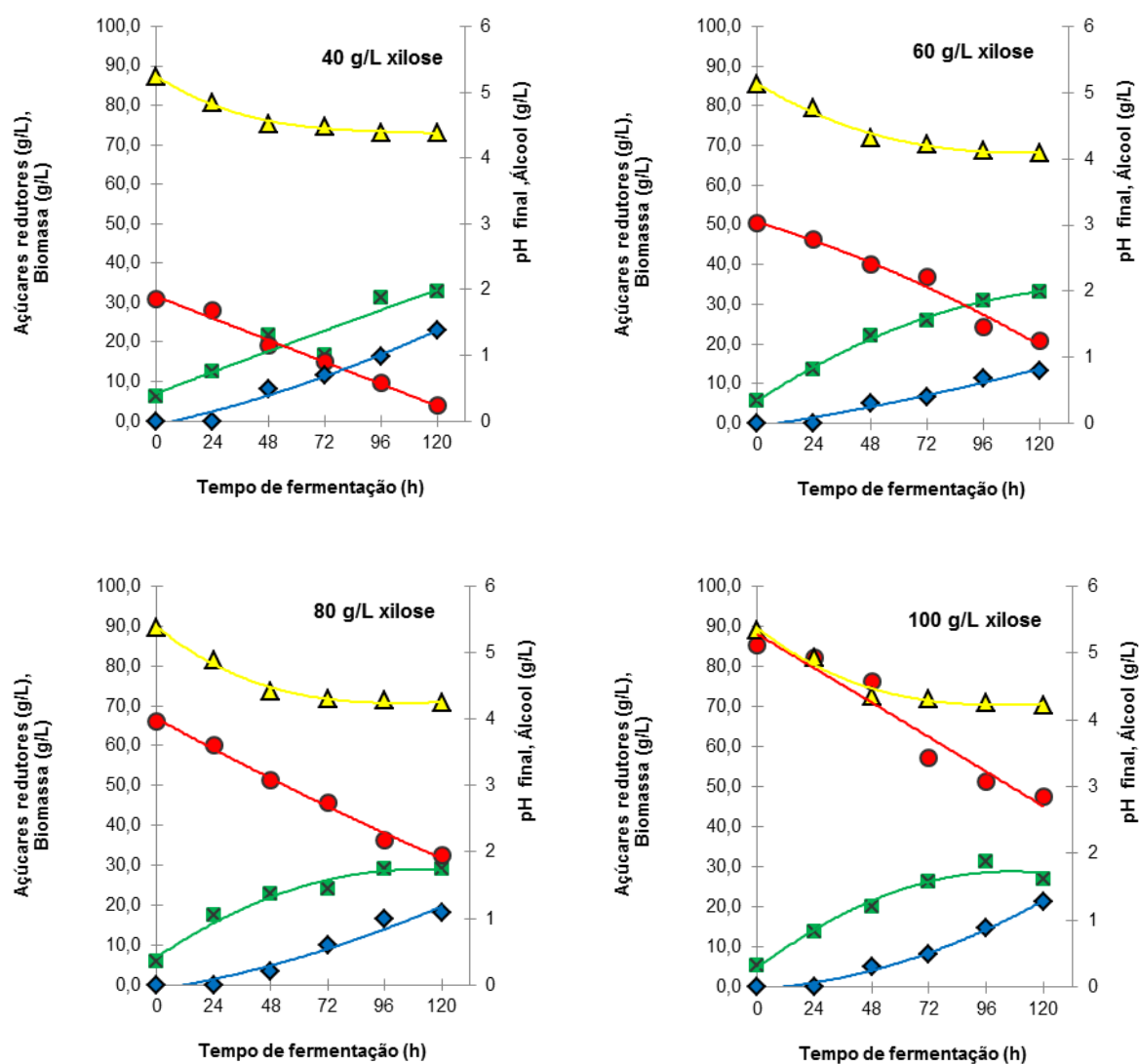


Figura 6. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo xilose como única fonte de carbono, a 30 °C, pH 5,5, a 150 rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L), ◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

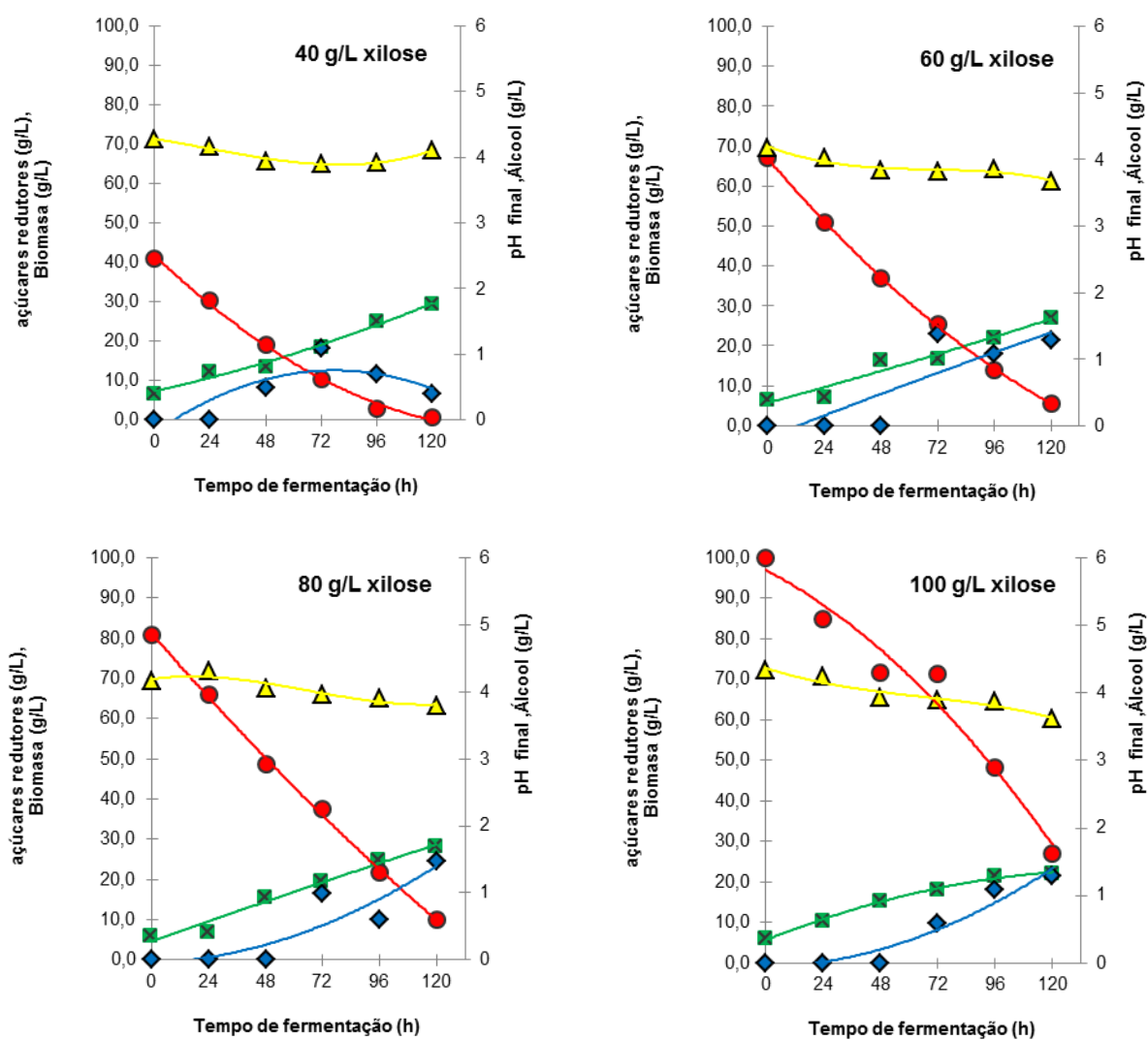


Figura 7. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo xilose como única fonte de carbono, a 35 °C, pH 4,5, a 150 rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L), ◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

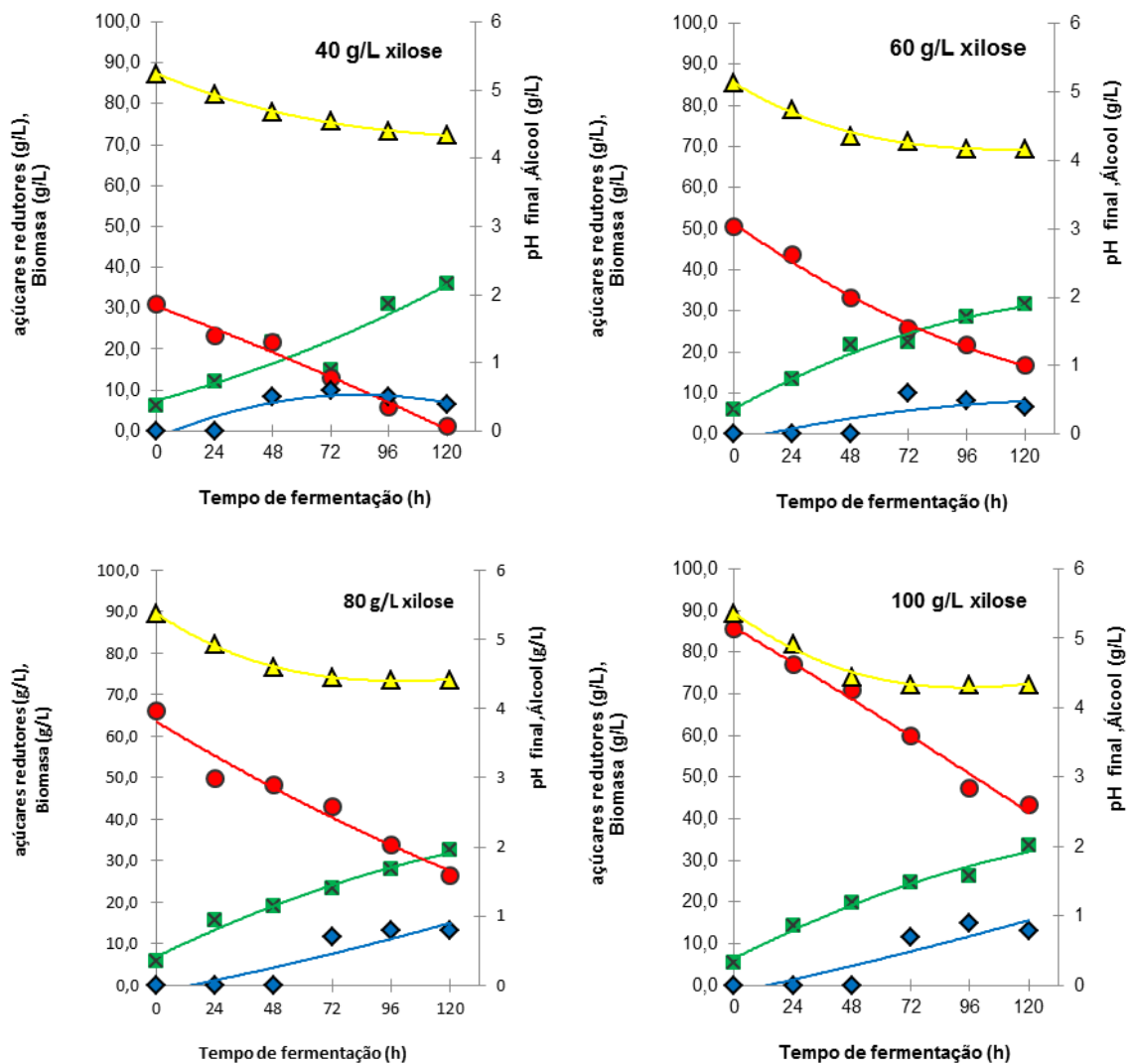


Figura 8. Testes de fermentação de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo xilose como única fonte de carbono, a 35 °C, pH 5,5, a 150 rpm. Legenda: ● açúcar redutor residual (g/L), ■ biomassa (g/L), ◆ álcool (g/L), ▲ pH final.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora a linhagem de *Meyerozyma guilliermondii* tenha apresentado capacidade de crescimento e fermentação de pentoses sob várias condições ambientais, a produção de álcool ainda é considerada baixa no meio de cultura utilizado. O aumento na concentração de xilose não resultou em maior produção de etanol, justificando a escolha da concentração de 40 g/L de xilose, pH 5,5, temperatura de 30 °C, como condições estabelecidas para a fermentação de hidrolisados ácidos de bagaço de cana.

5. REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v.4, p.2333-2336, 2006.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. C.; BUCKERIDGE, M. S. GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 91, p.1267-1275, 2011.
- ARAUJO, F. V.; SOARES, C. A.; HAGLER, A. N.; MENDONÇA-HAGLER, L. C. Ascomycetous yeast communities of marine invertebrates in a southeast Brazilian mangrove ecosystem. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.68, p.91-99, 1995.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. Diversity and physiological characterization of D-xylose- fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLoS One**, v.7, p.1-11, 2012.
- CAPRIOTTI, A.; RANIERI L. Yeasts in green house environment I. From soil, flowers and animals. **Archive Für Mikrobiologie**, v.48, p.325-331,1964.
- CHANDEL, K. A.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentoses sugar into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v.6, p.8-20, 2011.
- CODA, R.; RIZZELLO, C. G.; DI CAGNO, R.; TRANI, A.; CARDINALI, G. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: Identification of activity compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. **Food Microbiology**, v.33, p.243-251, 2013.
- DIRIYE, F. U.; GIANANTE, C.; SCORZETTI, G.; ZILLI, R. Indagine preliminare sulla ecologia dei lieviti delle acque del litorale Abruzzese. **Annale de la Faculte Agraria Perugia XLV**, p.339–345, 1993.
- DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microbial Technology** , v.16, p.944-956, 1994.
- FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; HÄHN-HAGERDAL, B. L-arabinose metabolism in *Candida arabinofementans* PYCC 5603^T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.75, n. 303-310, 2007.
- GUO, D.; DAI, M. L.; ZHOU, Z. P. Molecular identification and morphological analysis of yeast in spoiled orange juice. **Food Science**, v.9, p.131-137, 2012.
- KUMAR, A.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Bioconversion of lignocelulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicelulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v.100, p. 3293-3297, 2009.

LALUCE, C.; SCHENBERG, A. C. G.; GALLARDO, J. C. M.; CORADELLO, L. F. C.; POMBEIRO-SPONCHIADO, S. R. Advances and developments in strategies to improve strains of *Saccharomyces cerevisiae* and processes to obtain the lignocellulosic ethanol – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.166, p.1908-1926, 2012.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. R. B.; BRANDÃO, L. R.; ROSA, C. A.; VIANA, F. M. P. Isolation, identification and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. **Journal of Basic Microbiology**, v.52, p.1-10, 2012.

MARTINI, C. **Avaliação dos aspectos microbiológicos do caldo de diferentes variedades e partes do colmo da cana-de-açúcar sob manejo orgânico**. 2009. 79p. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2009.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

NAKAYAN, P.; HAMEED, A.; SINGH, S.; YOUNG, L. S.; HUNG, M. H; YOUNG, C. C. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. **Plant Soil**, v.373, n.1-2, p.301-315, 2013.

OLSSON, L.; HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microbial Technology**, v.18, p.312-331, 1996.

RAO, R. S.; BHADDRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol producing yeast from fruits and tree barks. **Letters in Applied Microbiology**, n.47, p.19-24, 2008.

RAO, R. S.; PRAKASHAM, R.S.; PRASAD, K. K.; RAJESHAM, S.; SARMA, P. N.; VENKATESWAR, R. L. Xylitol production by *Candida sp*: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry**, v.39, p.951-956, 2004.

SIBIRNY, A. *Pichia guilliermondii*. In: Wolf, K. (Ed.) **Nonconventional yeasts in biotechnology**. Berlin:Springer-Verlag, 1996. p.255-275.

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

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

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

Capítulo 4

CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR OBTIDO POR HIDRÓLISE ÁCIDA

RESUMO

A utilização de resíduos lignocelulósicos para produção de etanol de segunda geração requer uma etapa de hidrólise para a despolimerização da fração hemicelulósica. Os ácidos tem sido utilizados frequentemente para este fim devido ao seu baixo custo e alta eficiência. No entanto, inibidores podem também ser liberados juntamente com os açúcares, ocasionando inibição da atividade fermentativa das leveduras. No presente trabalho, o objetivo foi a obtenção e caracterização de hidrolisado ácido de cana-de-açúcar quanto aos açúcares e inibidores presentes, analisando os hidrolisados obtidos logo após a hidrólise, após a concentração por evaporação para atingir 40 g/L de açúcares redutores, e após a detoxificação do hidrolisado concentrado. Os resultados mostraram que a xilose foi o açúcar liberado em maior quantidade, seguida por arabinose e glicose. A concentração do hidrolisado por evaporação resultou em uma diminuição significativa do teor de furfural, um importante inibidor da fermentação, no entanto, os demais inibidores e os açúcares apresentaram aumento na concentração, como esperado. A detoxificação realizada por aumento do pH e adição de carvão ativado resultou em redução expressiva na concentração dos inibidores, com perda de 8 % na concentração de glicose, enquanto para a xilose e arabinose houve perda de 10,5 % e 32 %, respectivamente.

Palavras-chave: hidrolisado, bagaço de cana-de-açúcar, inibidores, arabinose, xilose e glicose.

1. INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos também podem ser convertidos em etanol, pois são ricos em celulose e hemicelulose, porém com uma dificuldade muito maior que as conversões de materiais ricos em açúcar e amido. Isto acontece pela estrutura que esses compostos apresentam, na qual as moléculas de celulose e hemicelulose estão entrelaçadas entre si e envoltas por lignina que dá resistência à estrutura (CHENG; TIMILSINA, 2010). A hidrólise ácida, empregando ácido sulfúrico diluído, tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica em material lignocelulósico, devido ao seu baixo custo e alta eficiência (SUN; CHENG, 2005).

O hidrolisado obtido a partir da hidrólise ácida contém açúcares pentoses como D-xilose e L-arabinose e hexoses como D-glicose, além de compostos que podem inibir o desempenho dos micro-organismos fermentadores (CADETE et al., 2012).

Segundo Rodrigues (2007), a hidrólise ácida apresenta até 90% de recuperação dos açúcares fermentescíveis, podendo gerar alguns produtos inibidores da fermentação e ocorrer degradação dos açúcares decorrente do tempo de hidrólise. Entre os produtos formados, destaca-se o 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, e furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF), que sob altas pressões e temperaturas são formados pela degradação de pentoses e hexoses (FENGEL; WEGENER, 1989; MARTÍN et al., 2007). O efeito inibitório pode ser superado submetendo-se o hidrolisado a tratamentos adequados que incluem alterações do pH do meio com adição de ácidos e bases, e também a utilização de carvão ativo (TAMANINI; HAULY, 2004).

Esses subprodutos podem inibir significativamente a fermentação e diminuir a produtividade do etanol (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a; XIMENES et al., 2010), e

a quantidade destes inibidores e sua toxicidade depende do tipo de pré-tratamento e de fermentação dos micro-organismos (CHEN et al., 2013). Os compostos fenólicos causam perda da integridade das membranas biológicas, não afetando sua capacidade de servir como barreiras seletivas e matrizes de enzimas (KANG et al., 2012).

O ácido acético, o principal composto presente alifático, é liberado a partir dos grupos acetil e o ácido fórmico é um produto de degradação do HMF (ULBRICHT et al., 1984). Quando estes ácidos (na forma não dissociada) entram na célula, dissociam-se no protoplasma por causa do seu pH. Este fato leva a uma diminuição do pH intracelular e pode gerar a morte celular (VERDUYN et al., 1990).

Trabalho realizado por Codato (2013) utilizando o processo Organosolv (ácido sulfúrico, acetona e etanol) para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, mostrou a presença de etanol no hidrolisado em concentração inibitória para a levedura testada (*Dekkera bruxellensis*), de forma que foi necessária a etapa de evaporação a fim de diminuir a concentração de etanol no hidrolisado.

Devido à presença dos compostos formados pode ocorrer a inibição do processo fermentativo pela alteração do metabolismo das leveduras (FUGITA, 2010). As alternativas seriam a adaptação das linhagens ao substrato contendo os compostos tóxicos (CARNEIRO, 2011) ou a detoxificação do hidrolisado. A escolha de um método eficaz de detoxificação depende do tipo de hidrolisado hemicelulósico e da espécie microbiana empregada, uma vez que cada um tem diferente grau de toxicidade e cada espécie de micro-organismo tem um grau diferente de tolerância aos inibidores (LARSSON et al., 1999).

Os métodos de detoxificação mais conhecidos são: elevação de pH com CaO e Ca(OH)_2 , seguido de ajuste de pH para a condição de fermentação com H_2SO_4 e H_3PO_4 (ALVES et al., 1998); utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos, enzimas (OLSSON; HÄHN-HAGERDAL, 1996; HÄHN-HAGERDAL et al., 2007) e micro-organismos (FONSECA, 2009). Alguns tratamentos mostram ser eficientes na remoção de inibidores, mas podem criar condições que afetam as características do meio e geram uma maior condição de estresse ao micro-organismo. Por exemplo, tratamentos com variação de pH podem desencadear aumentos excessivos na força iônica do meio. Outros tratamentos podem provocar

redução na concentração de açúcares do hidrolisado, como em precipitações ou uso de carvão ativado (MOUTTA, 2009).

O objetivo do presente trabalho foi caracterizar o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar após tratamento ácido e pressão com vistas à presença de inibidores e concentração de açúcares liberados. O hidrolisado foi analisado antes da etapa de concentração (até atingir 40 g/L de açúcares redutores), após a etapa de concentração e após processo de detoxificação com a utilização de elevação de pH e carvão ativado. Os hidrolisados obtidos serão utilizados como substrato para fermentação com a linhagem *Meyerozyma guilliermondii*, nas condições de fermentação otimizadas e descritas nos capítulos anteriores.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material lignocelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi coletado de usinas da região de Araras/SP, sendo acondicionado em sacos plásticos em laboratório a temperatura ambiente (25 °C) e em seguida triturado em um Moinho de Facas Andamo®, contendo uma peneira de Mesh 20 (abertura de 0,84 mm). Em seguida, as partículas foram classificadas em conjunto de peneiras Tyler para selecionar material com tamanho na faixa de 0,59 e 0,84 mm.

2.2. Hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e concentração do hidrolisado

As partículas de bagaço de cana-de-açúcar foram previamente selecionadas conforme item 2.1, sendo lavadas com água destilada, para retirada de possíveis resíduos de caldo de cana-de-açúcar, e colocadas em estufa a 40 °C por 24 horas.

Após esse período, o bagaço foi preparado de acordo com Carneiro (2011), com modificações. O bagaço foi pesado e acondicionado em frascos de vidro com tampa rosqueável tipo Boeco, adicionando-se ácido sulfúrico na proporção de 100 mg de ácido sulfúrico/g bagaço seco, em uma razão de 1:10 sólido/líquido. A reação

da hidrólise foi realizada a 120 °C, 1 atm de pressão, durante 50 minutos, em uma autoclave. Em seguida o hidrolisado foi separado do bagaço por filtração à vácuo com papel de filtro qualitativo e foram determinados o pH, em um medidor de pH digital; e açúcares redutores, pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de xilose. O hidrolisado apresentou em média pH 1,7 e 16,58 g/L de açúcares redutores. Para atingir a concentração de 40 g/L de açúcares redutores, o hidrolisado foi colocado em bequers de vidro sem tampa, os quais foram mantidos em banho-maria a 65 °C, sendo monitorada a concentração de açúcares redutores do hidrolisado periodicamente. Após a concentração, o hidrolisado foi mantido em frascos de vidro a 4 °C.

2.3. Detoxificação e concentração do hidrolisado de cana-de-açúcar

O hidrolisado de cana-de-açúcar foi detoxificado de acordo com Alves et. al. (1998). O procedimento da detoxificação consistiu na alteração do pH do hidrolisado concentrado por adição de óxido de cálcio comercial (CaO) até pH 7,0, seguido da diminuição do pH para 5,5 com ácido sulfúrico (H₂SO₄). Após esta etapa, o hidrolisado foi misturado ao carvão ativado (3 % p/v), em seguida incubado a 30 °C sob agitação de 200 rpm durante 60 minutos. Ao final dessa etapa, em decorrência dos precipitados formados, o líquido foi filtrado a vácuo, sendo em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e armazenado a 4 °C até ser utilizado.

Para atingir a concentração de 40 g/L de açúcares redutores, o hidrolisado foi colocado em bequers de vidro sem tampa, os quais foram mantidos em banho-maria a 65 °C, sendo monitorada a concentração de açúcares redutores do hidrolisado periodicamente. Após a concentração, o hidrolisado foi mantido em frascos de vidro a 4 °C.

2.4. Quantificação dos açúcares e inibidores do hidrolisado de cana-de-açúcar

As análises de açúcares e inibidores presentes nas amostras de hidrolisados (antes de concentrar; após concentração a 40 g/L de açúcares redutores; detoxificado e concentrado a 40 g/L de açúcares redutores) foram realizadas no

Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – EEL/USP, Lorena/SP.

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, glicerol e xilitol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um aparelho Agilent Technologies 1260 Infinity com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo do eluente 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para as análises, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em Sep-Pack Cartidge C₁₈ (Waters Associate – MILLIPORE®). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

As concentrações de furanos (furfural e hidroximetilfurfural) e os compostos derivados de lignina (CDL) ácido p-hidroxibenzóico, vanilina, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido ferúlico e siringaldeído, também foram determinados por CLAE em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando a coluna Waters Spherisorb C18 5µm ODS2 4,6 x 100 mm, sob as seguintes condições: temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra de 20 µL e detector UV a 276 nm. As amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE®). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da quantificação de açúcares e inibidores analisados por CLAE estão demonstrados nas Figuras 1 e 2, para as três amostras de hidrolisado. Os resultados comparativos permitem avaliar o efeito da concentração do hidrolisado do processo de detoxificação sobre a quantidade de açúcares e inibidores presentes no hidrolisado. Após detoxificação, o hidrolisado apresentou alteração na cor, conforme Figura 3, provavelmente devido ao uso do carvão ativado.

O hidrolisado foi concentrado até atingir 40 g/L de açúcares redutores e não 40 g/L de xilose, como estabelecidos nos ensaios fermentativos descritos no capítulo

3, devido a inexistência do cromatógrafo líquido no laboratório da UFSCar para realizar o monitoramento do hidrolisado na etapa de concentração.

Houve aumento nas quantidades de açúcares após a etapa de concentração por evaporação (Figura 1). Comportamento semelhante foi encontrado por Alves et al. (1998) durante a concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço. Segundo Fengel e Wegener (1989), a xilose pode ser degradada a furfural durante o processo de concentração, fato que no presente trabalho não ocorreu, pois foi observado que o aumento da concentração dos açúcares glicose, xilose e arabinose foi diretamente proporcional ao fator de concentração do hidrolisado (cerca de 2,5-3 vezes).

Com a detoxificação houve perda de 8 % de glicose enquanto para a xilose e arabinose houve perda de 10,5 % e 32 %, respectivamente. Em estudo realizado por Rodrigues et al. (2010) em hidrolisado de bagaço de cana utilizando ácido diluído, a concentração de glicose permaneceu em torno de 1 g/L, semelhante à concentração aqui encontrada (0,93 g/L). Mesmo xilose sendo a fonte de carbono em maior concentração (9,32 g/L), outros açúcares redutores tais como glicose, arabinose, manose, galactose, também estão presentes após o processo de pré-tratamento (BETANCUR; PEREIRA-JUNIOR, 2010). Isto pode ser confirmado pelo fato de o hidrolisado ter sido concentrado até 40 g/L de açúcares redutores (determinados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico), e no entanto, a soma das concentrações de xilose, arabinose e glicose totalizou 34,37 g/L, indicando a presença de outros açúcares redutores no hidrolisado. Segundo Aguilar et al. (2002), arabinose e xilose são provenientes da hemicelulose e como a xilose está presente em maiores concentrações, torna-se o produto de maior liberação no bagaço de cana quando comparado com arabinose, após hidrólise ácida.

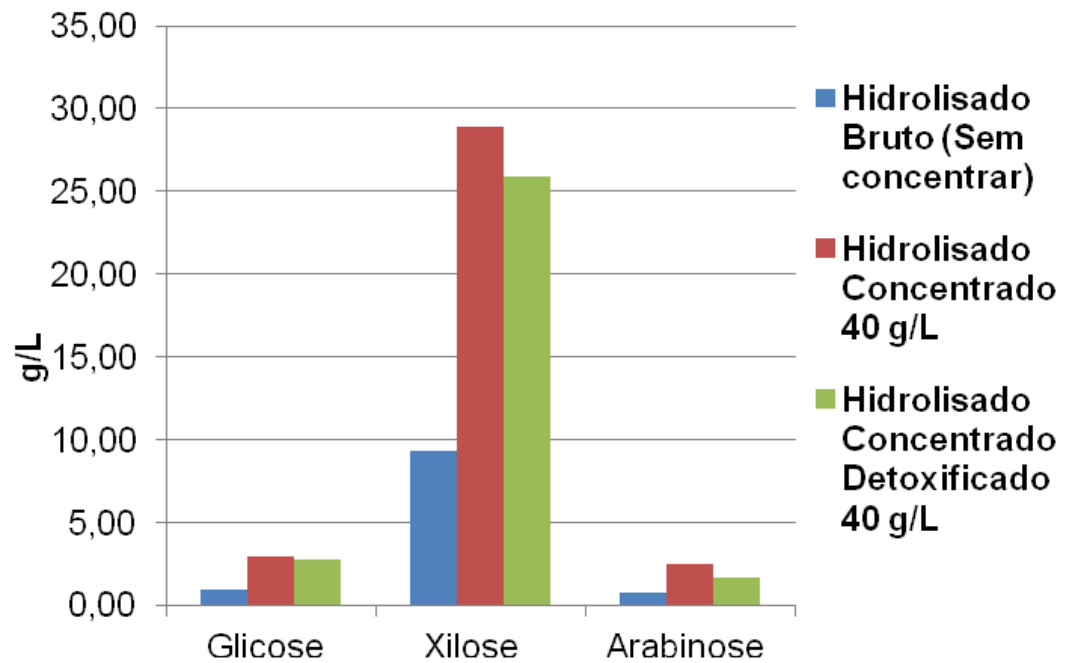


Figura 1. Quantificação dos açúcares nas amostras de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado foi concentrado por evaporação em banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares redutores. A detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de carvão ativado.

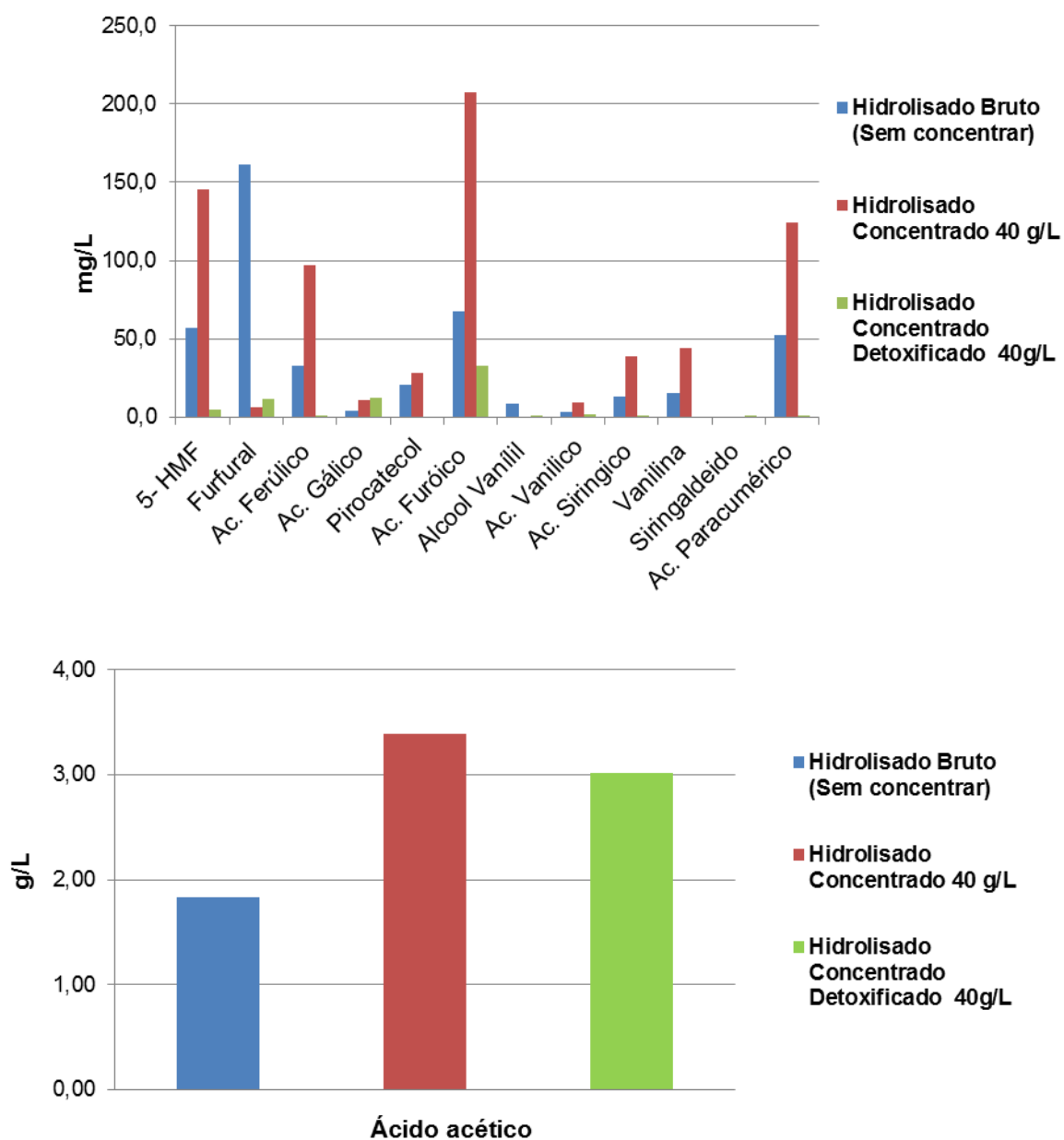


Figura 2. Quantificação dos inibidores nas amostras de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado foi concentrado por evaporação em banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares redutores. A detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de carvão ativado.



Figura 3. Frascos contendo bagaço após hidrólise ácida, à esquerda, e hidrolisado concentrado (H) e hidrolisado concentrado e detoxificado (HD), à direita. O hidrolisado foi concentrado por evaporação em banho-maria a 65 °C até atingir 40 g/L de açúcares redutores. A detoxificação foi realizada por elevação do pH e adição de carvão ativado.

Os resultados da caracterização dos inibidores presentes nos hidrolisados estão representados na Figura 2. O processo de hidrólise com a utilização de ácidos produz furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, resultantes da degradação das hexoses e pentoses submetidas a um meio ácido e de alta temperatura (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b). Estes compostos são tóxicos às leveduras e prejudicam a fermentação do hidrolisado, e dependendo de suas concentrações, podem inibir consideravelmente a fermentabilidade das leveduras (MATOS, 2001; LASER et al., 2002).

Com exceção do siringaldeído, o qual não foi detectado em nenhuma das amostras analisadas, os outros compostos apresentaram aumento nos teores (ao redor de 2-3 vezes) com a concentração do hidrolisado por evaporação, com exceção do furfural (Figura 2). Este composto apresentou redução drástica no teor após a concentração do hidrolisado, provavelmente devido à volatilização (RODRIGUES et al., 2001).

O ácido acético, considerado como forte inibidor da fermentação de xilose (FERRARI et al., 1992; FELIPE et al., 1996) teve sua concentração elevada de forma não proporcional (1,8 vezes) ao fator de concentração do hidrolisado,

provavelmente devido à volatilização parcial na etapa de concentração, como ocorrido com Canettieri; Silva; Felipe (2002), Figura 2. O ácido acético é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica, sendo reportadas concentrações de até 17 g/L em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, dependendo das condições de hidrólise ácida (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUES, 1998). De acordo com Tosetto (2008), a presença de ácido acético no meio de fermentação pode provocar queda nos parâmetros de rendimento em biomassa, produtividade e consumo de ART (açúcares redutores totais). Segundo Rodriguez-Chong et al. (2004) concentrações acima de 4 g/L podem inibir o crescimento de micro-organismos devido à sua difusão via membrana celular que leva à queda do pH intracelular. Os valores aqui obtidos são comparativamente baixos, ao redor de 3 g/L.

O processo de detoxificação ocasionou redução significativa na concentração dos inibidores, com exceção do furfural e ácido gálico, onde os valores determinados antes da detoxificação e após a detoxificação não diferem entre si (Figura 2).

A toxicidade do hidroximetilfurfural (5-HMF) é considerada equivalente à do furfural, entretanto sua concentração em hidrolisado hemicelulósico é menor devido principalmente à sua menor concentração em hemiceluloses (PALMQVIST; HÄHN-HAGERDAL, 2000). Tosetto (2008) afirmou que em cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, o aumento da concentração de HMF proporciona uma diminuição no rendimento em produto e no consumo de açúcares redutores totais, chegando à zero em concentrações acima de 500 mg/L. Os valores aqui encontrados para HMF são abaixo de 150 mg/L no hidrolisado não-detoxificado.

De acordo com Pacheco e Damásio (2010), o ácido vanílico é um composto intermediário formado antes da produção de vanilina a partir do ácido ferúlico. Dausch e Pastore (2005) reportaram que concentrações acima de 1 g/L inibem o crescimento de micro-organismos. Concentrações inferiores a 10 mg/L foram encontradas no hidrolisado aqui obtido, antes da detoxificação.

Dentre os compostos fenólicos, o siringaldeído e o ácido sirínico são dois dos derivados mais abundantes nos hidrolisados lignocelulósicos (ROSSELL et al., 2005), e em concentrações de 2 g/L, são capazes de afetar fortemente o consumo de xilose em meio fermentativo (CORTEZ, 2005). Estas substâncias são geradas nos processos de degradação da lignina, que ocorrem durante a hidrólise ácida.

Entre as substâncias fenólicas geradas da degradação da lignina encontram-se o ácido p-hidroxibenzóico, ácido m-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siringico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, cinamaldeído, p-hidroxicinamaldeído, álcool coniferílico e álcool 3,5 dimetoxi-4-hidroxinamílico (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUES, 1998; PALMQVIST; HÄHN-HAGERDAL, 2000).

Em trabalho realizado por Arruda et al. (2008), o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizando a combinação de ajuste de pH e adsorção em carvão vegetal ativado, foi mais eficiente para a remoção de fenóis totais com consequente favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, em comparação ao tratamento em que se empregou o polímero vegetal. Marton (2002), ao avaliar a detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana também obtido por hidrólise ácida pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado, constatou que este procedimento diminuiu a concentração de compostos fenólicos, porém propiciou a remoção também de xilose. Segundo o mesmo autor, a condição de maior remoção de compostos tóxicos não coincidiu com a de maior fermentabilidade do hidrolisado.

A concentração do hidrolisado se fez necessária para a obtenção de maior concentração de açúcar, porém ocorreu também aumento na concentração dos inibidores presentes no hidrolisado. A detoxificação diminuiu consideravelmente os inibidores, embora com certa perda de açúcares. Torna-se importante verificar assim o efeito da detoxificação sobre a produção de etanol a partir de hidrolisados, a fim de se constatar a real necessidade da detoxificação para a melhoria do processo fermentativo.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A concentração do hidrolisado se fez necessária para a obtenção de maior teor de açúcar, porém ocorreu também aumento nos teores dos inibidores. A detoxificação diminuiu consideravelmente os inibidores, embora com certa perda de açúcares. Considera-se importante verificar o efeito da detoxificação sobre a

produção de etanol a partir de hidrolisados, para a melhoria do processo fermentativo.

5. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, R., RAMÍREZ, J. A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309-318, 2002.
- ARRUDA, P. V.; CHAUD, L. C.S.; FELIPE, M. G. A.; PIVETTA, L. R. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, v.5., n.1, 2008.
- BETANCUR, G. J. V; PEREIRA-JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.5,p.1-11, 2010.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. Diversity and physiological characterization of D-xylose- fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLoS One**, v.7, p.1-11, 2012.
- CANETTIERI, E. V; SILVA, J. B. A; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.3, p.323-331, 2002.
- CARNEIRO, L.M. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol**. 2011. 175f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.
- Chen, J.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Ji, X.; Zhang, L.; Mi, X.; Huang, H. Removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation. **Bioresource Technology**, v. 144, p. 680-683, 2013.
- CHENG, J. J.; TIMILSINA, J. R. **Advanced Biofuel Technologies: Status and Barriers. Policy Research Working Paper 5411**. The World Bank Development Research Group Environment and Energy Team, p.1-47, 2010.
- CODATO, C.B. **Produção de etanol de 2ª geração por *Dekkera bruxellensis* a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2013. 95p. Dissertação (Mestrado em Agricultura e Ambiente) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2013.

CORTEZ, D. V. **Influência dos produtos de degradação de lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii***. 2005. 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2005.

DAUGSCH, A; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v.28, p.642-645, 2005.

FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SILVA, J. B. A. Fermentation of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v.56, n.2-3, p.281-283, 1996.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

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

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2009.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Jaboticabal, 2010.

HÄHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.937-953, 2007.

KANG, L.; LEE, Y.Y.; YOON, S.H.; SMITH, A.J.; KRISHNAGOPALAN, G.A. Ethanol production from the mixture of hemicellulose prehydrolysate and paper sludge. **Bioresources**, v.7, n.3, p. 3607-3626, 2012.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JËONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemical Biotechnology**, v.77– 79, p.91–103, 1999.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v.8, n.1, p.33-44, 2002.

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.

MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MATOS, Z. R. **Avaliação das condições de hidrólise ácida na fermentação de xilose em xilitol**. 2001. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analitical Chemistry**, v.31, p. 426-428, 1959.

MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, USP/EEL, Lorena, 2009.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p.1-10, 2004a.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.94-100. 2004b.

OLSSON, L., HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microbial Technology**, v.18, p.312 - 331, 1996.
PACHECO, S. M; DAMÁSIO, F. Vanilina Origem, Propriedades e Produção. **Química Nova na Escola**, v.32, p.215-219, 2010.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzate I: inhibition and detoxication. **Bioresource Technology**, v.74, p.17-24, 2000.

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

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana**. 2007. 160p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2007.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA, J. B. S.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P. V. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p.299-311, 2001.

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

RODRIGUEZ-CHONG, A., ROMIREZ, J. A., GARROTE, G., VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.143-152, 2004.

ROSSELL, C. E. V.; LAHR, D. F; HILST, A. G. P; LEAL, M. R. L. V. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. **International Sugar Journal**, v.107, p.192-195, 2005.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v.96, p.1599-1606, 2005.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. 258p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2008.

ULBRICHT, R.J.; NORTHUP, S.J.; THOMAS, J.A. A review of 5-hydroxymethylfurfural HMF in parenteral solutions. **Fundamental and Applied Toxicology**, v.4, n.5, p. 843-853,1984.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Physiology of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v.136, n.3, p. 395-403, 1990.

XIMENES, E.; KIM, Y.; MOSIER, N.; DIEN, B.; LADISCH, M. Inhibition of cellulases by phenols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 3-4, p.170-176, 2010.

Capítulo 5

AVALIAÇÃO DA FERMENTAÇÃO DE HIDROLISADOS DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Meyerozyma guilliermondii*

RESUMO

A hidrólise ácida dos resíduos lignocelulósicos pode gerar produtos tóxicos às leveduras e dependendo das concentrações, podem inibir a fermentabilidade destes micro-organismos. Esse trabalho teve o objetivo de avaliar a influência da detoxificação e suplementação nutricional sobre a fermentação conduzida pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar obtidos por hidrólise ácida. Os resultados mostraram que a adição de extrato de levedura teve efeito significativo sobre o consumo das pentoses pela levedura *M. guilliermondii* e a produção de etanol e xilitol. Houve maior produção de biomassa nos hidrolisados detoxificados. A linhagem de levedura utilizada foi capaz de consumir glicose, xilose e arabinose, provavelmente nesta ordem preferencial, além de ácido acético, promovendo detoxificação biológica. Apesar da detoxificação e da suplementação terem aumentado a produtividade em etanol (de 0,023 para 0,044 g/L.h), os resultados obtidos para *M. guilliermondii* são ainda pouco expressivos.

Palavras-chave: Hidrolisado, suplemento nutricional, pentoses, detoxificação, *Meyerozyma guilliermondii*, fermentação.

1. INTRODUÇÃO

Os biocombustíveis de segunda geração estão sendo vistos como uma forma de reciclagem da matéria orgânica e de se evitar o principal problema enfrentado pelos biocombustíveis de primeira geração, como a disponibilidade de terras para as monoculturas, cuja demanda é cada vez maior devido à crescente produção deste tipo de combustível (SALEMI, 2009; CHENG; TIMILSINA, 2010; EISENTRAUT, 2010; NYKO et al., 2010).

Os materiais lignocelulósicos, como madeira, bagaço de cana-de-açúcar, resíduos da plantação de trigo, arroz, mandioca, também podem ser convertidos em etanol, porém com uma dificuldade muito maior que as conversões de materiais ricos em açúcar e amido. Isto acontece pela estrutura que esses compostos apresentam, na qual as moléculas de celulose e hemicelulose estão entrelaçadas entre si e envoltas por lignina, que dá resistência à estrutura (CHENG; TIMILSINA, 2010).

A pré-hidrólise com a utilização de ácidos produz furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, os quais são resultantes da degradação das hexoses e pentoses submetidas a um meio ácido e de alta temperatura (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Tais produtos são tóxicos às leveduras e prejudicam a fermentação do hidrolisado, e dependendo das suas concentrações, podem inibir a fermentabilidade das leveduras (LASER et al., 2001; MATOS, 2001). No entanto, além da produção de compostos tóxicos, é necessário que o pH do hidrolisado seja neutralizado para o meio ser propício à fermentação (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Em estudos realizados por Roberto et al. (1991), submetendo o bagaço de cana-de-açúcar à hidrólise por *steam explosion* e à detoxificação por meio do método de alteração de pH, verificou-se uma melhoria da fermentabilidade do hidrolisado com estes procedimentos. Marton (2002), ao avaliar a detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido por hidrólise ácida, pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado,

observou que a condição de maior remoção de compostos tóxicos não coincidiu com a de maior fermentabilidade do hidrolisado.

Além disso, durante a fermentação, a levedura pode estar sujeita a vários fatores estressantes como alta concentração de etanol, temperaturas elevadas e acidez do meio (BASSI, 2011). Os fatores ambientais, tais como oxigenação do meio, fontes de carbono e compostos inibidores do metabolismo microbiano, influenciam fortemente a expressão gênica e a síntese de enzimas em leveduras (CARNEIRO, 2011). Neste sentido, estudos que avaliem o efeito dos métodos de detoxificação sobre a fermentação conduzida por leveduras tornam-se imprescindíveis, uma vez que a remoção dos inibidores pode ocorrer concomitantemente com a diminuição nos teores de açúcares, prejudicando o rendimento. Ademais, há de se levar em conta o custo da utilização de tais métodos no emprego de reagentes e energia.

O presente trabalho objetivou avaliar a capacidade fermentativa da levedura *Meyerozyma guilliermondii*, isolada de caldo de cana-de-açúcar, em hidrolisados de bagaço de cana obtidos por hidrólise ácida, detoxificados e não-detoxificados, com e sem suplementação nutricional. Resultados descritos no Capítulo 4 mostraram que o hidrolisado detoxificado e concentrado apresentou uma redução significativa nas concentrações de inibidores, embora com relativa perda de açúcares. Avaliar os parâmetros fermentativos sob a ótica da detoxificação e suplementação contribuirá para o melhor planejamento do processo visando o *scale-up*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Hidrolisados

Os hidrolisados foram obtidos por hidrólise ácida e detoxificação conforme descrição no Capítulo 4. Foram utilizados quatro tipos diferentes de hidrolisados com as seguintes características:

- hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado (40 g/L açúcares redutores) sem detoxificação e sem adição de suplemento, pH 5,5;

- hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado (40 g/L açúcares redutores) sem detoxificação e com adição de suplemento (3 g/L de extrato de levedura), pH 5,5;
- hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar detoxificado e concentrado (40 g/L açúcares redutores) sem adição de suplemento, pH 5,5;
- hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar detoxificado e concentrado (40 g/L açúcares redutores) com adição de suplemento (3 g/L de extrato de levedura), pH 5,5.

O pH dos hidrolisados foi ajustado com adição de ácido sulfúrico concentrado para as amostras de hidrolisados detoxificados, e com solução de hidróxido de sódio 10 mol/L para as amostras de hidrolisados não-detoxificados.

2.2. Preparo do inóculo e montagem dos experimentos

O inóculo foi preparado mediante inoculação de duas alçadas de células da levedura *Meyerozyma guilliermondii* (linhagem 311, isolada de caldo de cana-de-açúcar), reativada em placas com meio YPD a partir dos *slants* mantidos a 4 °C com meio YPD, em 10 mL de caldo YPD em tubos falcon previamente tarados e incubando-se por 12 horas (*overnight*) a 30 °C, sob agitação de 160 rpm. O meio de cultura YPD foi renovado (os tubos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e novo meio foi adicionado) até atingir a massa celular úmida desejada de 5 g/L (peso úmido). Em seguida as células de levedura foram lavadas por duas vezes em solução salina (NaCl 0,85 %), sendo essas centrifugadas a 3400 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Após a última lavagem, os tubos foram pesados em balança analítica para estimativa do peso da massa úmida. Utilizou-se a proporção de 5 g de massa úmida/litro de meio de fermentação. Com a massa celular desejada, as células foram ressuspensas em 40 mL de meio de fermentação de hidrolisado de cana-de-açúcar, sendo em seguida realizada a leitura de absorbância a 600 nm. Um volume de 20 mL desse inóculo foi adicionado aos erlenmeyers de 500 mL contendo 180 mL de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Os testes foram realizados em duplicata, por um período de 144 horas, a 30 °C, sob agitação de 150 rpm.

2.3. Parâmetros analisados

Amostras foram retiradas periodicamente para avaliação da absorbância em espectrofotômetro Thermo® Biomate a 600 nm. A biomassa (g/L) foi determinada pela conversão dos valores de absorbância utilizando uma curva padrão de absorbância X biomassa seca (massa celular seca a 105 °C até peso constante).

Após centrifugação, no sobrenadante determinou-se pH, em pH-metro digital; etanol, por destilação das amostras e determinação da densidade da solução hidroalcoólica em densímetro digital *Anton-Paar DMA-45*; xilose, arabinose, glicose, xilitol e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); e açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959), utilizando curva padrão de xilose. As determinações de açúcares, xilitol e ácido acético por CLAE foram realizadas nas amostras retiradas a cada 48 horas, enquanto as análises de biomassa, açúcares redutores, pH e etanol foram realizadas nas amostras retiradas a cada 24 horas.

As análises de açúcares por CLAE foram realizadas no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – EEL/USP. As concentrações de xilose, glicose, arabinose, xilitol e ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um aparelho Agilent Technologies 1260 Infinity com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo do eluente 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para as análises, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em Sep-Pack Cartridge C₁₈ (Waters Associate – MILLIPORE®). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

O cálculo do rendimento g etanol/g de xilose foi realizado através da seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (g etanol/g de xilose)} = \frac{\text{Etanol (g/L)}}{\text{Açúcar redutor consumido (g/L)}}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes fermentativos com os hidrolisados não-detoxificados e detoxificados, com e sem adição de suplemento (extrato de levedura) estão demonstrados nas Figuras 1 a 4.

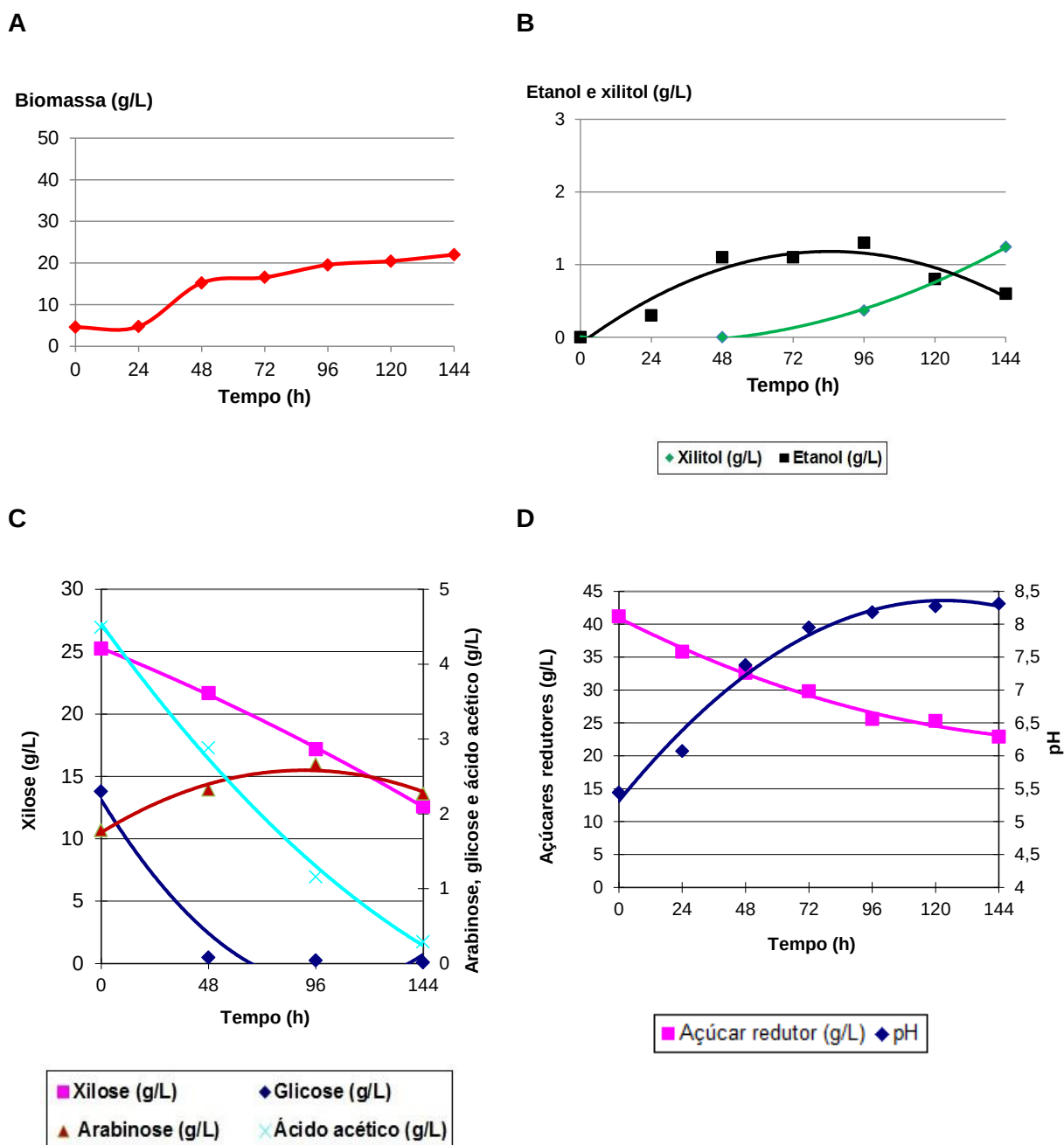
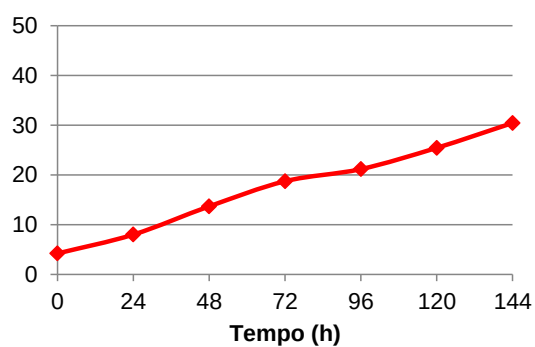


Figura 1. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, não-detoxificado e sem adição de suplemento, pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

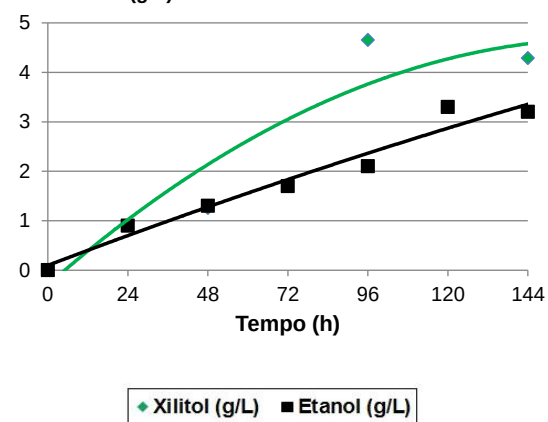
A

Biomassa (g/L)

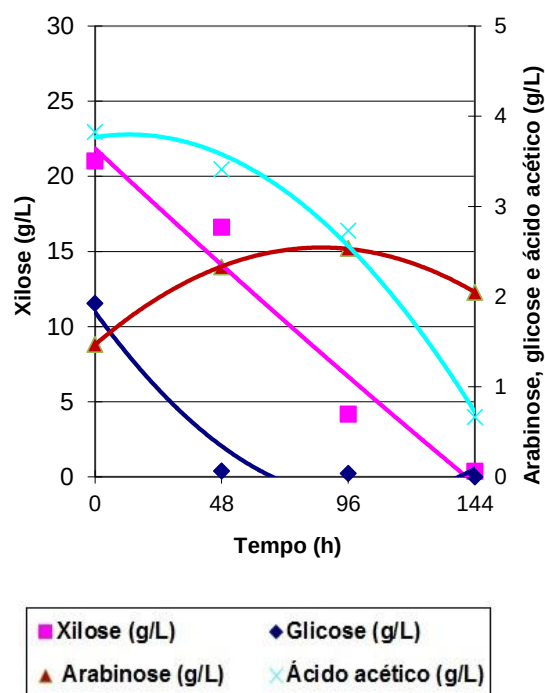


B

Etanol e xilitol (g/L)



C



D

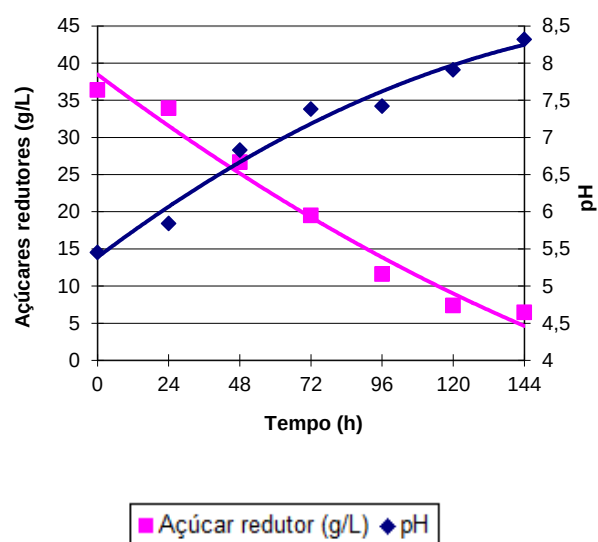
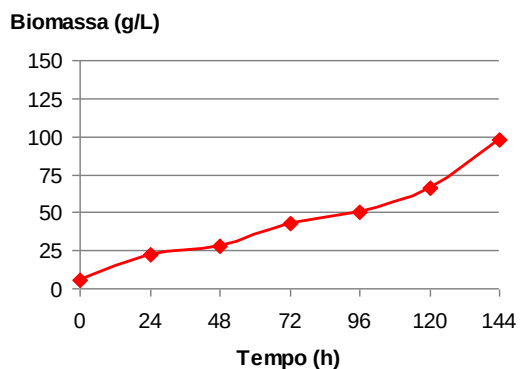
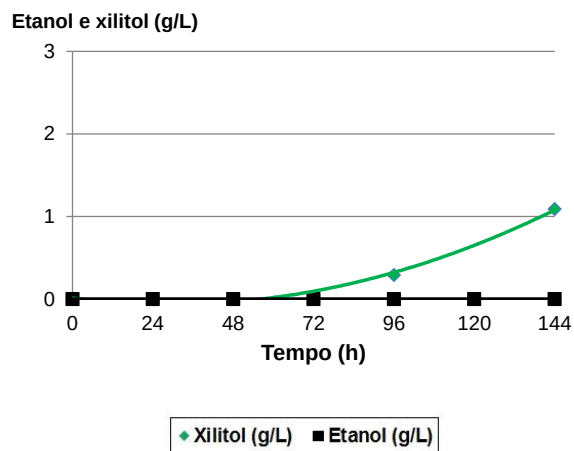


Figura 2. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, não-detoxificado e com adição de suplemento (3 g/L de extrato de levedura), pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

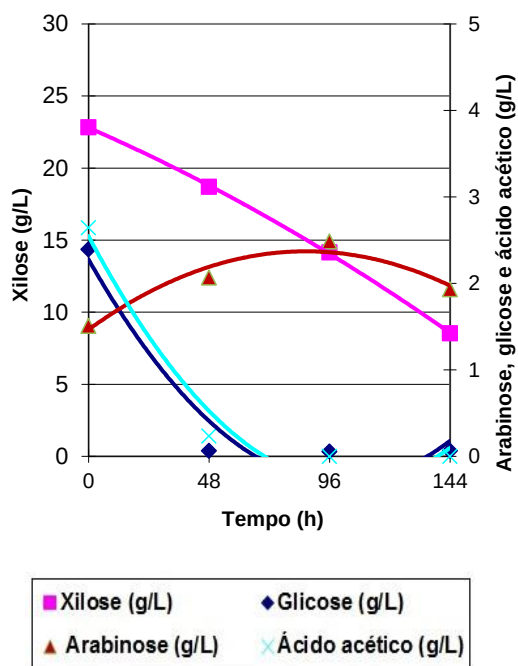
A



B



C



D

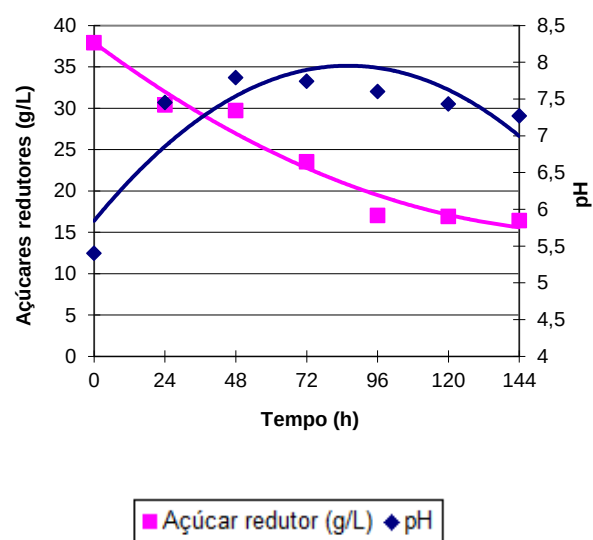
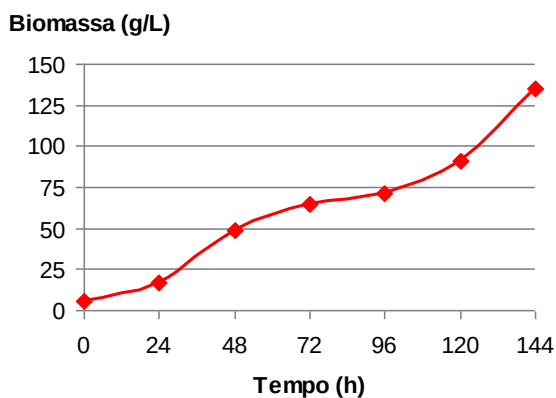
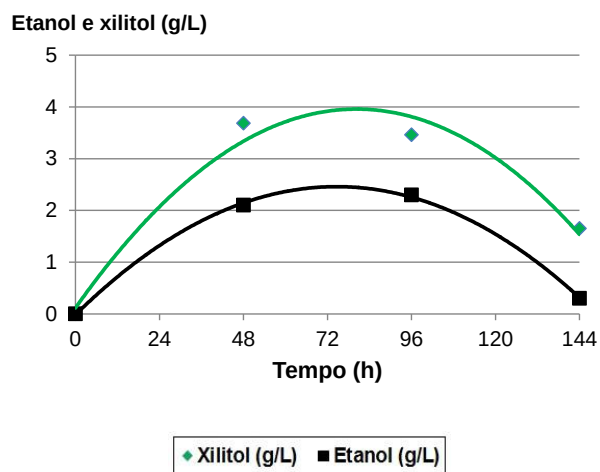


Figura 3. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, detoxificado e sem adição de suplemento, pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

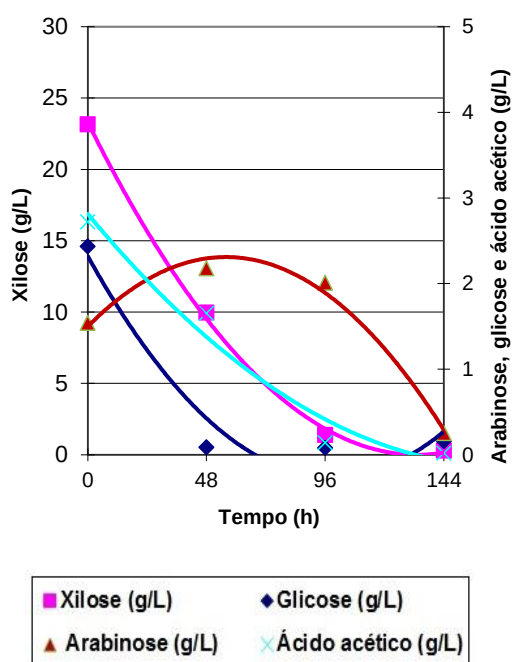
A



B



C



D

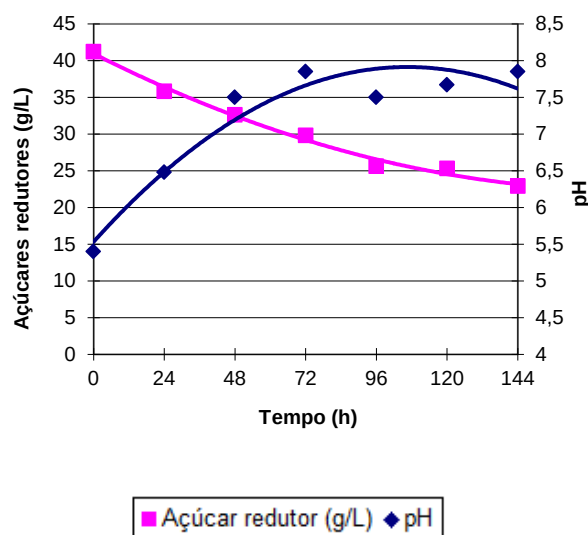


Figura 4. Teste fermentativo realizado com o hidrolisado concentrado, detoxificado e com adição de suplemento (3 g/L de extrato de levedura), pH 5,5, a 30 °C, 150 rpm, utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

A glicose foi a fonte de carbono consumida mais rapidamente pela levedura *M. guilliermondii* nos hidrolisados, independentemente da detoxificação e da suplementação com extrato de levedura. Em 48 horas de cultivo, a concentração de

glicose foi próxima a zero (Figuras 1 a 4, C). Nos estudos de Moutta (2009), nas fermentações de hidrolisado de palha de cana-de-açúcar utilizando-se uma cepa de *Pichia stipitis*, a glicose já havia sido completamente consumida em 15 horas, enquanto que xilose prosseguiu do início ao final de 110 horas de processo, sendo consumida mais lentamente na presença de glicose.

Quanto à xilose, houve consumo quase total em 96 horas de cultivo da levedura no hidrolisado detoxificado adicionado de extrato de levedura. No hidrolisado não detoxificado com extrato de levedura, o consumo foi mais lento, ocorrendo somente em 144 horas de cultivo o consumo total de xilose. Nos hidrolisados sem adição do extrato de levedura, o consumo foi ainda mais lento com sobra de xilose no meio de cultura (cerca de 10-15 g/L), Figuras 1 a 4, C. Estes resultados demonstram que a adição de extrato de levedura teve efeito significativo sobre o consumo da pentose pela levedura *M. guilliermondii*.

A utilização de extrato de levedura como suplemento nutricional se deve principalmente à sua composição: proteína 31 a 48 %; elevados teores de vitaminas, especialmente do complexo B (B₁, B₂, B₆, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico e biotina); minerais, incluindo macromelementos (Ca, P, Mg, K, Na, Al e Fe) e microelementos (Mn, Cu, B, Zn, Mo, Cd, Cr, Ni, Pb, Si e Se); e carboidratos, entre 25-35% (HALÁSZ; LASZTITY, 1991).

Quanto aos resultados dos teores de arabinose, só houve consumo deste açúcar no hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura, chegando a concentração próxima a zero ao final de 144 horas de cultivo. Nos experimentos com os outros hidrolisados (detoxificado ou não sem adição de extrato de levedura), a arabinose não foi consumida até 144 horas de fermentação. No hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura, houve consumo total de glicose e xilose dentro de 48 e 96 horas, respectivamente, o que pode ter levado a levedura ao consumo de arabinose. Nos outros experimentos não foi observado consumo de arabinose, pois no período de 144 horas ainda havia xilose disponível para consumo, com exceção do hidrolisado concentrado não detoxificado com adição de extrato de levedura (Figuras 1 a 4, C)

A via de assimilação de arabinose por leveduras é bastante similar à da xilose (SHI et al., 2000), no entanto, como observado neste trabalho o consumo da arabinose foi mais tardio do que o da xilose. De fato, ao se analisar as Figuras 4 A e 4 C, verifica-se uma fase de crescimento entre 24 e 72 horas sustentada pelo

consumo de glicose. Após 120 horas, quando as concentrações de xilose e ácido acético são praticamente desprezíveis, há uma segunda fase de crescimento o que sugere diauxia sustentada pelo consumo de arabinose.

Esse comportamento também foi observado por Silva; Roberto (2001) e Lima (2002) durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, assim como em meio sintético por Felipe et al. (1995). Nos experimentos realizados em meios sintéticos contendo arabinose, xilose ou glicose como única fonte de carbono, o crescimento da linhagem de *M. guilliermondii* foi também mais tardio e menor quando arabinose foi utilizada, conforme discutido no Capítulo 3.

A arabinose e a xilose estão diretamente envolvidas no metabolismo de pentoses por leveduras, sendo consideradas como principais responsáveis pela ativação das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em *Pachysolen tannophilus* (BOLEN; DETROY, 1985) e *Candida tenuis* (KERN et al., 1997). De acordo com Matos et al. (2002), a arabinose, utilizada como fonte de carbono no cultivo de *Candida guilliermondii*, promoveu uma melhoria de 35 % na bioconversão de xilose em xilitol por esta levedura.

Segundo Schlegel (1990) quando micro-organismos são expostos a mistura de açúcares, geralmente a glicose é catabolizada preferencialmente e inibe a quebra de outros substratos, caracterizando assim fenômenos de diauxia. De acordo com Du Preez; Bosch; Prior (1986), a diauxia pode causar um considerável período de fase de adaptação, sendo de ocorrência comum durante a fermentação de xilose ou celobiose na presença de glicose.

Em estudos realizados por Mouro (2012) foram mostrados vários padrões de fermentação de xilose e glicose pelas leveduras, sendo que linhagens do clado *Spathaspora*, particularmente *Spathaspora passalidarum*, fermentam eficientemente a xilose.

Gong et al. (1999) reportaram a assimilação preferencial de glicose em relação a pentoses e concluíram que o comportamento de leveduras cultivadas em mistura de açúcares, hexoses e pentoses, apresenta uma inibição ou retardamento da utilização de xilose pela presença de glicose no meio. Hähn-Hagerdal et al. (1991) reportaram que concentrações acima de 2 % de glicose, mesmo em espécies que possuem afinidade no transporte de pentoses, como *P. stipitis*, são capazes de reprimir a absorção de xilose.

Mouro (2012) revelou que leveduras como *Kluyveromyces marxianus* e *Candida materiae* são melhores fermentadoras de glicose do que xilose, enquanto as leveduras *Spathaspora passalidarum* e alguns isolados de *Candida shehatae*, apresentam melhor produção de etanol a partir de xilose. Já as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e as do gênero *Spathaspora* apresentaram praticamente a mesma produção de etanol a partir de ambos os açúcares (glicose e xilose). No entanto, os resultados sugeriram que a espécie *Scheffersomyces stipitis* e leveduras do gênero *Spathaspora* são as que apresentam um melhor rendimento em etanol quando consomem xilose como fonte de carbono.

No presente trabalho, a linhagem de levedura utilizada foi capaz de consumir glicose, xilose e arabinose, provavelmente nesta ordem preferencial, embora isto não possa ser afirmado com certeza com relação à glicose e xilose, pois a primeira análise foi realizada em 48 horas de cultivo, quando a glicose já havia se esgotado.

O ácido acético (Figuras 1 a 4, C) esteve presente em maiores quantidades nos hidrolisados não detoxificados, indicando que com a detoxificação ocorreu uma maior remoção desse inibidor (aproximadamente 4 g/L e 2,5 g/L, nos hidrolisados não-detoxificados e detoxificados, respectivamente). Ocorreu diminuição nas concentrações de ácido acético ao longo do período de cultivo, muito mais acentuada nos hidrolisados detoxificados, o que pode ser devido à volatilização ou ao consumo deste composto pela levedura. A dinâmica da curva do ácido acético não é a mesma nos quatro tipos de hidrolisados testados, o que não sugere que tenha ocorrido volatilização. É possível que a levedura tenha realmente consumido o ácido, como verificado para *Issatchenkia occidentalis* em hidrolisado de bagaço de cana, a qual promoveu a detoxificação biológica do bagaço (GONÇALVES et al., 2013). Esta questão merece estudos posteriores, pois aponta uma característica positiva a favor desta levedura, ainda não relatada, do que se tem conhecimento.

O ácido acético é o principal ácido presente nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal. Sua concentração depende do tipo de biomassa empregada e do processo de hidrólise utilizado, com variações de concentração de 0,6-12 g/L, e níveis de tolerância dos micro-organismos a esse ácido podendo variar de acordo com as espécies e com as condições de cultivo empregadas (HELLE et al., 2003).

O resultado das concentrações de açúcares redutores (Figuras 1 a 4, D) nos hidrolisados utilizados mostrou que o maior consumo ocorreu no hidrolisado não

detoxificado com adição de extrato de levedura seguido do hidrolisado detoxificado sem adição. O teor inicial de açúcares redutores para os quatro meios à base de hidrolisados utilizados ficou por volta de 40 g/L. No entanto, a soma dos teores de glicose, xilose e arabinose totaliza cerca de 30 g/L, indicando a existência de outras substâncias redutoras no meio de cultura e que podem estar sendo consumidas pelas leveduras.

Em relação ao etanol (Figuras 1 a 4, B), no hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura foram obtidos maiores teores em 48 horas (2,1 g/L) e 96 horas (2,3 g/L), apresentando uma diminuição significativa em 144 horas (0,3 g/L). Com o hidrolisado não detoxificado com adição de extrato de levedura, a produção de etanol foi crescente, atingindo cerca de 3 g/L em 144 horas. Com os hidrolisados sem adição de extrato de levedura, não foi detectada produção de etanol com o meio detoxificado, enquanto para o hidrolisado não detoxificado os maiores resultados foram obtidos de 48 horas a 96 horas (1,1 a 1,3 g/L), com redução em 144 horas (0,60 g/L). A produção de etanol pela levedura *P. stipitis* a partir de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas, com concentrações de xilose em torno de 50 g/L, tem sido reportado por vários autores (ZHU et al., 2010; WHITE; YOHANNAN; WALKER, 2008).

Em todos os experimentos, ocorreu alcalinização significativa do meio de cultura, passando de pH inicial 5,5 para pH final entre 7,5 e 8,5 (Figuras 1 a 4, D).

Em relação à biomassa (Figuras 1 a 4, A), a levedura *M. guilliermondii* apresentou maior crescimento no hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura, seguida pelo hidrolisado detoxificado. Para este parâmetro – produção de biomassa – a detoxificação teve um efeito mais pronunciado que a adição de extrato de levedura, ao contrário do observado em relação à produção de etanol. Os valores de biomassa obtidos nos experimentos com os hidrolisados detoxificados são muito altos e inesperados considerando-se a concentração de açúcares determinados (glicose, xilose e arabinose). Mesmo considerando-se a utilização de etanol como fonte de carbono, ainda assim valores de biomassa ao redor de 100-120 g/L são inexplicáveis, a não ser que outras substâncias presentes nos hidrolisados e que não foram determinadas na cromatografia líquida de alta eficiência possam estar sendo utilizadas pela levedura, que possam justificar a alta conversão de substrato em biomassa. Nas Figuras 3 e 4 – A, verifica-se diauxia após 96 horas de

fermentação, mais marcante quando se utilizou o hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura. Esta observação coincide com a diminuição drástica na concentração de etanol e xilitol do meio de fermentação com o hidrolisado detoxificado com adição de extrato de levedura, os quais podem também estar sendo mobilizados para a produção de biomassa. A detoxificação de alguma maneira permitiu que outros compostos ficassem disponíveis para a levedura para a produção de biomassa. Estes resultados podem também estar relacionados com o alto e rápido consumo de ácido acético (em 48 e 96 horas, para o hidrolisado detoxificado sem adição de suplemento, e para o hidrolisado detoxificado com adição de suplemento, respectivamente), deixando o meio de fermentação menos tóxico para a levedura, levando ao consumo de outras substâncias presentes no meio, uma vez que a xilose e glicose estavam praticamente esgotadas.

Alta densidade celular é utilizada nas destilarias com processos fermentativos convencionais a partir de caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço, para diminuir o tempo de fermentação e elevar a produtividade do processo (Amorim et al., 2011). Em hidrolisados de madeira, Sreenath; Jeffries (2000) utilizaram em torno de 1,5 a 3,0 g/L com *P. stipitis* e *Candida shehatae*, concentração semelhante utilizada por Canilha et al. (2010) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com *P. stipitis*. No presente trabalho foi utilizada concentração inicial de biomassa ao redor de 4-5 g/L.

Foi detectada a presença de xilitol (Figuras 1 a 4, B) durante as fermentações com os hidrolisados detoxificados e não-detoxificados com e sem adição de extrato de levedura, em maior quantidade nos hidrolisados suplementados (produção máxima ao redor de 4 g/L). O rendimento em etanol produzido pelas leveduras fermentadoras de pentoses em meios de cultivo com D-xilose é limitado principalmente por dois fatores: a utilização concorrente do etanol na presença de concentrações elevadas de xilose e a formação de xilitol e outros compostos como subprodutos (DUARTE, 1989).

O xilitol é um composto orgânico (poliálcool, natural de cinco átomos de carbonos) de fórmula $C_5H_{12}O_5$. Sua molécula possui estrutura aberta e é conhecido como polihidroxiálcool acíclico, ou pentitol, por ter cinco grupos OH em sua molécula, e cada grupo hidroxila se encontrar ligado a um átomo de carbono. Sua conformação molecular tem sido proposta como um “zig-zag”, apresentando rotação

nas ligações entre C₂ e C₃, e entre, C₃ e C₄, assim como uma interação entre O₂ e O₄ (MÄKINEN, 2000).

Para a conversão de xilose em xilitol, é necessário o transporte do açúcar xilose através da membrana celular. Uma vez dentro da célula, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (EC1.1.1.21) com a participação das coenzimas NADPH ou NADH (JEFFRIES, 1983). Em seguida, o xilitol é excretado para o exterior da célula ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9), com a participação de NAD⁺ (SLININGER; BOLEN; KURTZMAN, 1987). A xilulose é fosforilada a xilulose 5-fosfato, a qual pode ser convertida em piruvato através do complexo enzimático transcetolase-transaldolase, que faz a conexão entre a via das fosfopentoses e a via EMP (NOLLEAU et al., 1993).

A bioconversão de xilose a xilitol e ou etanol é influenciada por diversos fatores, mas dentre eles o mais importante é o nível de aeração, a qual afeta as rotas bioquímicas envolvidas na metabolização da xilose (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998; ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999). Em condições aeróbias, pode ocorrer desvio no metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol. Em condições limitadas de oxigênio, ocorre o acúmulo de xilitol (NÁHLIK et al., 2003).

Considerando que nos experimentos aqui realizados o nível de agitação dos frascos foi o mesmo para os quatro hidrolisados testados, teoricamente proporcionando o mesmo nível de aeração, a diferença observada na produção de xilitol deve ser creditada à utilização do suplemento nutricional, pois independentemente da detoxificação ter ocorrido ou não, somente os hidrolisados suplementados apresentaram produção considerável de xilitol.

Os valores de rendimento e produtividade em etanol dos testes fermentativos estão descritos na Tabela 1. Verifica-se que o melhor rendimento em etanol foi obtido com o hidrolisado não detoxificado sem adição de suplemento, no entanto, no período estabelecido de 48 horas houve consumo de somente 14,1 % de xilose, resultando em alto teor de açúcar residual. Nos hidrolisados com adição de suplemento, não houve diferença quanto ao rendimento, porém a produtividade em etanol foi maior no hidrolisado detoxificado.

Canilha et al. (2010) avaliaram a produção de etanol por *P. stipitis* utilizando hidrolisado de bagaço de cana, em frascos agitados a 200 rpm, 30 °C por 120 horas.

A hidrólise do bagaço foi realizada com ácido sulfúrico diluído, a 150 °C por 30 minutos, e os autores compararam os efeitos de diferentes estratégias de detoxificação para reduzir os compostos inibitórios liberados durante a hidrólise. Comparando os resultados aqui obtidos com aqueles obtidos pelos autores acima para o hidrolisado não-detoxificado (0,044 g/L.h, 120 h), somente a metade da produtividade em etanol foi alcançada neste trabalho, apesar de em menor período de tempo. A suplementação com nutrientes deve fazer a diferença, pois extrato de levedura, extrato de malte e peptona foram utilizados por Canilha et al. (2010).

Com estratégias de detoxificação, tanto Canilha et al. (2010) quanto Cadete et al. (2012) obtiveram melhores resultados para produtividade em etanol (0,13 - 0,16 g/L.h; 0,2 g/L.h, respectivamente) utilizando *P. stipitis* em hidrolisado de bagaço, comparado aos resultados aqui obtidos para os hidrolisados detoxificados e suplementados. Cadete et al. (2012) utilizaram extrato de levedura como suplemento do hidrolisado.

Desta forma, apesar da detoxificação e da suplementação terem aumentado a produtividade em etanol (de 0,023 para 0,044 g/L.h, Tabela 1), os resultados obtidos para *M. guilliermondii* são ainda muito baixos quando comparados com *P. stipitis*, por exemplo. Outras estratégias como aumentar e diversificar as fontes nutricionais, testar outras concentrações de inóculo inicial e agitação dos frascos e proceder à adaptação do inóculo ao hidrolisado antes da fermentação, podem contribuir para a melhoria do processo fermentativo. Carneiro (2011) desenvolveu estratégias de adaptação da levedura *P. stipitis* ao hidrolisado de palha de arroz não-detoxificado e verificou aumentos de 7 % e 50 % no rendimento em etanol e produtividade, respectivamente, quando o inóculo foi preparado após cultivos sucessivos da levedura no hidrolisado.

Tabela 1. Valores de produtividade e rendimento de etanol nas fermentações conduzidas com hidrolisados detoxificados e não-detoxificados, com e sem adição de suplemento (extrato de levedura), utilizando-se a levedura *M. guilliermondii*.

Parâmetro	Hidrolisado não detoxificado com adição de suplemento	Hidrolisado não detoxificado sem adição de suplemento	Hidrolisado detoxificado com adição de suplemento	Hidrolisado detoxificado sem adição de suplemento
Rendimento (g etanol/g de xilose)	0,16	0,31	0,16	0
Produtividade (g etanol/L.h)	0,028	0,023	0,044	0

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estratégias de detoxificação e suplementação dos hidrolisados de bagaço de cana aumentaram a produtividade em etanol e possibilitaram maior crescimento da levedura, porém os resultados ainda são baixos quando comparados com a literatura, especialmente para a levedura *P. stipitis*. A linhagem de *M. guilliermondii* além de consumir glicose e xilose do hidrolisado, consumiu também ácido acético, promovendo uma detoxificação biológica.

5. REFERÊNCIAS

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

BASSI, A.P.G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, Piracicaba, 2011.

BOLEN, P. L.; DETROY, R. W. Induction of NADPH-linked D-xylose reductase and NAD-linked xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* by D-xylose, L-arabinose or D-galactose. **Biotechnology and Bioengineering**, v.27, p.302-307, 1985.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; DUSSAN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. Diversity and physiological characterization of D-xylose- fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian forest. **PLoS One**, v.7, p.1-11, 2012.

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

CARNEIRO, L.M. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol**. 2011. 175p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena-Universidade de São Paulo, Brasil, 2011.

CHENG, J. J.; TIMILSINA, J. R.; **Advanced Biofuel Technologies: Status and Barriers**. Policy Research Working Paper 5411, The World Bank Development Research Group Environment and Energy Team, p.1-47, 2010.

DUARTE, M. C. T. **Hidrólise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. 1989. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 1989.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.23, p.228-233, 1986.

EISENTRAUT, A. Sustainable Production of Second- Generation Biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries. Information Paper, **IEA Renewable Energy Division**, p.1-221, 2010.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D. C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, n.3, p.171-77, 1995.

GONÇALVES, B. M. G.; JESUS, J. Y. F. M.; PERON, H. B.; FREITAS, W. L. C.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, S. S. Consumo de açúcares e ácido acético durante a destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico pela levedura *Issatchenkia occidentalis*. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.3, p.372-375, 2013.

GONG, C. S., CAO, N. J., DU, J., TSAO, G. T. Ethanol Production from Renewable Resources. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**, v.65, p.207-241, 1999.

HÄHN-HAGERDAL, B., LINDEN, T., SENAC, T., SKOOG, K. Ethanolic fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.28-29, n.1, p.131-144,1991.

HALÁSZ, A.; LASZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton, CRC Press, 1991, p.312

HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xilose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.33, p.786-792, 2003.

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

KERN, M.; HALTRICH, D.; NIDETZKY, B.; KULBE, K. D. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS4435. **FEMS Microbiology Letters**, v.149, p.31-37, 1997.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J. **A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol**. Thayer School of Engineering, Dartmouth College, Hanover, USA, 2001.

LIMA, L. H. A. **Efeito do ácido acético nas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii***. 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL. Lorena, 2002.

MÄKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v.54, n.4, p. 603-613, 2000.

MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MATOS, G. S.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, D. D. V.; SILVA, S. S. Influência da arabinose na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*. In: **VII Seminário de hidrólise enzimática de biomassas**, Programa e resumos, 2002. p.199

MATOS, Z. R. **Avaliação das condições de hidrólise ácida na fermentação de xilose em xilitol**. 2001. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2001.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v.31,p.426-428,1959.

MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. 2012. 69 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, USP/EEL, Lorena, 2009.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.1, p.94-100, 2004.

NÁHLIK, J.; PALATOVÁ, M.; GÍRIO, F.; ROSEIRO, C. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. **Process Biochemistry**, v.38, n.12, p.1695-1705, 2003.

NYKO, D. ; GARCIA, J. L. F.; MILANEZ, A. Y.; DUNHAM, F. B.; A corrida tecnológica pelos biocombustíveis de segunda geração: uma perspectiva comparada. **BNDES Setorial - Biocombustíveis**, v.32, p.5-48, 2010.

NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., DELGENES, J. P., DELGENES, J. M. Xylitol production from xylose by two yeast strains: Sugar tolerance. **Current Microbiology**, v.27, p.191-7, 1993.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65, p.191-201, 1998.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Influence of k_L a on bioconversion of rice straw hemicellulosic hydrolysate to xylitol production. **Bioprocess Engineering**, v.21, p.505-508, 1999.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.36, p.271-275, 1991.

SALEMI, L. F. Biocombustíveis de segunda geração: o futuro passa por aqui. **Revista Brasileira de Bioenergia**, v.3, n.7, p.1-11, 2009.

SCHLEGEL, H. G. **General microbiology**. Cambridge University Press, 7º ed., 1990. 214p.

SHI, N. Q.; PRAHL, K.; HENDRICK, J.; CRUZ, J.; LU, P. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.201-215, 2000.

SILVA, C. J., ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v.32, n.4, p.248-52, 2001.

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.

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

TAHERZARDEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based ethanol. **BioResources**, v.2, n.4, p.707-738, 2007.

WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G.M. Bioconversion of brewers`s spent grains to bioethanol, **FEMS Yeast Research**, v.8, p.1175-1184, 2008.

ZHU, J.; YONG, Q.; XU, Y.; YU, S. Detoxification of corn stover prehydrolysate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioresoure Technology**, v.103, n.2, p.1663-1668, 2010.

CONCLUSÕES FINAIS

O trabalho aqui apresentado apontou o potencial do banco de culturas de leveduras isoladas das fontes naturais, caldo de cana-de-açúcar, rizosfera de cana-de-açúcar, bagaço de cana-de-açúcar e palha de milho, para produção de etanol e outros compostos. Há ainda 38 linhagens de leveduras com capacidade de fermentação de pentoses que não foram testadas. A levedura selecionada, isolada de caldo de cana-de-açúcar (código 311) e identificada como *Meyerozyma guilliermondii*, apresentou capacidade de crescimento e fermentação de pentoses (arabinose e xilose) tanto em meios sintéticos quanto em hidrolisados de cana. Embora a detoxificação e a suplementação nutricional com extrato de levedura tenham ocasionado aumento na produtividade em etanol, há ainda necessidade de prosseguir com o trabalho de otimização das condições ambientais e do meio de cultura para a obtenção de melhores resultados.

A levedura selecionada além de ter apresentado rendimento e produtividade em etanol, apresentou uma habilidade bastante interessante para as indústrias alimentícia e farmacêutica, devido a sua produção e rendimento em xilitol, um composto que poderia ser mais explorado utilizando essa levedura, pois o xilitol apresenta características interessantes por ser um carboidrato natural com poder adoçante semelhante ao da sacarose, além de apresentar propriedades anticariogênicas, sendo tolerado por diabéticos e recomendado para pessoas obesas.

A levedura isolada apresentou algumas características interessantes do ponto de vista industrial que poderiam ser melhor exploradas, como a capacidade de crescer e fermentar em temperaturas acima de 30 °C e em valores baixos de pH, como 3,5 e 4,5. Além disto, foi capaz de consumir ácido acético, um inibidor comumente encontrado em hidrolisados ácidos, promovendo a chamada “detoxificação biológica”. Esta característica merece uma especial atenção, uma vez que não é comumente encontrada em leveduras.