RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/03/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FERMENTATIVAS DA LEVEDURA *Pichia membranifaciens* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Natália Novais Ribeiro
Tecnóloga em Biocombustíveis

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FERMENTATIVAS DA LEVEDURA *Pichia membranifaciens* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Natália Novais Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Dra. Lidyane Aline de Freita

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

2019

Ribeiro, Natália Novais
R484c Caracterização das condições fermentativas da levedura *Pichia membranifaciens* para produção de etanol de segunda geração / Natália Novais Ribeiro. — Jaboticabal, 2019
57 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton
Coorientadora: Lidyane Aline de Freita

1. Hidrolisado. 2. Licor hemicelulósico. 3. Licor sintético. 4. Pentose. 5. *Pichia spp*. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FERMENTATIVAS DA LEVEDURA *Pichia membranifaciens* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

AUTORA: NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO
ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON
COORIENTADORA: LIDYANE ALINE DE FREITA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MICROBIOLOGIA AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Lidyane Aline de Freita
Pós-doutoranda LIDYANE ALINE DE FREITA
Departamento de Tecnologia / UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - SP

Sandra Regina Ceccato Antonini
Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural-UFSCar / Araras/SP

Profa. Dra. MARIA BENINCASA VIDOTTI
Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza / FATEC - Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 07 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

NATÁLIA NOVAIS RIBEIRO – Nasceu aos 24 de dezembro de 1993, no município de Sertãozinho, estado de São Paulo. Em fevereiro de 2013 ingressou no curso de Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia, Fatec Nilo De Stéfani, Jaboticabal, recebendo o título de Tecnóloga em Biocombustíveis em agosto de 2016. Em março de 2017 ingressou na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal/SP, no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária em nível de Mestrado Acadêmico.

Epígrafe

A conquista é um acaso que talvez dependa mais das falhas dos vencidos do que do gênio do vencedor.

- *Madame de Staël*

A minha mãe pelo incentivo, conselhos, compreensão e amor incondicional.

A minha irmã pela amizade, carinho e companheirismo ao longo desta caminhada.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que me concedeu o privilégio de nascer e viver entre pessoas sensacionais que são o alicerce desta conquista;

Aos meus pais e irmã pelo carinho, incentivo, credibilidade e compreensão nas horas mais difíceis;

À prof. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton, orientadora desta dissertação, pela confiança em meu trabalho, pela acolhida, por todo o conhecimento transferido, pela sabedoria e amizade;

À Dra. Lidyane Aline de Freita, pela coorientação, disponibilidade, empenho, paciência, estímulo e dedicação;

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações;

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realização do curso e aprimoramento profissional;

A todos do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Álcool, pelos bons momentos de aprendizado, de alegria e pela colaboração: Aline, Calisto, Cristhyane, Franciele, Letícia, Lidyane, Sérgio e Vitor;

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a concretização desse estudo;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

SUMÁRIO i
RESUMO iii
ABSTRACT iv
LISTA DE FIGURAS v
LISTA DE TABELAS ix
1. INTRODUÇÃO 1
2. REVISÃO DE LITERATURA 4
2.1 Etanol no Brasil e no mundo 4
2.2 Biomassas lignocelulósicas 5
2.3 Leveduras 6
2.5 Metabolismo de xilose em leveduras 8
2.6 Gênero *Pichia* 9
2.7 *Pichia membranifaciens* 10
2.8 Parâmetros da fermentação 10
2.8.1 pH 10
2.8.2 Temperatura 11
2.8.3 Nutrientes 12
3. MATERIAL E MÉTODOS 13
3.1 Local do experimento 13
3.2 Microrganismo 13
3.3 Preparo do inóculo 13
3.4 Preparo do mosto sintético 14
3.5 Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico 14
3.6 Determinação de nutrientes no licor 15
3.7 Processo fermentativo 15
3.7.1 Ensaio 1 – Teste de pH e temperatura 15
3.7.2 Ensaio 2 – Teste de nutrientes 16
3.7.3 Ensaio 3 - Fermentação de licor hemicelulósico 16
3.8 Análises microbiológicas 17

3.9 Cromatografia líquida de alta eficiência 17
3.10 Analise estatística 17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 18
4.1 Viabilidade dos inóculos.....18
4.2 Ensaio 1 – Teste de pH e temperatura.....18
4.3 Ensaio 2 – Teste de nutrientes.....30
4.4 Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico 38
4.5 Determinação de nutrientes no licor.....39
4.6 Ensaio 3 - Fermentação de licor hemicelulósico 40
5. CONCLUSÕES 49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....50

CARACTERIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES FERMENTATIVAS DA LEVEDURA *Pichia membranifaciens* PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

RESUMO - Tecnologias desenvolvidas na última década tornaram viável o uso de materiais lignocelulósicos para produção de etanol. Entretanto para aumento do rendimento fermentativo são necessárias algumas melhorias, entre elas destaca-se a busca por novos microrganismos capazes de fermentar açúcares com cinco carbonos. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH, temperatura e suplementação de nutrientes sobre a fermentação de pentoses e hexoses por *Pichia membranifaciens* LJ04 em mostos sintéticos e comparar o desenvolvimento de processos fermentativos conduzidos em licores sintéticos e licor hemicelulósico concentrado e destoxificado nas condições fermentativas ideais. No primeiro ensaio, os tratamentos principais foram caracterizados pelas temperaturas 32°C, 37°C e 40°C nos pHs 3,5, 4,0 e 4,5 e os secundários pelos tempos 0, 6, 12 e 24h. No segundo ensaio, os tratamentos principais foram caracterizados pela suplementação com N, P, K, Mg, Mn e Zn associados e isolados e os secundários pelos tempos 0, 6, 12 e 24 h. Para o terceiro ensaio, os tratamentos principais foram caracterizados pelos mostos sintéticos com diferentes suplementações de nutrientes e licor hemicelulósico concentrado e destoxificado e os secundários pelos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 72 h. Estabeleceu-se neste estudo que os parâmetros ideais para produção de etanol foram temperatura de 32°C e pH 4,5, nestas condições obteve-se altas taxas de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos e a maior concentração de etanol após o período de 24h do processo fermentativo. A presença de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco mostraram-se essenciais para conservação e crescimento das células de leveduras e alta produção de etanol. O trabalho mostrou que é possível a produção de etanol por *Pichia membranifaciens* em mostos sintéticos e licor hemicelulósico. O licor hemicelulósico foi o tratamento que obteve o maior consumo de xilose ao longo das 72h do processo fermentativo.

Palavras-Chave: Hidrolisado, Licor hemicelulósico, Licor sintético, Pentose, *Pichia spp*.

CHARACTERIZATION OF FERMENTATIVE CONDITIONS OF YEAST *Pichia membranifaciens* FOR SECOND GENERATION ETHANOL PRODUCTION

ABSTRACT - Technologies developed in the last decade have made the use of lignocellulosic materials viable for ethanol production. However, to increase the fermentative yield some improvements are necessary, through the search of new microorganisms with the ability to ferment sugars with five carbons. Thus, the present research evaluated the influence of pH, temperature and nutrient supplementation on the fermentation of pentoses and hexoses by *Pichia membranifaciens* LJ04 in synthetic medium and to compare the fermentative processes in synthetic hydrolysate and hemicellulosic hydrolysate (detoxified) in optimum fermentative conditions. In the first trial, the main treatments were the temperature 32°C, 37°C and 40°C at pHs 3.5, 4.0 and 4.5 and the secondary treatments the times 0, 6, 12 and 24 hours. In the second trial, the main treatments were nutrient supplementation with N, P, K, Mg, Mn and Zn associated and isolated and the secondary treatments the times 0, 6, 12 e 24 h. For the third trial, the main treatments were the synthetic medium with different nutrient supplements and hemicellulosic hydrolysate (detoxified), and secondary treatments to the times 0, 6, 12, 24, 48 and 72 h. It was established in this study that the ideal parameters for ethanol production were a temperature of 32 ° C and pH 4.5, with these conditions it was obtained high rates of cell viability, budding rate, and bud viability, and the highest concentration of ethanol after the 24 hours of the fermentation process. The presence of nitrogen, phosphorus, potassium, magnesium, manganese and zinc was essential for the conservation and growth of yeast cells and high ethanol production. The work showed that it is possible to produce ethanol by *Pichia membranifaciens* in synthetic medium and hemicellulosic hydrolysate. The hemicellulosic hydrolysate was the treatment that obtained the highest consumption of xylose during the 72 hours of the fermentation process.

Keywords: Hydrolysate, Hemicellulosic Liquor, Synthetic Liquor, Pentose, *Pichia spp*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da via metabólica de D-xilose em fungos (Adaptado de MATSUSHIKA et al., 2009). 8
Figura 2. Desdobramento de interações para o parâmetro viabilidade celular; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5.....21
Figura 3. Desdobramento de interações para o parâmetro índice de brotamentos; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5.....22
Figura 4. Desdobramento de interações para concentração de glicose; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0.....25
Figura 5. Desdobramento de interações para concentração de xilose; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5. 26
Figura 6. Desdobramento de interações para concentração de glicerol; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5. 27
Figura 7. Desdobramento de interações para concentração de ácido acético; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5. 28

Figura 8. Desdobramento de interações para concentração de etanol; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5. 29

Figura 9. A. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 33

Figura 10. A. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de xilose. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 35

Figura 11. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 36

Figura 12. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro concentração de ácido acético. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 37

Figura 13. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de etanol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 38

Figura 14. A. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2–Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3-Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 41

Figura 15. A. Interação entre mosto e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre mosto e tempo para concentração de xilose. C. Interação entre mosto e tempo para concentração de arabinose. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 44

Figura 16. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.....46

Figura 17. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de etanol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.....47

Figura 18. Concentração de ácido acético ao longo do processo fermentativo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4- Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados das análises de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos dos inóculos utilizados nos ensaios de fermentação. 18
Tabela 2. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 3,5.....19
Tabela 3. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 4,0.....20
Tabela 4. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 4,5.....20
Tabela 5. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 3,5.....23
Tabela 6. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 4,0.....24
Tabela 7. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 4,5.....24
Tabela 8. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos para o ensaio de nutrientes 31
Tabela 9. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para o ensaio de nutrientes.....34
Tabela 10. Resultado da análise de HPLC da concentração de glicose, xilose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol presentes no licor hemicelulósico *"in natura"* e licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.....38
Tabela 11. Resultado da análise de macro e micronutrientes presentes no licor hemicelulósico concentrado e destoxificado 39
Tabela 12. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade de brotos para ensaio de fermentação com licor hemicelulósico 40

Tabela 13. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol para ensaio de fermentação com licor hemicelulósico.....43

1. INTRODUÇÃO

O etanol possui grande importância para a economia brasileira, pois, além de possuir diversas aplicações industriais, apresenta-se como uma alternativa energética viável para a substituição gradativa do uso do petróleo. Destaca-se que sua aplicação em motores de explosão contribuiu para a ascensão do mercado de combustíveis renováveis e no estabelecimento de indústrias químicas de base sustentadas pelo uso de biomassa de origem agrícola (Chieppe Junior, 2012).

Nas últimas quatro décadas, o Brasil se tornou o segundo maior produtor de etanol do mundo através da adoção de estratégias de expansão de produção a partir da cana-de-açúcar (Silva, 2017), entretanto este crescimento não será o suficiente para atender a futura demanda de exportações, havendo à necessidade de implementação de outras matérias-primas e tecnologias.

Visando o aumento do volume de etanol produzido sem que haja a necessidade da expansão de terras cultiváveis, a utilização de biomassas lignocelulósicas para produção deste biocombustível surge como uma atividade promissora. A adoção da utilização do bagaço e palha de cana-de-açúcar poderá suprir a demanda necessária para atender o mercado interno e externo (Silva, 2017).

Denominado etanol de 2ª geração, este biocombustível já possui tecnologias de tratamento para quebra da estrutura complexa do bagaço (celulose, hemicelulose e lignina) (Ferreira, 2015) que liberam pentoses como D-xilose e L-arabinose; e hexoses como D-glicose, D-manose e D-galactose (Tomás-Pejó et al., 2014). Após a liberação destes açúcares, as leveduras são capazes de realizar o processo fermentativo.

A fermentação é a etapa na qual ocorre a conversão do substrato (mosto) em etanol e outros compostos indesejados por intermédio de reações metabólicas realizadas por microrganismos (De Sousa e Monteiro, 2011). Entretanto a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada nos processos de produção de etanol de 1ª geração, não é capaz de metabolizar açúcares com cinco carbonos (Dos Santos, 2012). Desta forma, a busca por microrganismos capazes de realizar a fermentação de pentoses torna-se necessária.

De acordo com registros da literatura há um grande número de leveduras que metabolizam xilose. Entretanto somente cerca de 1% delas são capazes de fermentar xilose em etanol (Hahn-Hagerdal et al., 2007), dentre estas destaca-se *Pichia membranifaciens*. Amplamente distribuída na natureza, é considerada um microrganismo de degradação de alimentos e bebidas, sendo encontrada em materiais vegetais, frutas em estado de deterioração e bebidas fermentadas (Kurtzman, 2011). Este microrganismo também foi identificado como parte da microbiota de processos de fermentação espontânea de alimentos (Šuranská et al., 2012; Wu et al., 2013; Pereira et al., 2015, Benítez-Cabello et al., 2015; You et al., 2016; Stefanini et al., 2016; Grounta et al., 2016). Entretanto registros referentes a sua utilização para fermentação de mosto hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol 2G são escassos na literatura.

Para que processos com novos microrganismos isolados obtenham alta taxa de rendimento é necessário a realização de estudos para estabelecer as condições fermentativas que garantam que as leveduras consigam produzir concentrações altas de etanol sem que haja um alto índice de mortalidade das células. Dentre os fatores que afetam diretamente o processo fermentativo destaca-se pH, temperatura e nutrientes (De Sousa e Monteiro, 2011).

O pH tem grande influência nas fermentações industriais, devido ao controle da contaminação bacteriana e ao seu efeito no crescimento das leveduras, sendo em geral encontrados pHs ideais para leveduras na faixa de 4,5 à 5,0 (Chieppe Junior, 2012).

A temperatura é um dos fatores mais importantes da fermentação. O estudo e conhecimento desta grandeza é de suma importância, pois exerce efeitos no crescimento, viabilidade, metabolismo e fermentação (Souza, 2009).

Como qualquer outra forma de vida, as leveduras necessitam de determinados elementos químicos para garantir sua sobrevivência, por este motivo, os mostos podem requerer a adição complementar de nutrientes para que a fermentação possa ocorrer de forma satisfatória. Os mais utilizados são: fontes de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, manganês, cobre, zinco e ferro (Chieppe Junior, 2012). A ausência de alguns destes nutrientes podem afetar diretamente a velocidade da fermentação (Silva, 2010).

Nestas circunstâncias, para que se obtenha um bom rendimento fermentativo a escolha do microrganismo deve ser acompanhado por estudo de fatores que interferem sobre as condições ideias de crescimento e de fermentação. Desta forma todo o potencial pode ser explorado possibilitando melhores rendimentos e diminuição de perdas.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do pH, temperatura e suplementação de nutrientes sobre a fermentação de pentoses e hexoses por *Pichia membranifaciens* LJ04 em mostos sintéticos e comparar o desenvolvimento de processos fermentativos conduzidos em licores sintéticos e licor hemicelulósico concentrado e destoxificado nas condições fermentativas ideais.

5. CONCLUSÕES

Estabeleceu-se neste estudo que as condições ideais para produção de etanol por *Pichia membranifaciens* LJ04 através da assimilação de xilose e glicose foram temperatura de 32°C e pH 4,5.

Os mostos sintéticos tratados sobre os parâmetros ideias obtiveram altas taxas de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos e a maior concentração de etanol após o período de 24h do processo fermentativo.

A utilização do pH 3,5 nos mostos sintéticos provocou a redução do número de brotos vivos da levedura ao longo da fermentação.

O tratamento sem suplementação apresentou formação de etanol, entretanto os resultados obtidos demonstram que os nutrientes são importantes para obtenção de altas taxas deste produto.

A ausência de magnésio e manganês afetou intensamente a viabilidade celular, número de brotamentos e viabilidade dos brotos das células de levedura.

A presença de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco mostraram-se essenciais para conservação e crescimento das células de leveduras e alta produção de etanol.

O trabalho mostrou que é possível a produção de etanol por *Pichia membranifaciens* em mostos sintéticos e licor hemicelulósico.

O período de maior velocidade de consumo de xilose está relacionado ao tempo em que a glicose encontra-se disponível nos mostos.

O licor hemicelulósico foi o tratamento que obteve o maior consumo de xilose ao longo das 72h do processo fermentativo.

Pichia membranifaciens LJ04 apresentou alta tolerância à concentrações de ácido acético. Teores próximos a 12 $g.L^{-1}$ de ácido acético não provocou mudanças significativas na viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos das células de levedura.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvim A, Hoppe L (2016) Potencial de oferta de créditos negativos de carbono a partir do mercado de etanol no Brasil. **Espacios**, 37(15): 9p.

Amorim HV (2005) Fermentação alcoólica, ciência & tecnologia. Piracicaba: Fermentec. 448p.

Aquarone E, BorzanI W, Schmidell W, Lima UA (2001) Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher. 523p.

Balat, M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, 52:858–875.

Barbosa JC, Maldonado Junior W (2015) **Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos - AgroEstat**, versão 1.1.0.711.

Basso, LC, Basso TO, Rocha SN (2011) Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impacton yeast fermentation. In: Bernardes MAS (ed). **Biofuel Production – Recent Developments and Prospects**. InTech, p. 85-101.

Benítez-Cabello A, Romero-Gil V, Rodríguez-Gómez F, Garrido-Fernández A, Jiménez-Díaz R, Arroyo-López FN (2015) Evaluation and identification of poly-microbial biofilms on natural green Gordal table olives. **Antonie van Leeuwenhoek**, 108:597-610.

Betancur GJV (2010) **Otimização do pré-tratamento ácido de bagaço de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração**. 174 f. Tese (Doutorado) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Bonassa G, Teleken JG, Schneider LT, De Oliveira CJ (2013) Análise da Influência do pH e da Temperatura no Processo de Fermentação de Caldo de Cana. In: III Encontro Paranaense de Engenharia e Ciência. **Anais...** Toledo: Universidade do Oeste do Paraná.

Bonassa G, Schneider LT, Oliveira CJ, Meier TRW, Teleken JG (2014) Otimização do processo de fermentação alcoólica avaliando a influência do ph, concentração de açúcares e temperatura. In: II Simpósio de bioenergia e biocombustíveis do Mercosul. **Anais ...** Foz do Iguaçu.

Bregagnoli FCR (2006) **Comportamento fisiológico de microrganismos submetidos a biocidas convencional e natural na produção de cachaça orgânica**. 69f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Cadete RM, De Las Heras AM, Sandstrom AG, Ferreira C, Gírio F, Gorwa-Grauslund MF, Rosa CA, Fonseca C (2016) Exploring xylose metabolism in Spathaspora species: XYL1.2 from Spathaspora passalidarum as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered Saccharomyces cerevisiae. **Biotechnology for Biofuels**, 9:167.

Cadete RM, Melo MA, Dussán KJ, Rodrigues RC, Da Silva SS, Zilli JE, Vital MJS, Gomes FCO (2012) Diversity and physiological characterization of Dxylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, 7(8):e43135.

Cadete RM, Rosa CA (2017) The yeasts of the genus Spathaspora: potential candidates for second-generation biofuel production. **Yeast**, 35: 191-199.

CARDOSO MG (2006) Análises físico-químicas de aguardente. In: Cardoso MG (ed) **Produção de aguardente de cana-de-açúcar**. Lavras: UFLA, p. 445.

Carneiro ACG (2015) **Uma análise econômica de mudanças no uso da terra e produção de matéria-prima do etanol no Brasil: o papel da disponibilidade de água para o setor de irrigação**. 135 p. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Sociais Aplicadas, Recife.

Chieppe Junior JB (2012) **Tecnologia e fabricação do álcool**. Inhumas: Universidade Federal de Santa Maria, p. 74.

Costa CC, Burnquist HL (2016) Impactos do controle do preço da gasolina sobre o etanol biocombustível no Brasil. **Estudos Econômicos**, 46(4): 1003-1028.

De Abreu JAS, Rovida AFS, Pamphile JA (2015) Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **Revista UNINGÁ Review**, 21(1): 55-59.

De Castro HF (Ed) (2013) Processos Químicos Industriais II**:** Indústria Alcooleira. Lorena: Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena – EEL.

De Mello AGB (2012) **Redução e reaproveitamento de água no processo de produção de etanol: um estudo de caso**. 74 f. Monografia (Pós-Graduação MTA), Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos, Piracicaba.

De Sousa JLU, Monteiro RAB (2011) Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol. **FAZU em Revista**, 8: 100-107.

Dos Santos AM (2008) **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 77 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Exatas, Instituto de Química, Maceió.

Dos Santos DS (2012) **Produção de etanol de segunda geração por *Zymomonas mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósicas**. 218 f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro.

Dias RF, De Carvalho CAA (2017) Bioeconomia no Brasil e no Mundo: Panorama Atual e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, 9(1): 410-430.

Du Preez JC, Bosch M, Prior BA (1986) Xylose fermentation by Candida shehatae and Pichia stipitis: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, 8: 360-364.

Dussán KJ, Silva DDV, Perez VH, Da Silva SS (2016) Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. **Renewable Energy**, 87: 703-710.

Espíndola AA (2009) Processo de certificação do etanol brasileiro. **Revista de Ciências Gerenciais**, 8(17): 113-130.

Felipe MGA, Vitolo M, Mancilha IM, Silva SS (1997) Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by Candida guilliermondii. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** 18: 251-254.

Ferrari FCS (2013) **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 57 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Ferreira J (2015) Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**, 12(1).

Freita LA (2017) **Produção de etanol de segunda geração utilizando bagaço de sorgo sacarino, forrageiro e biomassa**. 179 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Freire RKB (2012) **Construção de bactérias recombinantes para produzir etanol e biopolímeros a partir de açúcares derivados do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar. 132 f**. Dissertação (Mestrado), Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Fugita TPL (2010) **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 60 f. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Gava AJ, Da Silva CAB, Frias JRG (Eds) (2008) **Tecnologia de alimentos - Princípios e aplicações.** São Paulo: Nobel, p. 116.

Goshadrou A, Karimi K, Taherzadeh MJ (2011) Bioethanol production from sweet sorghum bagasse by Mucor hiemalis. **Industrial Crops and Products**, 34: 1219-1225.

Gramiscia BR, Lutz MC, Lopes CA, Sangorrina MP (2018) Enhancing the efficacy of yeast biocontrol agents against postharvest pathogens through nutrient profiling and the use of other additives. **Biological Control**, 121: 151-158.

Grounta A, Doulgeraki AI, Nychas GE, Panagou EZ (2016) Biofilm formation on Conservolea natural black olives during single and combined inoculation with a functional Lactobacillus pentosus starter culture. **Food Microbiology**, 56: 35-44.

Govindaswamy S, Vane LM (2007) Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineered xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, 98: 677.

Hahn-hagerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 74: 937-953.

Hernández-Pérez AF, De Arruda PV, Felipe MGA (2016) Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by Candida guilliermondii FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology,** 47: 489-496.

Johnson EA, Echavarri-Erasun C (2011) Yeast Biotechnology. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (Ed.) **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science.

Jones Junior JB (1987) Kjeldahl nitrogen determination-What's in a name. **Journal of Plant Nutrition**, 10: 1675-1682.

Jones RP, Gadd GM (1990) Ionic nutrition of yeast—physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme and Microbial Technology**, 12: 402-418.

Kurtzman CP (1998) Pichia E. G. Hansen emend. Kurtzman. In: Kurtzman CP, FELL JW (Eds.) **The Yeasts: A Taxonomic Study**. 4. ed. v. 1. Elsevier Science.

Kurtzman CP, Robnett CJ, Basehoar-Powers E (2008) Phylogenetic relationships among species of Pichia, Issatchenkia and Williopsis determined from multigene phylogenetic analysis, and the proposal of Barnettozyma gen. nov., Lindnera gen. nov. and Wickerhamomyces gen. nov, **FEMS Yeast Research**,8: 939–954.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T (2011) Definition, Classification and Nomenclature of the Yeasts. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. (Eds.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science.

Kurtzman CP (2011) Pichia E.C. Hansen (1904). In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout, T. (Eds.). **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Elsevier Science.

Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, 11: 641-649.

Leite RC, Cortez LAB (2008) O etanol combustível no Brasil. **Revista Biocombustíveis no Brasil: Realidades e Perspectivas**, Ministério das Relações Exteriores. Disponível em: <http://novadelhi.itamaraty.gov.br/pt-br/promocao_comercial.xml>. Acesso em: 02 dez. 2018.

Lima UA, Basso LC, Amorim HV (2001) In: Lima UA (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo: Edgar Blucher, p.1-43.

Maia LC et al. (2015) Diversity of Brazilian Fungi. **Rodriguésia**, 66(4).

Macrelli S, Galbe M, Wallberg O (2014) Effects of production and market factors on ethanol profitability for an integrated first and second generation ethanol plant using the whole sugarcane as feedstock. **Biotechnol for Biofuels**, 7(26).

Martini C, Tauk-Tornisielo SM, Codato CB, Bastos RG, Ceccato-Antonini SR (2016) A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 32: 80.

Marton JM (2002) **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 115 f. Dissertação (Mestrado), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S (2009) Ethanol production from xylose in engineered Saccharomyces cerevisiae strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 84: 37–53.

McMillan JD (1993) **Xylose Fermentation Ethanol: A Review**. Springfield: National Technical Information Service.

Moreira CS, Santos MSM, Barros NS, Cardoso CAL, Batistote M (2015) Análise dos parâmetros morfofisiológicos de linhagens de leveduras industriais com potencial biotecnológico para a produção de etanol. **Ciência e Natura**, 37(4): 55-63.

Morries P (1983) A century of Kjeldahl (1883-1983). **Journal of the Association of Public Analysts**, 21: 53-58.

Mutton MJR (1998) **Avaliação da fermentação etanólica do caldo de cana-deaçúcar (*Saccharum spp*) tratada com maturadores químicos**. 178 f. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Narendranath NV, Thomas KC, Inlgledew WM (2001) Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of Saccharomyces cerevisiae in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 26: 171-177.

Niu X, Deng L, Zhou Y, Wang W, Yao S, Zeng K (2016) Optimization of a protective medium for freeze-dried Pichia membranifaciens and application of this biocontrol agent on citrus fruit. **Journal of applied microbiology**, 121: 234-243.

Pavani CD, Roviero JP, Freita LA, Costa GHG, Mutton MJR (2013) Efeito da concentração de n, p, mg, mn e zn sobre a fisiologia da levedura em fermentação. **Ciência & Tecnologia**, 5.

Pereira EL, Ramalhosa E, Borges A, Pereira JÁ, Baptista P (2015) YEAST dynamics during the natural fermentation process of table olives (Negrinha de Freixo cv.). **Food Microbiology**, 46: 582-586.

Remize F, Salblayrolles JM, Dequin S (2000) Re-assessment of the influence of yeast strain and environmental factors on glycerol prodution in wine. **Journal of applied microbiology**, 88: 371-378.

Roviero JP (2016) **Biomassa derivada de cana-de-açúcar e cana energia submetidas a hidrólise ácida e enzimática para produção de etanol**. 119f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

Rudolf A, Baudel H, Zacchi G, Hahn-Hägerdal B, Lidén G (2008) Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using Saccharomyces cerevisiae TMB3400 and Pichia stipitis CBS6054. **Biotechnology and bioengineering**, 99: 783-790.

Silva JA, Silva FLH, Alves RRN, Santana DP (2006) Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e ºBrix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, 29: 695-698.

Silva LAF (2010) **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada**. 91 f. Dissertação (Mestrado), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

Silva MR (2017) **Mandatos de biocombustíveis e crescimento da demanda mundial de etanol: Efeitos sobre a economia brasileira**. 85f. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

Souza CS (2009) **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 155 f. Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, São Paulo.

Stefanini I, Albanese D, Cavazza A, Franciosi E, De Filippo C, Donati C, Cavalieri D (2016) Dynamic changes in microbiota and mycobiota during spontaneous 'Vino Santo Trentino' fermentation. **Microbial Biotechnology**, 9(2): 195–208.

Steinle LA (2013) **Fatores que interferem na fermentação alcóolica**. 58 f. Monografia (Pós-Graduação MTA), Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, São Carlos.

Štornik A, Skok B, Trček J (2016) Comparison of cultivable acetic acid bacterial microbiota in organic and conventional apple cider vinegar. **Food Technology and Biotechnology**, 54: 113–119.

Šuranská H, Vránová D, Omelková J, Vadkertiová R (2012) Monitoring of yeast population isolated during spontaneous fermentation of Moravian wine. **Chemical Papers**, 66: 861-868.

Takahashi JÁ, Lima GS, Dos Santos GF, Lyra FH, Da Silva-Hughes AF, Gonçalves FAG (2017) Fungos filamentosos e química: velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, 9(6): 2351-2382.

Tomás-Pejó E, Bonander N, Olsson L (2014) Industrial yeasts strains for biorefinery solutions: Constructing and selecting efficient barcoded xylose fermenting strains for etanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, 8(5): 626-634.

Torija MJ, Roze`s N, Poblet M, Guillamo´n JM, Mas A (2003) Effects of fermentation temperature on the strain population of Saccharomyces cerevisiae. **International Journal of Food Microbiology,** 80: 47– 53.

United Nations Framework Convention on Climate Change (2016) **Report of the Conference of the Parties on its twenty-first session, held in Paris from 30 November to 13 December 2015**.

Varize CS, Cadete RM, Lopes LD, Christofoleti-Furlan RM, Lachance M, Rosa CA, Basso LC (2018) Spathaspora piracicabensis f. a., sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, 111: 525-531.

Walker GM (1998) **Yeast Physiology and Biotechnology**. Wiley J. & Sons (Eds.), Chichester.

Walker GM (2004) Metals in Yeast Fermentation Processes. **Advances in Applied Microbiology**, 54: 197-229.

Wang J, Wang HY, Xia XM, Li PP, Wang KY (2013) Synergistic effect of Lentinula edodes and Pichia membranefaciens on inhibition of Penicillium expansum infections. **Postharvest Biology and Technology**, 81: 7–12.

Wu Q, Chen L, Xu Y (2013) Yeast community associated with the solid state fermentation of traditional Chinese Maotai-flavor liquor. **International Journal of Food Microbiology**, 166: 323-330.

You L, Wang S, Zhou R, Hu X, Chu Y, Wang T (2016) Characteristics of yeast flora in Chinese strong-flavoured liquor fermentation in the Yibin region of China. **Journal of The Institute of Brewing**, 122: 517-523.

Zhou YH, Ming J, Deng LL, Zeng KF (2014) Effect of Pichia membranaefaciens in combination with salicylic acid on postharvest blue and green mold decay in citrus fruits, **Biological Control**, 74: 21-29.