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

SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS FERMENTADORES DE XILOSE EM ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DA CASCA DE UVAS (*VITIS SPP*).

DÉBORA CRISTINA MORAES

São José do Rio Preto – SP

Fevereiro – 2012

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

SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS FERMENTADORES DE XILOSE EM ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DA CASCA DE UVAS (*VITIS SPP*).

DÉBORA CRISTINA MORAES

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto – SP

Fevereiro – 2012

SELEÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS FERMENTADORES DE XILOSE EM ETANOL A PARTIR DE DIFERENTES VARIEDADES DA CASCA DE UVAS (*VITIS SPP*).

DÉBORA CRISTINA MORAES

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Unesp – São José do Rio Preto (orientador)

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia-Cruz

Unesp – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

FEA Unicamp - Campinas

São José do Rio Preto – SP

Fevereiro – 2012

Moraes, Débora Cristina.
Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose em etanol a partir de diferentes variedades da casca de uvas (*Vitis spp*) / Débora Cristina Moraes. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2012.
68 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Fermentação. 3. Bioetanol. 4. Uvas - Indústria. I. Del Bianchi, Vanildo Luiz. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.12

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

Dedico,

A minha mãe e minhas irmãs por todo apoio,

e a Rafael por todo amor e compreensão em cada momento difícil.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi pela orientação, dedicação e confiança.

À Profª Drª Claudia Dorta por todos os conselhos e colaboração durante a realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Gradução de Engenharia e Ciência de Alimentos do IBILCE que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos.

À CAPES pela bolsa oferecida durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício Boscolo por fornecer o CG para a análise de etanol das amostras.

Ao técnico do laboratório de Bioprocessos, Newton, por todo auxílio.

Aos meus companheiros de laboratório Gisele Bueno, Samara Murari, Pedro Aquino, Mauricio Bonatto, Vivian Nascimento, pela amizade e cumplicidade de todos os dias.

Aos meus amigos da Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de alimentos.

À minha família que me apoiou em todos os momentos que precisei.

E principalmente a DEUS por me permitir chegar até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **01**

2. OBJETIVOS **03**

2.1 Objetivo Geral **03**

2.2 Objetivo Específico **03**

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **04**

3.1 Indústrias Vinícolas **04**

3.2 Composição dos materiais lignocelulósicos **04**

3.2.1 Celulose **06**

3.2.2 Hemicelulose **06**

3.2.3 Lignina **07**

3.3 Hidrólise dos materiais lignocelulósicos **08**

3.3.1 Hidrólise ácida **09**

3.3.2 Hidrólise enzimática **09**

3.3.3 Compostos tóxicos derivados da hidrólise **09**

3.4 Fermentação dos açúcares derivados da hidrólise **10**

3.4.1 Fermentação das hexoses **13**

3.4.1.1 GLICOSE **13**

3.4.2 Fermentação das pentoses **13**

3.4.2.1 XILOSE **13**

4. MATERIAL E MÉTODOS **15**

4.1 Amostras de casca de uva **15**

4.2 Isolamento de micro-organismos fermentadores de xilose a partir da casca de uva **15**

4.3 Processos fermentativos **16**

4.3.1 Fermentação para produção de etanol **16**

4.3.2 Tolerância à concentração de açúcar **16**

4.3.3 Otimização do pH **16**

4.3.4 Fermentação de xilose e glicose **16**

4.3.5 Fermentação em batelada alimentada (xilose) **16**

4.3.6 Fermentação em batelada alimentada (glicose) **17**

4.3.7 Fermentação de xilose em aerobiose **17**

4.4 Métodos analíticos **17**
4.4.1 Pré-identificação dos micro-organismos **17**
4.4.2 Método de contagem de leveduras e bactérias **17**
4.4.3 Quantificação do crescimento por densidade ótica (D.O) **17**
4.4.4 Curva de crescimento das leveduras RL1 e RL5 **18**
4.4.5 Cálculos relacionados ao crescimento celular **18**
4.4.5.1 Fator de conversão substrato a célula **18**
4.4.5.2 Produtividade em célula **18**
4.5 Determinação de açúcares redutores residuais por ADNS **19**
4.5.1 Velocidade média de consumo do substrato **19**
4.6 Determinação da concentração de etanol **19**
4.6.1 Cálculos relacionados à produção etanólica **20**
4.6.1.1 Fator de conversão substrato à etanol **20**
4.6.1.2 Produtividade em etanol **20**
4.6.1.3 Rendimento em etanol **20**
4.7 Forma de análise dos resultados **21**
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO **22**
5.1 Isolamento dos micro-organismos a partir da casca de uvas (*Vitis spp*) consumidores de xilose **22**
5.1.1 Pré-identificação dos micro-organismos **22**
5.1.1.1 Micro-organismos da Uva Rubi **22**
5.1.1.2 Micro-organismos da Uva Thompson **22**
5.1.1.3 Micro-organismos da Uva Niagara **22**
5.1.2 Crescimento e consumo de xilose **23**
5.1.2.1 Linhagens isoladas da Uva Rubi **23**
5.1.2.2 Linhagens isoladas da Uva Thompson **25**
5.1.2.3 Linhagens isoladas da Uva Niagara **26**
5.2 Fermentação da xilose em etanol **28**
5.2.1 Isolamento dos micro-organismos **28**
5.2.2 Crescimento celular **28**
5.2.3 Consumo de xilose **29**
5.2.4 Rendimento etanólico **30**
5.3 Avaliação da tolerância a diferentes concentrações de xilose **33**

5.3.1 Linhagens de micro-organismos **33**
5.3.2 Crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol **33**
5.4 Otimização do pH **35**
5.4.1 Linhagens de micro-organismos **35**
5.4.2 Análise do pH **35**
5.4.3 Consumo de xilose **36**
5.4.4 Estudos cinéticos **38**
5.5 Fermentação de glicose e xilose para produção de etanol **40**
5.5.1 Processo fermentativo **40**
5.6 Fermentação em batelada alimentada **45**
5.6.1 Processo fermentativo **45**
5.7 Fermentação em processo aeróbio **48**
5.7.1 Processo fermentativo **48**
6. DISCUSSÃO PRINCIPAIS RESULTADOS **50**
7. CONCLUSÕES **53**
8. APÊNDICE I **54**
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **61**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da organização da biomassa lignocelulósica **05**

Figura 2. Unidades de glicose na celulose **06**

Figura 3. Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose **07**

Figura 4. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de Eucalipto **08**

Figura 5. Rotas de hidrólise e fermentação **12**

Figura 6. Estrutura da glicose **13**

Figura 7. Estrutura da xilose **14**

Figura 8. Vias metabólicas para o catabolismo da xilose **14**

Figura 9. Crescimento celular das linhagens de leveduras e bactérias da uva Rubi, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **24**

Figura 10. Consumo de xilose das linhagens de leveduras e bactérias da uva Rubi, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **24**

Figura 11. Crescimento celular das linhagens de bactérias da uva Thompson, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **25**

Figura 12. Consumo de xilose das linhagens de bactérias da uva Thompson, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **26**

Figura 13. Crescimento celular das leveduras e bactérias da uva Niagara, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **27**

Figura 14. Consumo de xilose das linhagens de leveduras e bactérias da uva Niagara, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **27**

Figura 15. Crescimento celular das leveduras e bactérias obtidas das uvas Rubi, Thompson e Niagara, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **29**

Figura 16. Porcentagem de xilose consumida no processo fermentativo das onze linhagens isoladas das diferentes variedades de uva, com 2% de xilose, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **30**

Figura 17. Rendimento etanólico obtido pelas linhagens isoladas das diferentes variedades de uva em fermentação de xilose (2%), em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **31**

Figura 18. Consumo de xilose pelas leveduras RL1 e RL5, em pH 6,0 a 30ºC por 48 horas **34**

Figura 19. Porcentagem de xilose consumida por RL1 em diferentes pH, em meio com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48 horas **37**

Figura 20. Porcentagem de xilose consumida por RL5 em diferentes pH, em meio com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48 horas **38**

Figura 21. Consumo de xilose e glicose durante a fermentação pela linhagem de levedura RL1, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **41**

Figura 22. Consumo de xilose e glicose durante a fermentação pela linhagem de levedura RL5, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **42**

Figura 23. Produção de etanol durante a fermentação de xilose e glicose pela linhagem de levedura RL1, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **42**

Figura 24. Produção de etanol durante a fermentação de xilose e glicose pela linhagem de levedura RL5, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **43**

Figura 25. Crescimento da linhagem de levedura RL1 durante a fermentação alcoólica de xilose e glicose, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **43**

Figura 26. Crescimento da linhagem de levedura RL5 durante a fermentação alcoólica de xilose e glicose, com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas **44**

Figura 27. Fermentação de xilose em aerobiose pela levedura RL1 **49**

Figura 28. Fermentação de xilose em aerobiose pela levedura RL5 **49**

Figura 29. Comportamento do crescimento celular da levedura RL1 **55**

Figura 30. Comportamento do crescimento celular da levedura RL5 **55**

Figura 31. Curva padrão da xilose **56**

Figura 32. Curva padrão da glicose **56**

Figura 33. Curva padrão do etanol **57**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Distribuição da celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos **05**

TABELA 2. Massa celular, consumo de xilose, produção de etanol, parâmetros cinéticos das linhagens RL1 e RL5 **33**

TABELA 3. Valores do pH antes a após a fermentação pela linhagem RL1 **35**

TABELA 4. Valores do pH antes e após a fermentação pela linhagem RL5 **36**

TABELA 5. Variáveis analisadas e parâmetros cinéticos da levedura RL1 **38**

TABELA 6. Variáveis analisadas e parâmetros cinéticos da levedura RL5 **39**

TABELA 7. Dados da cinética de fermentação de glicose e xilose pelas leveduras RL1 e RL5 **40**

TABELA 8. Fermentação de xilose pela levedura RL1 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas **45**

TABELA 9. Fermentação de xilose pela levedura RL5 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas **46**

TABELA 10. Fermentação de glicose pela levedura RL1 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas **46**

TABELA 11. Fermentação de glicose pela levedura RL5 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas **46**

TABELA 12. Dados cinéticos da fermentação de xilose em aerobiose pelas leveduras RL1 e RL5. **48**

TABELA 13. Condições ótimas de fermentação da xilose para as linhagens RL1 e RL5 **52**

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

HMF	Hidróxi-metil-furfural
SFS	Sacarificação e fermentação simultânea
CDM	Conversão direta pelo micro-organismo
ARRT	Açúcares redutores residuais totais
(p:v)	Relação peso/volume
ppm	Parte por milhão
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
ADNS	Ácido Dinitrossalicílico
g/L.h	Grama por litro/hora
g/g	Rendimento grama por grama

RESUMO

A utilização dos resíduos da agroindústria para a criação de novos produtos com valor agregado é uma ferramenta muito importante que vem merecendo destaque no país e no mundo. O Brasil é considerado um dos países que mais geram resíduos, desta forma a transformação destes compostos em novos produtos é imprescindível já que contribui para a preservação ambiental promovendo a adequada disposição dos mesmos no ambiente. Neste contexto as indústrias vinícolas têm destaque, já que o subproduto gerado por elas é de lenta decomposição e acarreta em poluição do meio ambiente.

A casca e a semente da uva são responsáveis pela maior parte dos resíduos deste setor (cerca de 20 a 48%). Esta é composta por celulose (glicose), hemicelulose (xilose, arabinose) e lignina. A glicose proveniente da celulose é facilmente fermentada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, porém a xilose da hemicelulose não é fermentada por esta levedura. O presente trabalho busca selecionar a partir da casca de uva microrganismos capazes de fermentar a xilose dos materiais lignocelulósicos em etanol contribuindo para o aumento da produção de bioetanol além de reduzir o impacto ambiental causado por estes subprodutos.

Foram selecionadas três variedades de uva (Rubi, Thompson e Niagara). Alíquotas destes materiais serviram de substrato em meio liquido para o crescimento de bactérias e leveduras. Os microrganismos isolados foram testados quanto à capacidade de assimilar xilose como fonte de carbono e realizar fermentação para produção de etanol a partir deste açúcar.

Duas linhagens de leveduras denominadas RL1 e RL5 (da uva Rubi) mostraram-se promissoras neste tipo de fermentação. Também foram realizados ensaios para otimizar as condições de fermentação, verificar a tolerância em níveis mais elevados de açúcar no mosto, aerobiose, testar a fermentação de glicose por estas mesmas leveduras e tipos de processo, como batelada alimentada.

Para RL1 os melhores resultados foram obtidos no processo de batelada simples, em pH6,0, com 2% e 5% de açúcar no mosto em anaerobiose, sendo que a produção de etanol chegou a 6,2g/L, e o $Y_{e/s}$ máximo foi de 0,36g/g.

Para RL5 as melhores condições foram: processo em batelada simples, em pH6,0, com 3% de açúcar no mosto em anaerobiose. A produção maxima de etanol foi de 3,5 g/L e $Y_{e/s}$ máximo de 0,22g/g. Ambas as linhagens metabolizaram mais a xilose do que a glicose.

ABSTRACT

The use of agro-industrial residues to create new value-added products is a very important tool that is worth mentioning in the country and the world. Brazil is considered one of the countries that generate more residues, thus the transformation of these compounds into new products is essential as it contributes to environmental conservation by promoting the proper disposal of these compounds into the environment. In this context, the wine industries have highlighted, since by-product generated by them has a slow docomposition and lead to environmental pollution.

The grape skin and seed are responsible for most of the residues from this sector (about 20 to 48%). The grape skin is composed of cellulose (glucose), hemicellulose (xylose, arabinose) and lignin. The glucose derived from cellulose is easily fermented by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, but xylose of hemicellulose is not fermented by this strain. This study aimed to select microorganisms of grape skins capable of fermenting xylose from lignocellulosic materials into ethanol contributing to the increase in bioethanol production and reducing the environmental impact caused by these products.

Three grape varieties (Ruby, Thompson and Niagara) were selected.). Aliquots of these materials served as substrate in a liquid medium for bacteria and yeast growth. The isolated microorganisms were tested for their ability to assimilate xylose as carbon source and to carry out fermentation to ethanol production from this sugar.

Two strains of yeast called RL1 and RL5 (Ruby grape) have shown promise in this type of fermentation. Additional tests were also performed to optimize the fermentation conditions and to verify the tolerance on higher levels of sugar in the wort, aerobic fermentation, to evaluate the glucose fermentation by the selected yeasts and fed batch process.

The best results obtained for RL1 were simple batch process, pH6,0; 2% and 5% sugar in the wort, under anaerobic conditions, and ethanol production reached 6.2 g/L, and $Y_{e/s}$ maximum was 0.36 g/g.

The best conditions to RL5 were: simple batch process, pH6,0; 3% sugar in the wort, under anaerobic conditions. The maximum production of ethanol was 3.5 g/L and $Y_{e/s}$ up to 0.22 g/g. Both strains metabolized more xylose than glucose.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tornou-se destaque no cenário econômico mundial por conta de sua ampla atividade agrícola, porém devido a esta atividade está entre os países que mais geram resíduos agroindustriais. Dessa forma, é necessário buscar alternativas de reaproveitamento ou criação de novos produtos para evitar que estes subprodutos sejam causa de poluição e agressão ao meio ambiente. Segundo Oliveira et al. (2009), a indústria vinícola tem grande interesse nestas tecnologias já que os subprodutos gerados por ela são de lenta decomposição causando grande impacto ambiental. Dentro deste ramo industrial, os principais subprodutos são a casca e a semente de uva.

Existem diversos estudos que mostram a utilização dos subprodutos da indústria vinícola, como a fabricação de farinha de semente e casca de uva que possui um grande poder antioxidante (OLIVEIRA et al., 2009). A utilização da casca de uva para produção e caracterização de aromas de frutas (UENOJO, 2003) também tem sido amplamente estudada. Outra maneira é a utilização deste resíduo agroindustrial para a produção de etanol a partir da celulose e hemicelulose da casca de uva. A utilização de biomassa (bagaço, cascas de frutas) para a produção de álcool combustível pela rota química e biológica envolve basicamente dois processos: hidrólise dos polissacarídeos contidos nos materiais lignocelulósicos em açúcares e a fermentação destes em etanol.

Existem inúmeras técnicas para a hidrólise destes materiais lignocelulósicos, como a enzimática que se baseia na utilização de enzimas produzidas por micro-organismos

capazes de hidrolisar os materiais que compõem a casca de uva e materiais de outros vegetais. As mais utilizadas são as celulases e hemicelulases originadas de micro-organismos como *Penicillium echinulatum* e *Pleurotus ssp.* (DILLON; CAMASSOLA, 2007; MENEZES et al.,2009). Outra técnica muito usada é a hidrólise ácida que compreende a utilização de ácidos, tais como ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido acético, ácido peracético e ácido fosfórico associado com o tratamento térmico. Nesses processos, há a formação de açúcares fermentescíveis os quais serão submetidos à fermentação para a produção de etanol (CUZENS; MILLER, 1997; TEIXEIRA et al., 1999; GÁMEZ et al., 2006). O produto obtido no processo de hidrólise da celulose são as hexoses: açúcares com moléculas de seis carbonos, como a glicose; esta é fermentada facilmente pela *Saccharomyces cerevisiae.* No entanto, na hidrólise da hemicelulose são produzidos açúcares de cinco carbonos, como a xilose, sendo a biotransformação desta pentose a etanol um desafio, pois o metabolismo da xilose procede mais lentamente que o da glicose, provocando a inibição alcoólica sobre o micro-organismo que metaboliza as pentoses (ROSSELL, 2006). Além disso, poucos micro-organismos têm capacidade de converter xilose em etanol. Na literatura, encontram-se dados referentes a micro-organismos fermentadores de xilose, como a levedura *Pichia stipitis* que tem se mostrado promissora para aplicação industrial, já que fermenta a xilose rapidamente com alta produção de etanol e aparentemente não produz xilitol (DELLWEG et al., 1984; DU PREEZ et al., 1986); e os provenientes de modificações genéticas, como a *Zymomonas mobilis* e a *Escherichia coli* KO11, que são capazes de produzir etanol a partir de hexoses e pentoses, segundo Takahashi (1998) com uma eficiência de conversão de 95%.

Nas uvas Rubi, Thompson e Niagara (*Vitis spp*), existem várias leveduras naturalmente presentes como *Saccharomyces cerevisiae, Candida valida, Kloeckera apiculata e Pichia membranaefaciens*, dentre as quais *Candida* e *Pichia* são gêneros capazes de fermentar xilose em etanol (DU PREEZ et al., 1986), além de representarem uma nova fonte de micro-organismos para processos biotecnológicos (CARMONA, 1995).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral a seleção de cepas de micro-organismos com potencial para aplicação em processos de produção de bioetanol, considerando-se a capacidade de fermentar a xilose, de modo a se aproveitar esse açúcar do hidrolisado de materiais lignocelulósicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Selecionar micro-organismos consumidores de xilose a partir da casca de uva (*Vitis spp*).

- ✓ Produzir etanol a partir da fermentação de xilose.

- ✓ Estabelecer as condições ideais de fermentação dos micro-organismos isolados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústrias vinícolas

O Brasil é um país de grande atividade agrícola, com geração de expressivas quantidades de resíduos. A vitivinicultura é uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil. Nos últimos anos, tem se tornado importante, também, na geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento. Atualmente, existe um interesse crescente na exploração dos resíduos gerados pela indústria do vinho (ARVANITOYANNIS et al., 2006). Os subprodutos da vinificação são caracterizados como o bagaço, que consiste principalmente de sementes e cascas de uvas, o folhelho, o engaço, as borras e o sarro (SILVA, 2003).

A casca de uva é um material lignocelulósico composto por celulose, hemicelulose e lignina. Este tipo de material tem capacidade de disponibilizar através da hidrólise açúcares fermentescíveis, como a glicose e xilose.

3.2 Composição dos materiais lignocelulósicos

Os compostos lignocelulósicos são principalmente constituídos de celulose, hemicelulose e lignina, sendo que estas porções podem variar de acordo com a espécie do vegetal, fatores biológicos, condições de crescimento entre outros como mostra a Tabela 1. Representam uma das fontes de energia mais abundantes no planeta (SILVA, 2007).

Tabela 1. Distribuição de celulose, hemicelulose e lignina em biomassas e resíduos celulósicos (adaptado de MARTINS, 2011).

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina
Tronco de madeira dura	40-45	24-40	18-25
Tronco de madeira mole	45-50	24-35	25-35
Pastagem (grama)	25-40	25-50	10-30
Folhas	15-20	80-85	0
Papel	40-45	24-50	18-30
Resíduos de papel da indústria de polpação	60-70	10-20	5-10
Bagaço de cana-de-açúcar	40-50	20-26	18-25

A parte do vegetal que forma a parede celular é chamada de estrutura lignocelulósica (Figura 1). É constituída por uma estrutura fibrosa composta basicamente por carboidratos (celulose e hemicelulose), os quais estão ligados a uma estrutura que contêm substâncias aromáticas, denominada lignina.

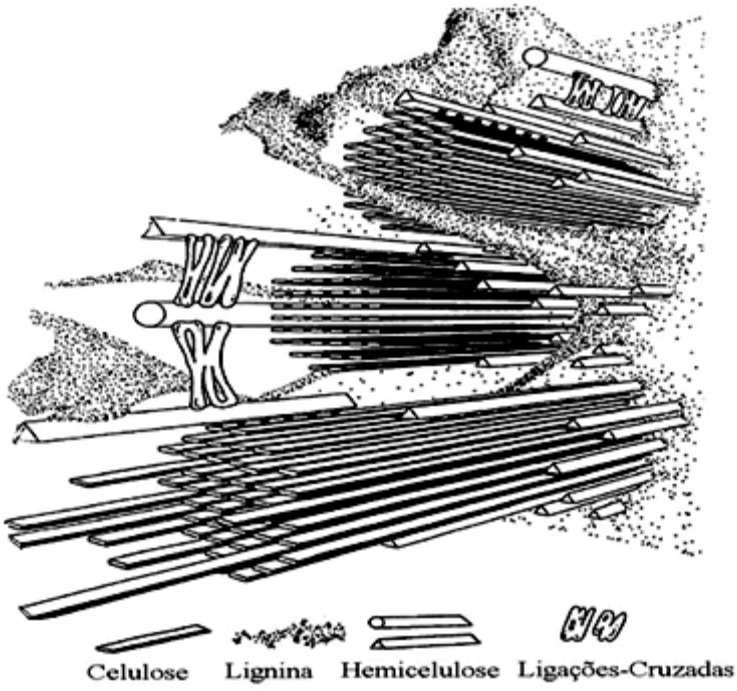


Figura 1. Representação da organização da biomassa lignocelulósica. (adaptado de BIDLACK; MALONE; BENSON, 1992).

3.2.1Celulose

É uma homoglicana, constituída de cadeias lineares de D-glicopiranoses, ligadas em β-(1,4) (Figura 2), em número que varia de 100 a 200 unidades de monossacarídeos $(C_6H_{10}O_5)_n$. As moléculas de celulose são estabilizadas por ligações de hidrogênio intramoleculares, entre as hidroxilas ligadas aos carbonos na posição três e o oxigênio do anel (Figura 2). Essas reações podem facilmente colocar-se paralelas uma às outras, devido à alta linearidade da molécula, formando regiões cristalinas, contribuindo para a insolubilidade e pouca reatividade da celulose (GOLDSTEIN, 1981).

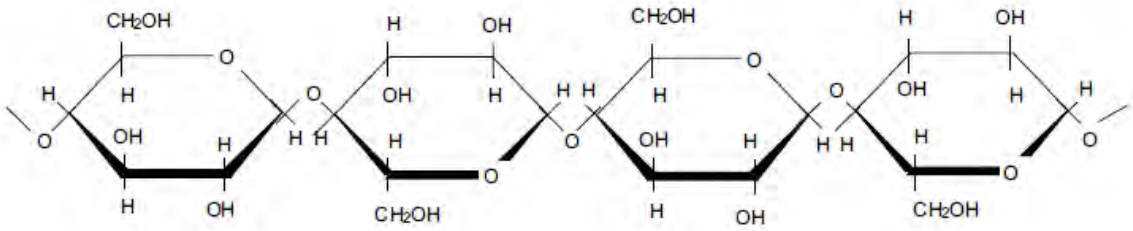


Figura 2. Unidades de glicose na celulose (LEHNINGER, 2002)

A celulose possui regiões amorfas e regiões cristalinas. As regiões amorfas são atacadas por solventes e reagentes químicos e as cristalinas não. Essa reação diferencial é usada na fabricação de celulose microcristalina, na qual as regiões amorfas são hidrolisadas por ácidos, deixando apenas pequenas regiões cristalinas resistentes.

Esta molécula é insolúvel em água, ácidos e álcalis, solúvel em solução amoniacal de hidróxido cúprico e dificilmente é totalmente hidrolisada por reagentes químicos, somente por enzimas, as celulases (PARISI, 1989).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero constituído principalmente por pentoses (xilose, arabinose), hexoses (glicose, manose, galactose) e ácidos urônicos, que são agrupados em estruturas maiores como xilano (beta-1,4-xilano), manano (glucomananos e galacto mananos) e galactanos (arabinogalactanos) (Figura 3).

São polissacarídeos complexos solúveis em água encontrados nas paredes de células vegetais, associados com celulose e lignina. São moléculas menores que as celuloses.

Junto com a pectina, forma uma matriz amorfa em torno das fibras de celulose (NEUREITER et al., 2002).

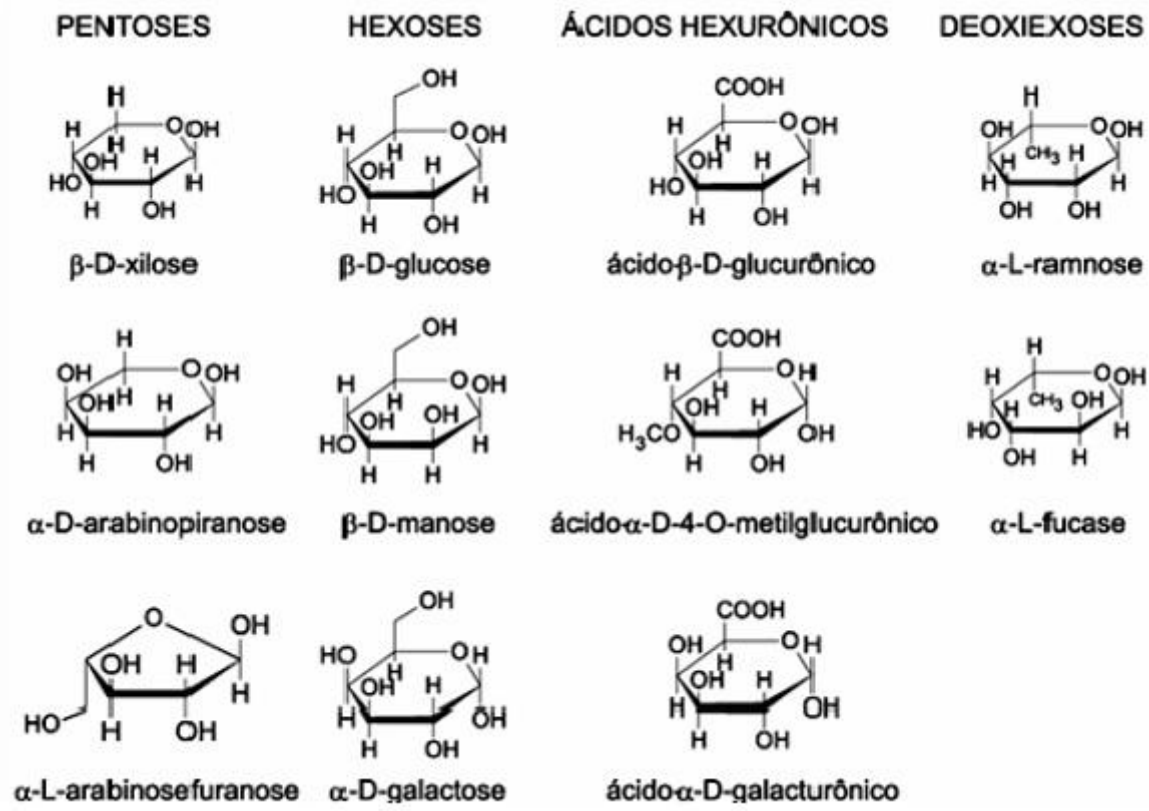


Figura 3. Açúcares que compõem as unidades de hemicelulose (LEHNINGER, 2002)

3.2.3 Lignina

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular, sendo responsável pela coesão entre as fibras, pela dureza dos compostos lignocelulósicos e atuando como barreira de proteção contra a degradação microbiana.

É um heteropolímero tridimensional, reticular de base fenólica, composta de três tipos de unidades de fenilpropano interligadas via sete tipos de ligações C-C ou C-O-C (Figura 4). Grupos metoxila se ligam nas posições 0, 1 e 2 (GOLDSTEIN, 1981; MARTINS, 2005).

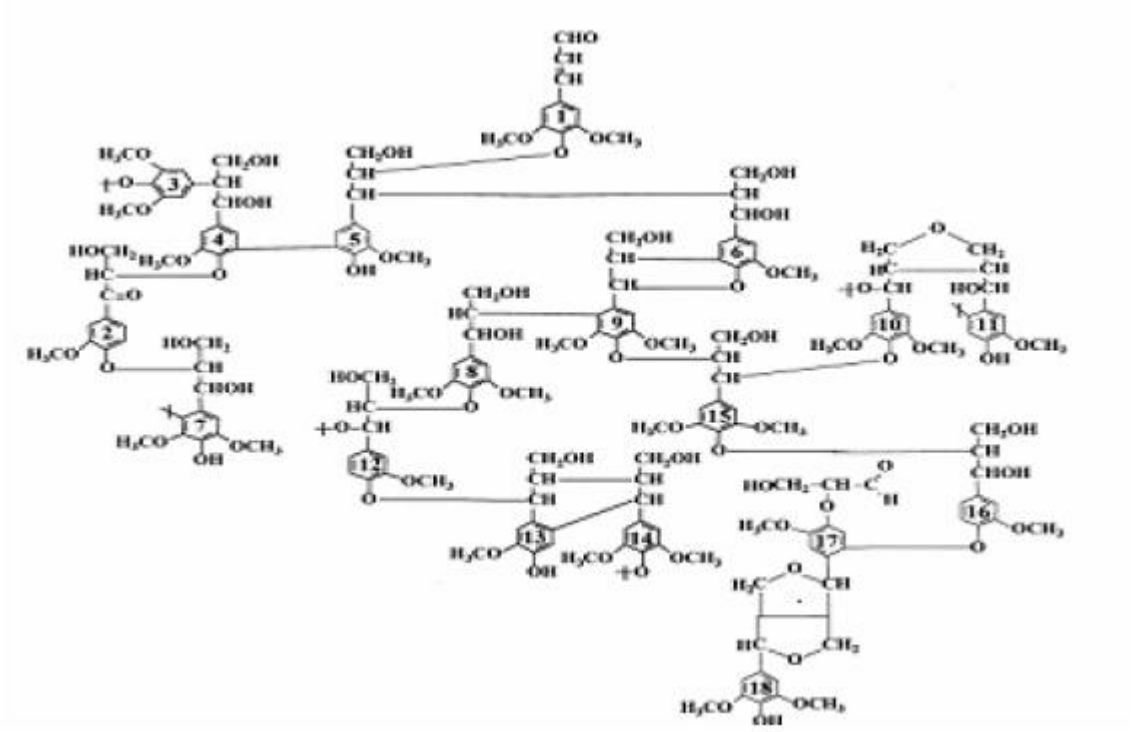


Figura 4. Estrutura proposta para a macromolécula de lignina de Eucalipto (LEHNINGER, 2002)

3.3 Hidrólise dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos podem originar carboidratos fermentescíveis através da hidrólise de seus componentes. A celulose origina monômeros de glicose, a hemicelulose dá origem a xilose e arabinose e a lignina por ser um material de muita fibra não é direcionada para a fermentação.

Existem duas maneiras para hidrolisar estes materiais, a hidrólise ácida e a hidrólise enzimática. O grande desafio da produção economicamente viável de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica consiste em determinar a melhor opção de disponibilizar a glicose e a xilose a partir da hidrólise da celulose e hemicelulose em termos de custo global, rendimento glicosídico e fermentabilidade do hidrolisado (GOMEZ, 1985).

As acentuadas diferenças nas propriedades estruturais e físico-químicas entre a celulose e a hemicelulose (composição química, morfologia, orientação molecular, resistência química e mecânica) demandam a realização de processos hidrolíticos em duas etapas, sendo a primeira com a finalidade de converter (e remover) as hemiceluloses, e a segunda com vistas à conversão da celulose em glicose (GOMEZ, 1985; ROSSEL, 2006).

Em termos gerais, um tratamento eficiente dos materiais lignocelulósicos para a produção de etanol deve ao mesmo tempo produzir polpa celulósica com elevada acessibilidade da fibra aos agentes hidrolíticos ácidos ou enzimáticos (digestibilidade),

garantir adequada recuperação das pentoses, além de limitar a geração de compostos inibidores aos micro-organismos usados na fermentação e às enzimas. Adicionalmente, aspectos associados ao uso de catalisadores de baixo custo, reciclagem de insumos e geração de subprodutos de alto valor agregado a partir da lignina caracterizam sistemas de pré-tratamento eco-eficientes (PEREIRA et al., 2007).

3.3.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida compreende a utilização de ácidos tais como sulfúrico (AGUILAR et al., 2002), clorídrico (CUZENS; MILLER, 1997), acético, peracético (TEIXEIRA et al., 1999), fosfórico (GÁMEZ et al., 2006). Nesse processo há a separação dos compostos lignocelulósicos, onde as frações (celulose e hemicelulose) serão submetidas à fermentação para a produção de etanol (NEUREITER et al., 2002; ROSSEL, 2006). Além disso, podem envolver também condições como altas temperaturas e pressão de trabalho, que facilitam o processo de hidrólise. Faz-se necessário o estudo da matéria-prima a ser utilizada já que as condições diferem em relação aos tipos de materiais usados.

3.3.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática baseia-se na utilização de enzimas produzidas por micro-organismos capazes de separar as substâncias que compõem os materiais vegetais (celulose, hemicelulose e lignina).

Dentre os trabalhos já publicados, estão entre as mais utilizadas as enzimas celulases e hemicelulases produzidas por micro-organismos como *Penicillium echinulatum*, *Pleurotus ssp.*(ROSSEL, 2006; DILLON; CAMASSOLA, 2007; MENEZES et al., 2009).

O uso das enzimas é preferível na hidrólise devido a sua alta eficiência e especificidade além de não haver geração de subprodutos e rapidez no processo, porém o que impede muitas vezes sua utilização no processo é o alto custo.

3.3.3 Compostos tóxicos derivados da hidrólise

Durante o pré-tratamento do material lignocelulósico ou nos processos de hidrólise catalisada por ácidos, não se obtém somente os açúcares provenientes da hidrólise. Na dissolução da celulose e hemicelulose, justamente por causa das altas temperaturas e condições ácidas nas quais se desenvolvem estes tratamentos, é originada uma série de

compostos que pode atuar como inibidores potenciais da fermentação. A natureza e concentração destes compostos dependem do tipo de matéria-prima (conteúdo percentual de celulose, hemicelulose e lignina), do pré-tratamento utilizado, das condições do processo (temperatura e tempo de reação) e do emprego ou não de catalisadores ácidos (ROSSEL, 2006).

Os materiais lignocelulósicos apresentam elevado teor de hemiceluloses (30%) constituídas predominantemente de polímeros de pentoses (xilanas e xilo-arabanas). Em virtude da alta reatividade das pentoses (particularmente a xilose), em temperaturas superiores a 140°C, a seletividade e o rendimento sacarídico do processo de hidrólise das hemiceluloses podem ser comprometidos, quando se realizam pré-tratamentos hidrolíticos do bagaço sob temperaturas superiores a 180°C durante tempos de processo da ordem de 30-60 minutos. A adoção de condições severas de processo tende a incrementar a degradação da xilose em furfural, bem como promover a degradação da glicose em hidróxi-metil-furfural (HMF), compostos potencialmente inibidores da fermentação etanólica (LASER et al., 2002; CARRION; DORTA, 2009). A solubilização e fracionamento da lignina, associada a elevadas severidades de processo, são potencialmente prejudiciais às etapas subseqüentes (fermentação), em virtude da deposição de lignina sobre a superfície da polpa celulósica, bem como da geração de compostos inibidores da fermentação tais como derivados fenólicos e ácidos orgânicos (FELIPE et al., 1997; AGUILAR et al., 2002; ROSSEL, 2006; PEREIRA et al., 2007)**.**

3.4 Fermentação dos açúcares derivados da hidrólise

A fermentação da glicose é um processo completamente estabelecido. Não existe micro-organismo mais apropriado que a levedura *Sacharomyces cerevisiae* que, através de seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica. Desde que os impactos negativos dos inibidores sejam controlados, a fermentação acontece sem maiores problemas (DORTA et al., 2006).

Quanto à fermentação das pentoses, poucos micro-organismos possuem a capacidade de fermentar estas a etanol (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985) .

Três espécies de leveduras foram identificadas como as de maior potencial para a fermentação alcoólica das pentoses: *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* (DU PREEZ et al.,1986) e *Pachysolen tannophilus*, porém o desempenho das mesmas é muito limitado. O

metabolismo das pentoses exige a presença de nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado. Estas cepas apresentam baixa tolerância ao etanol e aos ácidos alifáticos (DELLWEG et al., 1984; GOMEZ, 1985; RUDOLF et al., 2008).

Os estudos para obtenção de linhagens geneticamente modificadas de *Sacharomyces cerevisiae* para metabolizar as pentoses foram direcionados para as seguintes estratégias*:* inserção de genes bacterianos que realizam a isomerização da xilose a xilulose (xilose isomerase), está última fermentescível pelo *Sacharomyces*; inserção na *Sacharomyces cerevisiae* dos genes que permitam a assimilação da xilose; isomerização da xilose a xilulose via a adição de uma isomerase (GOMEZ, 1985; MATSUSHIKA et al.,2009).

Quanto ao emprego de bactérias termofílicas, têm sido realizados estudos com *Thermoanaerobacter ethanolicus*. Este organismo exige operar com mostos muitos diluídos em pentoses. Na fermentação com *Clostridium thermohydrosulfuricum* as dificuldades evidenciadas foram a formação significativa de acetatos que conduz a baixo rendimento alcoólico, baixa tolerância ao etanol e vulnerabilidade à presença de contaminantes. Bactérias termofílicas geneticamente modificadas vêm sendo estudadas visando evitar a formação de acetato em paralelo à formação de etanol. Os principais problemas relacionados ao emprego de bactérias termofílicas são: baixa tolerância ao etanol, forte sensibilidade aos inibidores, formação em paralelo de quantidade significativa de subprodutos e a necessidade de adicionar fatores de crescimento no mosto (TAKAHASHI, 1998).

Existe também a possibilidade de emprego de bactérias mesofílicas. Certas bactérias como a *Zymomonas mobilis* não são capazes de fermentar as pentoses, porém são muito eficientes no metabolismo da glicose a etanol através da via Entner Doudoroff. A introdução de genes de *Escherichia coli* possibilitou a fermentação da xilose a etanol. A *Zymomonas mobilis* é um dos micro-organismos mais promissores para fermentação do licor de hidrólise, por possuir forte tolerância ao etanol e aos inibidores e alta produtividade de fermentação. Dos micro-organismos com genes recombinantes, é a melhor para realizar com sucesso a fermentação das pentoses. Outras bactérias mesofílicas capazes de metabolizar as pentoses em ausência de oxigênio são: *Escherichia coli* e *Klebsiella.* Estas, depois de submetidas às modificações genéticas, estão sendo estudadas como alternativas para fermentação alcoólica do licor de hidrólise. É importante destacar que a única experiência industrial de fermentação alcoólica de mostos à base de açúcar empregando linhagem de *Zymomonas mobilis,* realizada na Alemanha nos anos 90, não foi bem sucedida e a unidade foi desativada voltando ao processo convencional com leveduras como agente de fermentação. O motivo pelo qual o processo foi suspenso seria que nas condições em que a

fermentação procede aparece uma rápida contaminação que inibe a fermentação (OTHA et al., 1991; ROSSEL, 2006).

Para realizar a fermentação alcoólica de um licor contendo pentoses e hexoses, as possibilidades em estudo são: fermentação simultânea ou seqüencial de pentoses e hexoses, ou seja, processo de conversão direta pelo micro-organismo (CDM). Na fermentação simultânea, dois micro-organismos que fermentem respectivamente a glicose e a xilose são cultivados em co-cultura (Figura 5). A maioria dos trabalhos realizados neste campo utilizou duas leveduras: *S. cerevisiae e P. stipitis* (pentoses). As dificuldades encontradas foram: o metabolismo da xilose procede mais lentamente que o da glicose, provocando a inibição alcoólica sobre o micro-organismo que metaboliza as pentoses; repressão catabólica da glicose sobre a utilização da xilose; competição entre *S. cerevisiae* e a levedura responsável pela fermentação da xilose pelo oxigênio presente no meio; possível incompatibilidade entre as duas cepas (ROSSEL, 2006; RUDOLF et al., 2008).

Uma alternativa é a de operar a fermentação num esquema seqüencial (monocultura), fermentando primeiro a glicose e depois a xilose (ou vice-versa). Os melhores resultados obtidos até agora foram usando uma linhagem mutante de *Escherichia coli* incapaz de metabolizar glicose, seguida de uma segunda etapa de fermentação da glicose com *S. cerevisiae* (RUDOLF et al., 2008).

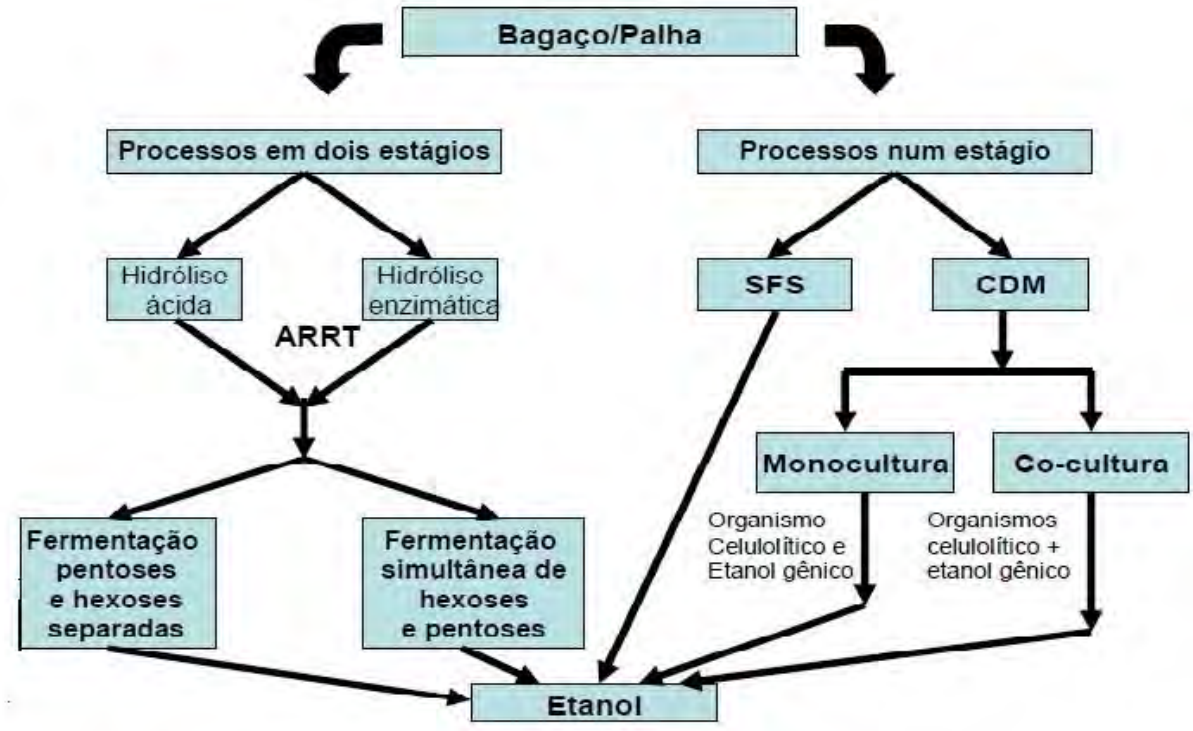


Figura 5. Rotas de hidrólise e fermentação (ROSSEl, 2006 *apud* Ogier, 1999, Domínguez, 2003).

3.4.1 Fermentação das hexoses

3.4.1.1 GLICOSE

D-glicose (Figura 6), conhecida também como açúcar de milho, é uma das principais fontes de energia dos organismos vivos. Ocorre na forma livre em frutas e mel, principalmente na forma piranosídica. É facilmente obtida nas duas formas anoméricas, que podem ser separadas facilmente por vários métodos. O isômero α pode ser obtido tanto na forma de cristais anidros, como na forma mono-hidratada. A β-D-glicopiranose forma cristais incolores. Ambas as formas são bastante solúveis em água (DERGAL, 1981; FENNEMA, 1997, LEHNINGER et al., 2002). A fermentação da glicose em etanol, como já mencionado anteriormente, é bastante difundida e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável.

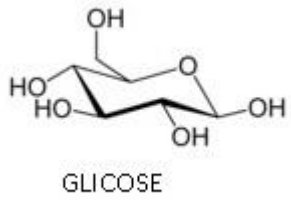


Figura 6. Estrutura da glicose (LEHNINGER, 2002)

3.4.2 Fermentação das pentoses

3.4.2.1 XILOSE

D-Xilose (Figura 7) é uma pentose não encontrada livre na natureza, mas largamente distribuída em polissacarídeos (as xilanas) existentes na madeira, palha, casca de cereais, sabugo de milho, de onde é obtida facilmente por hidrólise ácida (DERGAL, 1981; FENNEMA, 1997, LEHNINGER et al., 2002).

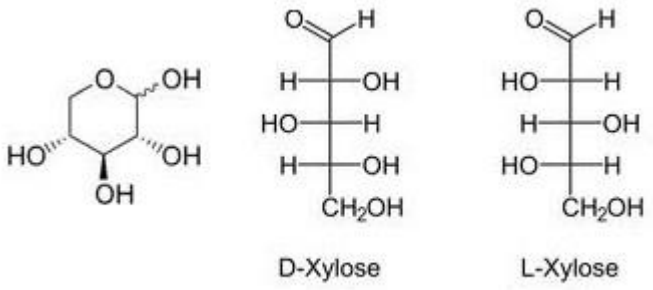


Figura 7. Estrutura da xilose (LEHNINGER, 2002).

Poucos micro-organismos possuem a capacidade de metabolizar a xilose em etanol e pouco é conhecido com relação à via fermentativa. A Figura 8 mostra as possíveis vias metabólicas de fermentação da xilose. A primeira ocorre em bactérias e alguns eucariotos, onde a enzima xilose isomerase catalisa a conversão de xilose em xilulose que é facilmente convertida em xilulose-5-fosfato na via das pentoses (PPP) em frutose-6-fosfato, seguindo a via glicólise a piruvato. A segunda via ocorre em algumas leveduras e fungos que não possuem xilose isomerase e inclui uma etapa, a conversão de xilose para xilitol pela xilose redutase e para xilulose pela xilitol desidrogenase seguindo a mesma via até piruvato (JACKSON; NICOLSON, 2002).

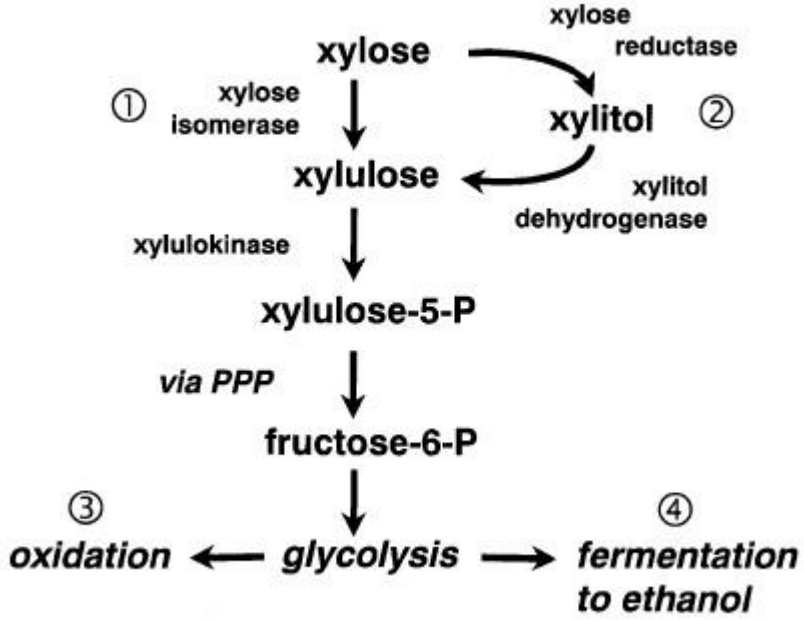


Figura 8. Vias metabólicas para o catabolismo de xilose: (1) etapas seguidas pela maioria das bactérias e eucariotos, (2) etapas seguidas por alguns fungos e leveduras, (3) oxidação que pode acontecer em todos os organismos e (4) fermentação a etanol. Fonte: JACKSON; NICOLSON, (2002).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de casca de uva

As uvas selecionadas foram de três variedades: Rubi, Thompson e Niagara, obtidas no CEAGESP de São José do Rio Preto–SP, no mês de março de 2011.

4.2 Isolamento de micro-organismos fermentadores de xilose da casca de uva

Foram colocados 20g (massa úmida) de cada amostra de casca de uva (previamente lavadas com água destilada), em um Erlenmeyer de 1000 mL contendo 500 mL de meio base de cultura (peptona 0,5% (p:v), $MgSO_4$ 0,035% (p:v), K_2HPO_4 0,05% (p:v), Na_2HPO_4 0,05% (p:v)), e outros 20g (massa úmida) de cada amostra de casca de uva no mesmo meio base acrescido de 2% álcool, sendo incubados em agitador orbital a 32ºC com agitação a 120 rpm por 72 horas. Após o crescimento dos micro-organismos, estes foram estriados no meio base citado com adição de xilose 2% (p:v) e ágar bacteriológico 1,5% (p:v). Para o isolamento de bactérias, foram adicionados 200ppm de cetoconazol no meio base e para leveduras 200ppm de cloranfenicol. A incubação dos micro-organismos foi feita a 28°C e 32ºC, respectivamente.

4.3 Processos fermentativos

4.3.1 Fermentação para produção de etanol

Os micro-organismos obtidos no isolamento a partir da casca de uva foram submetidos a uma fermentação em meio contendo xilose 2%(p:v), peptona 0,5%(p:v); $ZnSO_4.7H_2O$ 0,02%(p:v); $MgSO_4$ 0,035%(p:v); $MnSO_4.H_2O$ 0,01%(p:v); Na_2HPO_4 0,05%(p:v); K_2HPO_4 0,05%(p:v), com volume final de 8mL, pH 6,0 e incubados 32°C por 48 horas.

4.3.2 Tolerância à concentração de açúcar

As linhagens, foram submetidas à fermentação em meio base (peptona 0,5%(p:v); $ZnSO_4.7H_2O$ 0,02%(p:v); $MgSO_4$ 0,035%(p:v); $MnSO_4.H_2O$ 0,01%(p:v); Na_2HPO_4 0,05%(p:v); K_2HPO_4 0,05%(p:v)) com variação da concentração da xilose (2%, 3%, 4% , 5%) e volume final 15mL.

4.3.3 Otimização do pH

Posteriormente as linhagens isoladas foram submetidas à fermentação em meio: xilose 2%(p:v), peptona 0,5%(p:v); $ZnSO_4.7H_2O$ 0,02%(p:v); $MgSO_4$ 0,035%(p:v); $MnSO_4.H_2O$ 0,01%(p:v); Na_2HPO_4 0,05%(p:v); K_2HPO_4 0,05%(p:v) com volume final de 15mL e a dez pH diferentes (3,5; 3,8; 4,0; 4.2; 4,4; 4,6; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0) para verificar a melhor eficiência.

4.3.4 Fermentação em glicose e xilose

As leveduras RL1 e RL5 foram testadas em meio fermentativo com xilose (2%) ou glicose (2%). A composição do meio foi a seguinte: peptona 0,5%(p:v); $ZnSO_4.7H_2O$ 0,02%(p:v); $MgSO_4$ 0,035%(p:v); $MnSO_4.H_2O$ 0,01%(p:v); Na_2HPO_4 0,05%(p:v); K_2HPO_4 0,05%(p:v), com volume final de 40mL, pH 6,0 e incubadas a 30ºC por 48horas. Alíquotas desta fermentação foram retiradas de 12 em 12horas para as análises.

4.3.5 Fermentação em batelada alimentada (xilose)

As leveduras RL1 e RL5 foram testadas na fermentação em batelada alimentada. Elas foram incubadas a 30°C por 48horas, pH 6,0 e volume final de 40 mL. O meio fermentativo foi o meio base e a cada 12h a xilose era completada para 2% através da verificação da concentração do açúcar via análise de açúcar redutor.

4.3.6 Fermentação em batelada alimentada (glicose)

As leveduras RL1 e RL5 foram testadas na fermentação em batelada alimentada. Elas foram incubadas a 30°C por 48horas, pH 6,0 e volume final de 40 mL. O meio fermentativo foi o meio base e a cada 12h a glicose era completada para 2%.

4.3.7 Fermentação de xilose em aerobiose

Foi realizada uma pré-fermentação em meio líquido com xilose (1%) com volume final de 100 mL, agitação de 200 rpm, com pH 6,0, onde foram incubadas as leveduras RL1 e RL5 por 24horas a 30ºC.

A fermentação ocorreu no meio base com xilose 2% com volume final de 40 mL, pH 6,0, agitação de 150 rpm. Foram incubadas a 30°C por 96horas. Alíquotas foram retiradas a cada 24horas para realizar as análises.

4.4 Métodos analíticos

4.4.1. Pré-identificação dos micro-organismos

A análise morfológica do micro-organismo foi realizada através de visualização em microscópio óptico usando as objetivas 40x e 100x. Após o isolamento, as bactérias obtidas em meio com xilose foram submetidas à coloração de Gram.

4.4.2 Método de contagem de leveduras e bactérias

A contagem microbiana foi feita no tempo zero de fermentação (padronização do inoculo inicial) e após o processo fermentativo através de plaqueamento em superfície em meio PCA (IMEDIA REF M091) e por microscopia óptica em câmara de Neubauer usando as objetivas de 40x e 100x.

4.4.3 Quantificação do crescimento por densidade ótica

O crescimento celular foi determinado pela medida da absorbância a 600nm. Para calcular a concentração, foi feita uma curva de calibração do peso seco e absorbância obtida para as leveduras RL1 e RL5.

4.4.4 Curva de crescimento das leveduras RL1 e RL5

Foi feita uma curva para verificar o crescimento das linhagens de leveduras RL1 e RL5. O meio de cultura utilizado foi o meio base já citado anteriormente, volume final de 40 mL, pH 6,0 incubadas a 30°C por 48horas.

Foi medido o crescimento através da correlação entre absorbância a 600nm e peso seco mg/mL. A medida foi realizada em 11 pontos dentro das 48horas de fermentação. O experimento foi realizado em triplicata (Figuras 29 e 30 do apêndice I).

4.4.5 Cálculos relacionados ao crescimento celular

4.4.5.1 Fator de conversão substrato a célula (g/g)foi calculado pela Equação 1.

$$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_t - S_f} \quad (1)$$

Onde,

X_f – concentração celular final (g/L)

X_0 – concentração celular inicial (g/L)

S_t – concentração de substrato total (g/L)

S_f – concentração de substrato final (g/L)

$Y_{x/s}$ – fator de conversão substrato a célula (*g/g*)

4.4.5.2 Produtividade em célula (g/L.h) foi calculado pela Equação 2.

$$P_X = \frac{X_f - X_0}{t_f} \quad (2)$$

Onde,

X_f – concentração celular final (g/L)

X_0 – concentração celular inicial (g/L)

t_f – tempo total de fermentação (horas)

P_x – produtividade em célula (g/L.*h*)

4.5 Determinação de açúcares redutores residuais por ADNS

O consumo de xilose e glicose foi medido por ADNS (ácido dinitrossalicílico) (MILLER, 1959), utilizando-se de 0,5mL da amostra diluída e adicionando volume igual de solução de DNS nos tubos de ensaio, fervidos a seguir durante 5 minutos. A amostra foi resfriada e em seguida adicionou-se 4mL de água destilada. Simultaneamente, foi feita a curva de calibração (Figuras 31 e 32 do apêndice I) com diferentes concentrações de xilose e glicose (P.A. Labsynth). A leitura em espectrofotômetro foi feita a 540nm. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

4.5.1 Velocidade média de consumo do substrato g/L.h

A velocidade média do consumo de substrato foi calculada através da Equação 3.

$$P_S = \frac{S_t - S_f}{t_f} \quad (3)$$

Onde,

S_f – concentração substrato final (g/L)

S_t – concentração substrato total (g/L)

t_f – tempo total de fermentação (horas)

P_s – velocidade média consumo de substrato (g/L.*h*)

4.6 Determinação da concentração de etanol

A concentração de etanol foi determinada através de cromatógrafo a gás Hewlett Packard series II modelo 5890 equipado com coluna SPB-35 e detector de ionização de chama. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas a 230ºC. A temperatura do forno foi programada inicialmente para 40ºC, sendo aumentada a uma velocidade de 20ºC/min até a temperatura final de 100ºC. Como gás de arraste foi utilizado nitrogênio e uma taxa *split* de 1:5. A amostra do *headspace* foi retirada por meio de uma seringa própria para gases. Simultaneamente, foi feita uma curva de calibração (Figura 33 do apêndice I) com diferentes concentrações de etanol.

4.6.1 Cálculos relacionados à produção etanólica

4.6.1.1 Fator de conversão substrato a etanol (g/g)foi determinado pela Equação 4.

$$Y_{E/S} = \frac{E_f - E_0}{S_t - S_f} \quad (4)$$

Onde,

E_f – concentração produto final (g/L)

E_0 – concentração produto inicial (g/L)

S_t – concentração de substrato total (g/L)

S_f – concentração de substrato final (g/L)

$Y_{e/s}$ – fator de conversão substrato a produto (*g/g*)

4.6.1.2 Produtividade em etanol (g/L.h) foi determinada pela Equação 5.

$$P_E = \frac{E_f - E_0}{t_f} \quad (5)$$

Onde,

E_f – concentração produto final (g/L)

E_0 – concentração produto inicial (g/L)

t_f – tempo total de fermentação (horas)

P_e – produtividade em etanol (g/L.h)

4.6.1.3 Rendimento em etanol (%) foi determinada pela Equação 6

$$\eta(t) = \frac{Y_{E/S}}{0{,}511} \cdot 100 \quad (6)$$

Onde,

$Y_{e/s}$ – fator de conversão substrato a produto (g/g)

0,511 – coeficiente de transformação de açúcar a etanol

4.7 Forma de análise dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata. Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância **(ANOVA)** e as médias comparadas pelo teste de **Tukey** e **Kramer** através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University Camden, New Jersey). Os resultados foram considerados significativos para $P<0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento dos micro-organismos a partir da casca de uvas (*Vitis spp*) consumidores de xilose.

5.1.1 Pré-identificação dos micro-organismos isolados

5.1.1.1 Micro-organismos da Uva Rubi

Da uva Rubi foram selecionadas seis linhagens de leveduras denominadas de RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6. E doze linhagens de bactérias (cocos e bastonetes gram-positivos) denominadas de RB1, RB2, RB4, RB5, RB6, RB7, RB8, RB9, RB10, RB11, RB12.

5.1.1.2 Micro-organismos da Uva Thompson

Da uva Thompson foram isoladas catorze linhagens de bactérias (cocos e bastonetes gram-positivos) denominadas de TB1, TB2, TB3, TB4, TB5, TB6, TB7, TB8, TB9, TB10, TB11, TB12, TB13, TB14.

5.1.1.3 Micro-organismos da Uva Niagara

Foram isoladas seis linhagens de leveduras (NL1, NL2, NL3, NL4, NL5 e NL6) e doze linhagens de bactérias (cocos gram-positivos) denominadas de NB1, NB2, NB3, NB4, NB5, NB6, NB7, NB8, NB9, NB10, NB11 e NB12.

A presença de micro-organismos (leveduras e bactérias) é citado pela literatura como sendo comum encontrá-los naturalmente presentes na casca de uvas. Entre as leveduras as principais são *Saccharomyces cerevisiae, Candida valida, Kloeckera apiculata e Pichia membranaefaciens* (MAMEDE; PASTORE, 2004; FERNANDES, 2008).

Entre as bactérias, a literatura aponta que na natureza há um predomínio de bastonetes gram-positivos produtores de xilanases e fermentadores de xilose (GOMEZ, 1985; CARMONA, 1995).

5.1.2 Crescimento celular e consumo de xilose

5.1.2.1 Linhagens isoladas da uva Rubi

A figura 9 mostra que o crescimento celular das linhagens de leveduras e bactérias isoladas a partir da uva Rubi após 48horas de fermentação foi considerado significativo (Tukey, $P<0,05$) para todas as linhagens, sendo que a produtividade em células (P_x) foi em média 0,006 g/L.h. Quanto ao consumo de xilose a maioria das linhagens apresentou consumo significativo (Tukey, $P<0,05$), com velocidade média do consumo de substrato (P_s) em torno de 0,23 g/L.h. As exceções foram as linhagens RL2 e RB6 que pouco consumiram a pentose, porém direcionaram o açúcar consumido para crescimento celular já que apresentaram as mais altas taxas de conversão de substrato a célula ($Y_{x/s}$) 0,287g/g e 0,120 g/g respectivamente, enquanto que as outras linhagens apresentaram taxa de 0,03 g/g em média (Figura 10 e Quadro 1 do apêndice I).

As linhagens que mais consumiram a pentose foram RL1, RL5, RB3 e RB4 não havendo diferença significativa entre elas (Tukey, $P>0,05$).

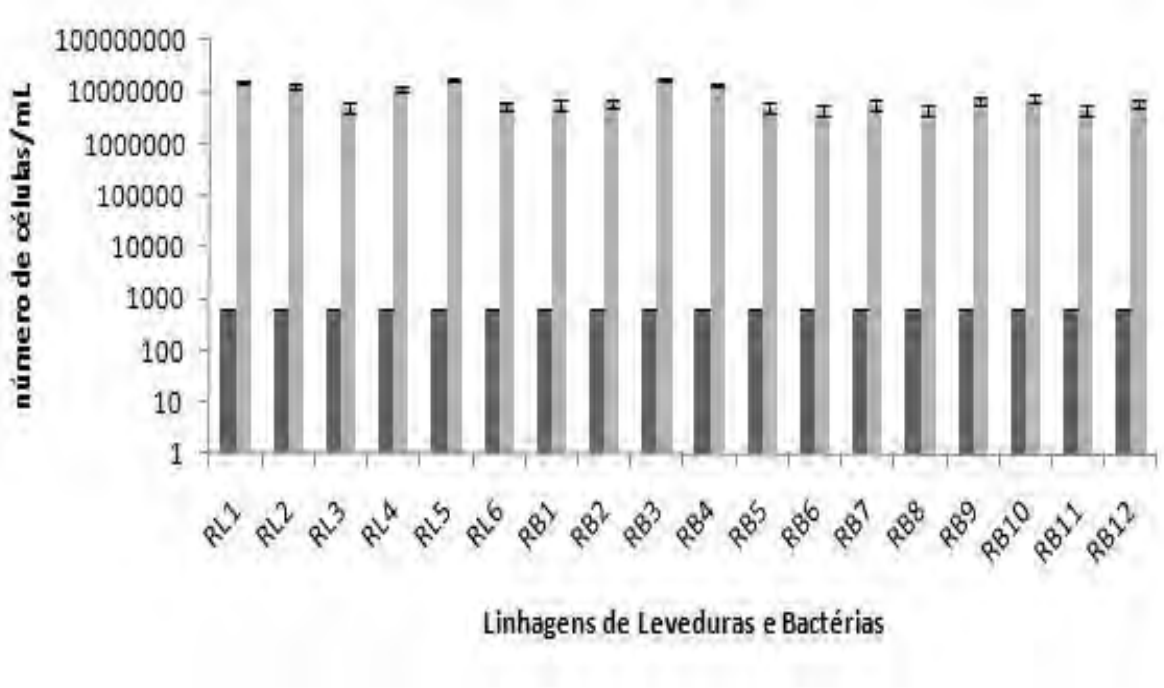


Figura 9. Crescimento celular das linhagens de leveduras e bactérias da uva Rubi com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas . T0h T48h

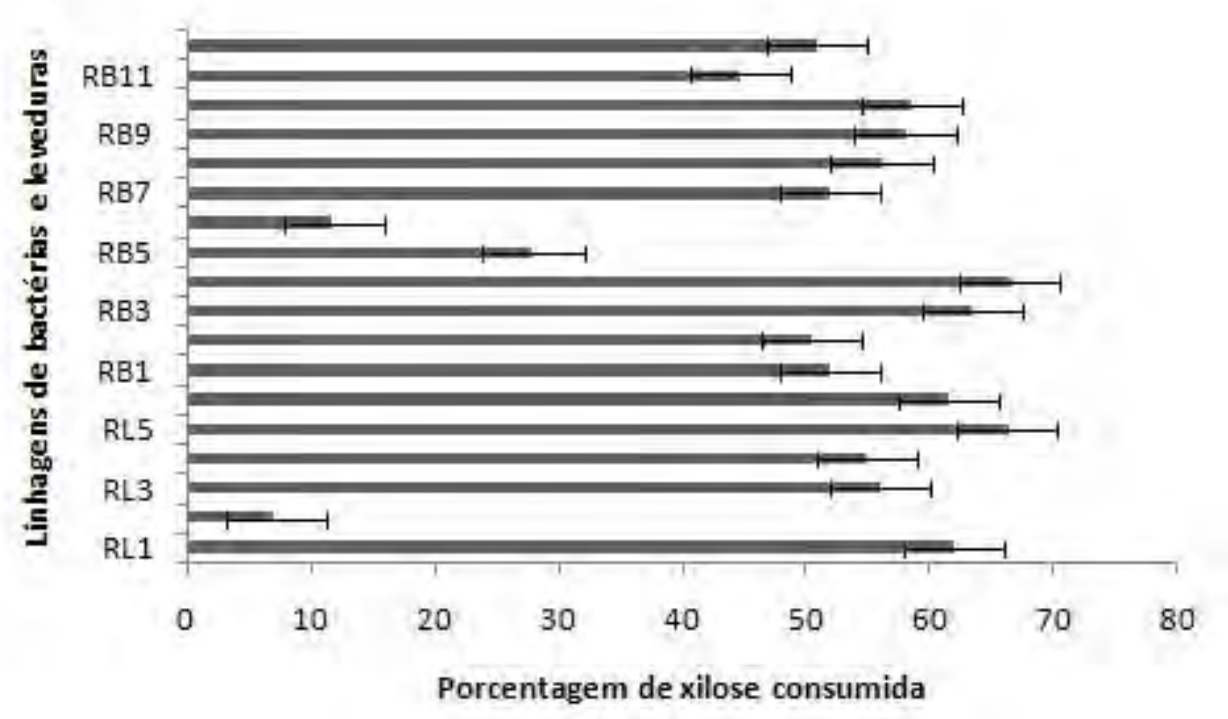


Figura 10.Consumo de xilose das linhagens de leveduras e bactérias da uva Rubi com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

5.1.2.2 Linhagens isoladas da uva Thompson

A figura 11 mostra que o crescimento celular das linhagens de bactérias isoladas a partir da uva Thompson após 48horas de fermentação foi significativo para todas as linhagens (Tukey, P<0,05). A média de produtividade em célula (P_x) foi de 0,004 g/L.h (Quadro 2 do apêndice I).

O consumo de xilose foi significativo (Tukey, P<0,05) para a maioria das linhagens, com exceção da TB9 que consumiu apenas 10% do açúcar, direcionando quase que exclusivamente para a biomassa, já que a taxa de conversão de substrato a célula ($Y_{x/s}$) foi a mais alta com valor de 0,08 g/L.h, como pode ser observado no Quadro 2 do apêndice I.

As linhagens que mais consumiram substrato foram TB7, TB8 e TB14 com velocidade média de consumo ao redor de 0,24 g/L.h (Figura 12 e Quadro 2 do apêndice I).

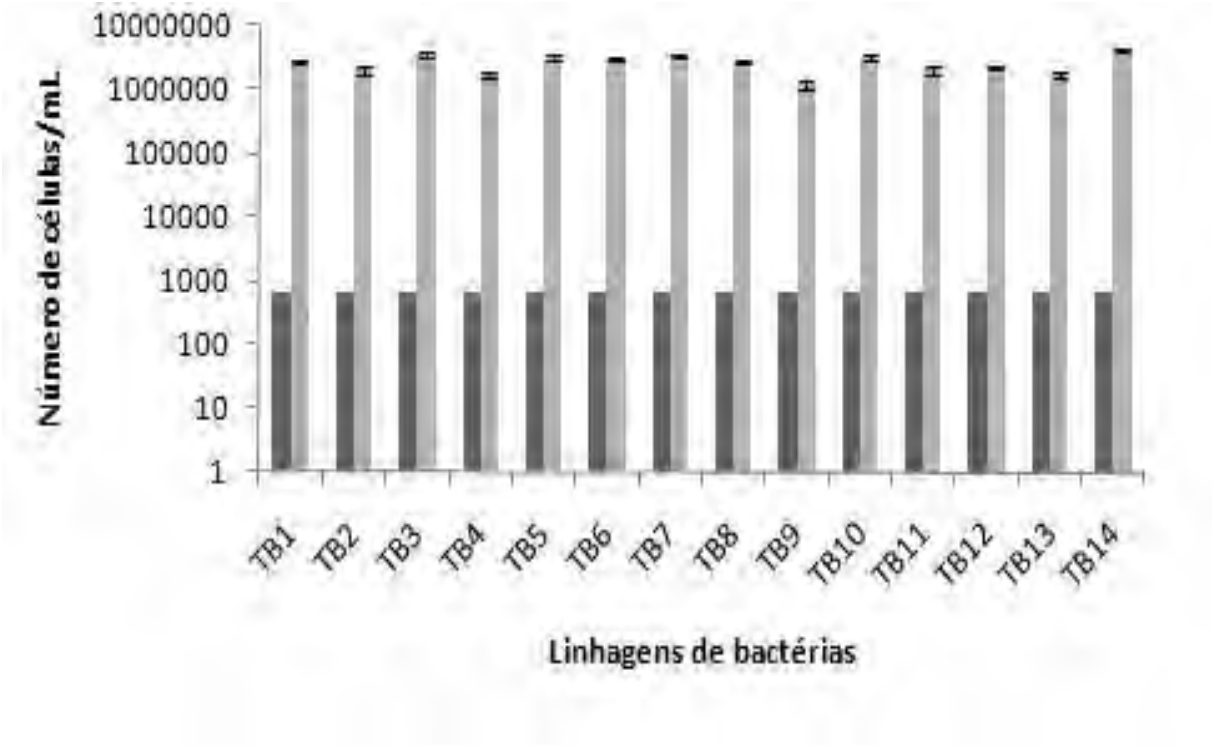


Figura 11. Crescimento celular das linhagens de bactérias da uva Thompson com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas. ■ T0h ■ T48h

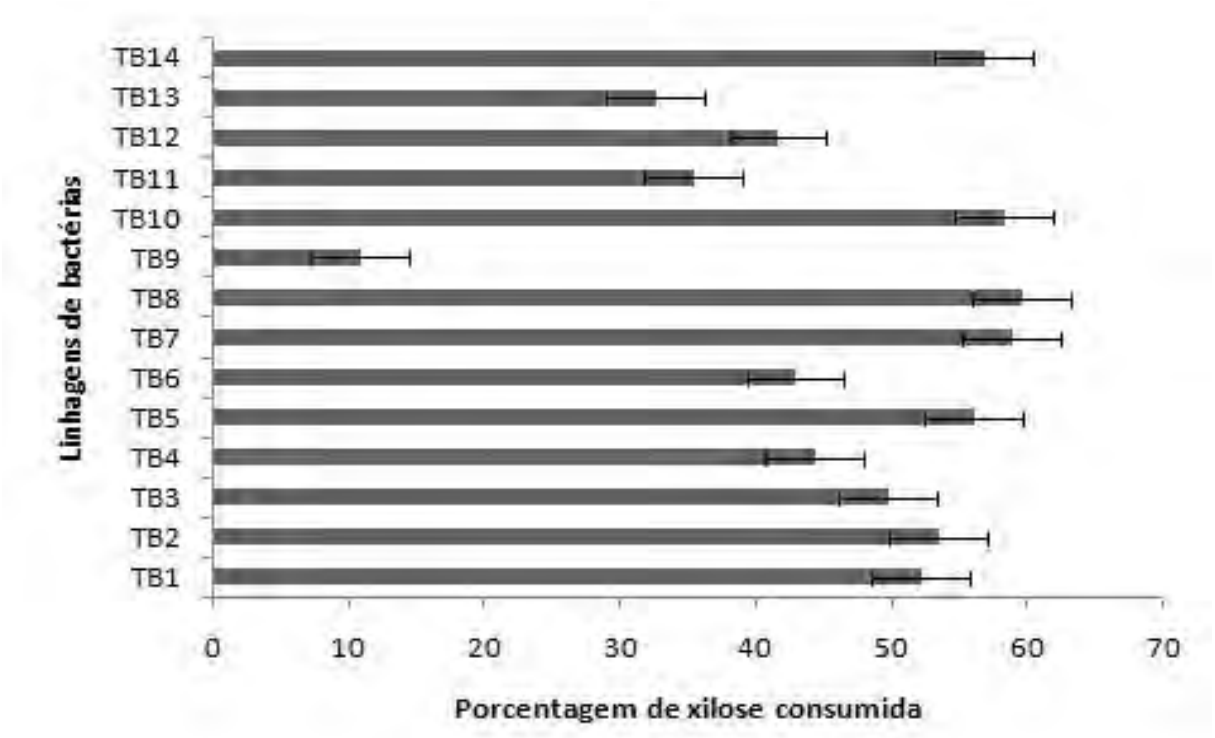


Figura 12. Consumo de xilose das linhagens de bactérias da uva Thompson com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

5.1.2.3 Linhagens isoladas da uva Niagara

A Figura 13 mostra que o crescimento celular das linhagens de leveduras e bactérias isoladas a partir da uva Niagara após 48horas de fermentação foram significativos para todas as linhgens obtidas (Tukey, $P<0,05$). Com relação ao consumo de xilose as linhagens que mais consumiram foram NL4, NL6, NB4, NB8 e NB11, sendo este consumo significativo em relação a maioria das demais linhagens (Tukey, $P<0,05$) mas não diferindo estatisticamente entre elas (Tukey, $P>0,05$) (Figura 14).

Quanto a velocidade média do consumo de substrato (P_s), a grande maioria manteve-se na faixa de 0,20 a 0,25 g/L.h, com exceção de NL2 NB2 que apresentaram 0,15 g/L.h sendo também as linhagens que menos cresceram e pouco consumiram açúcar (Figuras 13 e 14 e Quadro 3 do apêndice I).

A linhagem NL1 foi a que mais direcionou consumo de substrato para o crescimento ($Y_{x/s}$ 0,35 g/g).

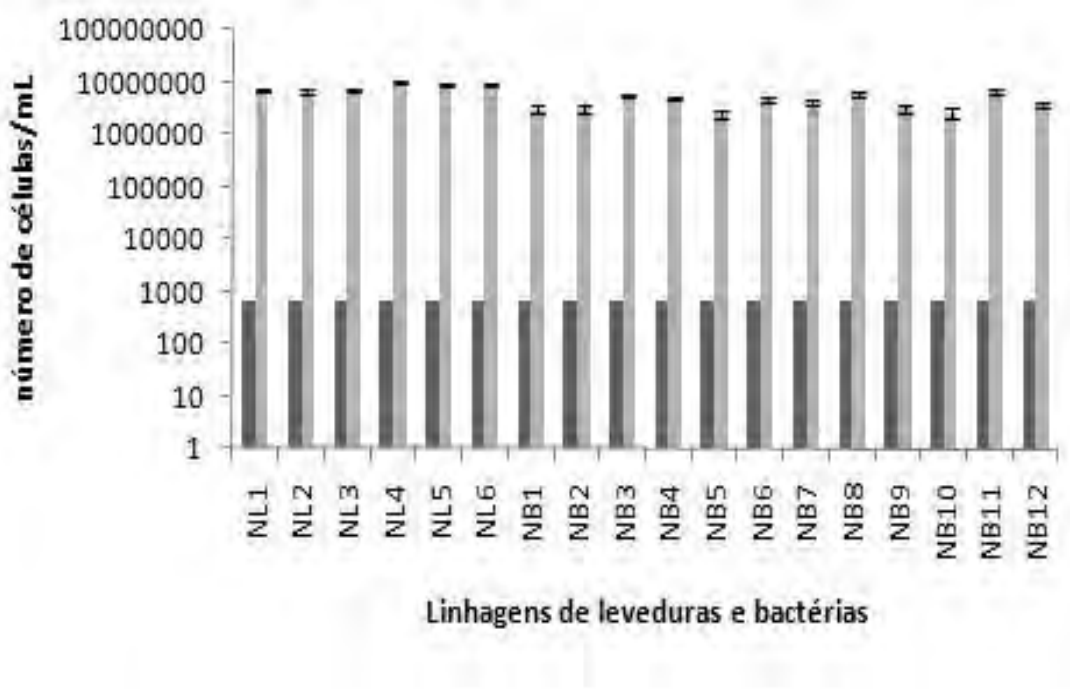


Figura 13. Crescimento celular das leveduras e bactérias da uva Niagara com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas ■ T 0h ■ T 48h

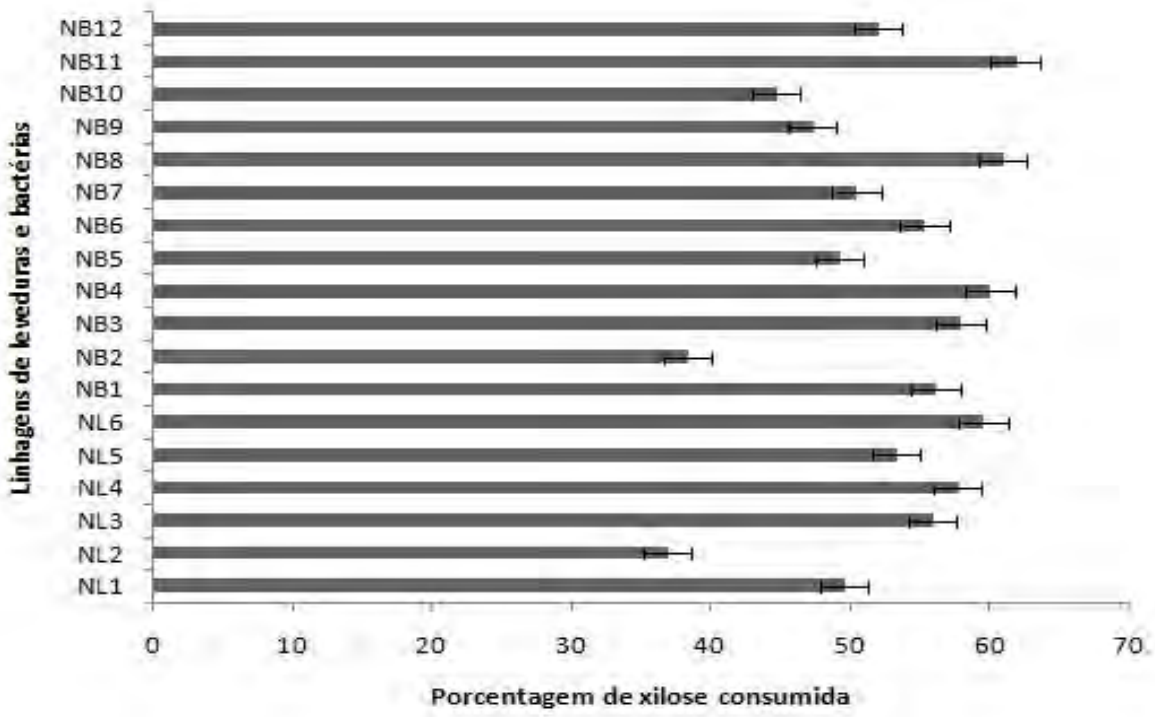


Figura 14. Consumo de xilose das linhagens de leveduras e bactérias da uva Niagara com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

5.2 Fermentação da xilose em etanol

5.2.1 Isolamento dos micro-organismos

Foram selecionadas do estudo anterior um total 3 linhagens de leveduras (2 da uva Rubi e 1 da uva Niagara) denominadas de RL1, RL5 e NL3; e 8 linhagens de bactérias (2 da uva Rubi, 2 da Uva Thompson e 4 da uva Niagara) denominadas de RB3, RB4, TB7, TB14, NB3, NB4, NB7 e NB11 com potencial fermentativo de xilose.

5.2.2 Crescimento celular

A Figura 15 mostra que após a análise estatística o crescimento foi considerado significativo para todas as linhagens testadas (Tukey $P<0,05$). O maior número de células foi apresentado pelas linhagens isoladas da uva Rubi, sendo duas linhagens de leveduras (RL1 e RL5) e duas de bactérias (RB3 e RB4), representando um aumento de até $4,8x10^5$ vezes quando comparado ao inóculo inicial. Essas linhagens mostraram maior crescimento que as demais, chegando a um aumento de até 10 vezes quando comparado ao crescimento da linhagem TB7, que apresentou o menor crescimento celular, sendo tal diferença significativa (Tukey, $P<0,05$) e também apresentaram os mais altos fatores de conversão de substrato em célula com rendimento ($Y_{x/s}$) ao redor de 0,033 g/g. Os micro-organismos isolados mostraram capacidade metabólica de utilizar xilose como fonte de carboidrato e direcionar para o crescimento celular.

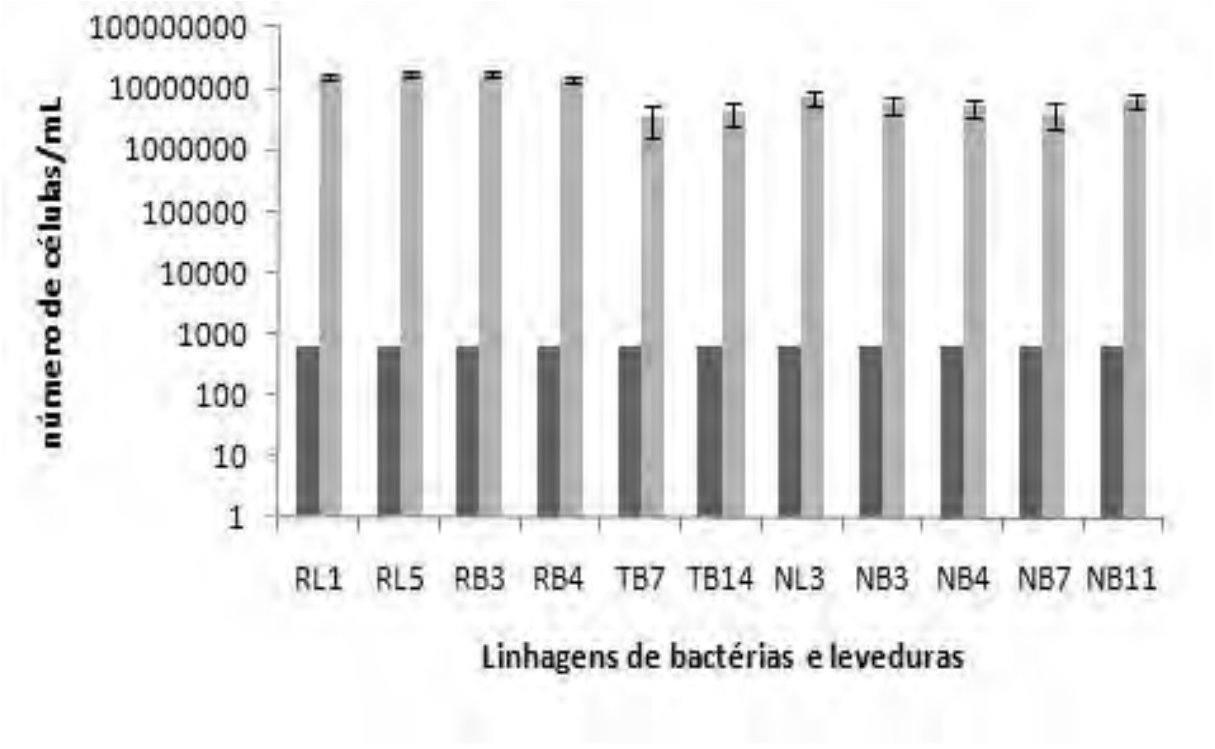


Figura 15. Crescimento celular das leveduras e bactérias obtidas das uvas Rubi, Thompson e Niagara com 2% de xilose, em pH 6,0; à 30°C por 48horas ■T0h ■T48h

5.2.3 Consumo de xilose

A Figura 16 mostra a porcentagem de xilose consumida no meio após a fermentação das onze linhagens isoladas das diferentes variedades de uva. Novamente as linhagens de leveduras da uva Rubi (RL1 e RL5) e as linhagens de bactérias também da uva Rubi (NB3 e NB4) apresentaram maior consumo de xilose, não havendo diferença significativa entre elas (Tukey, P>0,05). O consumo de açúcar por estas linhagens foi em média 5,12% maior que as demais linhagens (TB7, TB14, NL3, NB3, NB4, NB7 e NB11) (Tukey, P<0,05), indicando maior potencial fermentativo de xilose, sendo que a velocidade média do consumo de substrato (P_s) foi de 0,26 g/L.h. Ao comparar a Figura 15 com a Figura 16, é possível observar que nas linhagens com maior crescimento celular apresentaram maior consumo de xilose, mostrando que parte desta foi desviada para a produção de biomassa. Em dados encontrados na literatura, existem micro-organismos como a *Pichia stipitis* CBS6054 que é capaz de consumir até 74% da xilose, e micro-organismos geneticamente modificados como a *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 que consumiu 88% deste açúcar (RUDOLF et al.2008). Os micro-organismos isolados neste trabalho mostraram consumo de xilose de até 66,5%, valor inferior aos encontrados pelos pesquisadores citados, entretanto, tais

pesquisadores utilizaram concentrações de xilose diferentes e, além disso, as linhagens isoladas neste trabalho foram obtidas das uvas, ou seja, estão naturalmente presentes e não passaram por modificações genéticas.

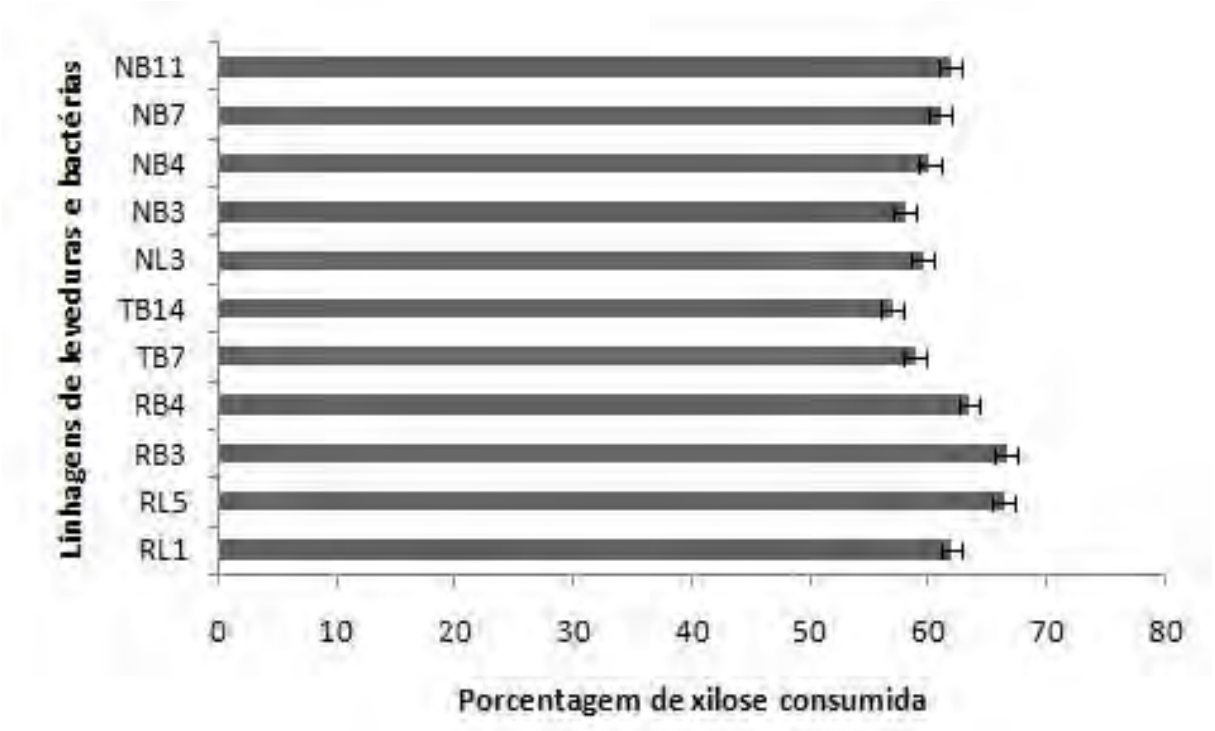


Figura 16. Porcentagem de xilose consumida no processo fermentativo das onze linhagens isoladas das diferentes variedades de uva com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

5.2.4 Rendimento etanólico

A Figura 17 mostra o rendimento etanólico ($Y_{e/s}$) das linhagens de micro-organismos isolados. Houve produção etanólica apenas por duas linhagens: RL1 e RL5. A linhagem RL5 mostrou rendimento etanólico 38,8% maior que RL1.

A linhagem RL5 mostrou rendimento de 0,36g de etanol/g de xilose consumida e RL1 0,22g de etanol/g de xilose. Tais rendimentos são semelhantes aos encontrados na literatura. Entretanto fica difícil a comparação, pois cada pesquisador usa padronizações de inóculo, concentrações de xilose e tempos de fermentações diferentes. Rudolf et al. (2008) mostraram que a *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 geneticamente modificada apresentou rendimento etanólico de 0,33 g/g e a *Pichia stipitis* CBS 6054 0,28g/g. Estes mesmos pesquisadores compararam o resultado obtido por van Zyl et al. (1988) no qual a *Pichia stipitis* CBS 7126 apresentou rendimento de 0,38 g/g na fermentação do bagaço de cana. A levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* após fermentar xilose mostrou rendimento de 0,33 g/g, porém MATSUSHIKA et al. (2009) adicionaram 4,5% de xilose ao

meio e o tempo de fermentação foi de 48 horas, enquanto no presente estudo adicionou-se 2% de xilose ao meio com o mesmo tempo de fermentação, precisando-se repetir o experimento com maiores concentrações desta pentose para se ter o mesmo parâmetro de comparação. *Pachysolen tannophilus* mostrou rendimento etanólico de 0,34g/g, a partir de 2,5% de xilose (GOMEZ, 1985). A bactéria recombinante *Klebsiella oxytoca* produziu etanol com rendimento de 0,38g/g (KOTTER; CIRIACY, 1993 apud RUDOLF et al. 2008). Em um estudo mais próximo do realizado neste experimento, Moraes et al. (2010) encontraram uma linhagem de bactéria bastonete gram-positiva isolada do bagaço de cana que produziu 0,33 g de etanol/g de xilose com 98,38% de açúcar consumido, utilizando as mesmas condições de fermentação deste trabalho.

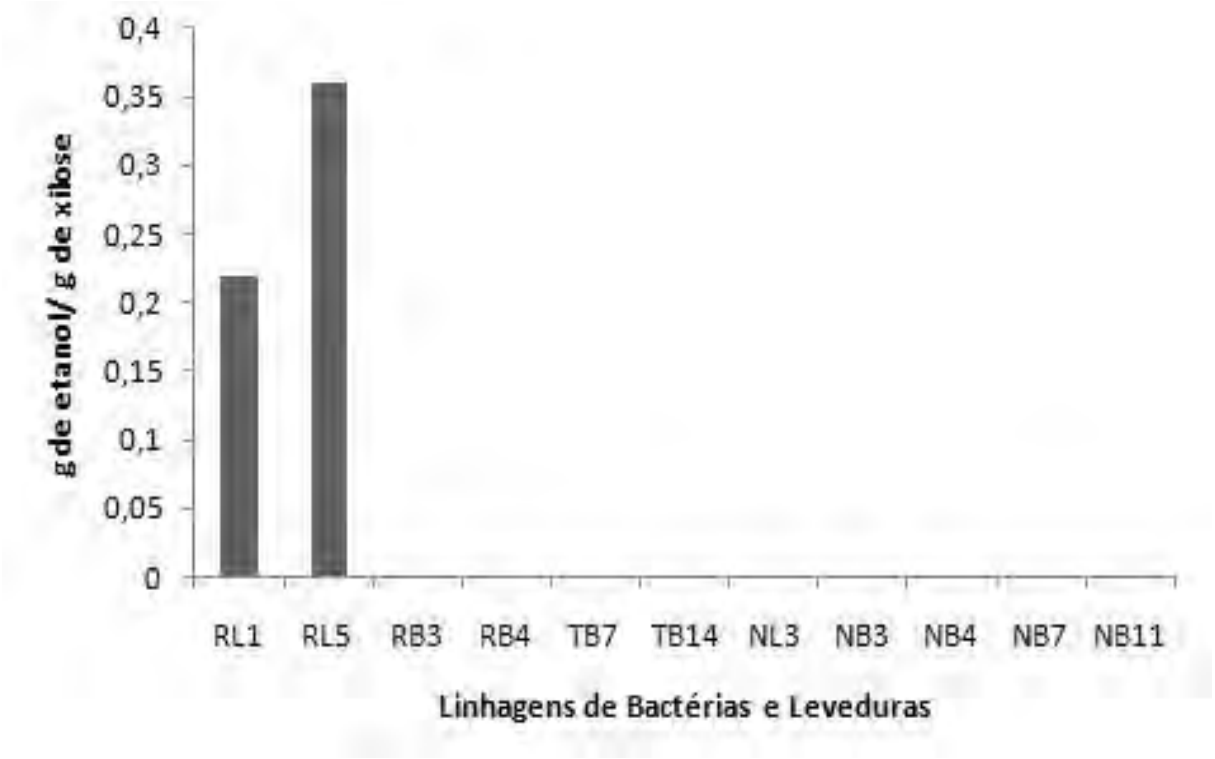


Figura 17. Rendimento etanólico obtido pelas linhagens isoladas das diferentes variedades de uva em fermentação de xilose (2%), em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

Assumindo que o rendimento teórico de transformação de xilose a etanol é 0,51g de etanol / g de xilose (GOMEZ, 1985) e considerando-se o consumo de xilose de 12,39 g/L para RL1 e 13,29 g/L para RL5, o rendimento de etanol durante a fermentação foi de 43% e 70% do teórico e a produtividade (P_e) foi de 0,05 e 0,09 g/L.h, respectivamente.

As demais linhagens isoladas não produziram etanol após a fermentação de xilose. A literatura mostra que a xilose também pode ser fermentada pelos micro-organismos

para obtenção de xilitol, ácidos orgânicos, glicerol e produção de biomassa (MATOS et al., 2003; PANDEY et al., 2000), o que justifica provavelmente o consumo de xilose pelas linhagens estudadas no trabalho. Dessa forma, é possível afirmar que as linhagens de leveduras isoladas da uva Rubi mostraram maior potencial fermentativo alcoólico do que as demais leveduras e bactérias isoladas e que o rendimento etanólico destas foi semelhante ao encontrado por outros pesquisadores, inclusive de linhagens geneticamente modificadas.

5.3 Avaliação da tolerância a diferentes concentrações de xilose

5.3.1 Linhagens de micro-organismos

As linhagens de leveduras isoladas anteriormente e que mostraram produção de etanol (RL1 e RL5) foram submetidas à fermentação de acordo com o item 4.3.2.

5.3.2 Crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol.

A Tabela 2 mostra os dados do crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol além dos parâmetros cinéticos avaliados.

Tabela 2. Massa celular,consumo de xilose, produção de etanol, parâmetros cinéticos das linhagens RL1 e RL5

Linhagem	Crescimento g/L	Açúcar g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$ g/g	P_x g/L.h	P_s g/L.h	$Y_{E/s}$ g/g	P_E g/L.h	Rendimento (%)
RL1 (2%)	0,222	17,61	3,6	0,011	0,004	0,36	0,21	0,07	41
RL1 (3%)	0,209	22,89	3,8	0,008	0,003	0,47	0,17	0,07	33
RL1(4%)	0,210	28,89	4,04	0,006	0,003	0,60	0,14	0,08	27
RL1(5%)	0,243	34,97	6,2	0,006	0,004	0,72	0,18	0,12	35
RL5 (2%)	0,219	14,79	2,0	0,013	0,004	0,30	0,14	0,04	27,3
RL5 (3%)	0,220	22,17	3,5	0,009	0,004	0,46	0,16	0,07	31
RL5(4%)	0,234	31,15	4,6	0,006	0,004	0,64	0,15	0,09	29
RL5(5%)	0,238	35,28	4,9	0,006	0,004	0,73	0,14	0,10	27,3

A maior produção de etanol obtida foi de 6,2 g/L de etanol com a levedura RL1 em meio com 5% de xilose e consumo de 34,97 g/L de xilose, porém o rendimento da

conversão de substrato em etanol ($Y_{e/s}$) 0,18 g/g e o rendimento final 35% não foram os melhores resultados (Tabela 2).

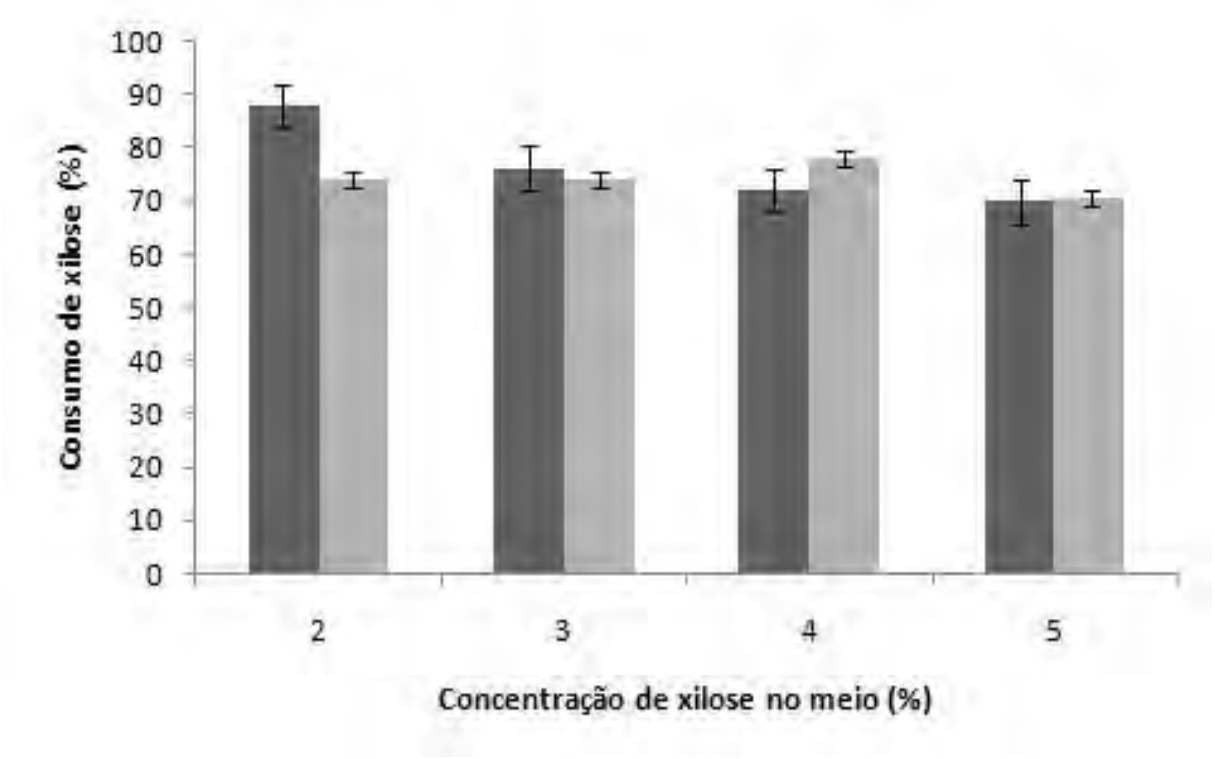


Figura 18. Consumo de xilose pelas leveduras em meio fermentativo com variação da concentração de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas RL1 ■ e RL5 ■.

Com relação ao consumo de açúcar, as leveduras mostraram que são capazes de metabolizar diferentes concentrações de xilose, chegando ao consumo máximo de 88% (Figura 18). O maior rendimento ($Y_{e/s}$) foi obtido com a levedura RL1 (2%) sendo produzido 0,21g etanol/g xilose, com rendimento máximo de 41%.

Já a linhagem RL5 teve maior rendimento com 3% de xilose no meio (0,16 g etanol/ g de xilose), porém estes valores são menores do que os encontrados na literatura para a fermentação da xilose (MATSUSHIKA et al., 2009; MORAES et al., 2010).

5.4 Otimização do pH

5.4.1 Linhagens de micro-organismos

As linhagens de leveduras RL1 e RL5 foram submetidas à fermentação de acordo com o item 4.3.3.

5.4.2 Análise do pH

A Tabela 3 mostra os resultados da verificação do pH antes e após as 48h de fermentação em meio com xilose da linhagem RL1.

Tabela 3. Valores do pH antes e após a fermentação pela linhagem RL1

pH inicial (0h fermentação)		pH final (48h de fermentação)	
M*	DP**	M*	DP**
3,5	± 0,14	3,96	± 0,04
3,8	± 0,07	4,11	± 0,01
4,0	± 0,14	4,29	± 0,01
4,2	± 0,07	4,52	± 0,01
4,4	± 0,07	4,64	± 0,02
4,6	± 0,07	4,96	± 0,00
4,8	± 0,07	5,01	± 0,01
5,0	± 0,07	5,09	± 0,01
5,5	± 0,14	5,62	± 0,05
6,0	± 0,00	6,01	± 0,05

M*=Média das triplicatas. DP**=Desvio Padrão.

A Tabela 4 mostra os resultados da verificação do pH antes e após as 48horas de fermentação em meio com xilose da linhagem RL5.

Tabela 4. Valores do pH antes e após a fermentação pela linhagem RL5

pH inicial (0h fermentação)		pH final (48h de fermentação)	
M*	DP**	M*	DP**
3,5	± 0,02	3,96	± 0,03
3,8	± 0,14	4,11	± 0,03
4,0	± 0,07	4,29	± 0,02
4,2	± 0,07	4,52	± 0,07
4,4	± 0,07	4,64	± 0,02
4,6	± 0,07	4,96	± 0,02
4,8	± 0,07	5,01	± 0,04
5,0	± 0,07	5,09	± 0,09
5,5	± 0,14	5,62	± 0,04
6,0	± 0,07	6,01	± 0,05

M*=Média das triplicatas. DP**=Desvio Padrão.

Para as duas linhagens é possível observar que na maioria dos pHs testados, após as 48horas de fermentação houve aumento do pH, mostrando que as duas linhagens consumiram o ácido do meio. A única exceção foi o pH 6,0 que manteve-se após as 48horas de fermentação. As leveduras tem o potencial de ajustar o pH ideal para sua utilização (DORTA et al., 2006), sendo assim é possível verificar que os pHs testados (3,5 a 5,5) não eram os ideais para a fermentação da xilose, já que em todos as leveduras promoveram alteração. Porém pode ter ocorrido produção de alguns outros compostos que não foram quantificados, além do fato de que certas variações podem ter ocorrido ao longo das 48horas e que não foram analisadas neste trabalho.

Na literatura os pHs mais utilizados para a fermentação de xilose são 5,0 e 6,0 (DU PREEZ et al.,1986; TAKAHASHI, 1998; MATOS et al.,2003; MATSUSHIKA et al., 2009), e neste trabalho com o pH 6,0 obteve-se bons resultados comprovando os dados da literatura.

5.4.3 Consumo de xilose

As figuras 19 e 20 mostram o consumo de açúcar das linhagens RL1 e RL5 respectivamente, nos diferentes pH testados.

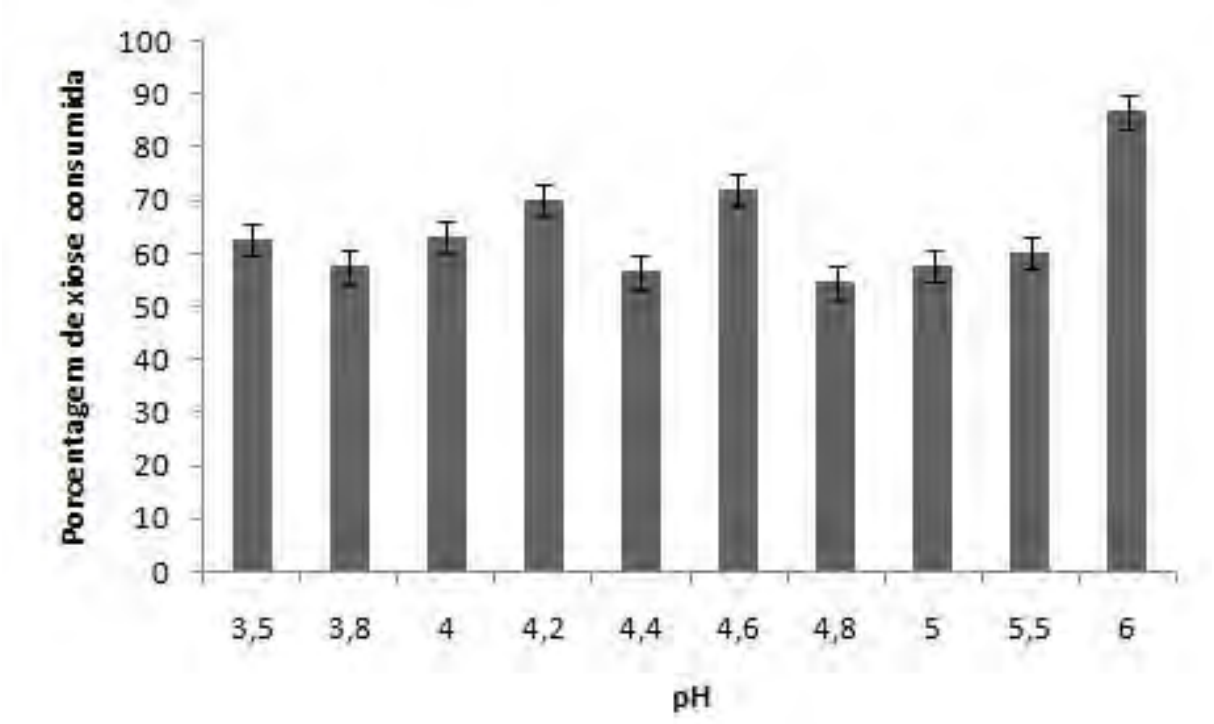


Figura 19. Porcentagem de xilose consumida por RL1 em diferentes pH em meio com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

A linhagem RL1 mostrou maior consumo de açúcar em pH 6,0 com 86,85%, consumo até 32% maior que o pH com menor consumo (pH 4,8 com 54,55%), sendo esta diferença significativa (Tukey, $P<0,05$).

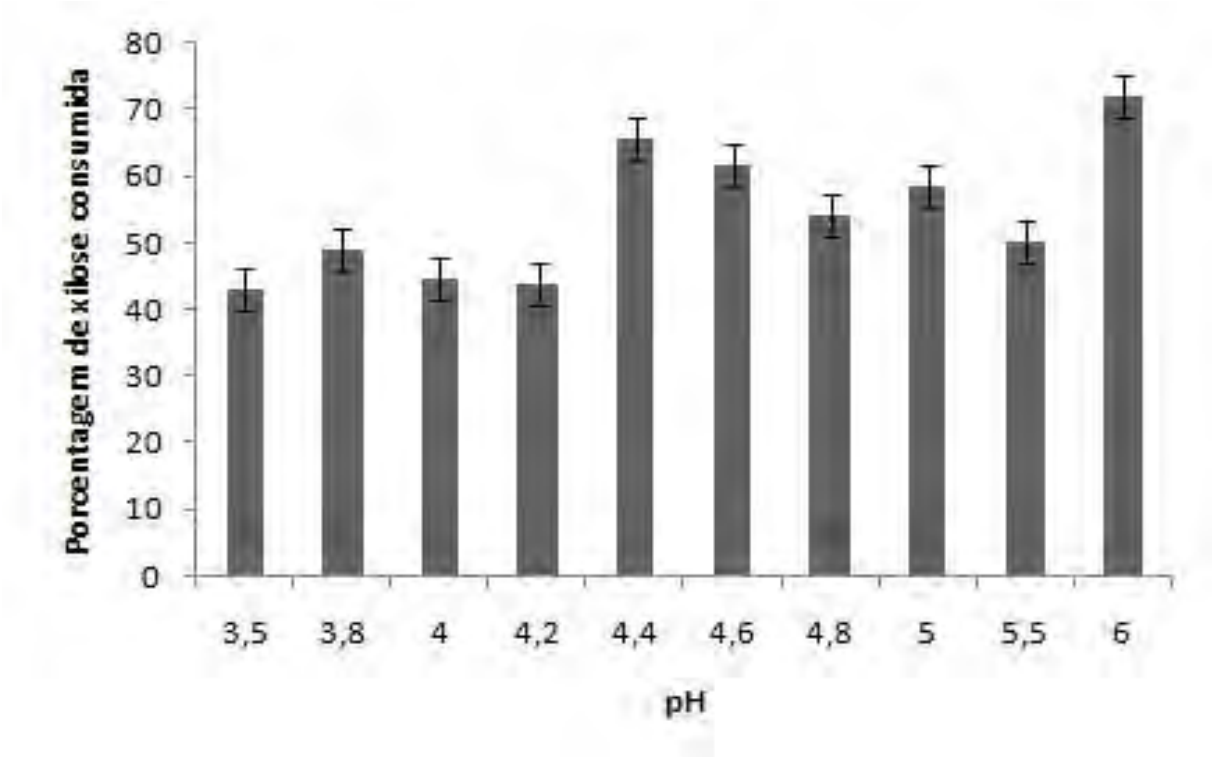


Figura 20. Porcentagem de xilose consumida por RL5 em diferentes pH em meio com 2% de xilose, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

A linhagem RL5 consumiu mais açúcar também em pH 6,0 (71,95%) representando 29% mais que o menor consumo, que foi em pH 3,5 (42,9%) sendo tal diferença significativa (Tukey, $P<0,05$).

5.4.4 Estudos cinéticos

A Tabela 5 mostra os dados dos parâmetros cinéticos estudados durante a fermentação de xilose em diferentes pHs para a levedura RL1.

Tabela 5. Variáveis analisadas e parâmetros cinéticos da levedura RL1.

Linhagem pH	Crescimento g/L	Açúcar g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$ g/g	P_x g/L.h	P_s g/L.h	$Y_{E/s}$ g/g	P_E g/L.h	Rendimento (%)
RL1(3,5)	0,338	12,54	-	0,024	0,006	0,26	-	-	-
RL1(3,8)	0,326	11,52	-	0,025	0,006	0,24	-	-	-
RL1(4,0)	0,372	12,66	-	0,027	0,007	0,26	-	-	-
RL1(4,2)	0,380	14,05	-	0,024	0,007	0,29	-	-	-
RL1(4,4)	0,336	11,32	-	0,027	0,006	0,23	-	-	-
RL1(4,6)	0,379	14,41	1,2	0,024	0,007	0,30	0,08	0,02	15,6
RL1(4,8)	0,324	10,91	1,7	0,026	0,006	0,22	0,15	0,03	29,3
RL1(5,0)	0,353	11,57	2,1	0,027	0,006	0,24	0,18	0,04	35,2
RL1(5,5)	0,376	12,06	2,2	0,028	0,007	0,25	0,18	0,04	35,2
RL1(6,0)	0,395	17,37	3,2	0,021	0,007	0,36	0,18	0,06	35,2

Os resultados obtidos mostram que para a linhagem RL1 até o pH 4,4 o açúcar consumido foi direcionado para a produção de biomassa e provavelmente outros metabólitos que não foram quantificados, já que não houve produção de etanol. A taxa de conversão de substrato a células ($Y_{x/s}$) foi em média 0,026g/g e a produtividade em células (P_x) 0,006 g/L.h.

Para os pHs acima de 4,4 houve produção de etanol, sendo que no pH 6,0 obteve-se a maior produção, com 3,2 g/L, rendimento de conversão de substrato em produto ($Y_{e/s}$) de 0,18 g/g ; produtividade (P_e) 0,06 g/L.h e também a menor conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) mostrando, que o açúcar foi mais direcionado para a formação de produto (etanol) (Tabela 5).

A Tabela 6 mostra os dados dos parâmetros cinéticos estudados durante a fermentação de xilose em diferentes pH para a levedura RL5.

Tabela 6. Variáveis analisadas e parâmetros cinéticos da levedura RL5.

Linhagem pH	Crescimento g/L	Açúcar g/L	Etanol g/L	$Y_{x/s}$ g/g	P_x g/L.h	P_s g/L.h	$Y_{E/s}$ g/g	P_E g/L.h	Rendimento (%)
RL5(3,5)	0,339	8,58	-	0,036	0,006	0,17	-	-	-
RL5(3,8)	0,343	9,79	-	0,031	0,006	0,20	-	-	-
RL5(4,0)	0,323	8,93	-	0,032	0,006	0,18	-	-	-
RL5(4,2)	0,316	8,76	-	0,032	0,005	0,18	-	-	-
RL5(4,4)	0,376	13,16	0,9	0,026	0,007	0,27	0,06	0,01	11,7
RL5(4,6)	0,352	12,31	-	0,026	0,006	0,25	-	-	-
RL5(4,8)	0,343	10,81	-	0,028	0,006	0,22	-	-	-
RL5(5,0)	0,353	11,71	1,5	0,027	0,006	0,24	0,12	0,03	23,4
RL5(5,5)	0,328	10,02	1,3	0,029	0,006	0,20	0,12	0,02	23,4
RL5(6,0)	0,383	14,39	2,7	0,024	0,007	0,29	0,18	0,05	35,2

Para a levedura RL5 houve produção mínima de etanol em pH 4,4, depois somente a partir do pH 5,0. O pH 6,0 novamente apresentou os melhores resultados para a produção de etanol com 2,7 g/L; $Y_{e/s}$ de 0,18 g/g; P_e de 0,05 g/L.h além da menor taxa $Y_{x/s}$ de 0,024 g/g.

Nos pH 3,5 a 4,2 as taxas $Y_{x/s}$ foram as maiores mostrando o direcionamento do açúcar para a conversão em células (Tabela 6).

5.5 Fermentação de glicose e xilose para produção de etanol

5.5.1 Processo Fermentativo

A fermentação alcoólica de glicose e de xilose pelas leveduras RL1 e RL5 foi realizada de acordo com o item 4.3.4. Os resultados estão apresentados nas Figuras 21, 22, 23, 24, 25, 26 e nos quadros 4, 5, 6 e 7 do apêndice I. Os resultados da cinética de fermentação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados da cinética de fermentação de glicose e xilose pelas leveduras RL1 e RL5.

Linhagem/ açúcar	$Y_{x/s}$ g/g	P_x g/L.h	P_s g/L.h	$Y_{E/s}$ g/g	P_E g/L.h	Rendimento (%)
RL1 Glicose	0,206	0,08	0,41	0,15	0,06	29,3
RL5 Glicose	0,220	0,08	0,40	0,16	0,06	31,3
RL1 Xilose	0,336	0,06	0,17	0,36	0,06	70,4
RL5 Xilose	0,325	0,06	0,21	0,22	0,04	43,0

Na fermentação de xilose, como pode ser observado na figura 21 e quadro 6, a levedura RL1 consumiu em 12horas praticamente o total do consumo final. Na fase inicial há um declínio do crescimento celular que só entra em fase exponencial após as 12horas (Figura 25). Em relação a produção de etanol, o pico acontece nas 24horas de fermentação (Figura 23). A Tabela 7 mostra que o rendimento ($Y_{e/s}$) foi de 0,36 g/g com P_e 0,06 g/L.h, resultado esse maior que alguns dados da literatura, como por exemplo Gomez (1985) que descreve que

a levedura *Pachysolen tannophilus* em fermentação de xilose com condições semelhantes apresentou um rendimento de 0,158 g/g. Assumindo o rendimento de transformação de xilose a etanol em 0,51 g de etanol / g de xilose, o rendimento de RL1 foi de 70,4%.

Para RL5 ocorreu resultado semelhante à fermentação de xilose por RL1, em que houve consumo em 12horas (Figura 22). Quanto a produção de biomassa, também ocorreu um declínio em 12horas e a fase exponencial surgiu em 24horas (Figura 26). A produção de etanol máxima foi em 24horas (Figura 24) com rendimento $Y_{e/s}$ de 0,22 g/g e P_e de 0,04 g/L.h. Estes resultados são inferiores aos obtidos por Rudolf et al. (2008) com a levedura geneticamente modificada *Saccharomyces cerevisiae* TBM 3400 que apresentou rendimento de 0,33 g/g e para *Pichia stipitis* CBS 6054 rendimento de 0,28 g/g.

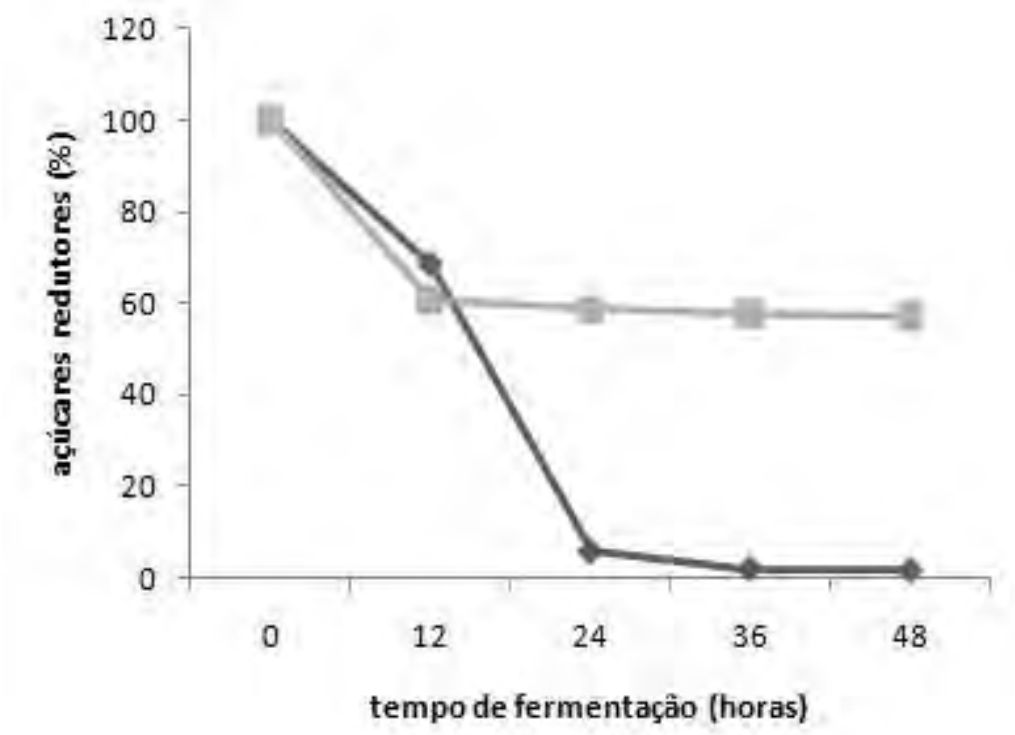


Figura 21. Consumo de xilose e glicose durante a fermentação pela linhagem de levedura RL1 com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

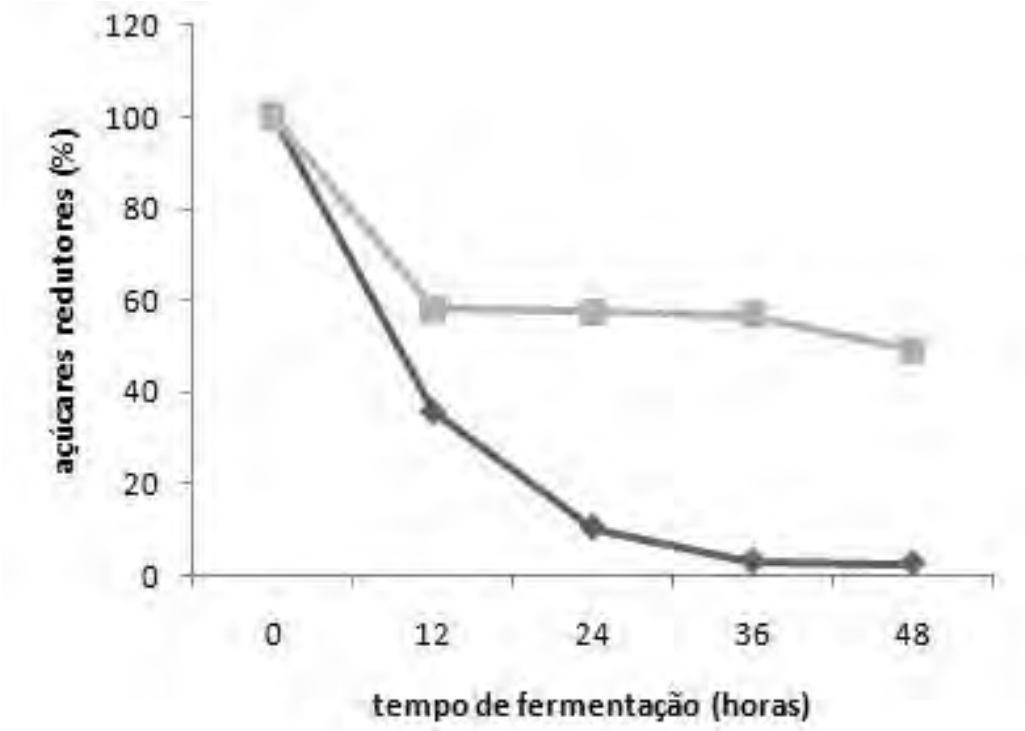


Figura 22. Consumo de xilose e glicose durante a fermentação pela linhagem de levedura RL5 com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.



Figura 23. Produção de etanol durante a fermentação de xilose e glicose pela linhagem de levedura RL1 com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

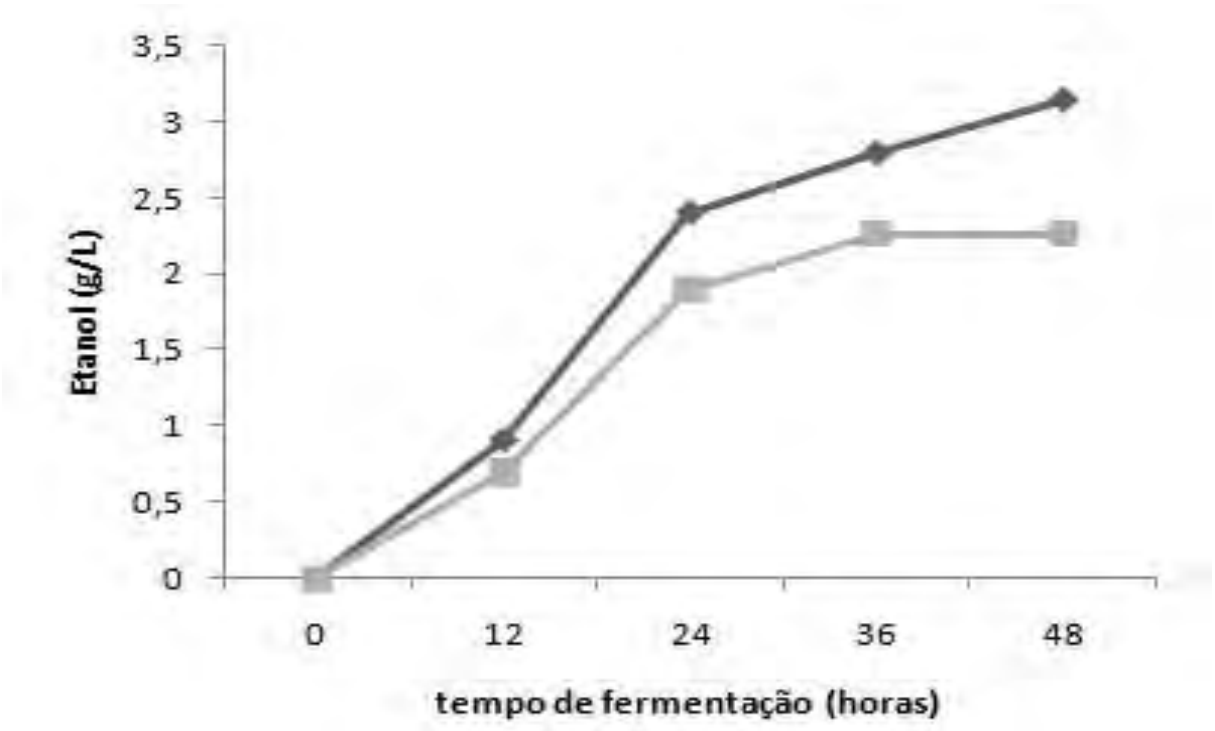


Figura 24. Produção de etanol durante a fermentação de xilose e glicose pela linhagem de levedura RL5 com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

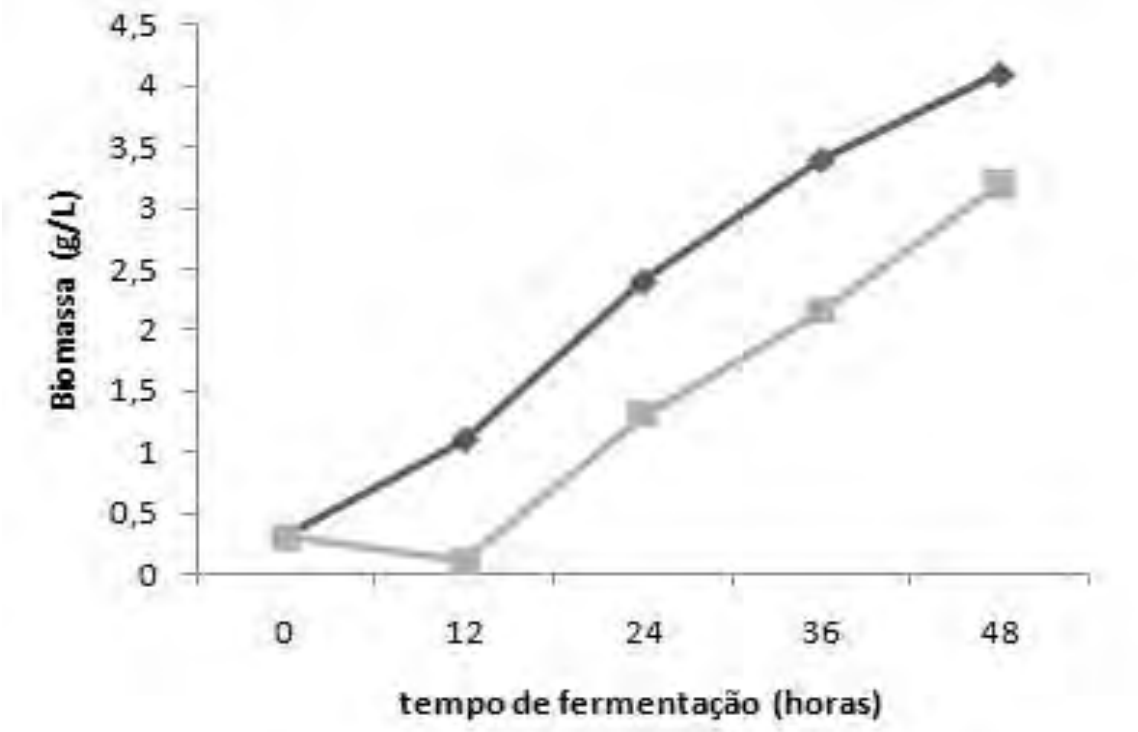


Figura 25. Crescimento da linhagem de levedura RL1 durante a fermentação alcoólica de xilose e glicose com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

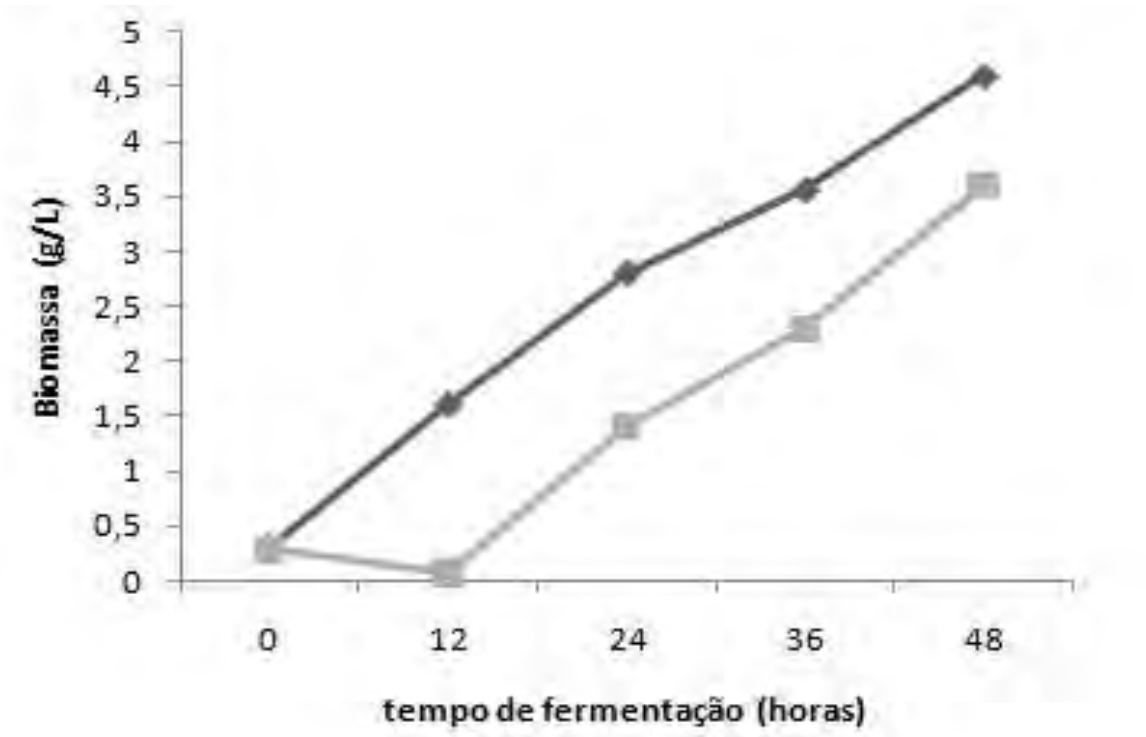


Figura 26. Crescimento da linhagem de levedura RL5 durante a fermentação alcoólica de xilose e glicose com 2% de açúcar, em pH 6,0; a 30°C por 48horas.

Na fermentação de glicose pela levedura RL1, houve rápido consumo de açúcar em 24horas além de crescimento exponencial a taxa de P_x de 0,08 g/L.h e $Y_{x/s}$ de 0,206 g/g (Figuras 21 e 25 e Tabela 7). A produção de etanol teve seu pico em 24horas e o rendimento $Y_{e/s}$ 0,15 g/g obtido é muito inferior ao encontrado na literatura onde *P. tannophilus* apresentou rendimento de 0,38 g/g na fermentação com glicose (GOMEZ, 1985).

A levedura RL5 consumiu açúcar (glicose) rapidamente 12horas (Figura 22) e teve crescimento exponencial com taxa de conversão do substrato em células ($Y_{x/s}$) de 0,220 g/g e P_x de 0,008 g/L.h (Figura 26 e Tabela 7). A produção de etanol máxima ocorreu em 24horas e o rendimento $Y_{e/s}$ 0,16 g/g que é maior que o rendimento da levedura RL1, mas também é inferior aos valores apresentados na literatura (GOMEZ, 1985; KIPPER, 2009).

Quando se compara a fermentação das leveduras RL1 e RL5 em xilose e glicose, nota-se que a fermentação de xilose corresponde a conversão ($Y_{e/s}$) até 4 vezes maior que fermentação de glicose, mostrando que estas linhagens possuem a capacidade de assimilar xilose e produzir etanol melhor do que assimilar glicose e produzir etanol, fato que não ocorre na fermentação destes açúcares por *P. tannophilus* já que para esta levedura a produção de etanol é mais eficiente glicose do que xilose (GOMEZ, 1985).

5.6 Fermentação em batelada alimentada

5.6.1 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica de glicose e xilose pelas leveduras RL1 e RL5 em processo de batelada alimentada foi realizada de acordo com os itens 4.3.5 e 4.3.6. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 8, 9, 10 e 11.

Tabela 8. Fermentação de xilose pela levedura RL1 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas.

Tempo de fermentação	Concentração de xilose(i)	Concentração de xilose (f)	Massa celular	Produção de etanol
Horas	g/L	g/L	g/L	g/L
0	20,0	--	0,8	n/a*
12	20,0	10,0	2,3	n/a*
24	20,0	11,5	4,4	n/a*
36	20,0	11,0	5,3	n/a*
48	20,0	11,2	6,3	4,3

*não avaliado

A levedura RL1 na fermentação de xilose produziu 5,5 g/L de biomassa após as 48horas e 4,3 g/L de etanol a partir de 36,1 g/L de açúcar (somando todas as alimentações) resultando em rendimento $Y_{e/s}$ de 0,11 g/g.

Tabela 9. Fermentação de xilose pela levedura RL5 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas.

Tempo de fermentação	Concentração de xilose(i)	Concentração de xilose (f)	Massa celular	Produção de etanol
Horas	g/L	g/L	g/L	g/L
0	20,0	--	0,9	n/a*
12	20,0	10,0	2,3	n/a*
24	20,0	10,5	3,2	n/a*
36	20,0	10,7	4,6	n/a*
48	20,0	11,2	5,7	3,9

*não avaliado

A levedura RL5 na fermentação de xilose produziu 4,8 g/L de biomassa após as 48horas e 3,9 g/L de etanol a partir de 37 g/L de açúcar (somando todas as alimentações) resultando em rendimento $Y_{e/s}$ de 0,10 g/g.

Tabela 10. Fermentação de glicose pela levedura RL1 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas.

Tempo de fermentação	Concentração de glicose(i)	Concentração de glicose (f)	Massa celular	Produção de etanol
Horas	g/L	g/L	g/L	g/L
0	20,0	--	0,8	n/a*
12	20,0	10,0	2,3	n/a*
24	20,0	12,5	3,8	n/a*
36	20,0	12,4	7,12	n/a*
48	20,0	11,9	8,75	3,6

*não avaliado

A levedura RL1 na fermentação de glicose produziu 8,15 g/L de biomassa após as 48horas e 3,6 g/L de etanol a partir de 33,2 g/L de açúcar (somando todas as alimentações) resultando em rendimento $Y_{e/s}$ de 0,10 g/g.

Tabela 11. Fermentação de glicose pela levedura RL5 em batelada alimentada com pH inicial de 6,0, 30°C por 48horas.

Tempo de fermentação	Concentração de glicose(i)	Concentração de glicose (f)	Massa celular	Produção de etanol
Horas	g/L	g/L	g/L	g/L
0	20,0	--	0,6	n/a*
12	20,0	10,0	2,9	n/a*
24	20,0	12,5	3,19	n/a*
36	20,0	13,0	6,2	n/a*
48	20,0	12,5	7,1	3,4

*não avaliado

A levedura RL5 na fermentação de glicose produziu 6,5 g/L de biomassa após as 48horas e 3,4 g/L de etanol a partir de 32 g/L de açúcar (somando todas as alimentações) resultando em rendimento $Y_{e/s}$ de 0,10 g/g.

Os rendimentos encontrados neste estudo estão abaixo dos relatados na literatura (GOMES, 1985; RUDOLF et al.,2008; MATSUSHIKA et al., 2009), porém nota-se que de 12 em 12horas as leveduras consomem até a metade do açúcar disponível transformando parte deste em etanol. Contudo, o presente trabalho utilizou amostras retiradas somente após 48horas de fermentação, para precisar melhor os resultados o ideal seria retirar uma alíquota deste fermentado a cada 12horas e proceder a análise de etanol, para saber se este consumo do açúcar é direcionado para a produção de etanol.

Ao analisar a produção de etanol em g/L, os resultados encontrados após 48horas de fermentação são coerentes com os relatados na literatura, apresentados por Tantirungkig et al. (1993), com uma linhagem de *Saccharomyces* modificada geneticamente, a qual produziu 2,7g/L de etanol em meio com 50g/L de xilose. Os resultados apresentados no presente trabalho são satisfatórios quando comparados com os obtidos por Gong et al. (1981), que apresentou uma *Candida sp*. com produção média de 1,52 g/L em meio com 5% de xilose.Entretanto, na maioria dos casos, as leveduras assimiladoras de pentoses convertem xilose em xilitol que pode ser um potencial inibidor, o que faz com que a produtividade de etanol seja baixa (GÍRIO et al.,2010).

5.7 Fermentação em processo aeróbio

5.7.1 Processo fermentativo

A fermentação alcoólica de xilose pelas leveduras RL1 e RL5 em processo aeróbio foi realizada de acordo com o item 4.3.7. Os resultados estão apresentados nas Figuras 27 e 28. Os parâmetros cinéticos de fermentação estão na Tabela 12.

Tabela 12. Dados cinéticos da fermentação de xilose em aerobiose pelas leveduras RL1 e RL5.

Linhagem	Etanol g/L	$Y_{x/s}$ g/g	P_x g/L.h	P_s g/L.h	$Y_{E/s}$ g/g	P_E g/L.h	Rendimento (%)
RL1	2,56	0,255	0,05	0,20	0,12	0,02	23,4%
RL5	2,48	0,305	0,06	0,20	0,12	0,02	23,4%

Para as duas linhagens RL1 e RL5, houve consumo quase total da xilose em 24horas. No mesmo período houve também produção de biomassa que foi estabilizando em momentos posteriores (Figuras 27 e 28).

Quanto a produção de etanol, as duas linhagens produziram pouco, cerca de 2,5 g/L com rendimento ($Y_{e/s}$) 0,12 g/g durante as 96horas de fermentação. Esses resultados são inferiores aos divulgados por Silva et al. (2009) que encontraram 0,32 g/g com a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

Outro fator que pode ter prejudicado a fermentação foi o excesso de aeração utilizado no experimento. Segundo Schneider et al. (1983), 50mL de meio de cultura incubado a 30°C em frascos Erlenmeyer de 500 mL a 150 rpm, constitui um sistema altamente aerado não permitindo a produção de etanol pois esta acontece somente em baixos

níveis de oxigênio. Porém as condições utilizadas neste trabalho mostraram-se ótimas para a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 (SILVA et al., 2009).

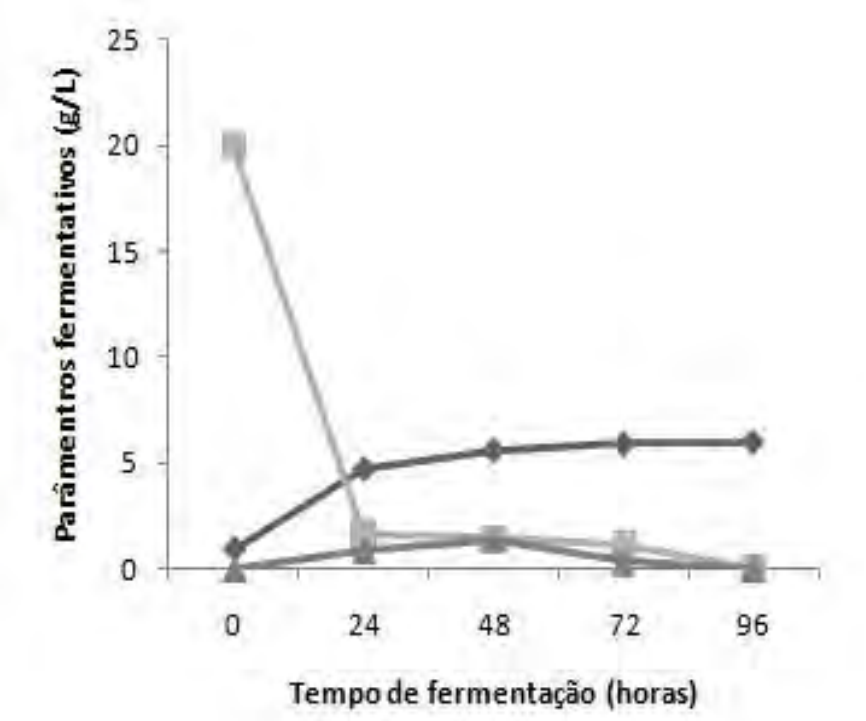


Figura 27. Fermentação de xilose em aerobiose pela levedura RL1. Biomassa ◆, consumo de xilose ■, produção de etanol ▲

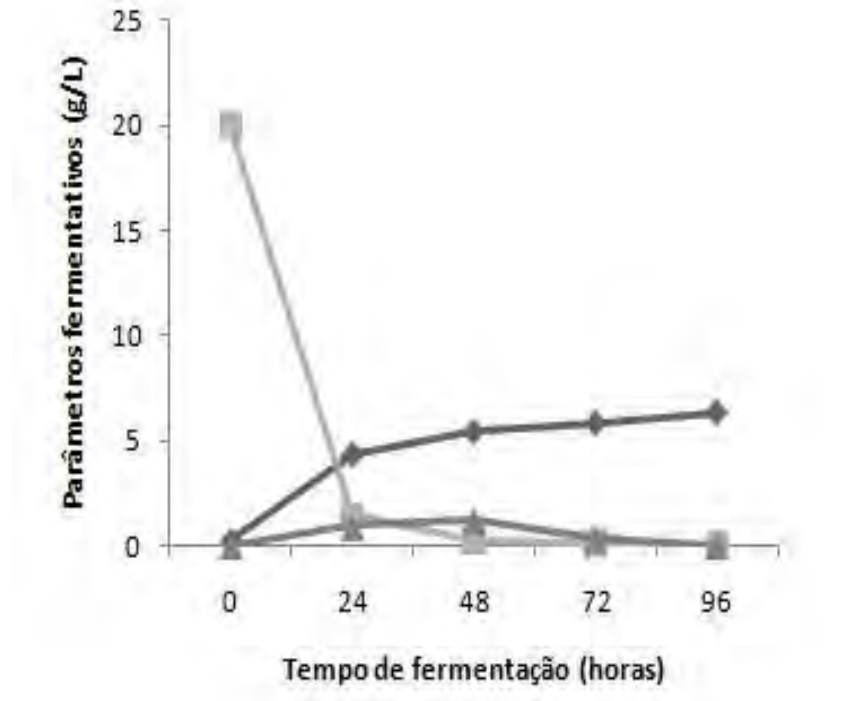


Figura 28. Fermentação de xilose em aerobiose pela levedura RL5. Biomassa ◆, consumo de xilose ■, produção de etanol ▲

6. DISCUSSÃO DOS PRINCIPAIS RESULTADOS

Na primeira parte do projeto, foram isolados, a partir das diferentes variedades da casca de uvas (*Vitis spp*), diversos micro-organismos (leveduras e bactérias) capazes de assimilar a xilose em seu metabolismo. Alguns merecem destaque como é o caso das linhagens RL1, RL5, RB3 e RB4 isoladas da uva Rubi, as linhagens TB7, TB8 e TB14 da uva Thompson e NL4, NL6, NB4, NB8 e NB11 da uva Niagara.

No teste de fermentação da xilose, somente duas linhagens (RL1 e RL5 leveduras isoladas da uva Rubi) mostraram produção de etanol com $Y_{e/s}$ de 0,36g/g e 0,22g/g e rendimento de 43% e 70% respectivamente, as demais linhagens testadas consumiram a pentose e provavelmente direcionaram este açúcar para crescimento ou para produção de outros compostos como: ácidos orgânicos, glicerol e xilitol que são comuns na via metabólica de assimilação da xilose.

Em relação à variação da concentração de xilose, a levedura RL1 apresentou melhor rendimento (41%) e $Y_{e/s}$ de 0,21g/g com 2% de açúcar, porém com 5% de açúcar foi o segundo melhor resultado com rendimento de 35%, $Y_{e/s}$ de 0,18g/g além da maior produção de etanol 6,2g/L, mostrando que esta levedura é capaz fermentar 5% de xilose com bons resultados. Para RL5 3% de xilose foi a melhor condição testada já que apresentou o melhor resultado com rendimento 31%, $Y_{e/s}$ de 0,16g/g e 3,5g/L de etanol.

O teste com diferentes pH mostrou que tanto para RL1 quanto para RL5 o pH 6,0 é o melhor a ser utilizado para a fermentação da xilose por estas leveduras, já que os

resultados de produção de etanolde 3,2g/L e 2,7g/L, rendimento de 35,2% e $Y_{e/s}$ de 018g/g foram os melhores obtidos.

Na fermentação de glicose e xilose, a levedura RL1 mostrou melhor resultado na fermentação de xilose, com 3,1g/L de etanol e rendimento de 70,4% além do maior $Y_{e/s}$ de 0,36g/g. A levedura RL5 também mostrou maior rendimento (43%), $Y_{e/s}$ de 0,22g/g na fermentação de xilose e a produção foi de 2,2g/L de etanol. Ambas as linhagens mostraram que seu metabolismo favorece a produção de etanol a partir da xilose, fato que é relevante já que a maioria dos micro-organismos, inclusive os metabolizadores de xilose tem preferência pela glicose e mostram melhores resultados a partir deste açúcar.

Na fermentação em batelada alimentada, a RL1 apresentou produção de 4,3 g/L de etanol a partir da glicose (3,6%), mostrando que este processo não é melhor que a batelada simples onde a mesma levedura produziu 3,1g/L a partir de 2% de açúcar.

Na batelada alimentada com xilose a levedura RL1 produziu 3,9 g/L de etanol a partir de 3,7% de xilose. Este resultado foi inferior ao processo de batelada simples, já que a levedura produziu 3,8g/L de etanol a partir de 3% de xilose.

A levedura RL5 na fermentação de glicose por batelada alimentada mostrou produção de 3,6g/L a partir de 3,3% de glicose e no processo de batelada simples a produção foi de 3,1g/L a partir de 2% de açúcar, mais uma vez mostrando que o processo de batelada alimentada não é viável.

Na fermentação de xilose por batelada alimentada a levedura RL5 mostrou produção de 3,4g/L de etanol a partir de 3,3% de açúcar e no processo de batelada simples a produção foi de 3,5 g/L a partir de 3% de açúcar. Para as duas linhagens (RL1 e RL5) e para os dois açúcares (glicose e xilose), o processo de batelada alimentada não foi tão eficiente, sendo preterido em relação ao processo de batelada simples, em relação à concentração final de etanol.

O processo fermentativo em condições aeróbias não foi mais eficiente que o processo conduzido sob anaerobiose, já que os resultados de rendimento (23,4%), $Y_{e/s}$ de 0,12g/g e produção de etanol de 2,56g/L para RL1 e 2,48g/L para RL5 foram mais baixos, mostrando que para estas leveduras no processo em anaerobiose obtêm-se melhores resultados.

A Tabela 13 mostra o resumo das melhores condições de fermentação para as linhagens de leveduras isoladas a partir da casca de uva (*Vitis spp*).

Tabela 13. Condições ótimas de fermentação da xilose para as linhagens RL1 e RL5

	RL1	**RL5**
pH	6,0	6,0
Temperatura	30°C	30°C
Tempo	48horas	48horas
Concentração de açúcar	2% (mais usado) 5% (tolera)	3%
Processo	Batelada Simples	Batelada Simples
Oxigênio	Anaerobiose	Anaerobiose

7. CONCLUSÕES

- ✓ As duas linhagens de leveduras isoladas da casca de uva Rubi, denominadas RL1 e RL5, mostraram boa capacidade de se desenvolver em meio com xilose como única fonte de carboidrato.

- ✓ As duas linhagens mostraram-se capazes de fermentar xilose produzindo etanol.

- ✓ As duas linhagens foram capazes de tolerar diferentes concentrações de xilose no meio.

- ✓ As duas linhagens mostraram-se mais promissoras na fermentação de xilose em etanol do que glicose em etanol.

8. APÊNDICE I

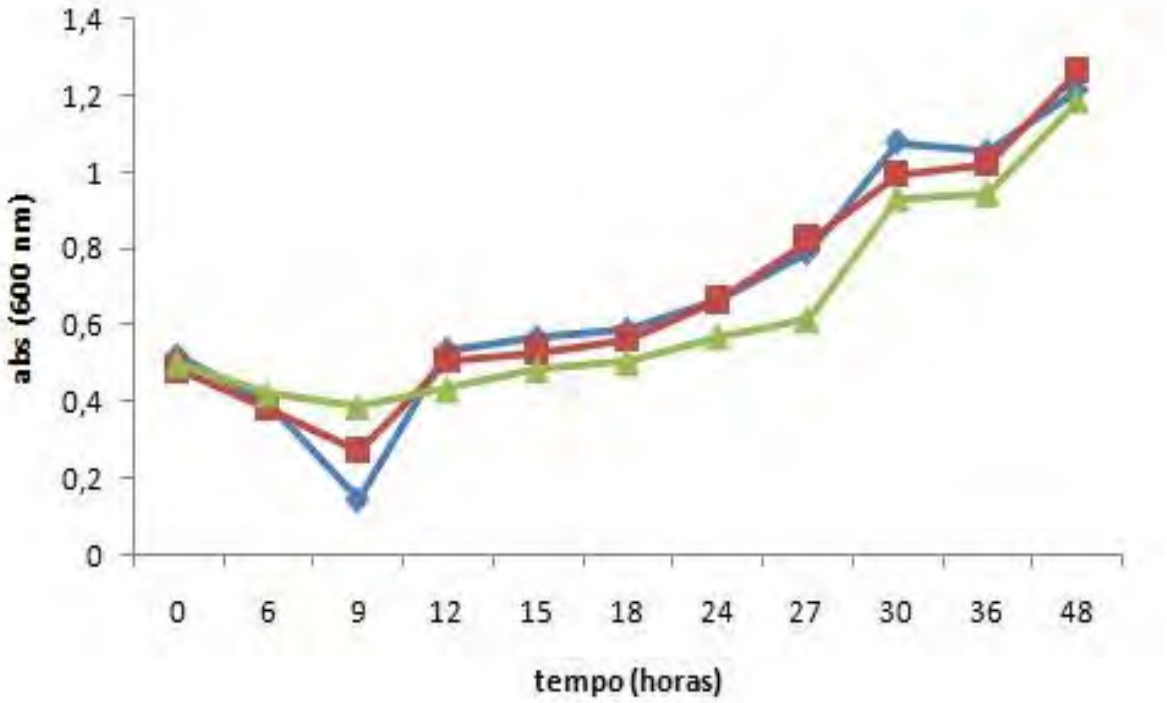


Figura 29. Comportamento do crescimento celular da levedura RL1.

RL1 RL1r RL1rr

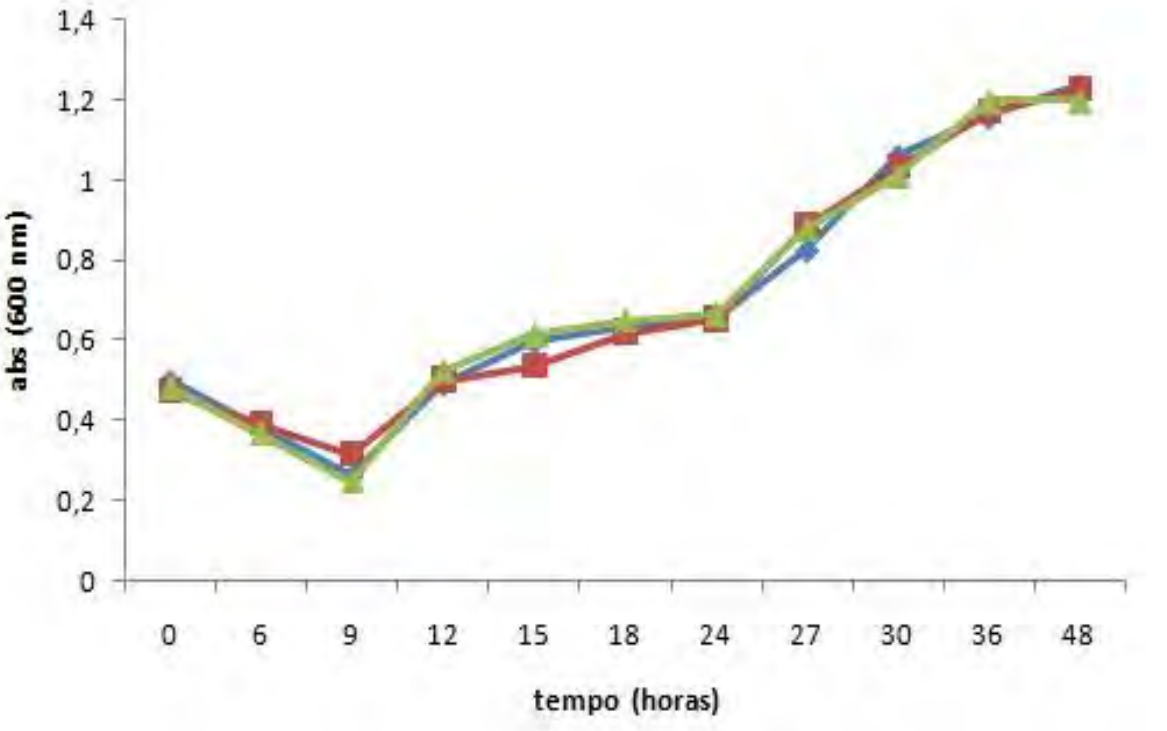


Figura 30. Comportamento do crescimento celular da levedura RL5.

RL5 RL5r RL5rr

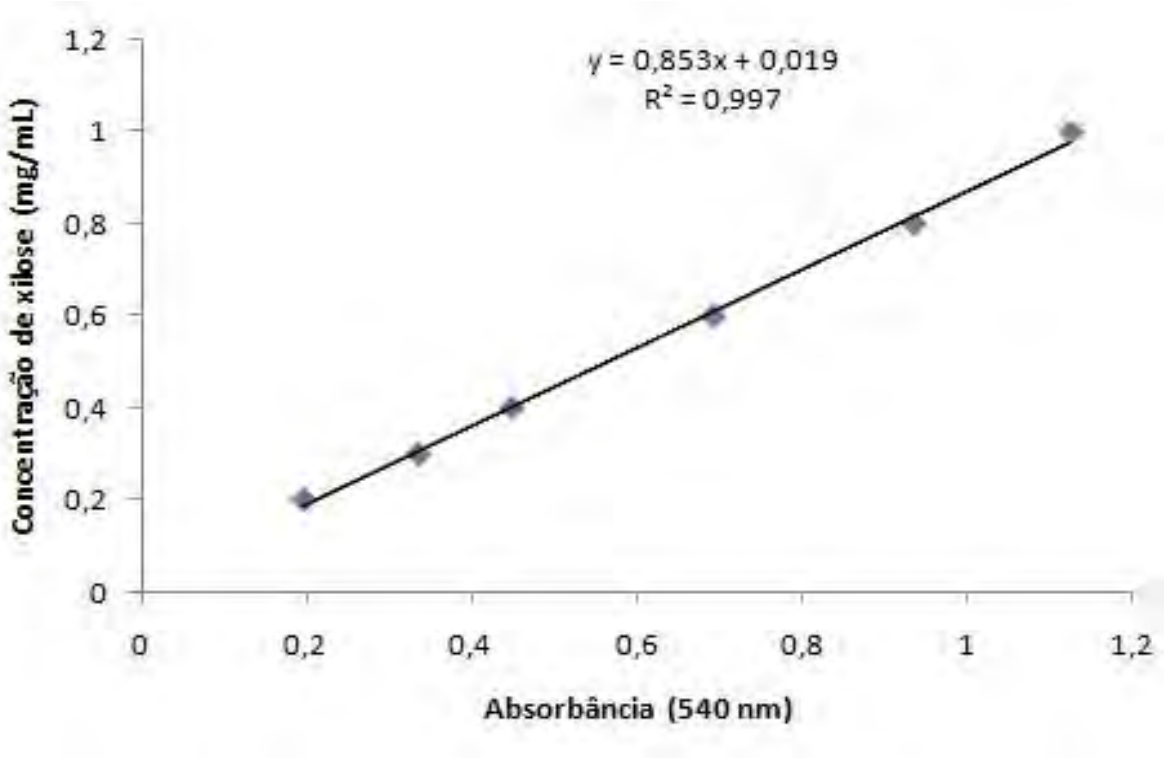


Figura 31. Curva padrão da xilose

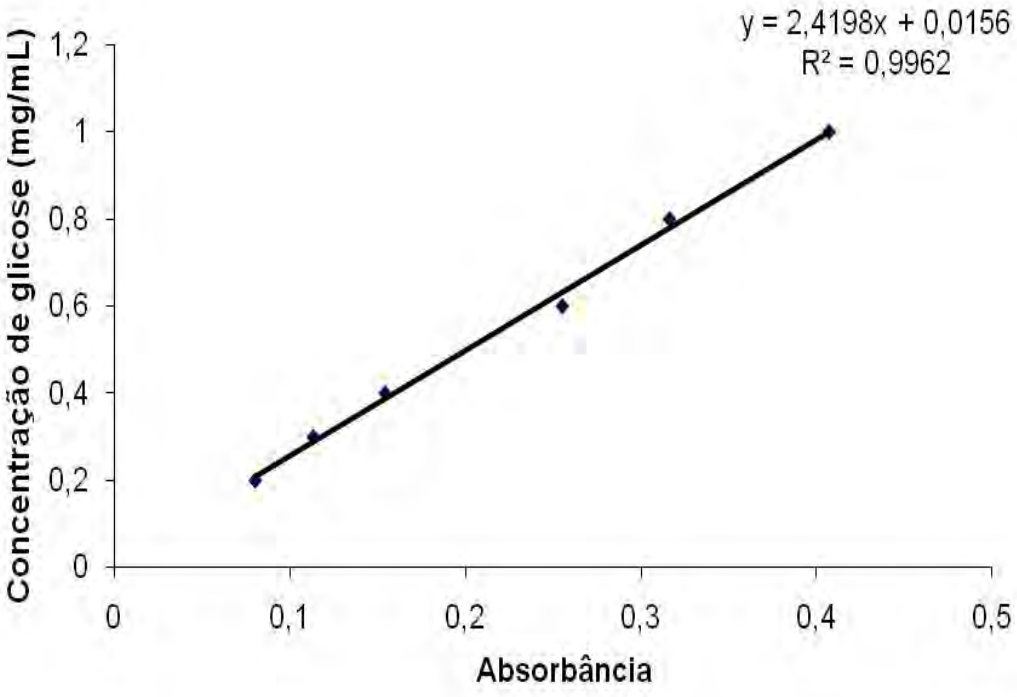


Figura 32. Curva padrão da glicose

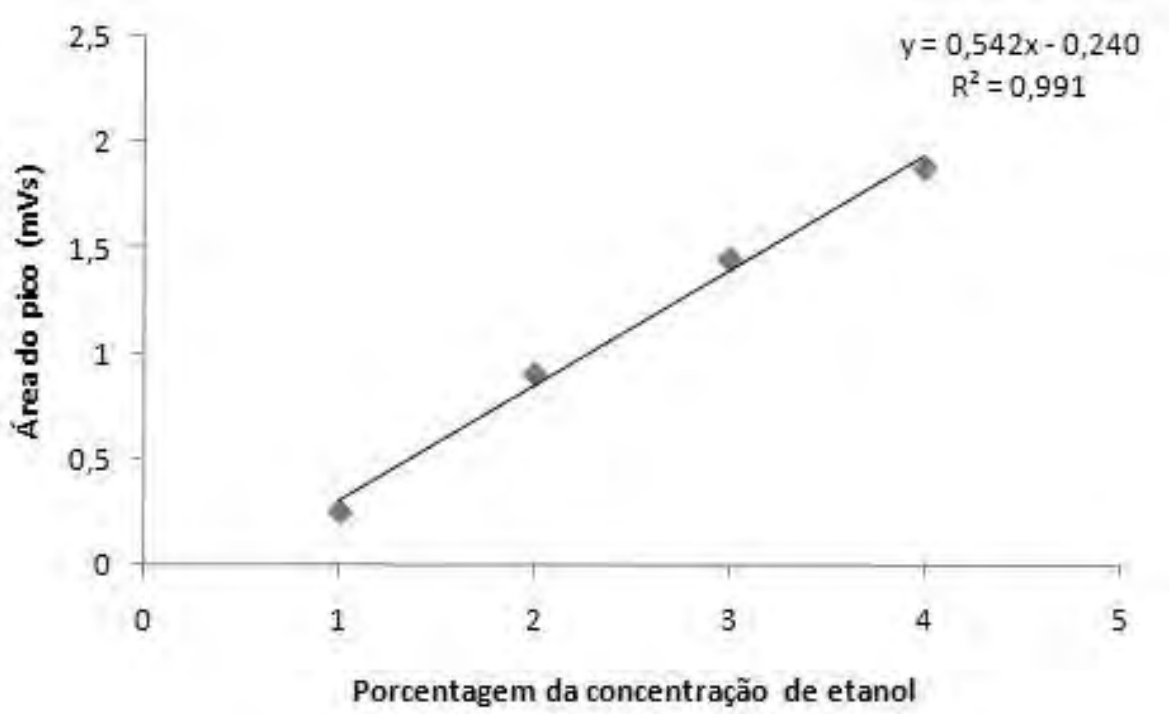


Figura 33. Curva padrão do etanol

Quadro 1. Massa celular, consumo de açúcar, e parâmetros cinéticos das linhagens de Uva Rubi durante a fermentação em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Linhagem	**Neubauer**	**ABS**	**Crescimento g/L**	**Açúcar g/L**	**$Y_{x/s}$ g/g**	**P_x g/L.h**	**P_s g/L.h**
RL1	$1,6x10^7$	0,350	0,437	12,38	0,035	0,008	0,25
RL2	$1,3x10^7$	0,327	0,436	1,41	0,287	0,005	0,02
RL3	$5,0x10^6$	0,273	0,341	11,2	0,021	0,006	0,23
RL4	$1,2x10^7$	0,316	0,395	10,98	0,032	0,007	0,22
RL5	$1,7x10^7$	0,368	0,46	13,26	0,031	0,008	0,27
RL6	$5,5x10^6$	0,289	0,361	12,29	0,026	0,006	0,25
RB1	$5,7x10^6$	0,293	0,366	10,39	0,031	0,006	0,21
RB2	$6,2x10^6$	0,297	0,371	10,07	0,032	0,006	0,20
RB3	$1,8x10^7$	0,372	0,465	12,68	0,033	0,008	0,26
RB4	$1,4x10^7$	0,336	0,42	13,29	0,028	0,007	0,27
RB5	$5,2x10^6$	0,277	0,346	5,6	0,054	0,006	0,11
RB6	$4,5x10^6$	0,263	0,328	2,4	0,12	0,006	0,05
RB7	$5,8x10^6$	0,292	0,365	10,32	0,031	0,006	0,21
RB8	$4,5x10^6$	0,285	0,356	11,22	0,029	0,006	0,23
RB9	$7,0x10^6$	0,310	0,387	11,60	0,029	0,007	0,24
RB10	$7,5x10^6$	0,312	0,39	11,69	0,023	0,007	0,24
RB11	$4,7x10^6$	0,296	0,37	9,0	0,036	0,006	0,18
RB12	$6,3x10^6$	0,297	0,371	10,16	0,032	0,006	0,21

Quadro 2. Massa celular, consumo de açúcar, e parâmetros cinéticos das linhagens de Uva Thompson durante a fermentação em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Linhagem	**Neubauer**	**ABS**	**Crescimento g/L**	**Açúcar g/L**	**$Y_{x/s}$ g/g**	**P_x g/L.h**	**P_s g/L.h**
TB1	$2,7x10^6$	0,210	0,262	10,40	0,023	0,004	0,21
TB2	$2,0x10^6$	0,208	0,26	10,66	0,020	0,004	0,22
TB3	$3,5x10^6$	0,256	0,32	9,92	0,028	0,005	0,20
TB4	$1,7x10^6$	0,187	0,233	8,87	0,021	0,004	0,18
TB5	$3,2x10^6$	0,238	0,297	11,19	0,022	0,005	0,23
TB6	$3,0x10^6$	0,228	0,285	8,58	0,028	0,005	0,17
TB7	$3,3x10^6$	0,242	0,302	11,75	0,022	0,005	0,24
TB8	$2,7x10^6$	0,212	0,265	11,89	0,018	0,004	0,24
TB9	$1,2x10^6$	0,178	0,222	2,16	0,084	0,003	0,04
TB10	$3,2x10^6$	0,233	0,291	11,64	0,021	0,005	0,24
TB11	$2,0x10^6$	0,201	0,251	7,04	0,029	0,004	0,14
TB12	$2,2x10^6$	0,209	0,261	8,31	0,026	0,004	0,17
TB13	$1,7x10^6$	0,186	0,232	6,51	0,029	0,004	0,13
TB14	$4,2x10^6$	0,282	0,352	11,34	0,027	0,006	0,23

Quadro 3. Massa celular, consumo de açúcar, e parâmetros cinéticos das linhagens de Uva Thompson durante a fermentação em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Linhagem	**Neubauer**	**ABS**	**Crescimento g/L**	**Açúcar g/L**	**$Y_{x/s}$ g/g**	**P_x g/L.h**	**P_s g/L.h**
NL1	$7,2x10^6$	0,316	0,395	9,89	0,035	0,007	0,20
NL2	$6,7x10^6$	0,310	0,387	7,37	0,047	0,007	0,15
NL3	$7,0x10^6$	0,312	0,39	11,17	0,031	0,007	0,23
NL4	$9,5x10^6$	0,329	0,411	11,52	0,032	0,007	0,24
NL5	$9,0x10^6$	0,325	0,406	10,64	0,034	0,007	0,22
NL6	$8,7x10^6$	0,318	0,397	11,89	0,030	0,007	0,24
NB1	$3,0x10^6$	0,228	0,285	11,19	0,021	0,005	0,23
NB2	$3,2x10^6$	0,234	0,292	7,66	0,032	0,005	0,15
NB3	$5,7x10^6$	0,294	0,367	11,57	0,028	0,006	0,24
NB4	$5,0x10^6$	0,290	0,362	11,99	0,026	0,006	0,24
NB5	$2,5x10^6$	0,200	0,25	9,82	0,021	0,004	0,20
NB6	$4,7x10^6$	0,280	0,362	11,05	0,029	0,006	0,23
NB7	$4,0x10^6$	0,250	0,312	10,07	0,027	0,005	0,20
NB8	$5,8x10^6$	0,296	0,37	12,17	0,027	0,006	0,25
NB9	$3,2x10^6$	0,238	0,297	9,43	0,027	0,005	0,19
NB10	$2,6x10^6$	0,201	0,251	8,92	0,023	0,004	0,18
NB11	$6,5x10^6$	0,301	0,376	12,35	0,027	0,007	0,25
NB12	$3,8x10^6$	0,245	0,306	10,39	0,025	0,005	0,21

Quadro 4. Concentração de glicose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação pela levedura RL1 em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Tempo de fermentação	**Concentração de glicose**	**Massa celular**	**Produção de etanol**
Horas	**g/L**	**g/L**	**g/L**
0	20,0	0,3	0,00
12	13,7	1,1	0,8
24	1,14	2,4	1,67
36	0,4	3,4	0,63
48	0,3	4,1	0,00

Quadro 5. Concentração de glicose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação pela levedura RL5 em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Tempo de fermentação	**Concentração de glicose**	**Massa celular**	**Produção de etanol**
Horas	**g/L**	**g/L**	**g/L**
0	20,0	0,3	0,00
12	7,1	1,6	0,91
24	2,09	2,8	1,49
36	0,59	3,56	0,39
48	0,49	4,6	0,35

Quadro 6. Concentração de xilose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação pela levedura RL1 em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Tempo de fermentação	**Concentração de xilose**	**Massa celular**	**Produção de etanol**
Horas	**g/L**	**g/L**	**g/L**
0	20,0	0,3	0,00
12	12,12	0,1	0,15
24	11,72	1,3	2,19
36	11,52	2,15	0,53
48	11,42	3,19	0,27

Quadro 7. Concentração de xilose, crescimento celular e produção de etanol durante a fermentação pela levedura RL5 em pH 6,0, a 30°C por 48h.

Tempo de fermentação	**Concentração de xilose**	**Massa Celular**	**Produção de etanol**
Horas	**g/L**	**g/L**	**g/L**
0	20,0	0,29	0,00
12	11,6	0,07	0,7
24	11,51	1,4	1,2
36	11,32	2,3	0,36
48	9,82	3,6	0,00

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEREZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of food Engineering*, v. 55, p. 309–318, 2002.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 41, p. 475-487, 2006.

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. *Quimica de los alimentos*. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 1985.

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.

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

CARMONA, E. C. Produção, purificação e caracterização de xilanase por *Aspergillus versicolor*. 1995. 111f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências de Rio Claro, 1995.

CARRION, L. M. Isolamento de leveduras fermentadoras de pentoses e suas aplicações na produção de xilitol e etanol a partir do licor negro proveniente do processo Kraft de extração da celulose. 2011. 65f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biocências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 2011.

CARRION, L. M.; DORTA, C. Inativação de compostos tóxicos derivados da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar. *Revista Analytica,* v. 42, p. 82-92, 2009.

CUZENS, J. C.; MILLER, J. R. Acid Hydrolysis of bagasse for ethanol production**.** *Renewable Energy*, v. 10, p. 285-290, 1997.

DELLWEG, H.; RIZZI, M.; METHNER, H.; Debus, D. Xylose fermentation by yeasts. *Biotechnology Letters*, v. 6, p. 395-400, 1984.

DERGAL, S.B. *Quimica de los Alimentos*. 2 ed. México: Alhambra Mexicana, 1981.

DILLON, A. J. P.; CAMASSOLA, M. Production of celluloses and hemicelluloses by *Penicillium echinulatum* on pretred sugar cane bagasse and wheat bran in solid-state fermentation. *Journal of Applical Microbiology*, p. 2196-2204, 2007.

DOMÍNGUEZ, J. M. O. Efecto de los Productos de Degradación originados en la explosión por vapor de Biomassa de chopo sobre *Kluyveromyces marxianus*. 2003. 160f. Tese (Doutorado) - Universidad Complutense, Madrid, 2003.

DORTA, C. Sinergismo entre sulfite, ácido lático, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26. 2006. 144f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências de Rio Claro, 2006.

DORTA, C.; OLIVA-NETO, P.; ABREU-NETO, M. S.; NICOLAU-JUNIOR, N.; NAGASHIMA, A. I. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic

fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). *World Journal of Microbiology Biotechnology,* v.22, p.177–182, 2006.

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

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. *Anais*... Florianópolis, 2003. 1 CD-ROM, 2003.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. *Biomass and Bioenergy*, v. 13, p. 11–14, 1997.

FENNEMA, O. R. *Food Chemistry*. Marcel Dekker: New York, 1997.

FERNANDES, A. P. F. V. Leveduras isoladas de produtos frutícolas: capacidade fermentativa e estudos sobre a H+-ATPase da membrana. 2008. 2001 f. Tese (Doutorado) Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2008.

FREITAS, V. R.; PICOLI, S. U. A coloração de Gram e as variações na sua execução. *Newslab,* ed. 82, p. 124-128, 2007.

FROMANGER, R. et al. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,* v. 37, p. 437–445, 2010.

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

FUGITA, T. P. L. Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de

etanol em hidrolisado heimicelulósico de bagaço de cana. 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

GÁMEZ, S.; CABRIALES, J. J. G.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid**.** *Journal of food engineering*, v. 74, p. 78–99, 2006.

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

GOLDSTEIN, I. S. *Organic chemicals from Biomass*. Boca Raton: CRC Press, 1981.

GOMEZ, R. J. H. C. Sacarificação da Hemicelulose do Bagaço de cana de açúcar e sua fermentação por *Pachysolen tannophilus*. 1985. 137 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola de Campinas, 1985.

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

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

JONES, R. P.; PAMMENT, N.; GREENFIELD, P. F. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, v. 16, p.42-49, 1981.

KIPPER, P. G. Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus*. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências de Rio Claro, 2009.

LACHKE, A. Biofuel from D-xylose – the Second Most Abundant Sugar. *Resonance*, p.50-58, 2002.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; STEPHEN, G. A.; LICHEA, J.; ANTAL-JR, M. J.; LYND, L. R. A. comparison of liquid hot water and steam preteatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresourse Technology*, v 81, p. 33 – 44, 2002.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 4 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Avaliação da produção dos compostos majoritários da fermentação de mosto de uva por leveduras isoladas da região da "Serra Gaúcha" (RS). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, p. 453–458, 2004.

MARTINS, G. M. Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose. 2011. 104f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista Instituto de Biocências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, 2011.

MARTINS, L. F. Caracterização do Complexo Celulásico de *Penicillium echinulatum*. 2005. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MATOS, G. S.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Formação de xilitol, etanol e glicerol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003, Florianópolis. *Anais*... Florianópolis, 2003. 1 CD-ROM, 2003.

MATSUSHUKA, A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 2392-2398, 2009.

MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. Bagaço de cana: para a produção de enzimas lignocelulolíticas. *Estudos tecnológicos*, v. 5, n. 1, p. 68-78, 2009.

MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical. Chemistry*, v. 31, p. 426-429, 1959.

MORAES, D. C.; PEREZ, C. A.; DORTA, C. Seleção de micro-organismos fermentadores de xilose. *Revista Analytica*, v. 47, p. 59-66, 2010.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 98-100, p. 49-58, 2002.

NIGAM, J.N.; IRELAND, R.S.; MARGARITIS, A.; AND LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment d-xylose directly to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 50, p. 1486–1489, 1985.

OGIER, J. C.; BALLERINI, D.; LEIGUE, J. P.; RIGAL, L.; POURQUIÉ, J. Production d'ethanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology*/ *Revue de l'Institut Francais du Petrole* v.54, p. 67-94, 1999.

OHTA, K., BEALL, D.S., MEJIA, J.P., SHANMUGAN,K.T., INGRAM, L.O., Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: Chromossomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II, *Applied and Environmental Microbiology*, v.57 (4), p. 893-900, 1991.

OLIVEIRA, L.T.; VELOSO, J. C. R.; TERAN-ORTIZ, G. P. Caracterização físico-química da farinha de semente e casca de uva, *II Semana de Ciência e Tecnologia do IFMG campus Bambuí***,** Brasil, 2009.

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

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, v. 38, p. 53-87, 1989.

PEREIRA, A. A.; MARTINS, G. F.; ANTUNES, P. A.; CONRRADO, R.; PASQUINI, D.; JOB, A. E.; CURVELO, A. A. S.; FERREIRA, M.; RIULJr, A.; CONSTANTINO, C. J. L. Lignin from sugar cane bagasse: Extraction, Fabrication of namoestructured films, and application. *Langmeuir*, v. 23, p. 6652–6659, 2007.

PEREIRA, R. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Inhibitory action of toxic compounds present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by Candida guilliermondii. *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, v. 38, p. 71–78, 2011.

ROSSEL, C. E. V. Conversion of lignocellulose biomass (bagasse and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol. Industrial Perspectives for Bioethanol. Ed. Telma Franco. Cap. 8, p.123-142. ISBN 85-98951-06-4, 2006a.

ROSSEL, C.E.V. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. *Sugar Industry / Zuckerindustrie* v. 131, n°1, 2006b.

RUDOLF, A.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAGERDAL, B. H.; LIDEN, G. Simultaneous Saccharification and Fermentations of Steam-Pretreated Bagasse Using *Saccharomyces cerevisae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering*, v 99, p. 783 – 790, 2008.

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

SCHNEIDER, H.; MALESZKA, R.; NEIRINCK, L.; VELIKY, I. A.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K. Ethanol Production from D-Xylose and Several Other Carbohydrates by *Pachysolen tannophilus* and Other Yeasts. Advances *in Biochemical Engineering*/Biotechnology, v. 27, p. 57-71, 1983.

SILVA, J. P. A. Estudo da produção de etanol por Pichia stipitis empregando hidrolisado de palha de arroz. 2007. 146 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena, 2007.

SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Avaliação do Processo de Bioprodução de Etanol a partir de Xilose pela Levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em Reator de Bancada In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2009, Natal. *Anais*... Natal, 2009. 1 CD-ROM, 2009.

SILVA, L. M. L. R. Caracterização dos Subprodutos da Vinificação. *Revista do ISPV*, n. 28, 2003. Disponível em: <http://www.ipv.pt/millenium/Millenium28/10.pdf>. Acesso em: jun. 2011, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos*. 3 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

TAKAHASHI, C. M. Produção de etanol por *Escherichia coli* geneticamente modificada: influência de fatores nutricionais**.** 1998. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1998.

TANTIRUNGKIJ, M.; NAKASHIMA, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Construction of xylose assimilating *Saccharomyces cerevisiae. Journal of Fermentation and Bioengineering,* v.75, p. 83-88, 1993.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHAROEDER, H. A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renewable Energy*, v. 16, p. 1070–1073, 1999.

UENOJO, M. Produção e caracterização de aromas de frutas por micro-organismos pectinolíticos utilizando-se resíduos agroindustriais. 2003. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 2003.