



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

LARISSA MAGRON CARRION

ISOLAMENTO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE
E SUAS APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A
PARTIR DO LICOR NEGRO PROVENIENTE DO PROCESSO KRAFT
DE EXTRAÇÃO DA CELULOSE.

São José do Rio Preto,

Agosto/2011

LARISSA MAGRON CARRION

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.

Orientador: Prof.Dr. Roberto da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Daniela Alonso Bocchini Martins

São José do Rio Preto

Agosto/ 2011

LARISSA MAGRON CARRION

**ISOLAMENTO DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE PENTOSE E SUAS
APLICAÇÕES NA PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DO LICOR
NEGRO PROVENIENTE DO PROCESSO KRAFT DE EXTRAÇÃO DA
CELULOSE.**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, área de Ciência e Tecnologia de Alimentos junto ao programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *campus* de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr.Roberto da Silva

Prof. Titular

UNESP-São José do Rio Preto (Orientador)

Profa. Dra. Eleni Gomes

Professor Assistente Doutor

UNESP – São José do Rio Preto

Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini

Professor Associado Doutor

UFSCAR- Araras

São José do Rio Preto,

Agosto/2011

*Aos meus pais Paulo e Cleusa, meus irmãos Luís Augusto
e Levi Henrique e ao meu namorado Wesley por todo
carinho, apoio e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Roberto da Silva, pela oportunidade, amizade e dedicação na orientação deste trabalho.

Ao CNPQ pela concessão de bolsa de mestrado.

A Profa. Dra. Eleni Gomes pela amizade e incentivo.

A Profa.Dra. Daniele Alonso Bocchini Martins, por toda ajuda, paciência e amizade.

Aos Professores Célia Maria Landi Franco, Maurício Boscolo e Eduardo Alves pela gentil disponibilização de seus laboratórios e equipamentos.

As minhas amigas queridas Gabriela, Ariane, Rita e Isabete por terem dividido todos os momentos de alegria e tristeza.

Aos amigos Thiago Ohe, Gisele, Raquel, Janaína, Danilo, Thiago Okubo, Ricardo e Carolina Bezerra por toda ajuda neste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Andréia, Márcia, Tássia, Fabiana, Rodolfo, Ana Lúcia, Bárbara Garcia, Elaine, Guilherme, Tamires, Ariane, Barbara, Aline, André, Bárbara Bonine, Ariane Movio, Carolina Merheb, Cristiane, Ellen, Fernanda, Josiane, Isabel, Milla, Natália, Rafaela, Ruan, Sara, Ticiane, Pedro, Diego, Bruna, Priscila e Samara por todos os trabalhos e risadas compartilhados.

Aos meus amigos do GOU com quem aprendi muito.

E principalmente a Deus em quem confio, espero e amo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Materiais lignocelulósicos	14
3.2. Extração da celulose	15
3.3. Polpação Kraft e Branqueamento.....	15
3.3.1. Licor negro.....	17
3.4. Produção de xilitol e etanol.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1. Meios de cultivo.....	21
4.1.1. Meio nutriente para a coleta e isolamento das amostras.....	21
4.1.2. Meio nutriente para assimilação de açúcares e ensaios de fermentação.....	21
4.1.3. Licor Negro.....	21
4.2. Isolamento das leveduras.....	22
4.3. Identificação molecular das leveduras isoladas.....	22
4.4. Padronização do inóculo.....	23
4.5. Avaliação da capacidade de assimilação de xilose e glicose pelas leveduras isoladas.....	24
4.6. Teste para seleção de leveduras fermentadoras de etanol.....	24
4.7. Ensaios de fermentação alcoólica e produção de xilitol.....	24
4.8. Hidrólise do licor negro.....	25
4.9. Teste de fermentação do licor negro.....	25
4.10. Atividade de xilanase.....	25
4.11. Contagem de células.....	25
4.12. Determinação quantitativa de açúcares redutores.....	26
4.13. Quantificação de etanol.....	26
4.14. Quantificação de açúcares e xilitol.....	26
4.15. Quantificação de Furfural e 5-Hidroximetilfurfural.....	27

4.16. Análise estatística.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1. Isolamento e Seleção.....	28
5.2. Ensaio de fermentação.....	31
5.3. Fermentação do Licor Negro.....	37
6. CONCLUSÃO.....	43
7. REFERÊNCIAS.....	44
APÊNDICE.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Vias metabólicas para o catabolismo de xilose.....	20
FIGURA 2	Consumo de açúcar pelas leveduras selecionadas durante o cultivo em meio basal contendo 1% de xilose/glicose em 120 horas	30
FIGURA 3	Produção de etanol por três linhagens de <i>Candida tropicalis</i> em 120 horas de fermentação.....	31
FIGURA 4	Consumo de xilose e produção de xilitol por três linhagens de <i>Candida tropicalis</i> em fermentadores anaeróbios em 120 horas de fermentação.....	32
FIGURA 5	Perfil de crescimento celular de leveduras <i>Candida tropicalis</i> durante 120 horas de fermentação de xilose em fermentadores anaeróbios.....	35
FIGURA 6	Viabilidade das leveduras <i>Candida tropicalis</i> em 120 horas de fermentação, com xilose(100mg/mL) como única fonte de carbono.....	35
FIGURA 7	Produção de etanol por três linhagens de <i>Candida tropicalis</i> durante 120h de fermentação em meio contendo xilose como única fonte de carbono.....	36
FIGURA 8	Consumo de açúcares pela levedura <i>Candida tropicalis</i> linhagens E2 , S4 e FP em 120 horas de fermentação do licor negro.....	38
FIGURA 9	Produção de xilitol por leveduras <i>Candida tropicalis</i> a partir do licor negro da extração da celulose em 120h de fermentação	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Locais de isolamento.....	28
TABELA 2	Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante o experimento de fermentação alcoólica com concentração de xilose de 100g/L, temperatura de 28°C, agitação de 100 rpm e inoculo inicial de 4g/L.....	33
TABELA 3	Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante o experimento de fermentação alcoólica com concentração de xilose de 7g/L, temperatura 28°C, agitação 100rpm e inoculo inicial de 4g/L	40
TABELA 4	Comparação do rendimento de xilitol, fermentação em meio com xilose e e fermentação do licor negro.....	41
TABELA 5	Concentração de furfural e 5 hidroximetilfurfural no licor negro <i>in natura</i> , no hidrolisado e no hidrolisado tratado com carvão ativado	42

RESUMO

A efetiva produção de etanol lignocelulósico depende de leveduras capazes de fermentar a fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica que é composta em sua maioria por xilose. Há uma grande dificuldade em encontrar esses microrganismos já que a capacidade de utilizar xilose como fonte de carbono não é apresentada pela maioria das leveduras. Neste trabalho leveduras isoladas de diferentes materiais da zona rural, foram testadas quanto à assimilação de xilose e glicose, e fermentação de xilose a 30°C, onde observou-se diferentes comportamentos entre diferentes linhagens da mesma espécie. As linhagens de leveduras isoladas foram identificadas pela técnica molecular PCR-RFLP empregando-se as regiões ITS 5,8 S e D1/D2 do DNA ribossômico. Três leveduras identificadas como espécies de *Cândida tropicalis* foram avaliadas quanto a capacidade de produção de xilitol e etanol a partir de meio basal com xilose como única fonte de carbono e do licor negro da extração da celulose hidrolisado por enzimas do fungo *Thermoascus aurantiacus*. A produção de xilitol foi semelhante nos dois substratos, entretanto a produção de etanol foi maior quando o licor negro foi empregado, esses resultados mostraram que a quantidade e a natureza dos açúcares presentes nos meios foram um interferente maior no metabolismo da levedura que os compostos tóxicos presentes no licor negro.

Palavras-chave: levedura, fermentação, pentose, licor negro, etanol e xilitol.

ABSTRACT

The effective lignocellulosic ethanol production depends on yeasts that are able to ferment the hemicellulosic biomass fraction, which is mostly composed by xylose. There is a big difficulty in finding such microorganisms because most yeasts do not use xylose as a carbon source. In this work, yeasts isolated from different materials were tested for xylose and glucose assimilation and xylose fermentation at 30°C, where it was observed different behaviors between strains of the same species. The strains isolated were identified by PCR-RFLP molecular technique employing the ITS 5,8 and D1/D2 regions of ribosomal DNA. Three yeasts were identified as *Cândida tropicalis* species and their ability to produce xylitol and ethanol from xylose and the black liquor from the cellulose extraction hydrolyzed by enzymes of the fungus *Thermoascus aurantiacus* was evaluated. The xylitol production was similar in both media, but the ethanol production was higher when the black liquor was used, these results shows that the quantity and nature of the sugars present in the media have a bigger interference in the metabolism of yeast to toxic compounds present in black liquor.

Keywords: yeast, fermentation, pentose, black liquor, ethanol and xylitol

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento da preocupação com o meio ambiente e desenvolvimento sustentável, aponta para utilização de resíduos industriais como matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos, como uma alternativa interessante. O apelo da mídia para a utilização de processos sustentáveis, faz com que essa prática seja ainda mais empregada pelas indústrias. É crescente o número de empresas que investem em programas ambientais, porque estão descobrindo que poluir significa desperdiçar, não ter eficiência e perder competitividade (NOSSA, 2002).

O processo de produção de papel tem sido visto como agressivo e poluidor ao meio ambiente, por isso o reaproveitamento de seus resíduos seria uma alternativa para se inserir sustentabilidade à esse processo. Isto pode ser feito transformando uma indústria química de extração de celulose em uma Biorefinaria integrada com a floresta (*Integrated Forest Biorefinery*), ou seja, que fabrique produtos de alto valor agregado com os resíduos da polpação (HEININGEN, 2005).

O processo de polpação Kraft, realizado com NaOH e Na₂S remove aproximadamente 90% da lignina presente na madeira, e produz um efluente de alta carga orgânica denominado “licor negro”. Este efluente é alcalino e apresenta alta concentração de espécies fenólicas (PERALTA-ZAMORA et al., 1997). Este material também possui polímeros dispersos no meio, tais como as xilanas (LISBOA et al., 2005).

A hidrólise deste composto com xilanases permite que haja a liberação de açúcares fermentescíveis, em sua grande maioria, de pentoses como a xilose. Entretanto a levedura *Saccharomyces cerevisiae* que é o microrganismo fermentador mais eficiente na fermentação de glicose não se mostra eficiente para a fermentação de açúcares de cinco carbonos (MEINANDER; BOELS; HAHN HAGERDAL, 1999).

A descoberta de microrganismos capazes de fermentar esses açúcares e que ainda sejam resistentes aos compostos tóxicos presentes no licor negro seria uma alternativa relevante da utilização deste resíduo em sistemas produtivos.

A fermentação de pentoses pelas leveduras em sua maioria resulta na produção de xilitol que posteriormente pode levar ao etanol. Por um desequilíbrio enzimático algumas leveduras passam a produzir somente xilitol (JACKSON & NICOLSON, 2002).

Dentre as leveduras fermentadoras de xilose, a espécie *Candida tropicalis* vem sendo muito estudada por sua capacidade de produzir xilitol e etanol e também por ser capaz de resistir à compostos tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético (HUANG et al, 2011).

Conhecendo a necessidade de reaproveitamento dos resíduos na indústria de papel e celulose e reduzido número de pesquisas para a utilização do licor negro, esta pesquisa visou a seleção de leveduras fermentadoras de pentoses e resistentes ao licor negro. Assim neste trabalho será apresentado os resultados da utilização da levedura *Candida tropicalis* no processo de produção de xilitol e etanol a partir do licor negro.

2. OBJETIVOS

- Isolar leveduras da natureza com capacidade de fermentar xilose,
- Avaliar sua capacidade de produção de etanol e xilitol a partir do licor negro proveniente da extração da celulose.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais lignocelulósicos

A madeira é melhor definida como um aglomerado biopolimérico tridimensional, interconectado, composto por lignina, celulose e hemicelulose. O composto químico mais abundante em árvores é a água, mas se falando em peso seco, todas as paredes celulares de madeira consistem principalmente de polímeros de açúcar (carboidratos, 65-75%) que é combinado com lignina (18-35%) (ROWELL et al., 2005).

A quantidade de cada polímero varia de acordo com a espécie, a época de colheita do vegetal e, ainda, entre as diferentes partes do mesmo vegetal (GLAZER & NIKAIDO, 1995).

As espécies de coníferas em geral têm um maior conteúdo de celulose (40-45%), mais lignina (26-34%), e menos hemicelulose (7-14%), comparado a espécies de madeiras duras (celulose 38-49%, lignina 23-30% e hemicelulose 19-26%).

A celulose é um polímero constituído apenas de glicose (D'ARCE, BOIN; MATTOS, 1985), e a hemicelulose é um polímero heterogêneo composto por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glucose, D-manose e D-galactose) e/ou ácido urônico. Outros açúcares como alpha-L-raminose e alpha-L-fucose também podem estar presentes em pequenas quantidades e os grupos hidroxil dos açúcares podem ser parcialmente substituídos com grupos acetil (GÍRIO et al., 2010).

Resíduos agrícolas e agro-industriais são originados do cultivo e do processamento de produtos agrícolas. Tais resíduos representam fontes naturais, abundantes, baratas e prontamente disponíveis de material lignocelulósico, podendo ser utilizados para obtenção de vários produtos de interesse (BOCCHINI, 2004).

A aplicação de resíduos agro-industriais em bioprocessos além de prover substratos alternativos, ajuda na solução de problemas, como a poluição que o descarte desses resíduos pode causar. Com as inovações biotecnológicas em expansão, principalmente na

área de tecnologia de enzimas e fermentações, novos caminhos são frequentemente propostos para a utilização destes resíduos (PANDEY et al.,2000).

O melhor aproveitamento dos constituintes da madeira tem sido foco de muitos estudos, e um dos constituintes mais visados atualmente são as hemiceluloses. Sendo carboidratos de menor peso molecular e estabilidade química que à celulose, as hemiceluloses são solubilizadas em grande extensão durante a polpação Kraft.(LONGUE-JÚNIOR,2007)

3.2. Extração da celulose

O Brasil é o quarto maior produtor de celulose do mundo produzindo 14 milhões de toneladas de celulose por ano. O crescimento médio anual é de 7,4%, o que faz da celulose o terceiro produto mais exportado do Brasil, ficando atrás somente da soja e dos derivados de cana de açúcar. Este mercado rendeu em 2010 US\$ 6,8 bilhões e produziu cerca de 690 mil empregos diretos e indiretos em todo o país (BRACELPA,2011).

Hoje o Brasil é um expoente mundial na produção sustentável de papel e celulose, e para manter essa hegemonia, investimentos tem sido feitos em pesquisa, de modo a obter produtos de excelente qualidade, e de baixos custos e impacto ambiental. (LONGUE-JÚNIOR,2007)

3.3. Polpação Kraft e Branqueamento

A madeira é composta basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. Para transformar madeira em papel a celulose deve ser separada dos outros compostos, e para que isto aconteça, a madeira precisa passar por dois processos, polpação (extração da polpa da madeira) e branqueamento (DURAN et al,1995). A indústria mundial de papel e celulose na sua grande maioria utiliza-se do processo químico de polpação. A polpação química consiste em transformar a madeira em polpa empregando o cozimento em meio alcalino e elevadas temperaturas em digestores, eliminando a maior parte da lignina

presente e baixando o número kappa (k) do material. O número kappa está correlacionado com o teor de lignina da polpa, sendo empregado como uma medida indireta do teor desta na polpa (SILVA & GOMES,2004). Em geral deseja-se a redução do número kappa visando diminuir a quantidade de lignina a ser enviada para o estágio de branqueamento com reagentes clorados, prejudiciais ao meio ambiente (DURAN et al,1995).

O processo químico mais utilizado é a polpação Kraft para a extração de celulose, uma vez que dá excelente polpa a partir de uma grande variedade de madeiras (BUCHERT et al,1995). Este processo se inicia na extração da madeira, essa é descascada e cortada em toretes, quando chega à indústria esta é cortada em partes menores denominadas cavacos. Esses cavacos passam por cozimento em pressão e temperaturas elevadas (170°C) na presença de solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfato de sódio por aproximadamente duas horas, chamada de licor de cozimento ou de polpação (MORRIS,1997). Nesta etapa cerca de 95% da lignina é extraída e sob essas condições os polímeros de lignina são fragmentados em grupos fenólicos e se dissolvem no licor de polpação através da clivagem das ligações éter que mantém ligados os monômeros de lignina (DURAN,1995).

A etapa seguinte é o branqueamento, que tem como objetivo a eliminação seletiva da lignina preservando ao máximo as fibras de celulose. A intensidade da coloração da polpa é função da quantidade e do estado químico da lignina remanescente (SUBRAMANIYAN & PREMA, 2002). Para ser obtida polpa branca, adequada para a manufatura de papel de boa qualidade, é necessário clarear a polpa, ou seja, remover os constituintes de lignina e seus derivados (DURAN et al,1995).Existem muitas tecnologias de branqueamento empregando diferentes agentes químicos de deslignificação. Os principais agentes para esta finalidade são o peróxido de oxigênio, ozônio e cloro. A maioria das indústrias de papel usa uma sucessão de etapas de branqueamento baseadas no cloro,seguidas de extração através de soluções alcalinas. O cloro provê branqueamento excelente da polpa, porém resulta na formação de compostos organoclorados diversos,

dioxinas e furanos e que acabam sendo lançados nos efluentes da indústria (SILVA & GOMES, 2004).

3.3.1. Licor negro

O licor negro pode ser considerado como uma suspensão aquosa complexa, contendo materiais orgânicos provenientes de madeira ou plantas fibrosas (CARDOSO; OLIVEIRA; PASSOS, 2009).

No processo de polpação Kraft, polissacarídeos da madeira tais como celulose, hemicelulose e pectinas são parcialmente degradados em derivados de baixo peso molecular ou dissolvidos no licor negro, mantendo parcialmente sua natureza polimérica (GENCO et al, 1990). A concentração e composição dos polissacarídeos dissolvidos no licor negro é altamente dependente da natureza da madeira e das condições da polpa. (SIMONSON,1963).

Cardoso (2009), verificou a composição polissacarídica do licor negro proveniente da polpação Kraft de diferentes tipos de madeiras e observou que a quantidade de lignina presente no licor negro de eucalipto das indústrias brasileiras é maior e com menor massa molar que as provenientes do licor negro de pinhos das indústrias do Hemisfério Norte.

Durante a polpação Kraft, os polissacarídeos são degradados e ficam dissolvidos no licor negro, numa proporção de cerca de 18% do peso inicial da madeira. As xilanas degradadas e/ou dissolvidas representam 5,6% do peso da madeira e são precipitadas cerca de 40-50% no licor negro. Essas xilanas têm peso molecular em torno de 17-19kDa, um valor cerca de 30% menor que as remanescentes na polpa (LISBOA et al, 2005).

O licor negro contém entre 30 e 34% de lignina. Nos processos convencionais, esse licor é queimado e produz energia para a operação das indústrias. Hoje esse meio destrutivo de se tratar essa grande quantidade do licor negro gerado não é considerado mais uma solução satisfatória (HEININGEN,2005).

Para superar as desvantagens associadas ao tratamento convencional do licor negro, alternativas estão sendo pesquisadas. Uma solução é que a partir do licor negro se obtenha produtos de alto valor agregado, como a vanilina ou ácido vanílico, agentes dispersantes, taninos sintéticos, carvão ativado etc (SILVA et al, 2009).

A hemicelulose também se faz presente no licor negro. Por ter estrutura frágil em relação a celulose, grande parte dela se perde no processo de polpação Kraft, mas ainda assim, a sua presença na forma de xilanas se mostra significativa (LISBOA et al,2005).No entanto, não são relatados na literatura, o aproveitamento desses açúcares no licor negro.

3.4. Produção de xilitol e etanol

Para que os polímeros presentes no licor negro possam ser utilizados como matéria-prima por microrganismos capazes de transformá-los em novos produtos, é necessária a hidrólise desses carboidratos, até seus monômeros constituintes.

Vários processos de pré-tratamento já foram estudados para favorecer a hidrólise na biomassa lignocelulósica, como explosão a vapor (LASER et al., 2002), o emprego de ácidos como ácido sulfúrico (AGUILAR et al.,2002), ácido clorídrico (SPRINGER,1966), ácido nítrico (RODRÍGUEZ-CHONG et al.,2004) ácido fluorídrico, ácido fosfórico (MARTÍNEZ et al.,2002) ou hidrólise alcalina com NaOH ou amônia (KURAKAKE, KISAKA, KOMAKI, 2001).

No entanto, a hidrólise ácida favorece o surgimento de compostos tóxicos no meio. Alguns componentes tóxicos são provenientes da degradação de açúcares como o furfural e o 5-hidroximetilfurfural. Esses compostos são formados a partir da desidratação de pentoses como a xilose (furfural) e de hexoses como a glicose (hidroximetilfurfural) (LEVANON,2003).

Os furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) são compostos que afetam os microrganismos, pois reduzem suas atividades enzimáticas e biológicas, quebram o DNA e

inibem a síntese de RNA e proteínas (SANCHEZ & BAUTISTA, 1988; MODING et al.,2002).

O processo de hidrólise mais promissor para transformar polissacarídeos é o emprego de enzimas (GÍRIO et al.,2010), por ser um alternativa limpa e sustentável, devido a sua eficiência de conversão, à ausência da perda do substrato devido a modificações químicas e ao uso de procedimento mais moderados tais como baixas temperaturas de reação, pH neutro e uso de reagentes biodegradáveis e não tóxicos (BON; FERRARA, 2007).

Um outro fator muito importante no aproveitamento das hemiceluloses é o microrganismo fermentador. A levedura normalmente utilizada na produção de etanol a partir de hexoses (glicose e frutose), a *Saccharomyces cerevisiae*, não tem capacidade de metabolizar pentoses como xilose e arabinose, que são açúcares de presença significativa no licor negro hidrolisado. Microrganismos capazes de fermentar pentoses são mais restritos em relação aos fermentadores de hexoses. Os microrganismos selvagens mais utilizados são algumas espécies de leveduras do gênero *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*, de bactérias como *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteroides*, *Thermoanaerobacter* e *Erwinia* (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2005). Microrganismos modificados geneticamente como *Saccharomyces cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL et al.,2001), *Klebsiella oxytoca* (ZHOU,2001;WOOD,1992) e *Escherichia coli* (OHTA et al., 1991), *Zymomonas mobilis* (MOHAGHEGHI et al.,2004), são também relatados.

O metabolismo de xilose em microrganismos (Fig.1), pode seguir duas vias: A primeira ocorre em bactérias e alguns eucariotos, onde a enzima xilose isomerase catalisa a conversão de xilose em xilulose que é facilmente convertida para xilulose-5-fosfato e na via das pentoses (PPP) é convertida em frutose-6-fosfato, que então entra na via glicolítica. A segunda via ocorre em algumas leveduras e fungos que não possuem xilose isomerase e inclui as etapas de conversão de xilose a xilitol pela xilose redutase e para xilulose pela

xilitol desidrogenase e este segue a mesma via a dos demais microrganismos (JACKSON & NICOLSON, 2002).

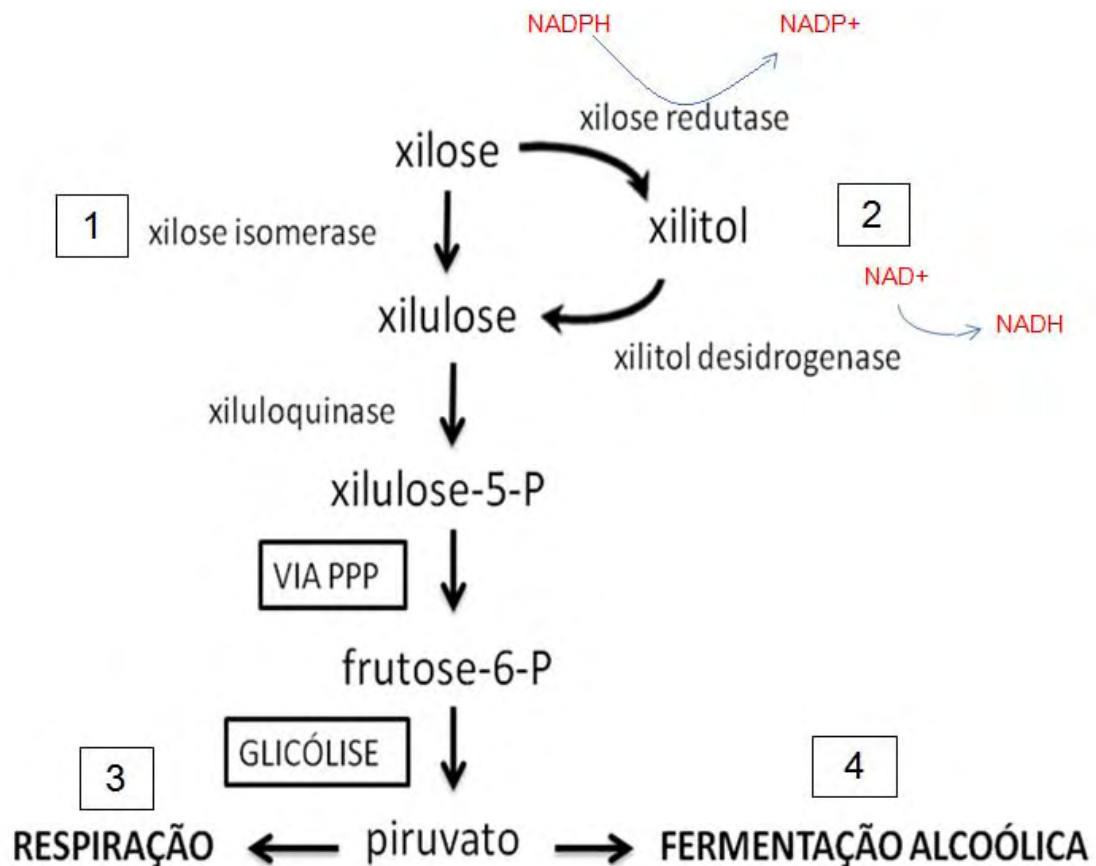


Figura 1. Vias metabólicas para o catabolismo de xilose: (1) etapas seguidas pela maioria das bactérias (2) etapas seguidas por alguns fungos e leveduras, (3) oxidação que pode acontecer em todos os organismos e (4) fermentação a etanol. Fonte: JACKSON & NICOLSON (2002).

O xilitol é um álcool-açúcar de cinco carbonos que pode ser encontrado na natureza em pequenas quantidades. Ele tem atraído a atenção por ter um poder adoçante como o da sacarose, porém é muito menos calórico, tem propriedades anticariogênicas, também é conhecido por não passar pelo ciclo da insulina no corpo humano podendo ser assim um açúcar para diabéticos (HUANG et al,2011).

Entre os desafios atuais de tornar o etanol ou o xilitol proveniente de resíduos de hemiceluloses viáveis estão: melhorar os processos de pré-tratamentos, tornando-os mais acessíveis, aperfeiçoar o processo de hidrólise enzimática, reduzir os custos na obtenção

de enzimas lignocelulolíticas e encontrar cepas de leveduras capazes de fermentar pentoses.

Devido às várias dificuldades ainda encontradas na fermentação alcoólica de xiloses, este trabalho buscou contribuir nesta área.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Meios de cultivo

4.1.1. Meio nutriente para a coleta e isolamento das amostras

O meio utilizado para coleta das amostras foi o YEPX composto por xilose (2%), peptona(2%) e extrato de levedura (1,5%), com antifúngico propionato de sódio (0,025%) e antibióticos ampicilina e cloranfenicol (0,025%).

4.1.2. Meio nutriente para assimilação de açúcares e ensaios de fermentação

As cepas isoladas foram avaliadas quanto à capacidade de assimilação de xilose, sendo cultivadas em meio nutriente basal composto por KH_2PO_4 (2,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), uréia (0,3 g/L), CaCl_2 (0,3 g/L), solução de sais (1,0 g/L) e xilose ou glicose (10,0 g/L) como única fonte de carbono. A avaliação da produção de etanol pelas leveduras selecionadas foi feita pelo cultivo das mesmas no mesmo meio nutriente basal contendo xilose (60,0 g/L) como única fonte de carbono.

4.1.3. Licor Negro

O licor negro hidrolisado pelo complexo enzimático produzido pelo fungo *Termoascus aurantiacus*, tem em sua composição: xilose (7 mg/mL), arabinose (1

mg/mL), galactose (2,3 mg/mL) e glicose (2,2 mg/mL). Foi utilizado para a fermentação sem a adição de nenhum outro nutriente.

4.2. Isolamento das leveduras

As linhagens foram isoladas no Bosque Municipal e na zona rural da cidade de Marília-São Paulo. Foram coletadas amostras de troncos de árvores em decomposição, folhas, solo, silagem, fezes bovinas e ovinas, flores e frutos. Cerca de 0,5g do material foi suspenso em 2 mL do meio YEPX líquido e levado ao laboratório, onde foram incubadas a 30°C por 48h. Depois disto alíquotas de 200 µL foram inoculadas superficialmente em placa com YEPX-ágar e incubados por 24 h. Alternativamente, amostras de insetos foram colocados sobre superfície da placas contendo YEPX-ágar para que caminhassem liberando microrganismos presentes na sua pata e ventre (SUH et al., 2005; NGUYEN,2006). Estes microrganismos foram isolados e testados conforme o protocolo anterior.

4.3. Identificação molecular das leveduras isoladas

As linhagens de leveduras foram identificadas em nível de espécie através da técnica de PCR-RFLP (Polimorfismos de Comprimento de Fragmentos de Restrição), usando a região ITS incluindo o gene 5,8S e D1/D2 do DNA ribossômico, como marcador molecular. Para tanto foi feito um pré-inóculo para cada amostra em meio YPD líquido. Após 24 horas, este pré-inóculo foi centrifugado e o pellet usado para a extração de DNA. O DNA foi extraído pelo método de extração com fenol, descrito por Fernandez et al. (2000). A reação de PCR foi conduzida empregando-se 0,5M dos *primers* ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') que amplificam as zonas variáveis e intergênicas (ITS1 e ITS2) incluindo o gene 5,8S do DNAr, 0,2 µM de deoxinucleotídeo, 1,5 mM de MgCl₂, 1,5 unidades de *Taq polimerase*, 10 mM de tampão Tris-HCl, 50mM de KCl e 10 ng de DNA (White et al., 1990). As reações de amplificação foram conduzidas em um termociclador sob as seguintes condições:

desnaturação prévia a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 30 minutos; e uma extensão final a 72°C por 5 minutos (Fernandez et al., 2003). Os produtos amplificados foram separados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo. Para identificação em nível de espécie, os produtos amplificados (10µL) foram tratados com enzimas de restrição (*Hinfl*, *CfoI*, *HaeIII*), de acordo com as instruções do fabricante usando 10 U/µL. Os fragmentos de restrição foram analisados por eletroforese em gel de agarose 3% contendo brometo de etídeo. A identificação das espécies de leveduras foi feita através do Programa Quidy versão 2004. O tamanho do fragmento amplificado e o tamanho e o número de fragmentos de restrição permitiram uma correta identificação das leveduras em nível de espécie (Fernandez et al., 2003). As espécies foram depositadas no Gene Bank.

4.4. Padronização do inóculo

Para a padronização do inóculo, as cepas isoladas foram inoculadas (1 alçada) em 20 mL do meio nutriente descrito no item 4.1.2, em frascos Erlenmeyer de 125 mL e cultivadas a 28 °C por 24 horas a 150 rpm. Com o meio fermentado foram feitas várias diluições e medidos os valores de absorbância em espectrofotômetro, cada diluição foi colocada em eppendorf de 1mL essas foram centrifugadas à 10.000g por 15 minutos, depois descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado com água destilada e novamente centrifugado, descartou-se o sobrenadante novamente e o precipitado foi colocado na estufa por 24 h a 60°C depois foram pesados para determinação do peso seco. Foi construído um gráfico Abs a 600 nm x peso seco (mg/mL) e a equação de regressão foi obtida. Esta equação foi utilizada para a determinação do peso seco nos experimentos posteriores, a partir da medida da absorbância a 600 nm. Os inóculos foram padronizados em 1mg/mL para os testes de assimilação e 4 mg/mL para os testes de fermentação.

4.5. Avaliação da capacidade de assimilação de xilose e glicose pelas leveduras isoladas

As cepas isoladas foram pré-inoculadas no meio nutriente basal 4.1.2, por 24 horas e posteriormente inoculadas (1mg/mL) no mesmo meio para o teste de assimilação. O cultivo foi feito a 28 °C, por 120 horas, sob agitação de 150 rpm e amostras foram tomadas a cada 24 horas para a avaliação do crescimento celular e do consumo de açúcar.

4.6. Teste para seleção de leveduras fermentadoras de etanol

As linhagens que melhor assimilaram xilose foram testadas quanto à capacidade de produção de etanol, sendo cultivadas, por fermentação submersa, em meio definido contendo xilose (60,0 g/L) como única fonte de carbono e o inóculo padronizado para 4mg/mL. O processo fermentativo foi realizado utilizando-se tubos de vidro (20mL) devidamente lacrados e com uma agulha introduzida na tampa para saída de CO₂, em semi-aerobiose, a 28°C, agitação de 100 rpm e com 6 mL de meio fermentativo. Amostras foram retiradas a cada 24 horas, por 5 dias, para quantificação da biomassa, avaliação do consumo de açúcar e da produção de etanol.

4.7. Ensaios de fermentação alcoólica e produção de xilitol

As linhagens que melhor produziram etanol foram utilizadas para testes em fermentadores semi- aeróbios para avaliação de produção de xilitol e etanol. O teste foi realizado de forma idêntica ao descrito no tópico 4.6., exceto a quantidade de xilose utilizada que foi de 100g/L e os testes foram feitos em Erlenmeyers de 125 mL fechados com válvula própria para fermentação, à válvula continha solução de metabissulfito de sódio à 1mg/mL para permitir saída de CO₂ e evitar entrada de O₂, em cada erlenmeyer utilizou-se 50mL de meio.

4.8. Hidrólise do licor negro

A hidrólise foi realizada em banho-maria sob agitação de 100 rpm a 60°C em pH 5 por 12 horas (overnight), com extrato enzimático do fungo *Thermoascus aurantiacus*, contendo 50U/mL de atividade de xilanase. Antes da hidrólise o pH foi ajustado para 5,0 com ácido sulfúrico.

4.9. Teste de fermentação do licor negro

O teste foi realizado por fermentação submersa do material proveniente da hidrólise do licor negro a 28°C e agitação de 100 rpm. As amostras foram retiradas a cada 24 horas para quantificação da biomassa, avaliação do consumo de açúcar, da produção de etanol e xilitol.

4.10. Atividade de xilanase

A atividade de xilanase foi determinada com 0,1mL de extrato enzimático convenientemente diluído, 0,9mL de xilana 1% (Xylan Birchwood, Sigma) em tampão ácido acético/NaOH 0,1M pH 5,0 por 10 minutos em banho termostático a 60°C. A reação foi interrompida após 10 minutos pela adição de 1 mL de reagente ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico). O volume resultante foi colocado em banho de ebulição durante 10 minutos e em seguida foi acrescido de 8 mL de água destilada, e finalmente a quantidade de xilose liberada foi medida por espectrofotometria a 540nm (MILLER,1959). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1µmol de açúcar redutor por minuto de reação, de acordo com a quantificação pela curva padrão do açúcar redutor correspondente.

4.11. Contagem de células

A contagem de células totais foi feita através do microscópio óptico em Câmara de Neubauer com corante eritrosina e expressa em nº de células/mL, onde as amostras foram retiradas a cada 24h. O cálculo para obtenção do número de células por mL foi realizado

pela equação: Número de células viáveis/mL = Número médio de células em 5 quadrados x 25×10^4 x F, onde F = fator de diluição.

4.12. Determinação quantitativa de açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores foi feita pelo método ADNS, como proposto por Miller (1959). Os valores de absorbância foram convertidos em mg de açúcar redutor/mL pelas curvas padrão de xilose ou glicose.

4.13. Quantificação de etanol

A quantificação do etanol produzido foi realizada por cromatografia em fase gasosa com injeção com seringa de micro extração de fase sólida, e injetados no cromatógrafo.

O cromatógrafo gasoso (HP 5890) foi equipado com um detector de ionização de chama, um injetor split/splitless e com uma coluna capilar FFAP (polietileno glicol) de 30 metros de comprimento, 0,22 mm de diâmetro e 0,3 de espessura de filme. A injeção foi no modo split (1:20) com fluxo de gás de arraste de 1mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram de 250°C.

4.14. Quantificação de açúcares e xilitol

A quantificação de açúcares e xilitol dos meios fermentativos foi realizada por Cromatografia de Troca Iônica de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD). Todas as amostras foram filtradas (membrana de 0,22 µm) e injetadas (20µL) no Sistema HPAEC-PAD (ICS, Dionex Corporation, EUA) equipada com o amostrador automático AS40. A forma de onda padrão empregada foi a “standard quadruple” com os seguintes potenciais de pulso e durações: E1= 0,10V (t1= 0,40s); E2 = -2,00V (t2= 0,02s); E3=0,60V (t3=0,01s); E4= -0,10V (t4= 0,06 s). Foi feita uma corrida isocrática com 10mM de NaOH, com fluxo de 1mL/min e temperatura de 35°C, os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 MΩ.cm) e degaseificados com N2.

Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex Corporation EUA. As análises foi realizada em duplicata.

4.15. Quantificação de Furfural e 5-Hidroximetilfurfural

O furfural e o 5- hidroximetilfufural (5-HMF) foram quantificados por HPLC Dionex, bomba ESA584 e um detector UV-ESA526. Os cromatogramas foram construídos utilizando o software EZ Chrom Elite (Agilent Technologies). As amostras foram previamente filtradas em membrana Millipore 0,22µm e submetidos a um método proposto por Dogaris et al. (2009) modificado, usando uma coluna Perkin Elmer C18 fase reversa (Coluna ACE 5 C18 – 250mm x 4,6mm x 5µm) e o detector ajustado a 280nm. O volume de injeção foi de 20µL e a temperatura da coluna ajustada a 40°C. O fluxo foi de 0,8mL/minuto e a fase móvel com o solvente A (água deionizada) e B (metanol Dinâmica 99,8%). A eluição foi por gradiente de 100% de A até 60% e 40% de B em 4 minutos. A quantificação foi feita por padronização externa com padrões de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

4.16. Análise estatística

Os experimentos foram realizados em duplicata. Os dados amostrais de crescimento e consumo de açúcar do início ao fim do ciclo fermentativo 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 e Seleção

As leveduras foram isoladas em locais como bosques, chácaras e sítios na cidade de Marília–SP. Foram feitas três coletas com espaço de dois meses entre elas, com aproximadamente 20 tubos de meio YEPX por coleta. As linhagens isoladas capazes de crescer em YEPX-ágar, locais de isolamento e espécie das leveduras estão listados na Tabela 1:

Tabela 1. Linhagens isoladas, locais de isolamento e espécie das leveduras.

Linhagens	Local de isolamento	Espécie
S1,S2,S3 e S4	Silagem	<i>Candida tropicalis</i>
T	Tronco em decomposição	<i>Candida tropicalis</i>
E2	Fezes bovina	<i>Candida tropicalis</i>
FP	Flor de pitanga	<i>Candida tropicalis</i>
C1 e C2	Casca de carambola	-
CO1 e CO2	Larva de fezes bovina	<i>Yarrowia lipolítica</i>
B1 e B2	Besouro de cama de frango	<i>Pichia guilliermondi</i>

As leveduras S1, S2, S3 e S4, T, E 2, FP e C 1 e 2, apresentaram crescimento satisfatório no pré-inóculo, e então, avaliadas quanto à assimilação de xilose (Figura 2a) e glicose (Figura 2b). S1 apresentou o mesmo consumo de xilose e glicose, exaurindo 99% dos dois açúcares em 48 horas, S2 consumiu 23% menos glicose do que xilose, já S3, S4 e FP se mostraram cerca de 50% mais eficientes na assimilação de xilose em relação a glicose, consumindo em 72 horas 99% da xilose, C1 também consumiu 99% da xilose até o terceiro dia de fermentação, e foi 34% mais eficiente em meio com xilose. A levedura isolada de tronco (T) também consumiu duas vezes mais xilose que glicose, no entanto em 120 horas chegou ao consumo de 67% da xilose do meio e E2 consumiu 19% mais glicose

do que xilose e em 120 horas não foi capaz de consumir todo o açúcar do meio, assimilando apenas 79% da xilose. A levedura C2 não se mostrou eficiente em meio contendo apenas xilose como fonte de carbono, pois em 120 horas não foi capaz de metabolizar nem 50% da xilose presente no meio. (Figura 2a).

Estes dados foram interessantes porque mostraram que há diferenças fisiológicas mesmo em linhagens de leveduras da mesma espécie já que apresentaram diferentes consumos de açúcares. As linhagens FP,S2,S3,S4 e T possivelmente são mais adaptadas ao consumo de xilose, E2 ainda metaboliza mais facilmente a glicose e S1 é capaz de assimilar rapidamente pentoses e hexoses, e todas foram identificadas como *Cândida tropicalis*.

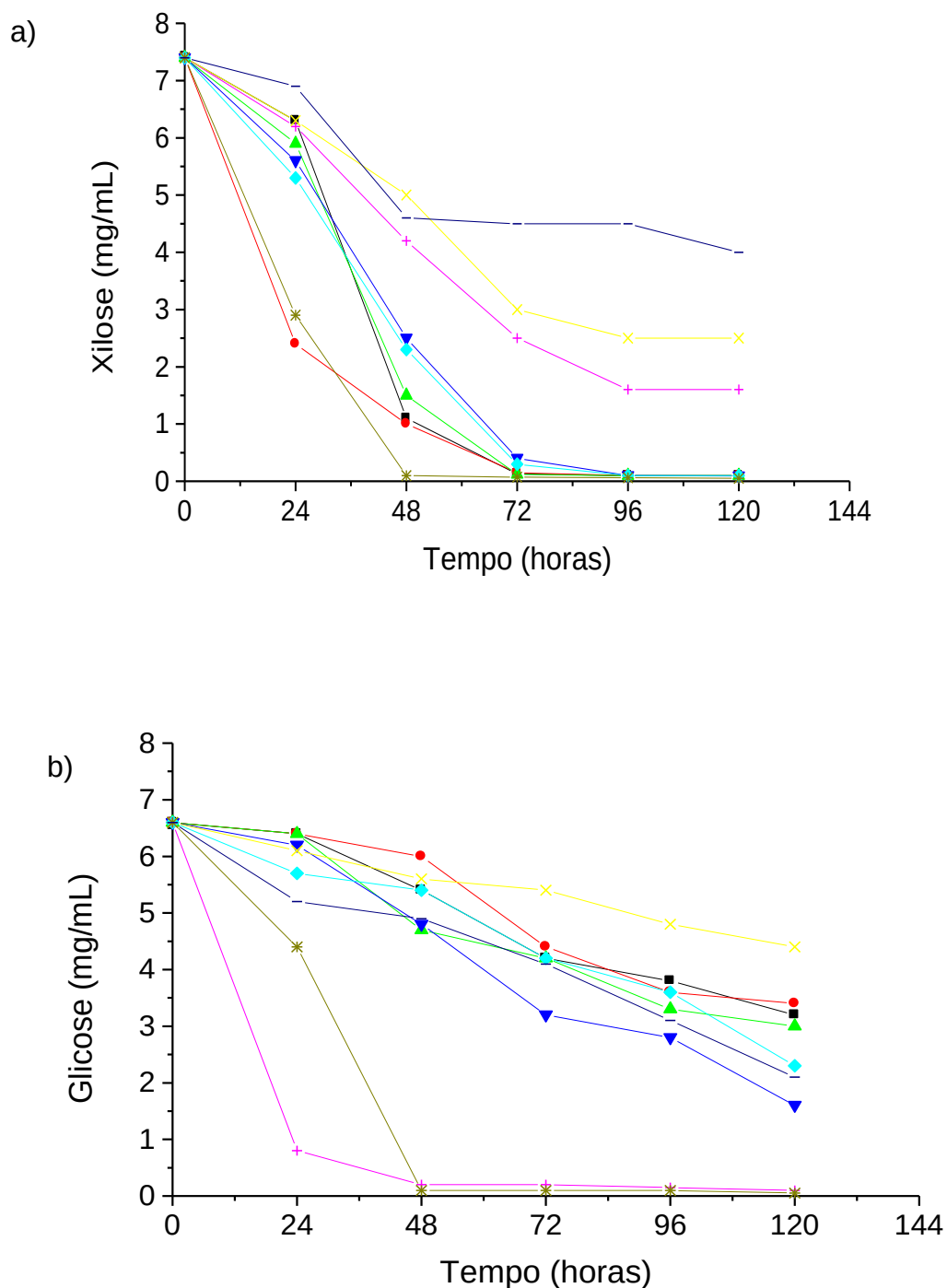


Figura 2a . Consumo de açúcar pelas leveduras selecionadas durante o cultivo em meio basal contendo 1% de xilose em 120 horas. Figura 2b Consumo de açúcar pelas leveduras selecionadas durante o cultivo em meio basal contendo 1% de glicose em 120 horas. —■— FP, —●— S4, —▲— S3, —▼— S2, —◆— C1, —+— E2, —×— T, —*— S1.

Das leveduras testadas quanto à assimilação, oito foram testadas quanto a capacidade fermentativa (S1, S2 , S3, S4 , C1, FP, E2 e T) em tubos de vidro (20mL), pois foram capazes de consumir mais de 50% da xilose presente no meio. Destas oito, somente

três produziram etanol (S4, FP e E2), com a produção média de 5,1 g/L, o que corresponde a cerca de 0,65% de etanol, ao final das 120 h (Figura 3).

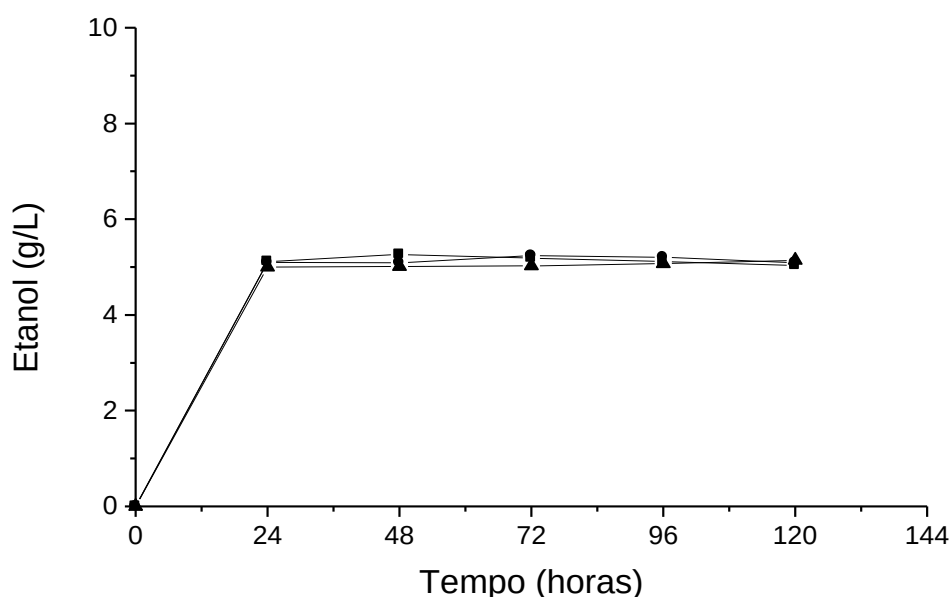


Figura 3. Produção de etanol por três linhagens de *Cândida tropicalis* em 120 horas de fermentação contendo 6% de xilose. —■— E2, —◆— S4, —▲— FP.

Estes resultados são maiores que os 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 (1983), que apresentou uma *Candida sp.* com produção média de 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)

5.2. Ensaio de fermentação

Depois de serem testadas em tubos de penicilina, as leveduras que foram testadas em fermentadores anaeróbios para avaliação da produção de etanol e xilitol. Foram estabelecidos parâmetros iguais àqueles utilizados anteriormente.

Todas as leveduras apresentaram consumo de xilose semelhante ao final das 120 horas de fermentação consumindo 99% da xilose presente no meio, mas E2 apresentou a

taxa de consumo mais rápida, exaurindo 99% do açúcar em 48h como pode ser observado na Figura 4. Ela também apresentou a maior produção de xilitol cerca de 23mg/mL em 120 horas de fermentação. No entanto, FP teve a produção de xilitol mais rápida, chegando a 16mg/mL em 72 horas (Figura 5). Os ciclos fermentativos submetidos ao teste de variância ANOVA mostraram que a diferença no consumo de açúcar entre as linhagens não foi significativa ($p= 0,2113$). A produção de xilitol também se mostrou semelhante entre as leveduras, no entanto, FP teve a maior produção em menor tempo de fermentação e o fato de ser mais rápida, pode ser determinante para sua escolha no processo de produção de xilitol. A queda na produção de xilitol observada em FP em 120h é provavelmente pelo fato que o xilitol é um precursor na via de produção do etanol a partir de pentoses, e ele pode ter sido consumido pela levedura para a produção de etanol.

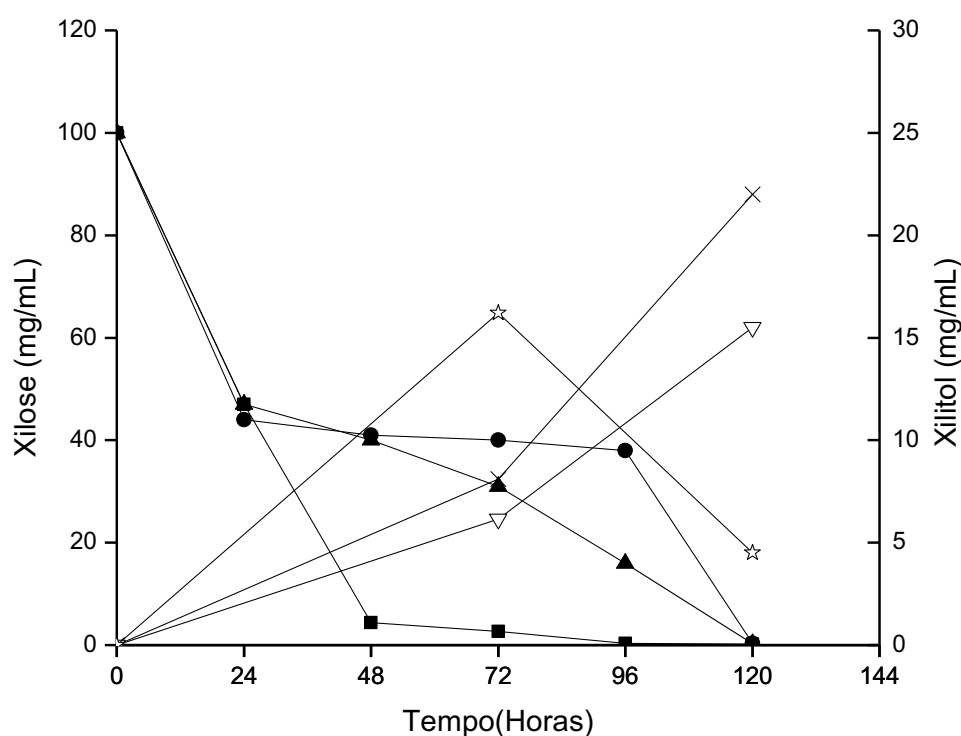


Figura 4. Consumo de xilose e produção de xilitol por três linhagens de *Cândida tropicalis* em fermentadores anaeróbios em 120 horas de fermentação. —■— E2 (xilose) —●— S4 (xilose) —▲— FP (xilose), —×— E2 (xilitol), —▽— S4(xilitol), —☆—,FP (xilitol)

Tabela 2. Consumo de xilose, produção de etanol e rendimento de etanol por xilose consumida durante o experimento de fermentação alcoólica com concentração de xilose de 100g/L, temperatura de 28°C, agitação de 100 rpm e inóculo inicial de 4g/L.

Linhagens	Tempo de amostragem (h)	Xilose consumida (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Rendimento xilitol g xilitol/g xilose consumida	Rendimento etanol (g de etanol/g xilose consumida)	Viabilidade celular (%)
<i>Cândida tropicalis</i> E2	24	53	3			0,0566	79
	48	95	2,5			0,02632	89
	72	97	2,5	8,1	0,08351	0,02577	88
	96	99	1,7			0,01717	83
	120	99	1,7	22	0,22222	0,01717	72
<i>Cândida tropicalis</i> S4	24	56	6,9			0,12321	89
	48	59	5,4			0,09153	85
	72	60	4	6,15	0,1025	0,06667	89
	96	61	2,8			0,0459	85
	120	99	1,6	15,5	0,15657	0,01616	77
<i>Cândida tropicalis</i> FP	24	57	2,5			0,04386	83
	48	60	3			0,05	79
	72	69	4	16	0,23188	0,05797	71
	96	84	4,6			0,05476	85
	120	99	3,1	4,5	0,04545	0,03131	70

Agbogbo et al (2007), mostrou em seu trabalho um rendimento de xilitol de 0,077g/g quando utilizava concentração celular de 4g/L de uma linhagem de *Pichia stiptis* em 192 horas de fermentação. Lightelm et al (1988) também utilizou uma linhagem de *Pichia stiptis* com oxigenação controlada obtendo um rendimento de 0,06g/g de xilitol e utilizando a mesma linhagem em meio anaeróbio, não teve produção de xilitol. Também Lightelm et al (1988), utilizando uma levedura *Candida shehatae* em meio aeróbio teve o rendimento de 0,4g/g, com oxigenação limitada 0,13, e em meio anaeróbio 0,18, o que mostra que a quantidade de aeração interfere na produção de xilitol e a quantidade de oxigênio

necessária varia de espécie para espécie e algumas vezes de linhagem para linhagem. Em estudos sobre a necessidade de oxigênio no metabolismo de xilose, a razão entre a produção em condições aeróbias e anaeróbias foi maior em células cultivadas sob aerobiose do que as cultivadas sob anaerobiose indicando, que o oxigênio induz ou ativa o sistema de transporte. (HAHN HAGERDAL et al,1994)

Na produção de xilitol o balanço oxidação-redução do cofator piridina nucleotídeo (NADP) é determinante no rendimento. Na primeira reação do metabolismo da xilose na maioria das leveduras produtoras de xilitol, a enzima xilose redutase reduz D-xilose a xilitol usando o cofator NADPH (YAHASHI et al,1996). Barbosa et al. 2005, mostrou que o rendimento teórico de xilitol a partir de D-xilose foi 0,912 (g/g de xilose consumida) se NADPH fosse completamente regenerado pela via das pentoses fosfato. No entanto em cultivo o rendimento é menor que o teórico porque parte da xilose é utilizada para o crescimento celular.

A queda da concentração de xilitol durante o cultivo de FP pode ser devido ao xilitol ser um precursor do etanol no ciclo fermentativo da xilose e a levedura por sua vez utilizou o xilitol para produzir etanol, como também para crescimento celular.

Os cálculos estatísticos pelo método de variância ANOVA, mostraram que a diferença de crescimento entre as leveduras é significativa ($p= 0,0312$). Este fato pode ser mesmo claramente observado na Figura 5 já que a partir de 48 horas o crescimento de E2 foi muito maior que S4 e FP. Portanto, E2 foi a levedura que teve maior crescimento, mas também teve o maior consumo de xilose.

No cultivo de E2, observa-se uma estabilização após 72h e uma queda na concentração celular após 96 horas, muito provavelmente devido exaustão de xilose do meio já que esta foi quase totalmente consumida em 72 horas (Figura 5). Todas as linhagens permaneceram com viabilidade maior que 70% até o final do ciclo fermentativo (Figura 6).

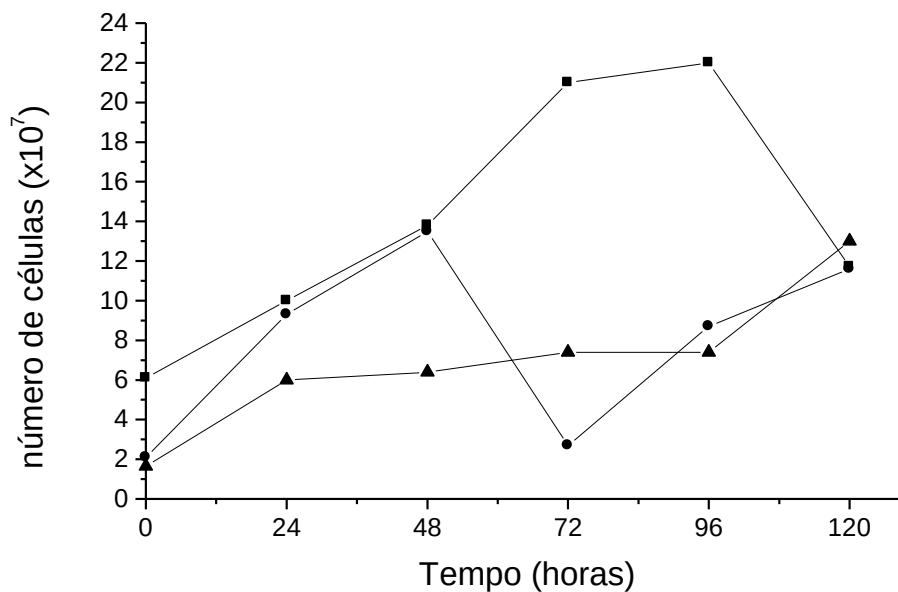
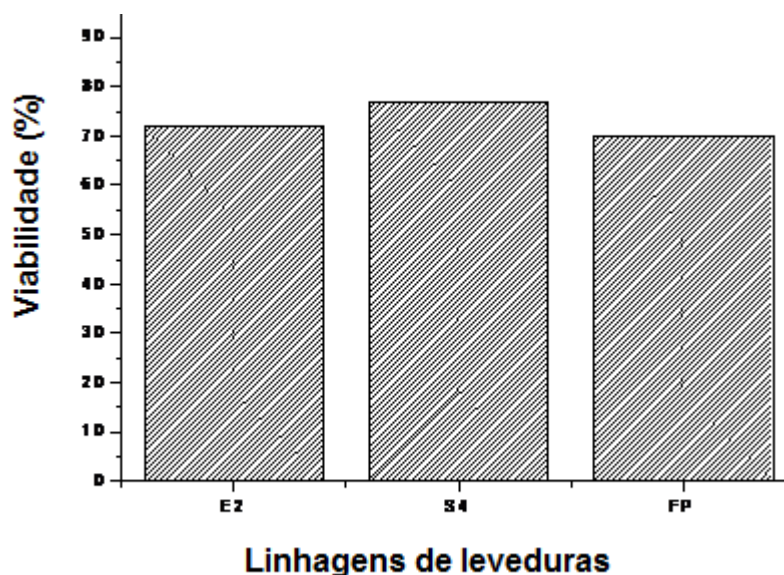


Figura 5. Perfil de crescimento celular de leveduras *Cândida tropicalis* durante 120 horas de fermentação de xilose em fermentadores com 10% de xilose.. —■— E2, —●— S4, —▲— FP.



A leveduras E2 e S4 tiveram a maior produção de etanol em 24 horas produzindo respectivamente 3 e 6,9 g/L e FP teve produção máxima em 96h com 4,6 g/L. A linhagem FP teve produção semelhante à Fujita(2010), que obteve com uma levedura isolada da natureza, a concentração máxima de etanol de 1,34 g/L em meio sintético com 17g/L de xilose.

A linhagem S4 teve produção semelhante a *Pacchysolen tannophilus* testada por Kiiper (2009), que apresentou rendimento de 0,11g/g em 24h e maior produção de etanol que a

linhagem que a mesma levedura testada por Debus et.al (1983), que apresentou rendimento de 0,07g/g, no entanto as demais leveduras não tiveram produções altas comparadas à literatura. Isto sugere que provavelmente utilizaram a maior parte da xilose para produção de biomassa, e que a conversão de xilose em etanol, não foi completa resultando no acúmulo de xilitol, o que pode ser atribuído a um possível desequilíbrio redox por falta de oxigênio.

Segundo Hahn-Hagerdal et al (1994), a hipótese do desequilíbrio redox foi baseada em resultados de um estudo com *Candida utilis* que apresentava xilose redutase e uma xilitol desidrogenase que necessitavam de NADPH e NAD⁺ respectivamente. Isso resultou numa super produção de NADP⁺ e NADH. O NADP⁺ pode ser reduzido no ciclo da via da frutose 6-fosfato, no entanto a levedura *C.utilitis* não pode reoxidar NADH na falta de oxigênio. Esse desbalanço é mais tarde refletido pela excreção intermediária de xilitol. Este fato pode variar de espécie para espécie, por exemplo, em *P. tannophilus* a produção de xilitol aumenta conforme a diminuição do oxigênio do meio (HAHN-HAGERDAL et al,1994),já em *Pichia stiptis*, a produção de xilitol sob anaerobiose é praticamente nula (HAHN-HAGERDAL et al,1994).

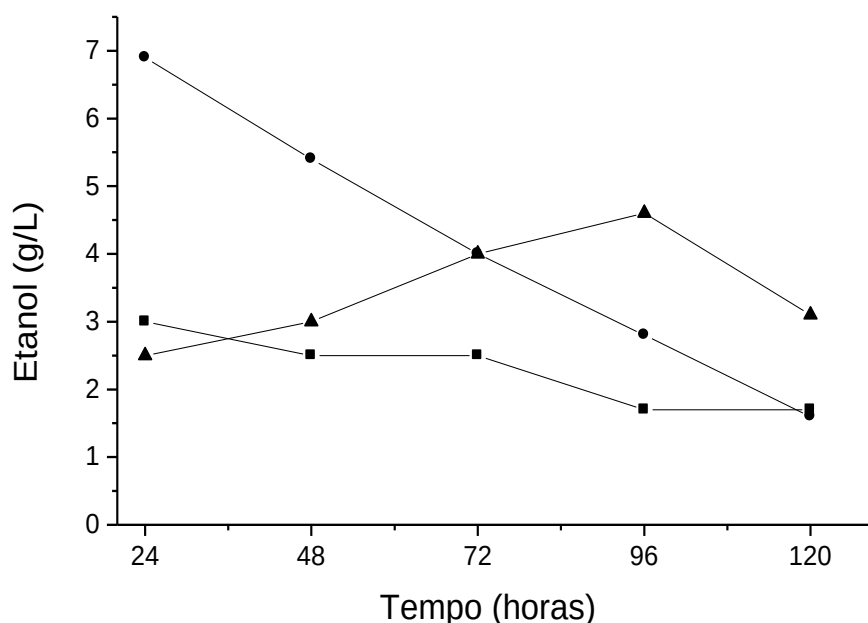


Figura 7. Produção de etanol por três linhagens de *Cândida tropicalis* durante 120h de fermentação em meio contendo 10% de xilose como única fonte de carbono. —■— E2, —●— S4, —▲— FP.

A diminuição da quantidade de etanol em E2 é proporcional ao aumento do número de células o que mostra que a levedura pode ter utilizado o etanol para crescimento celular. Em S4 também foi observada uma queda na concentração de etanol, no entanto, o açúcar ainda não havia sido totalmente consumido, podendo justificar a perda por evaporação, já em FP a concentração de etanol só diminui em 120 horas, quando não havia mais xilose presente no meio, o que indica que também FP utilizou o etanol como fonte de carbono para crescimento celular.

5.3. Fermentação do Licor Negro

O licor negro proveniente da extração da celulose é um meio que possui muitos resíduos de polissacarídeos provenientes principalmente da hemicelulose. Para que estes possam ser utilizados pelas leveduras, eles devem ser hidrolisados a monossacarídeos.

O pH do licor é altamente alcalino (pH 12) e foi reduzido com H_2SO_4 para o pH 5 de forma a ajustar ao pH ótimo da xilanase do fungo *Thermoascus aurantiacus*. O processo de hidrólise foi feito por 12 horas a 60°C (Da SILVA et al, 2005).

O fungo *Thermoascus aurantiacus* é capaz de produzir a maioria das enzimas hemicelulolíticas capazes de transformar a hemicelulose em monômeros fermentecíveis (Brienzo,2008). Após a hidrólise enzimática foi observado um aumento da quantidade de açúcares, xilose (7 mg/mL), arabinose (1 mg/mL), galactose (2,3 mg/mL) e glicose (2,2 mg/mL). Este hidrolisado foi utilizado para o teste de produção de etanol e xilitol, e a única fonte de carbono do meio foram os açúcares provenientes da hidrólise do licor negro.

Todas as leveduras consumiram 99% dos açúcares presentes no meio em 72 horas o que mostra que a levedura *Cândida tropicalis* não só é eficiente no consumo de xilose quanto dos demais açúcares presentes no licor negro (Figura 8 e Apêndice).

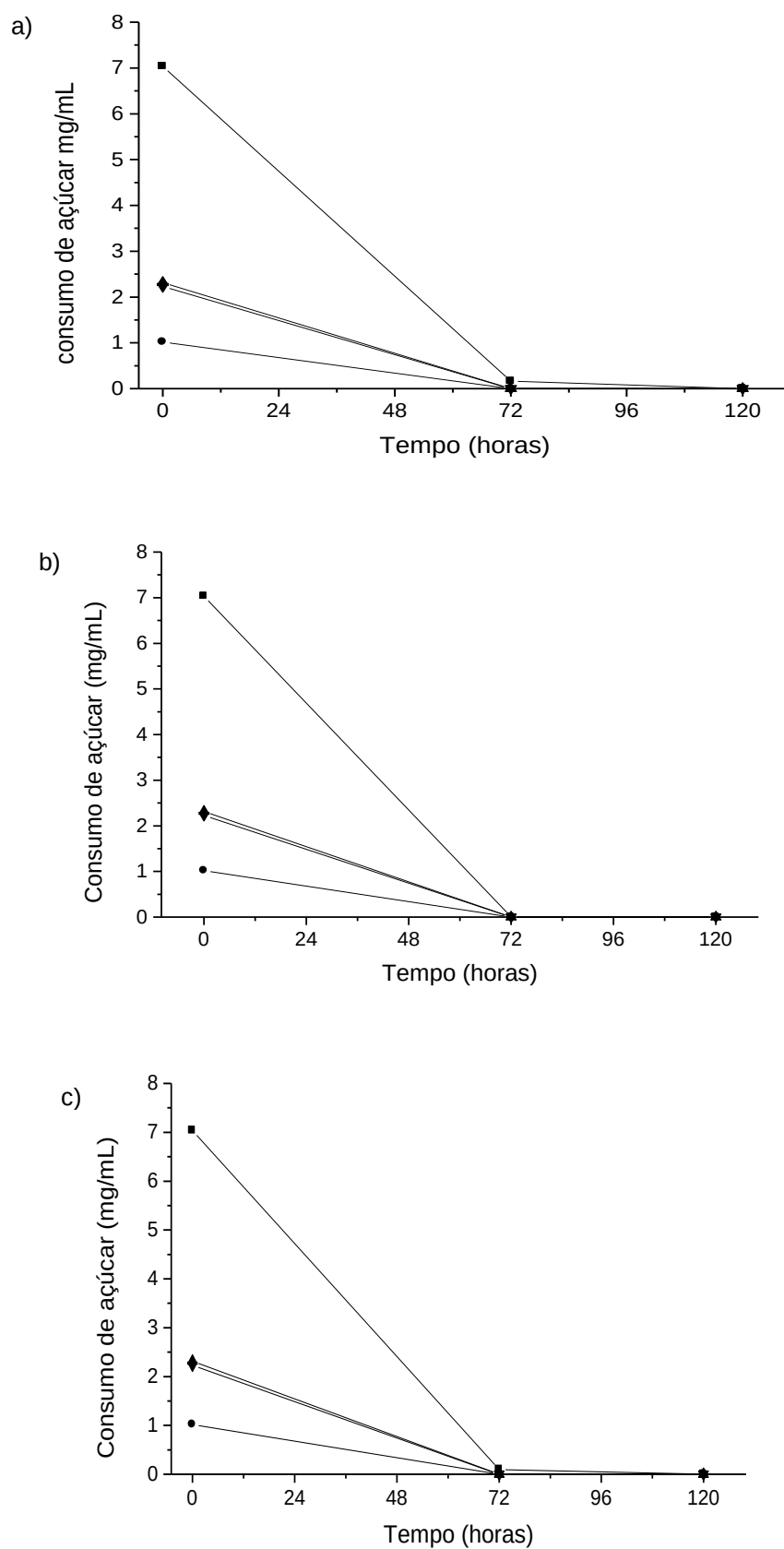


Figura 8. Consumo de açúcares pela levedura *Candida tropicalis* linhagens E2 (a), S4 (b) e FP (c) em 120 horas de fermentação do licor negro. —■— xilose, —◆— arabinose, —▲— galactose, —●— glicose.

As leveduras também se mostraram eficientes na produção de xilitol a partir do licor negro (Figura 9). Estes resultados podem ser confirmados comparando-se o rendimento de xilitol, ou seja, teor de xilitol (produto) produzido (g), dividido pela quantidade de xilose (substrato) consumida (g).

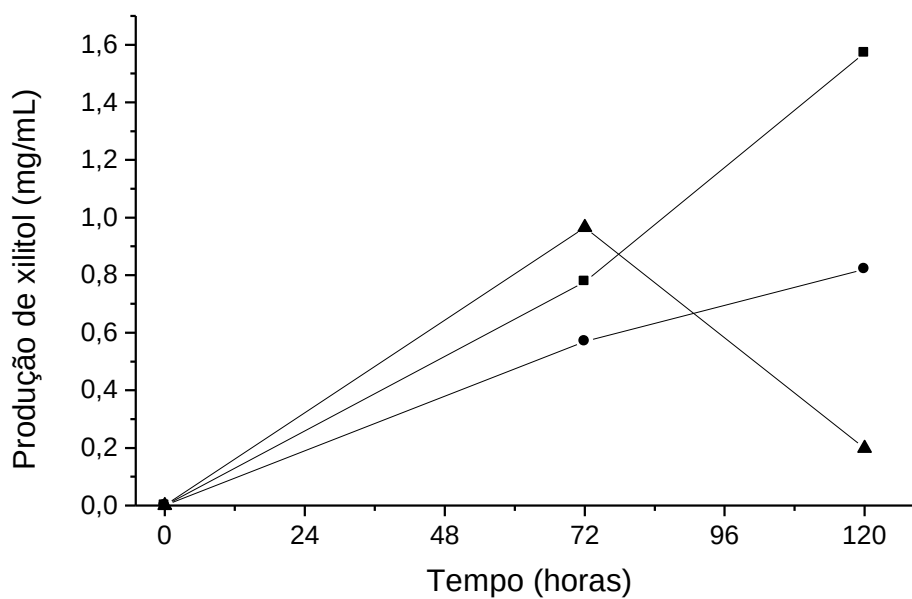


Figura 9. Produção de xilitol por leveduras *Candida tropicalis* a partir do licor negro da extração da celulose em 120h de fermentação. —■— E2 , —●— S4 e —▲— FP.

Tabela 3. Consumo de xilose, produção de etanol e xilitol e rendimento de etanol e xilitol por xilose consumida durante o experimento de fermentação alcoólica com concentração de xilose de 7g/L, temperatura de 28°C, agitação de 100 rpm e inóculo inicial de 4g/L, a partir de hidrolisado do licor negro.

Linhagens	Tempo de amostragem (h)	açúcar consumido (g/L)	etanol (g/L)	xilitol (g/L)	rendimento xilitol (g xilitol/g xilose consumida)	rendimento etanol (g etanol/g açúcar consumido)	Viabilidade Celular (%)
<i>Cândida tropicalis</i> E2	24		1,2				80
	48		2,4				79
	72	12,33	3,7	0,8	0,11	0,3	73
	96		3,9				83
	120	12,5	0,6	1,6	0,23	0,05	86
<i>Cândida tropicalis</i> S4	24		2				85
	48		3				81
	72	12,4	3,2	0,57	0,08	0,26	79
	96		3,8				76
	120	12,5	4,2	0,82	0,12	0,34	71
<i>Cândida tropicalis</i> FP	24		2				82
	48		2,3				76
	72	12,5	3,5	1	0,14	0,28	80
	96		3,6				76
	120	12,5	3,8	0,2	0,03	0,3	85

Pode-se observar que o rendimento etanólico é maior na fermentação do licor negro do que no meio definido contendo somente xilose, isso pode ser devido ao maior teor de açúcar no meio definido que pode ter inibido a produção etanólica, como também a presença de outros açúcares no meio no caso do licor negro. Segundo Agbogbo et al (2006), a fermentação de pentoses se torna mais produtiva com a presença de glicose, já

que a levedura pode utilizar a glicose como forma de crescimento e posteriormente a xilose para a produção de etanol.

A viabilidade celular pode confirmar a hipótese de que a presença de glicose favorece no crescimento celular, pois E2 e FP tiveram mais células viáveis ao fim de 120h e S4 permaneceu semelhante comparadas ao meio sintético, mostrando que mesmo em um meio com compostos tóxicos, as leveduras na fermentação do licor negro hidrolisado apresentaram crescimento, consumo de açúcar, rendimento etanólico e de xilitol semelhante, constatando-se que os compostos tóxicos não foram capazes de interferir no processo fermentativo.

O rendimento de etanol de E2 em 72 horas e S4 e FP em 120 horas se mostrou próximo de três linhagens de *Pichia stipitis* testadas por Hahn-Hagerdal et al 1994 que foi em média 0,35, o que indica a eficiência das leveduras *Cândida tropicalis* testadas.

O rendimento de xilitol se mostrou muito semelhante entre os meios de fermentação (sintético e licor) nas três leveduras testadas.

Tabela 4. Comparação do rendimento de xilitol, utilizando fermentação em meio com xilose e fermentação do licor negro.

Leveduras	Rendimento x_p/x_s (g/g)	
	Xilose	Licor Negro
E2	0,22	0,23
S4	0,15	0,12
FP	0,16	0,14

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

O licor negro é um meio rico em compostos tóxicos para as leveduras, pois ao longo do processo industrial até a remoção da celulose, com a utilização de altas temperatura e

diferentes compostos químicos, associados aos monossacarídeos já presentes no meio, ocorre a formação de furanos, com a adição de ácido sulfúrico para a redução do pH, a formação desses compostos pode ser ainda maior. Este fato pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 5. Concentração de furfural e 5 hidroximetilfurfural no licor negro *in natura*, no hidrolisado e no hidrolisado tratado com carvão ativado.

Inibidores (ng/mL)		
Amostras	5- Hidroximetilfurfural	Furfural
Licor	35,5	49,3
Licor hidrolisado	206,5	93,3
Licor tratado com carvão ativado	29,3	28,1

Observa-se o aumento da concentração de furfural e 5-HMF no meio hidrolisado, possivelmente devido a reação do ácido sulfúrico com os monômeros presentes no meio. No entanto o aumento não foi suficiente para inibir o crescimento das leveduras. Segundo Mussato & Roberto (2004), apenas concentrações acima de 1mg/mL de furfural e de 5-hidroximetilfurfural são suficientes para interferir no metabolismo da levedura. Por sua vez Carrion & Dorta, (2009), observaram que baixas concentrações de furfural (0,16g/L) e 5-hidroximetilfurfural (0,048g/L) junto a outros compostos tóxicos, interferiram de forma sinérgica no metabolismo da levedura. Segundo GÁMEZ et al (2005), é importante considerar que mesmo que estas sejam em pequenas concentrações existe o efeito sinérgico entre as diferentes substâncias tóxicas dos hidrolisados de bagaço no estresse metabólico do microrganismo.

6. CONCLUSÃO

A grande predominância de leveduras *Cândida tropicalis* na seleção da natureza em meio com xilose mostra que essa espécie é realmente adaptada ao consumo de xilose, o que faz dela uma alternativa interessante na pesquisa e produção do etanol celulósico.

A diferença no consumo de açúcares com leveduras da mesma espécie também se mostra um dado interessante, porque mesmo sendo todas *Cândida tropicalis*, as linhagens se comportaram diferentemente entre os consumos de pentose e hexoses.

Os rendimentos semelhantes de xilitol entre o meio sintético e o hidrolisado e a maior produção de etanol no meio com hidrolisado mostram que a quantidade de açúcar pode ter sido o fator determinante na produção desses compostos pois a grande quantidade de xilose no meio sintético pode ter interferido no metabolismo celular. Outro fato ligado ao açúcar que pode ser observado é a presença de glicose no meio hidrolisado que pode ter contribuído para o crescimento celular e assim maior rendimento.

A alta viabilidade celular no meio com licor negro das três linhagens mostra que os compostos tóxicos presentes no meio não foram capazes de interferir no metabolismo da levedura, mostrando mais uma vez que esta levedura pode ser interessante na utilização de hidrolisados para a produção de bioetanol e xilitol.

Os bons rendimentos de etanol e xilitol na fermentação do licor hidrolisado com leveduras *Cândida tropicalis* mostram que a fermentação do licor negro pode ser uma alternativa interessante para o aproveitamento desse resíduo, incentivando a continuidade dos estudos de determinação das condições ótimas de fermentação da *Cândida tropicalis*, empregando o licor negro, visando obtenção de produtos de maior valor agregado.

7. REFERÊNCIAS

- AGBOGBO,F.K., COWARD KELLY,G., SMITH,M.T., WENGER,K.S., Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stiptis*, **Process Biochemistry**, v.41, p.2333-2336, 2006.
- AGBOGBO,F.K., COWARD-KELLY,G., TORRY-SMITH,M., WENGER,K., JEFFRIES,T.W., The effect of initial cell concentration on xylose fermentation by *Pichia stiptis*, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136, p.653-662,2007.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ,J.A;GARROTE,G.;VÁZQUEZ,M.; Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55,p.309-318,2002.
- BARBOSA, C.R., CÂNDIDO,E.J., SILVA, J.B.A. Caracterização dos compostos inibidores do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada utilizado para a produção biotecnológica de xilitol. **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 2005.
- BOCCHINI, D.A., **Estudos da produção, indução e purificação da xilanase termoestável em *Bacillus circulans* D1**, (Doutorado em Biotecnologia), Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- BON, E. P. S.; FERRARA M.A. Bioethanol Production via Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Biomass. In: THE ROLE OF AGRICULTURAL BIOTECHNOLOGIES FOR PRODUCTION OF BIOENERGY IN DEVELOPING COUNTRIES, 2007, Roma, FAO publications, 11p. Disponível em: <http://www.fao.org/biotech/seminaroct2007.htm>. Acessado em fevereiro de 2009.
- BRACELPA, Dados do Setor de Papel e Celulose, Março 2011, Site acessado: <http://www.bracelpa.org.br/bra2/index.php>, acesso em 15 de maio de 2011.
- BRIENZO,M. ARANTES,V., MILAGRES,A.M.F, Enzymology of the thermophilic ascomycetous fungus *Thermoascus aurantiacus*. **Fungal Biology Reviews**, v.22, p.120-130,2008.
- BUCHERT, J.; KANTELINEN, A.; SUURNÄKKI, A.; VIIKARI, L.; JANSON, J. Evaluation of the effects of hemicellulases on the bleachability of sulphite pulps. *Holzforschung*, v.49(5), p.439-44, 1995.
- CARDOSO,M., OLIVEIRA, E.D., PASSOS, M.L., Chemical composition of black liquors and their effects on liquor recovery operation in Brazilian pulp mills, **Fuel**, v.88, p. 756-763,2009.
- CARRION,L.M.,DORTA,C., Inativação de compostos tóxicos derivados da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar. **Rev. Analytica**. v.42, 2009.

D'ARCE, R.D.; BOIN, C.; MATTOS, W.R.; **Utilização de resíduos agroindustriais na alimentação de ruminantes**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brasil, 1985.

DA SILVA R., GOMES,E., **Enzimas como agentes biotecnológicos: Ligninases**. 1 ed., cap.19, p.342-375, Ed. Legis Suma, Ribeirão Preto,2004.

DA SILVA, R., LAGO, E.S., MERHEB,C.W., MACCHIONE,M.M., PARK,Y.K., GOMES, E., Production of xylanase and CMCase on solid state fermentation in different residues by *Thermoascus aurantiacus* Miehe, **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36,p. 235-241, 2005.

DEBUS, D. METHNER, H., SCHULZE, D., DELLWEG,H., Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Eur. J. Appl. Microb. Biotechnol.**, v.17, 287-291,1983.

DOGARIS,I., KARAPATI,S., MAMMA,D. KALOGERIS,E.,KEKOS, D., Hydrothermal processing and enzymatic hydrolysis of sorghum bagasse for fermentable carbohydrates production. **Biosource Technology**, v.100, p.6543-6549,2009.

DÚRAN, N.; ESPOSITO, E.; ARAÚJO-NETO, J.S. Enzimas de importância na indústria de polpa de celulose e papel. **O papel**, v. 56(12), p.68-85,1995.

FERNANDEZ,M.T., UBEDA,J.F.I., BRIONES, A.I.P., Comparative study of non-Saccharomyces microflora of musts in fermentation by physiological and molecular methods. **FEMS Microbiology Letters**, v. 173, p. 223-229, 2003.

FERNANDEZ,M.T., UBEDA,J.F.I., BRIONES, A.I.P., Typing of non-Saccharomyces yeasts with enzymatic activities of interest in winemaking. **International Journal Food Microbiology**,v. 59,p. 29-36, 2000

FUJITA, T.P.L., **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. (Mestrado em Microbiologia Agropecuária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 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 Eng.** v.74, p.78-88, abr. 2005.

GENCO, J.M., BUSAYASAKUL, N., MEDHORA,H.K., ROBBINS, W., Hemicellulose retention during kraft pulping, **Tappi Journal**, 223-233, 1990.

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

GLAZER,A.N., NIKAIDO,H., Microbial Biotechnology. In: **Fundamentals of Applied Microbiology**, New York: W.H.Freeman and Company,p.325-339,1995.

GONG, C.S., Direct fermentation of D-xylose to ethanol by a xylose-fermenting yeast mutant, **United States Patent**, 1983.

HAHN-HAGERDAL,B., JEPPSSON,H.,SKOOG,K., PRIOR, B.A., Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.** v. 16, p. 933-943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL,B.; WAHLBORN,C.F.;GARDONYI,M.;ZYL VAN,W.H.; OTERO,R.R.C.;JONSSON,L.J., Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization,**Adv.Biochem.Eng.Biotechnol.** v.73,p. 53-84, 2001.

HEININGEN,A.V., Converting a Kraft pulp Mill into an Integrated Forest Products Biorefinery, **Technical Articles**, Technical Association of the pulp and paper industry of Southern Africa,2005. Site de acesso: http://www.tappsa.co.za/archive3/Journal_papers/On_the_managemente_os_odour/on_the_management_of_odour.html , acessado em: 15 de maio de 2011.

HUANG,C.F.; JIANG,Y.F.; GUO,G.L.,HWANG,W.,S., Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**, v.102, p.3322-3329,2011.

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

JEFFRIES,T.W.,JIN,Y.S.; Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, **Advances in applied microbiology**,47,221-268,2000.

KURAKAKE, M.; KISAKA, W.; KOMAKI, T. Pretreatment with ammonia water for enzymatic hydrolysis of corn husk, bagasse and switchgrass. **App. Biochem. Biotechno.**, v. 90, p. 251-259, 2001.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G ; LICHWA, J.; ANTAL Jr.,M.J.; LYND, L.R.; A comparison of liquid hot water and stem pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v.81,p.33 – 44, 2002.

LEVANON, Y., Manual de trabalhos práticos em Bioquímica, v.1, p.2-8, 2003.

LIGTHELM, M.E., PRIOR, B.A., DU PREEZ,J.C., The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. **Appl.Microbiol. Biotechnol.**, v.28, p.63-68, 1988.

LISBOA,S.A., EVTUGUIN,D.V., PASCOAL NETO,C., GOODFELLOW,B.J., Isolation and structural characterization of polysaccharides dissolved in *Eucalyptus globulus* kraft black liquors. **Carbohydrate Polymers**, v.60, p. 77-85, 2005.

LONGUE-JÚNIOR,D., **Métodos alternativos para aproveitamento das hemiceluloses da madeira de eucalipto na indústria de celulose Kraft**. (Mestrado em Ciência Florestal), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

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

MARTÍNEZ, E. A., VILLARREAL, M.L.M., ALMEIDA E SILVA, J.B., SOLENZAL, A.I.N., CANILLHA, L., MUSSAMATO, S.I; Uso de diferentes material primas para la producción biotecnológica de xilitol. **Ciencia y Tecnología Alimentaria**, v.3, n.5, 295-301, 2002.

MEINANDER,N.Q., BOELS,I.,HANH-HAGERDAL,B., Fermentation of xylose/glucose mixtures by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing XYL1 and XYL2 from *Pichia stipitis* with and without over expression of TAL1. **Bioresource Technonology**, v.68, p.79-87,1999.

MILLATI, R; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizopus*,*Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolysates. **Enzyme Microb Technol**, v.36, p. 294-300, 2005.

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

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

MOHAGHEGHI A.; DOWE, N., SCHELL D.; CHOU, Y-C; EDDY C.; ZHANG M.; Performance of a newly developed integrant of *Zymomonas mobilis* for ethanol production on corn stover hydrolysate, **Biotechnol. Lett**. v.26, p. 321–325,2004.

MORRIS, D. D. **Isolation of xylanases genes from extremely thermophilic bacteria as potential kraft pulp bleaching aids**. (Tese de doutorado). Molecular Genetics and Microbiology School of Biological Sciences, University of Auckland, Auckland, New Zealand, 1997.

MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para a produção de xilitol. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 24, n. 1, 2004.

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

NOSSA,V. **Disclosure ambiental: Uma análise do conteúdo dos relatórios ambientais de empresas do setor de papel e celulose em nível internacional**. 2002. 249p.(Doutorado em Controladoria e Contabilidade)- Faculdade de Economia, Administração e Contabilidade, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

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

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

PERALTA-ZAMORA,P., ESPOSITO,E., REYES,J.,DURÁN,N., Remediação de efluentes derivados da indústria de papel e celulose, tratamento biológico e fotocatalítico. **Química Nova**, 20 (2), p.186-190, Campinas, SP, 1997.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.,RAMÍREZ, J.A.,GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid:A kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**,v.61,p.143-152, 2004.

ROWELL,R.M.,PETTERSEN,R.,HAN,J.S., ROWELL,J.S., TSHABALALA,M.A., **Handbook of wood chemistry and wood composites: Cell Wall Chemistry**, 1 ed., cap.3, p.37-72,CRC Press, Flórida, 2005.

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

SILVA, E.A.B., ZADKOVA,M.,ARAÚJO,J.D., CATETO, C.A., BARREIRO, M.F., BELGACEM, M.N., RODRIGUES,A.E., An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. **Chemical Engineering Research and design**, v.87, p.1276-1292, 2009.

SIMONSON,R., The hemicelluloses in the sulfate pulping process. Part1. The isolation of the hemicelluloses fractions from pine sulfate cooking liquors. **Syensk Papperstidning**, v. 66, p.839-845, 1963.

SPRINGER,E.L. Hydrolysis of aspenwood xylan with aqueous solutions of hydrochloric acid.**TAPPI**,v.49,p.102-106,1966.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.22(1), p.33-64, 2002.

SUH,S.O.,McHUGH,J.V.,POLLOCK,D.D.,BLACKWELL,M., The beetle gut: a hyperdiverse source of novel yeasts, **Mycol.Res.**, v.109, p.261-265,2005

TANTIRUNGKIJ,M., NAKASHIMA,N., SEKI,T., YOSHIDA, T., Construction of xylose assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.** v.75, p.83-88, 1993.

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S., TAYLOR, J. PCR protocols. **A guide to methods and applications. In Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics** ed. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and With, T.J.pp. 315–322. San Diego: Academic Press,1990.

WOOD,B.E.;INGRAM,L.O., Ethanol production from cellubiose , amorphous cellulose, and crystalline cellulose by recombinant *Klebsiella oxytoca* containing chromosomally integrated *Zymomonas mobilis* genes for ethanol production and plasmids expressing thermostable cellulase genes from *Clostridium thermocellum*.**Appl.Environ.Microbiol.**v.58,p.2103-2110,1992.

YAHASHI,Y.,HORITSU,H.,KAWAI,K., SUZUKI,T.Z., TAKAMIZAWA,K., Production of xylitol fro D-xylose by *Candida tropicalis*: The effect of D-Glucose feeding. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.18,n.2, p.148-152,1996.

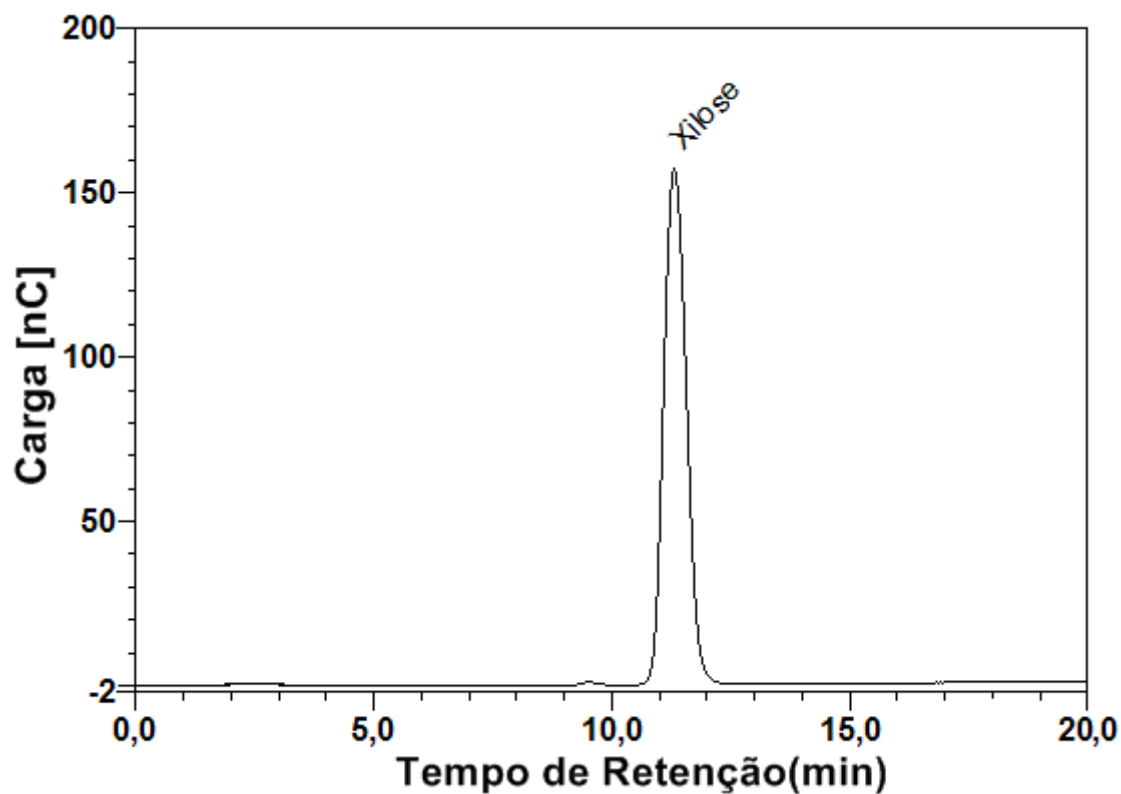
ZHOU,S.;INGRAM,L.O.;Simultaneous saccharification onnd fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulose,**Biotechnol.Lett.** v.23,p.1455-1462, 2001.

APÊNDICE

Cromatogramas

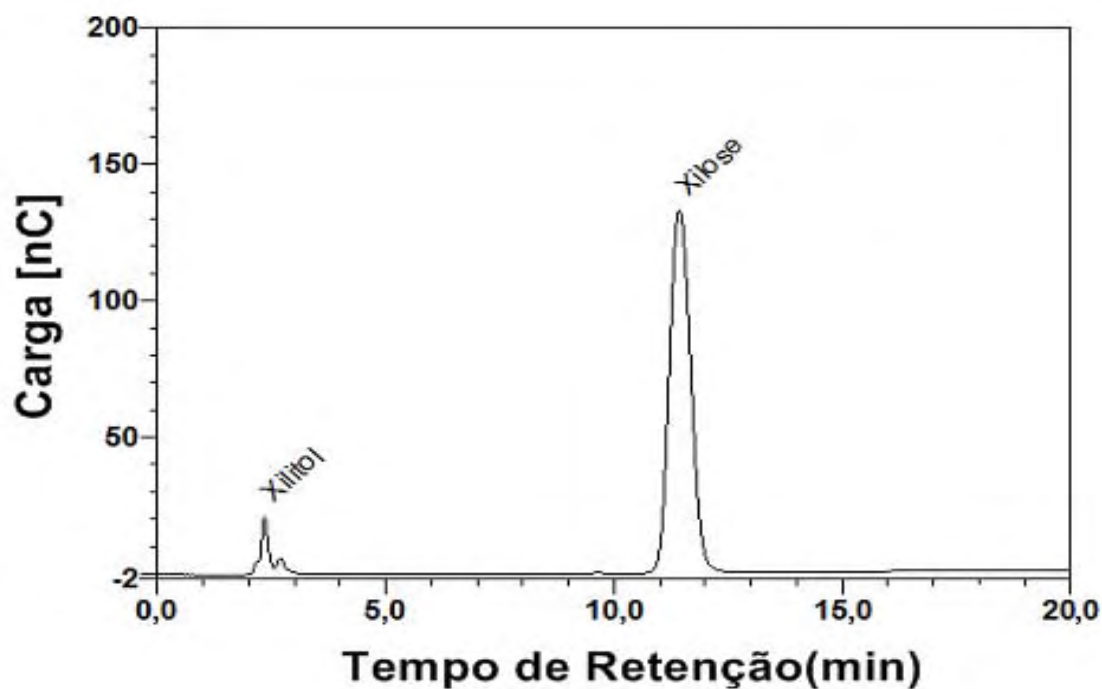
Encontram-se a seguir os cromatogramas obtidos pela análise de Cromatografia de Troca Iônica de Alta Eficiência com Detecção Amperométrica Pulsada (HPAEC-PAD), para quantificação de açúcares e xilitol nos meios de fermentação de cada levedura.

A1. Meio inicial contendo somente xilose como fonte de carbono



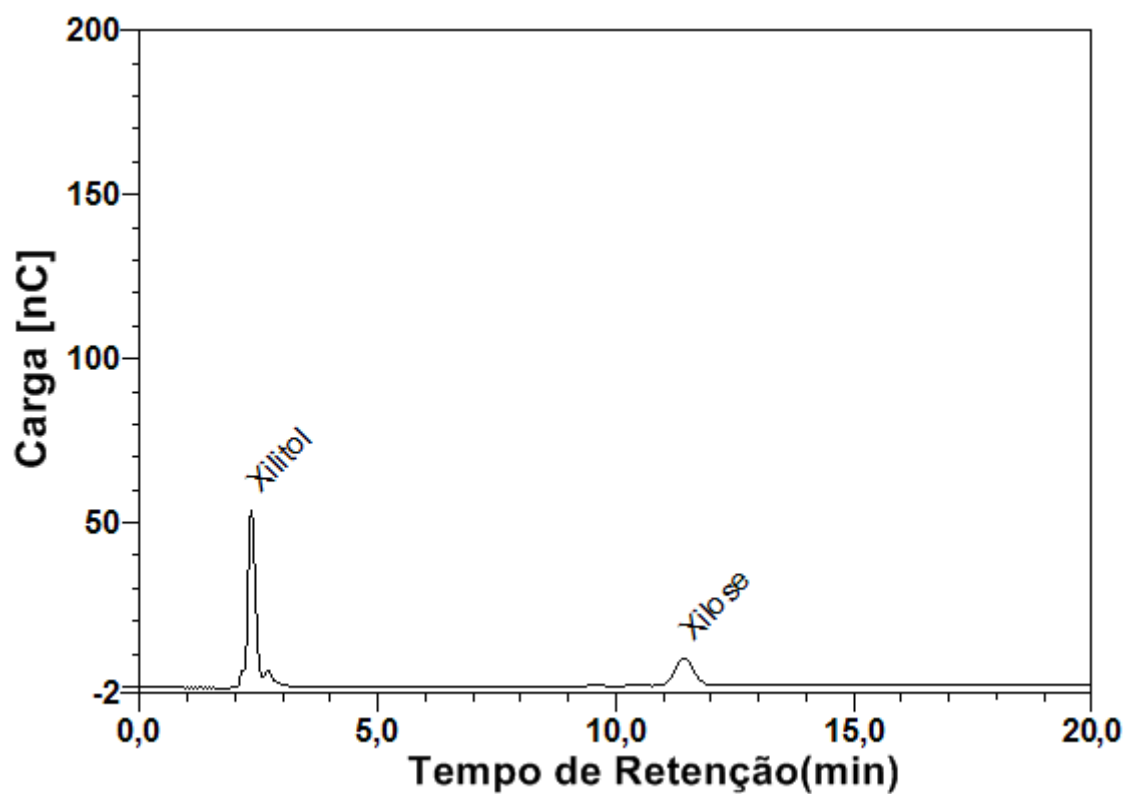
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	11,30	Xilose	157,091	86,151	100,00	99,835	BMB
Total:			157,091	86,151	100,00	99,835	

A2. Levedura *Cândida tropicalis* (E2) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 72 horas de fermentação.



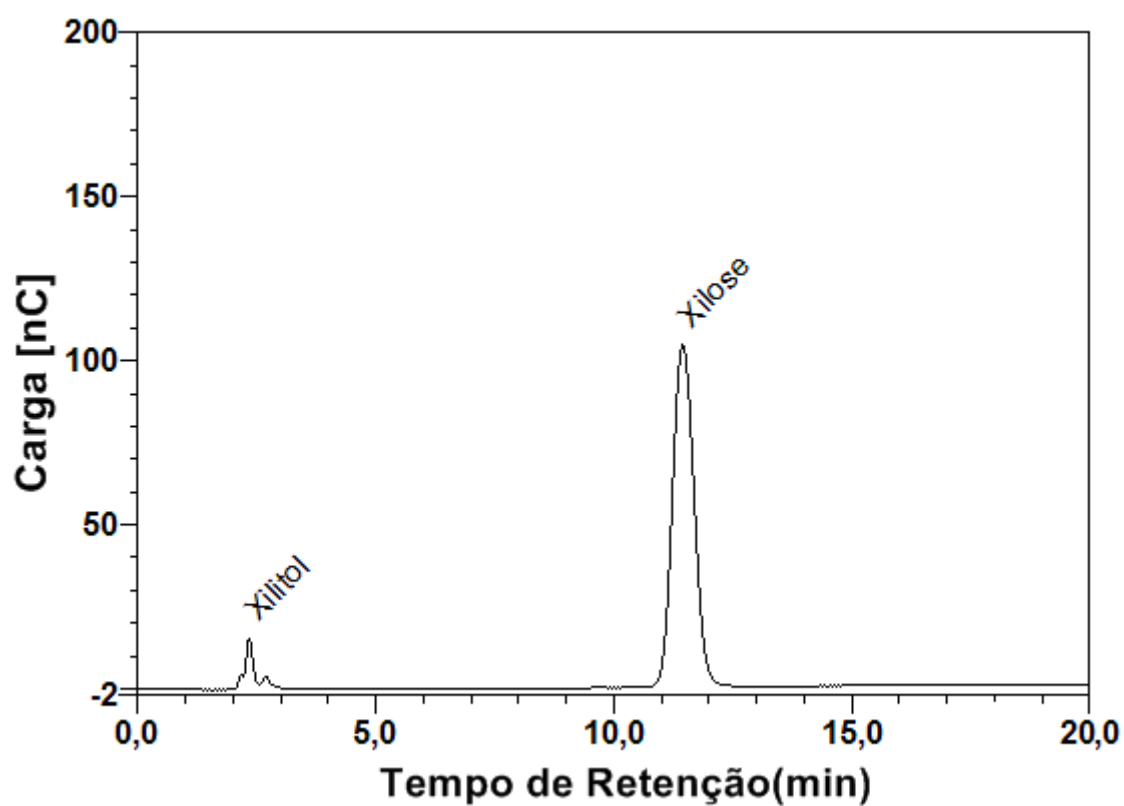
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,35	Xilitol	19,906	3,568	4,75	8,115	BMB*
2	11,43	Xilose	132,605	71,577	95,25	83,645	BMB
Total:			152,511	75,145	100,00	91,760	

A3. Levedura *Cândida tropicalis* (E2) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 120 horas de fermentação.



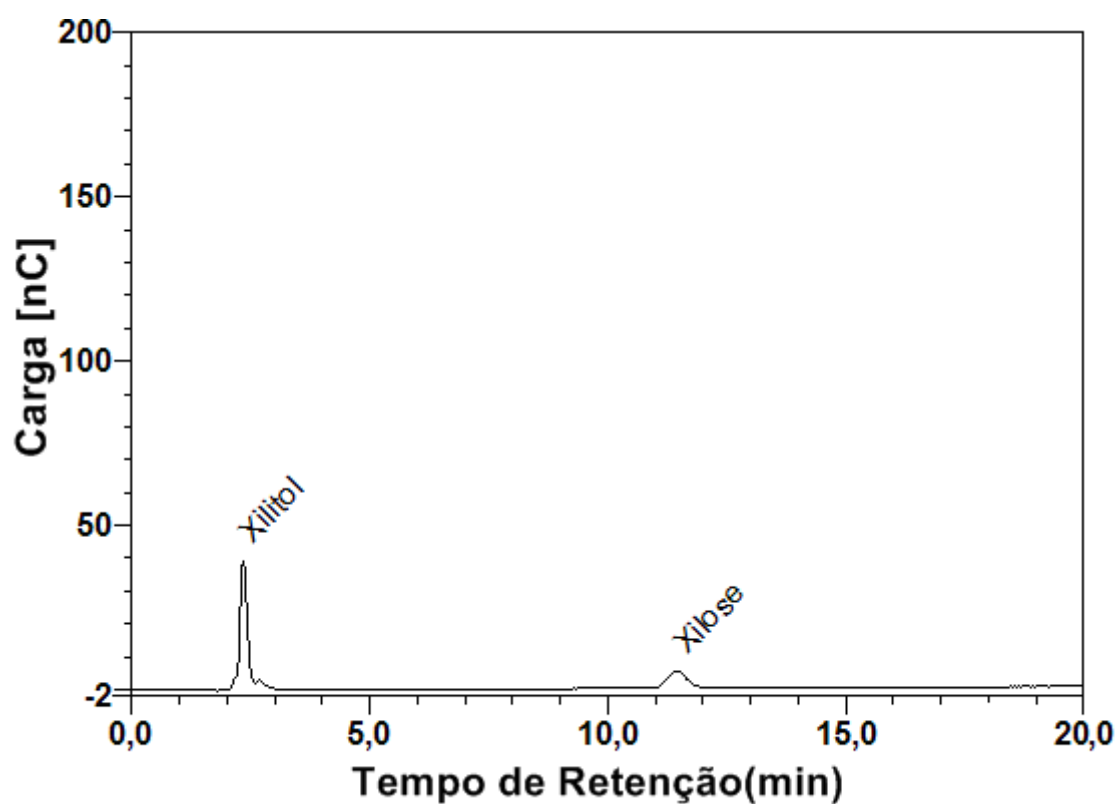
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,33	Xilitol	52,348	9,415	71,59	21,986	BMB*
2	11,43	Xilose	8,304	3,736	28,41	8,284	BMB
Total:			30,652	13,151	100,00	30,270	

A4. Levedura *Cândida tropicalis* (S4) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 72 horas de fermentação.



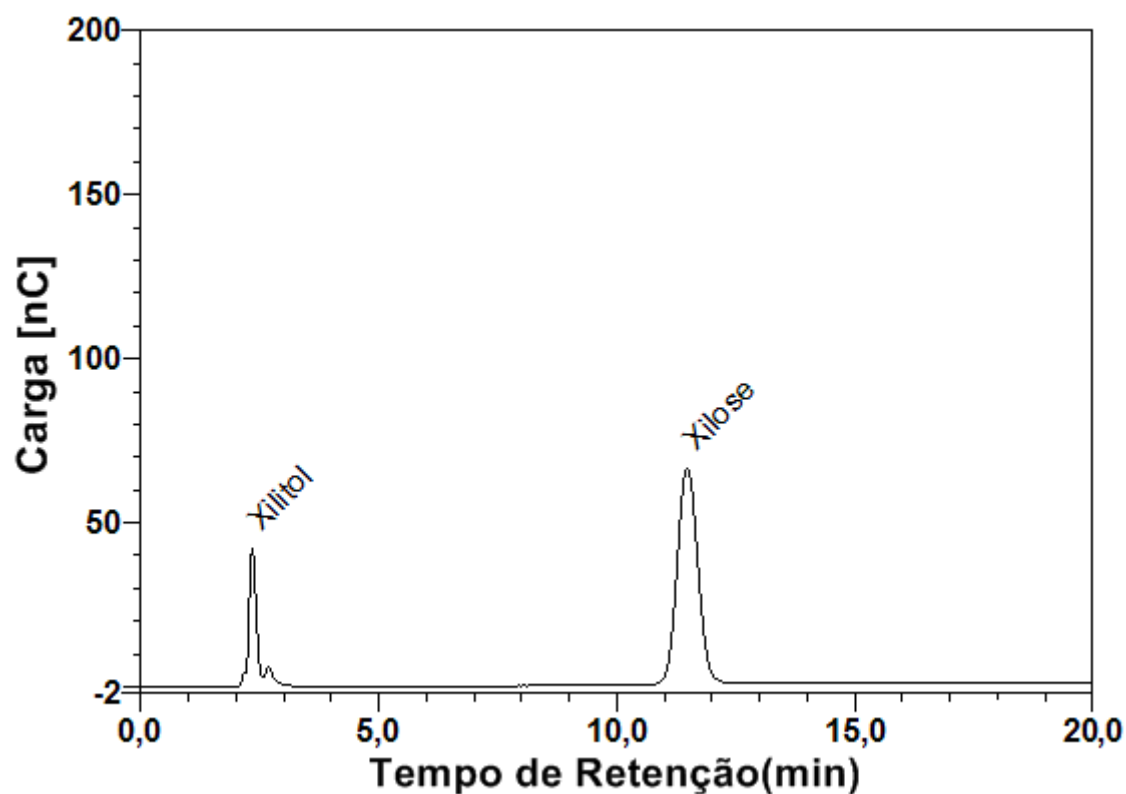
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,33	Xilitol	14,778	2,743	4,79	6,157	BMB*
2	11,45	Xilose	104,302	54,555	95,21	64,736	BMB
Total:			119,080	57,298	100,00	70,893	

A5. Levedura *Cândida tropicalis* (S4) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 120 horas de fermentação.



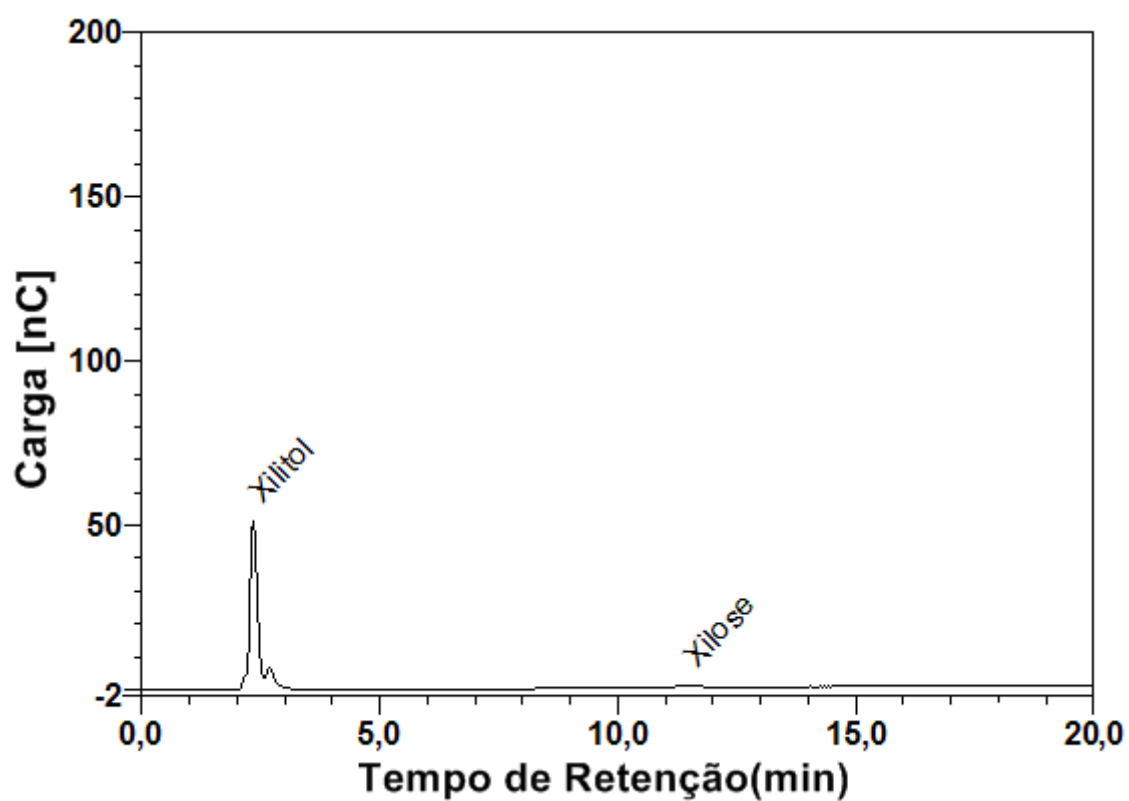
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,33	Xilitol	38,518	6,675	75,37	15,485	BMB*
2	11,47	Xilose	4,909	2,181	24,63	6,558	BMB
Total:			43,427	8,857	100,00	22,043	

A6. Levedura *Cândida tropicalis* (FP) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 72 horas de fermentação.



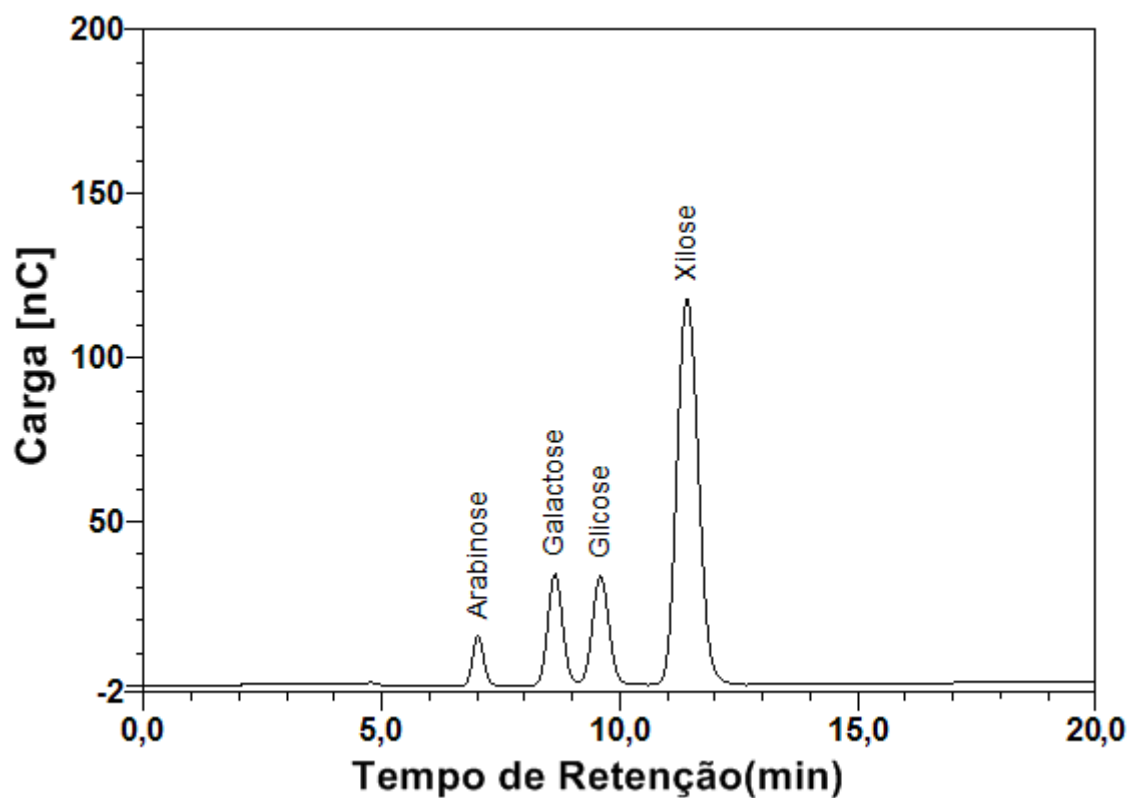
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,33	Xilitol	40,666	6,979	17,52	16,207	BMB*
2	11,48	Xilose	65,805	32,856	82,48	40,632	BMB
Total:			106,471	39,835	100,00	56,838	

A7. Levedura *Cândida tropicalis* (FP) em meio contendo xilose como única fonte de carbono em 120 horas de fermentação.



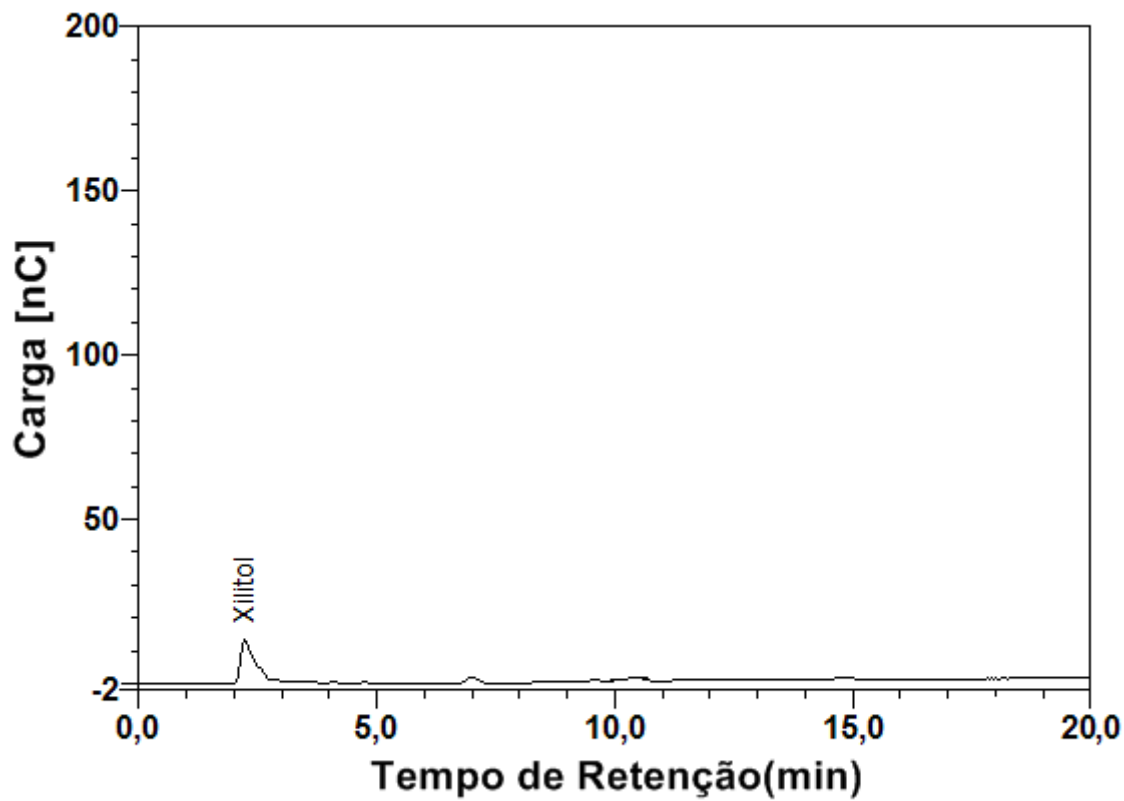
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,33	Xilitol	49,529	8,626	96,56	20,113	BMB*
2	11,47	Xilose	0,764	0,307	3,44	4,476	BMB
Total:			50,293	8,933	100,00	24,589	

A8. Meio inicial do licor hidrolisado



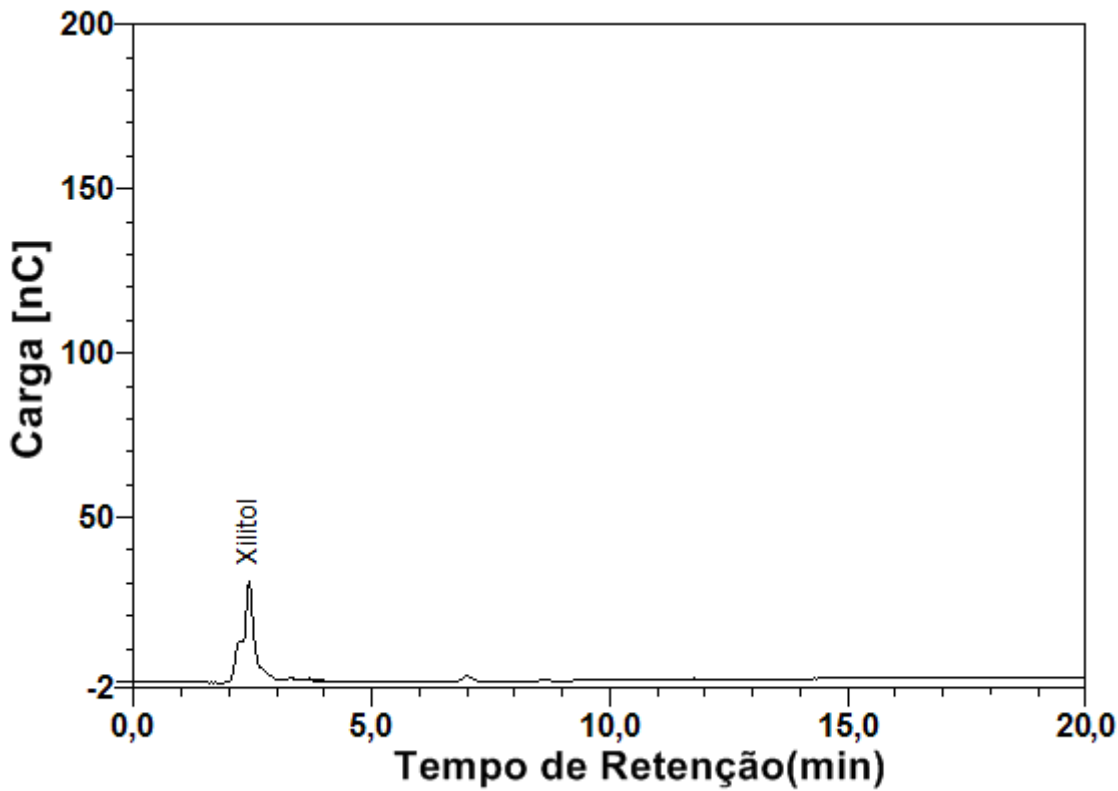
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	7,02	Arabinose	15,097	4,083	4,52	10,153	BMB
2	8,63	Galactose	33,539	11,955	13,23	23,186	BMB
3	9,60	Glicose	32,517	12,800	14,16	22,299	BMB
4	11,42	Xilose	117,529	61,552	68,10	70,374	BMB
Total:			198,683	90,389	100,00	126,011	

A.9. Levedura *Cândida tropicalis* (E2) em licor negro hidrolisado em 72 horas de fermentação.



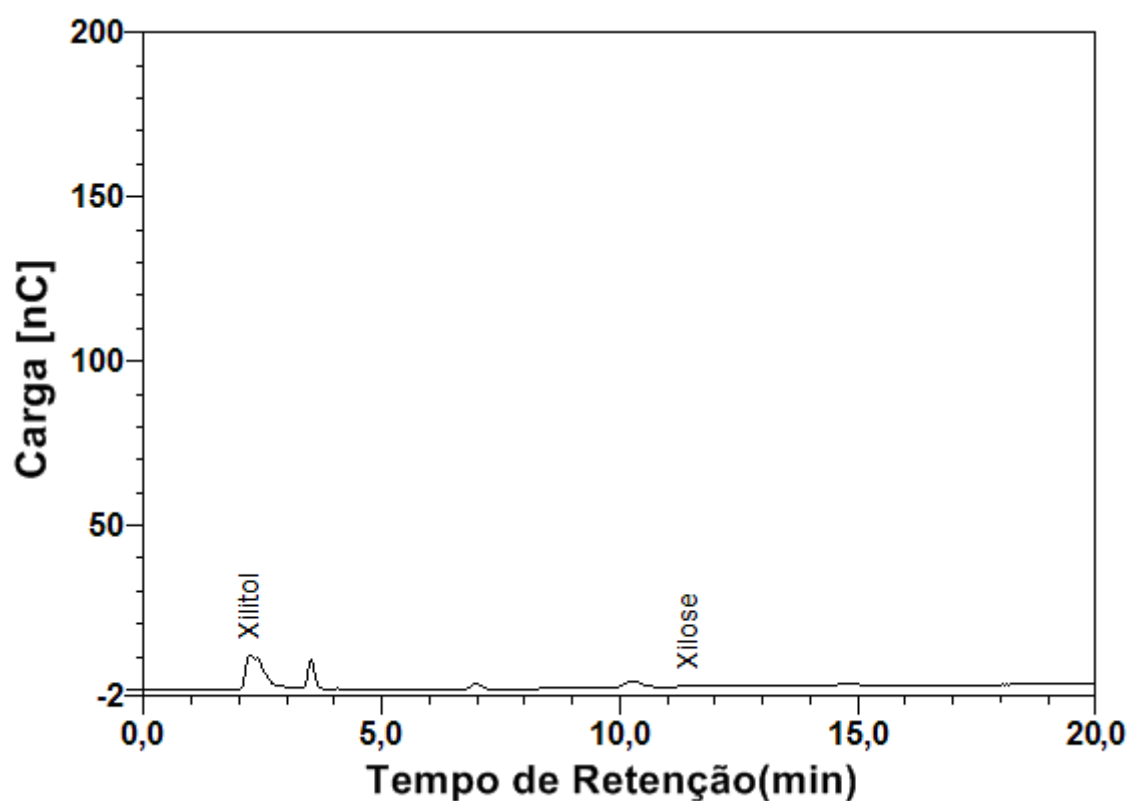
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,22	Xilitol	13,118	4,349	100,00	9,967	BMB*
Total:			13,118	4,349	100,00	9,967	

A10. Levedura *Cândida tropicalis* (E2) em licor negro hidrolisado em 120 horas de fermentação.



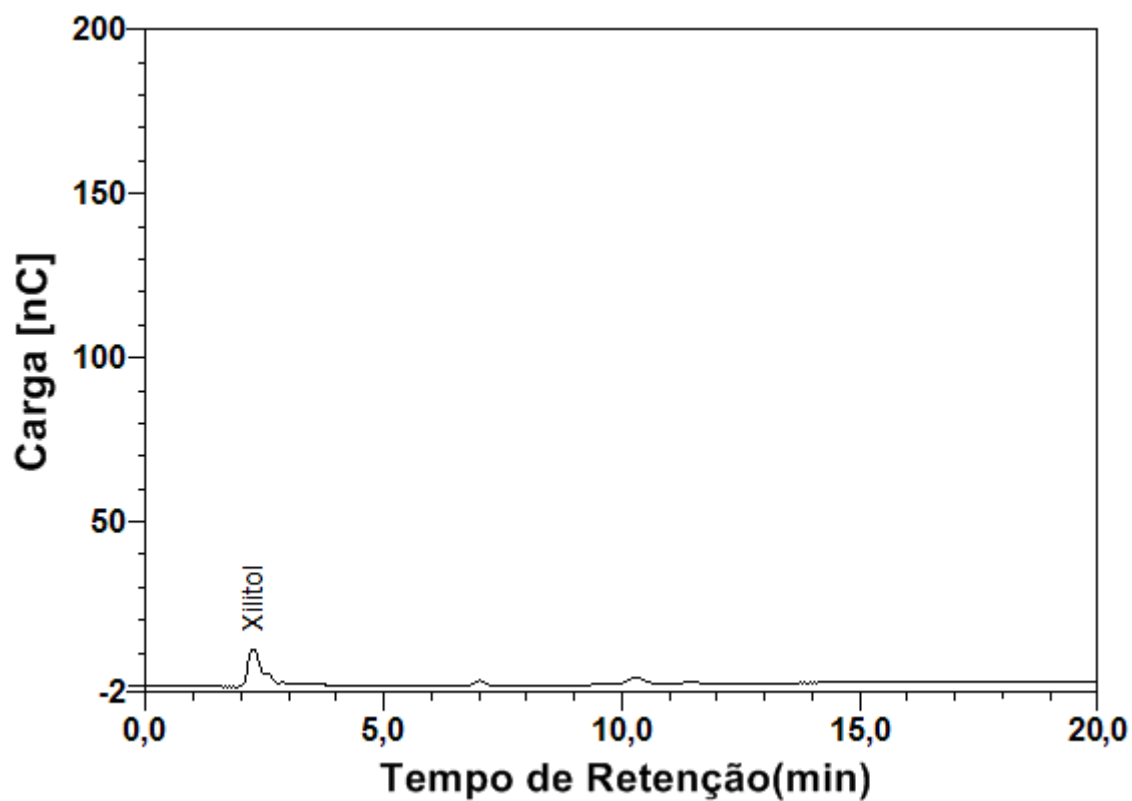
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,42	Xilitol	29,175	7,711	100,00	17,943	BMB*
Total:			29,175	7,711	100,00	17,943	

A11. Levedura *Cândida tropicalis* (S4) em licor negro hidrolisado em 72 horas de fermentação.



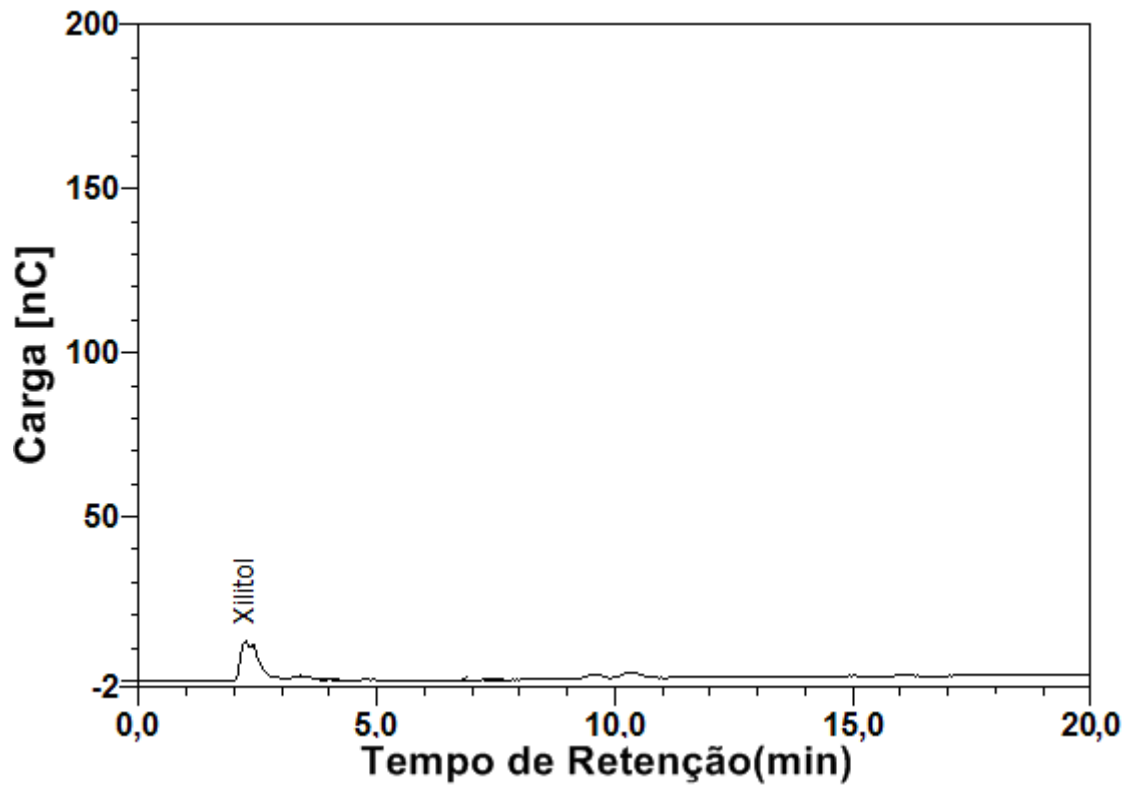
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,23	Xilitol	8,336	2,557	99,74	5,714	BMB*
2	11,45	Xilose	0,065	0,007	0,26	1,001	BMB
Total:			8,401	2,563	100,00	6,715	

A12. Levedura *Cândida tropicalis* (S4) em licor negro hidrolisado em 120 horas de fermentação.



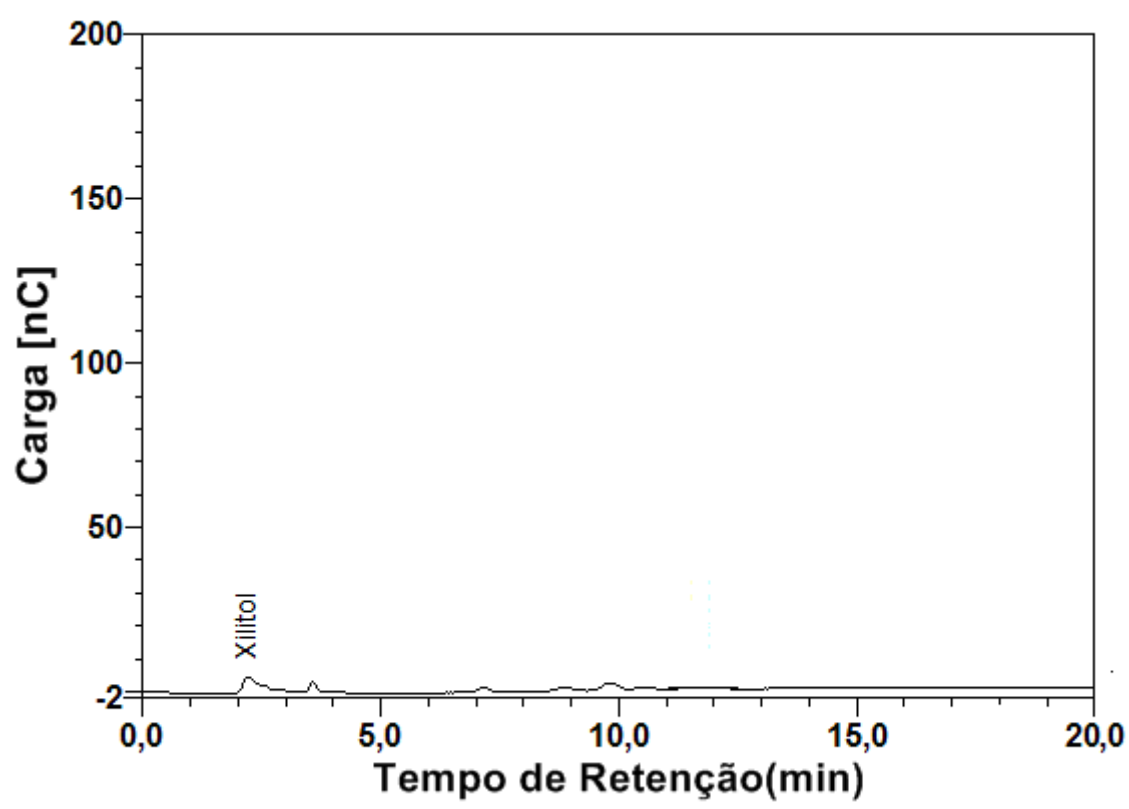
No.	Tempo Retenção min	Nome do Pico	Peso nC	Área nC*min	Rel.Área %	Valor µg/mL	Tipo
1	2,27	Xilitol	10,860	3,527	100,00	8,017	BMB*
Total:			10,860	3,527	100,00	8,017	

A.13. Levedura *Cândida tropicalis* (FP) em licor negro hidrolisado em 72 horas de fermentação.



No.	Tempo	Nome do Pico	Peso	Área	Rel.Área	Valor	Tipo
	Retenção min		nC	nC*min	%	µg/mL	
1	2,23	Xilitol	11,332	4,221	100,00	9,662	BMB*
Total:			11,332	4,221	100,00	9,662	

A.14. Levedura *Cândida tropicalis* (FP) em licor negro hidrolisado em 120 horas de fermentação.



No.	Tempo	Nome do Pico	Peso	Área	Rel.Área	Valor	Tipo
	Retenção min		nC	nC*min	%	µg/mL	
1	2,20	Xilitol	4,025	0,991	100,00	1,999	BMB*
Total:			4,025	0,991	100,00	1,999	

A.15 . Padrão de bandas gerado após clivagem com enzimas de restrição (*Hinfl*, *Cfol*, *HaeIII*).

