



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

ROSIMEIRE OENNING DA SILVA

**Bioprospecção de Leveduras Fermentadoras de Xilose Visando a
Produção de Etanol a partir de Bagaço de Cana-de-açúcar.**

São José do Rio Preto
Maio de 2015

ROSIMEIRE OENNING DA SILVA

**Bioprospecção de Leveduras Fermentadoras de Xilose Visando a
Produção de Etanol a partir de Bagaço de Cana-de-açúcar.**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Eleni Gomes
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Marney Pascoli Cereda

São José do Rio Preto
Maio de 2015.

Silva, Rosimeire Oenning da.
Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando
a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar /
Rosimeire Oenning da Silva. -- São José do Rio Preto, 2015
134 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes
Coorientador: Marney Pascoli Cereda
Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Levedos – Aplicações industriais.
3. Fermentação. 4. Bagaço de cana – Microbiologia.
5. Hemicelulose. 6. Etanol. I. Gomes, Eleni. II. Cereda, Marney
Pascoli. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 663.12

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

ROSIMEIRE OENNING DA SILVA

**Bioprospecção de Leveduras Fermentadoras de Xilose Visando a
Produção de Etanol a partir de Bagaço de Cana-de-açúcar.**

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Campus de São José do Rio Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Microbiologia.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dra. Eleni Gomes
Unesp – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dra. Ana Lúcia Barreto Penna
Unesp – São José do Rio Preto

Dra. Christiane da Costa Carreira Nunes
Unesp – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso
USP – Piracicaba

Prof^a. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini
UFSCAR – Araras

São José do Rio Preto
Maio de 2015.

*“ O aumento do conhecimento é como uma esfera dilatando-se no espaço:
quanto maior a nossa compreensão, maior o nosso contato com o desconhecido. ”*

Blaise Pascal

Dedico este trabalho aos meus pais Vitorino "In memoriam" e Alice que me propiciaram uma vida digna e honesta e ao meu esposo Epitacio junior e filhos Epitacio Neto e Maria Clara que estiveram sempre ao meu lado me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que sempre esteve ao meu lado, me guiando, me direcionando em cada passo dado durante todos os anos de minha existência, me fazendo ultrapassar as barreiras impostas pela vida, fazendo com que eu chegasse onde eu cheguei.

A Capes pela bolsa fornecida;

A Unemat pelo afastamento profissional concedido e pela bolsa em período parcial fornecida;

A minha orientadora Professora Dra. Eleni Gomes pela oportunidade e orientação.

A minha co-orientadora Professora Dra Marney Pascoli Cereda, por tudo que me ensinou, pela paciência, amizade e incentivo.

A colega Gisele por dividir comigo todo o conhecimento sobre os métodos e técnicas utilizados na pesquisa.

Aos colegas Priscila, Bruna, Fernanda, Olavo, Sydnei, Pedro, Diego, e Josiane pelo carinho e auxílio;

Ao meu esposo Epitácio, pela motivação, apoio, confiança e compreensão.

Aos meus filhos Maria Clara e Epitácio Neto, que deram um sentido maior a minha vida e são simplesmente toda a razão do meu esforço;

A minha mãe Alice e irmãos João, Sergio, Adriana e Eder pela atitude positiva que tiveram ao torcer por mim, acreditando que eu atingisse meus objetivos e realizasse meu sonho;

Ao meu pai Vitorino, que infelizmente não está mais entre nós, mas não poderia deixar de citar, pois esta sempre presente em minha mente;

Aos componentes da banca de defesa: Prof^a. Dra. Ana Lúcia Barreto Penna, Dra. Christiane da Costa Carreira Nunes, Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, Prof^a. Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini, agradeço antecipadamente pelas correções e orientações;

A Universidade Estadual Paulista – Campus de São José do Rio Preto e a todos os professores desta instituição pelos conhecimentos transmitidos.

A todos os funcionários, e colegas vinculados ao laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Rosimeire Oening da Silva

RESUMO

SILVA, R. O. **Bioprospecção de leveduras fermentadoras de xilose visando à produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 134 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São José do Rio Preto, 2014.

A biomassa lignocelulósica é fonte alternativa para a produção de etanol. Entre os substratos produzidos no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é abundante e disponível. Um uso compatível com a geração do bagaço seria a produção de etanol. Duas formas de hidrólise do bagaço são possíveis, a química e a enzimática. Qualquer que seja a via de hidrólise, o mosto conterá D-xilose por ser a pentose mais abundante na constituição do material lignocelulósico. A disponibilidade de micro-organismos que fermentam pentoses é imprescindível para desenvolvimento de processos de produção de etanol hemicelulósico. Para contornar essa limitação, a pesquisa buscou selecionar cepas de leveduras capazes de converter em etanol a xilose presente no meio semissintético e no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Para tanto realizou-se coletas de amostras de caldo de cana e flores, e o isolamento das cepas foi feito em meio contendo xilose como fonte de carbono. Fez-se uma triagem por meio dos testes biológicos de avaliação de produção de etanol seguindo a metodologia de rastreio em placas. As leveduras que apresentaram respostas positivas no teste das placas foram identificadas por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA. De um total de cento e sessenta e cinco cepas isoladas, quatro foram selecionadas por sua possível capacidade de fermentar D-xilose. Essas leveduras foram identificadas como *Wickerhamomyces anomalus*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Starmerella meliponinorum*. Foram feitas avaliações quantitativas da produção de etanol a partir da xilose e, para fins de comparação, também foi avaliada a produção de etanol a partir da glicose. As leveduras que produziram etanol em meio semissintético foram selecionadas para fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Para essa avaliação, o bagaço de cana foi submetido à hidrólise ácida, concentrado e destoxificado com carvão vegetal ativo. Foram analisados o crescimento e viabilidade celular por contagem em câmara de Neubauer, glicose, xilose, xilitol, ácido acético, glice-

Rosimeire Oenning da Silva

rol, furfural e 5-hidroximetilfurfural por cromatografia líquida e etanol por cromatografia gasosa. As leveduras selecionadas como produtoras de etanol a partir da xilose na avaliação quantitativa foram caracterizadas em relação a temperatura, acidez, agitação, aeração, concentração inicial de células, concentração de etanol, furfural e hidroximetilfurfural. Em todos os ensaios realizados, as leveduras apresentaram resultados satisfatórios quanto ao seu potencial para a produção de etanol a partir da glicose. Entretanto, das quatro leveduras avaliadas neste trabalho, apenas duas (*S. meliponinorum* e *S. pombe*) produziram pequenas quantidades de etanol a partir da xilose em meio semissintético e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. A levedura *S. meliponinorum* apresentou potencial para produção de xilitol apenas em meio semissintético, sendo inibida no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, apresentou resistência a ambientes ácidos e altas concentrações de etanol, sendo sensível a altas temperaturas, sendo essa sensibilidade ainda maior quando a fonte de carbono é xilose. As cepas *S. pombe* e *W. anomalous* FRP.04 apresentaram resistência térmica e de acidez. As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural avaliadas nesta pesquisa não influenciaram na viabilidade celular das leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum*. Nos ensaios em biorreator, a maior produção de xilitol foi alcançada no maior fluxo de ar/agitação (0,5 vvm/200 rpm) e não foi detectada produção de etanol em nenhuma das condições avaliadas.

Palavras-chave: Seleção. Fermentação. Hemicelulose. Etanol.

ABSTRACT

SILVA, R. O. Bioprospecting of xylose-fermenting yeasts Aiming to Produce Ethanol from bagasse Cane sugar. 2014. 134 p. Thesis (PhD in Microbiology) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sao Jose do Rio Preto, 2014.

The biomass lignocellulosic is an source alternative for the production of ethanol. Among the substrates produced in Brazil sugar cane bagasse is abundant and available. Compatible with the generation of bagasse use would be the production ethanol. Two ways are possible hydrolysis of bagasse, the chemical and enzymatic. Whatever the route of the hydrolysis the must contain D-xylose to be the most abundant pentose in the constitution of the lignocellulosic material. The availability of micro-organisms that ferment pentose sugars is essential for the development of processes for production of hemicellulosic ethanol. To overcome this limitation the research sought to select strains of yeast capable of converting xylose present in the semisynthetic medium and hemicellulose in bagasse hydrolyzate of cane sugar into ethanol. To both samples was performed on samples of flowers and cane juice and isolation of the strains was done in medium containing xylose as a carbon source. There was screened by means of biological tests for the evaluation of ethanol production following the methodology for screening plates. The yeasts that showed positive responses in the test plates were identified through sequencing of D1 / D2 domains of the rDNA. A total of one hundred sixty-five isolates, four were selected for their possible ability to ferment D-xylose. These Yeast were identified as Wickerhamomyces anomalus, Schizosaccharomyces pombe and Starmerella meliponinorum. Quantitative evaluation of ethanol production from xylose were made and for comparison were also evaluated ethanol production from glucose. The yeast that produced ethanol in semisynthetic medium were selected for fermentation of hemicellulose hydrolyzate bagasse cane sugar. For this evaluation sugarcane bagasse was subjected to acidic hydrolysis and concentrated detoxified with active charcoal. Cell growth and viability by counting in a Neubauer chamber, glucose, xylose, xylitol, acetic acid, glycerol, furfural and 5-hydroxymethylfurfural by liquid chromatography and ethanol were analyzed by gas chromatography. Selected as producing ethanol

Rosimeire Oenning da Silva

from xylose in the quantitative evaluation yeasts were characterized with respect to temperature, acidity, agitation, aeration, initial cell concentration, concentration of ethanol, furfural and hidroximetilfufural. In all tests, the yeast showed satisfactory results with regard to their potential for ethanol production from glucose. However the four yeasts evaluated in this study only two (S. pombe and S. meliponinorum) produced small amounts of ethanol from xylose in semisynthetic medium and bagasse hydrolyzate of cane sugar medium. The yeast S. meliponinorum shows potential for production of xylitol from xylose, however in this work this yeast produced substantial amounts of xylitol only in semisynthetic medium, being inhibited in hemicellulose hydrolyzate of bagasse cane sugar. The yeast S. meliponinorum has potential for xylitol production in medium semisynthetic, the hydrolyzed hemicellulose being inhibited from sugarcane bagasse showed resistance to acid environments and high concentrations of ethanol, sensitive to high temperatures, and this sensitivity even greater when the carbon source is xylose. Strains S. pombe and W. anomalus FRP.04 presented thermal and acid resistance. Concentrations of furfural and 5-hydroxymethylfurfural evaluated in this study had no effect on cell viability of the yeast S. pombe and S. meliponinorum. In the tests in bioreactors, most xylitol production was achieved in greater airflow / stirring (0.5 vvm / 200 rpm) and ethanol production was not detected in any of the evaluated conditions.

Keywords: Selection. Fermentation. hemicellulose. Ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Variedades de cana-de-açúcar plantadas e cultivadas no Brasil, safra 2012	21
Figura 2 - Dados estatísticos anuais de vendas de etanol hidratado, 2000-2012	22
Figura 3 - Dados de vendas de etanol carburante hidratado (a) e anidro (b) pelas unidades da região Centro-Sul.....	24
Figura 4 - Porcentagem da utilização do bagaço de cana para geração de energia por usinas do estado do Paraná.....	25
Figura 5 - Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.....	28
Figura 6 - Fluxograma da via biotecnológica de obtenção de etanol e xilitol a partir de glicose e xilose	30
Figura 7 - Vias de fermentação da xilose.....	32
Figura 8 - Reações que ocorrem durante a hidrólise de biomassa lignocelulósica ..	37
Figura 9 - Fluxograma geral das atividades desenvolvidas neste trabalho.	41
Figura 10 - Levedura <i>Wickerhamomyces anomalus</i> BB.10 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C.	59
Figura 11 - Levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C.....	60
Figura 12 - Levedura <i>Wickerhamomyces anomalus</i> FRP.04 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C.	61
Figura 13 - Levedura <i>Starmerella meliponinorum</i> cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C.....	62
Figura 14 - Levedura <i>Wickerhamomyces anomalus</i> BB.10 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0.....	65
Figura 15 - Levedura <i>Schizosaccharomyces pombe</i> BB.92 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0.	66
Figura 16 - Levedura <i>Wickerhamomyces anomalus</i> FRP.04 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0.	67

Figura 17 - Levedura <i>Starmerella meliponinorum</i> cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0.....	68
Figura 18 - Média dos valores dos parâmetros analisados durante fermentação em meio semissintético com xilose (símbolos fechados e linhas contínuas) e glicose (símbolos abertos e linhas pontilhadas) como fonte de carbono, pelas leveduras <i>W. anomalus</i> BB.10 (a); <i>S. pombe</i> (b); <i>W. anomalus</i> FRP.04 (c); e <i>S. meliponinorum</i> (d)	70
Figura 19 - Média dos valores dos parâmetros analisados durante fermentação em meio semissintético com xilose (símbolos fechados e linhas contínuas) e glicose (símbolos abertos e linhas pontilhadas) como fonte de carbono, pelas leveduras <i>W. anomalus</i> BB.10 (a); <i>S. pombe</i> (b); <i>W. anomalus</i> FRP.04 (c) e <i>S. meliponinorum</i> (d)	75
Figura 20 - Levedura <i>S. pombe</i> (a) e <i>S. meliponinorum</i> (b) cultivadas em meio de cultura YEPD e YEPX contendo 6, 10 e 15% de etanol (v/v), incubadas em agitação de 150 rpm por 96 horas	77
Figura 21 - Levedura <i>S. pombe</i> (a) e <i>S. meliponinorum</i> (b) cultivadas em meio de cultura YEPX contendo 0,02, 0,04 e 0,06% de furfural e 5-hidroximetilfurfural (v/v), separadamente, e incubadas em agitação de 150 rpm por 96 horas.....	78
Figura 22 - Comparação dos resultados de viabilidade celular de todos os fatores estressantes pH 3,0, 40 °C, 15% etanol, 0,06% furfural e 0,06% HMF (v/v) da levedura <i>S. pombe</i> (a) e <i>S. meliponinorum</i> (b) em 12 horas de cultivo.....	80
Figura 23 - a) Número de células; b) = viabilidade celular; e c) rendimento de crescimento (Y x/s) em fermentação sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm.	82
Figura 24 - Respostas metabólicas das leveduras <i>S. meliponinorum</i> (a) e <i>S. pombe</i> (b) em fermentação sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm em meio semissintético.....	83
Figura 25 - Parâmetros de fermentação em meio semissintético sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm com as leveduras <i>S. meliponinorum</i> (a - b) e <i>S. pombe</i> (c - d). ;.....	84
Figura 26 - Número de células, viabilidade celular e rendimento de crescimento (Y x/s) da levedura <i>S. Pombe</i> BB.92 (a - b) e <i>S. meliponinorum</i> FRP.09 (c - d) em fermentação com diferentes concentrações de células inoculadas.....	86

Figura 27 - Consumo de xilose, produção de etanol e xilitol pelas leveduras <i>S. pombe</i> (a) e <i>S. meliponinorum</i> (b) em fermentação com diferentes concentrações de células inoculadas.	88
Figura 28 - Parâmetros de fermentação em meio semissintético com diferentes concentrações de células inoculadas das leveduras <i>S. pombe</i> (a - b) e <i>S. meliponinorum</i> (c - d).	90
Figura 29 - Aspecto visual do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar antes (a) e após (b) destoxificação com carvão ativado.....	93
Figura 30 - Perfil de crescimento e viabilidade celular em 96 horas de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em temperatura de 28 °C e rotação de 150 rpm para <i>S. meliponinorum</i> e 32 °C e 100 rpm para <i>S. pombe</i>	95
Figura 31 – Consumo de açúcares, produção de etanol e xilitol durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico por 96 horas a temperatura de 28 °C e rotação de 150 rpm para <i>S. meliponinorum</i> e 32°C e 100 rpm para <i>S. pombe</i>	95
Figura 32 – Rendimento de etanol e xilitol, produtividade volumétrica de etanol e xilitol, rendimento de crescimento (a) e eficiência de conversão (b) durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar por 96 horas em temperatura de 32 °C para <i>S. pombe</i> e 30 °C para <i>S. meliponinorum</i>	96
Figura 33 - Rendimento de xilitol ($Y= p/s$) e crescimento ($Y= x/s$), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p) e eficiência de conversão (η) em fermentação realizada em biorreator Cellinggen 310 com meio semissintético com uma concentração de 70 g L ⁻¹ de xilose.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produtos da Indústria sucroalcooleira. Produção de etanol - Safra 2012/13 e 2013/14.	23
Tabela 2 - Composição Média do Bagaço de Cana-de-açúcar.....	26
Tabela 3 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida.....	29
Tabela 4 - Leveduras fermentadoras de xilose.	34
Tabela 5 - Local e substrato de isolamento das leveduras isoladas e identificação das leveduras selecionadas para produção de etanol a partir da xilose.	56
Tabela 6 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por Hidrólise ácida.	92
Tabela 7 – Média dos valores de consumo de xilose, produção de xilitol, etanol, número de células e viabilidade celular durante fermentação por 96 horas pela levedura <i>S. meliponinorum</i> em meio de cultura com 70 g L ⁻¹ de xilose, pH 4,0, 28 °C, com um inóculo inicial de 1,0 x 10 ⁸	99

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	17
2 - REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 - Cana-de-açúcar	19
2.2 - Etanol de primeira e segunda geração	21
2.3 - Bagaço de cana-de-açúcar como alternativa para produção de etanol	24
2.4 - Micro-organismos produtores de etanol: leveduras.	29
2.4.1 - Metabolismo de xilose em leveduras.....	29
2.4.2 - Leveduras metabolizadoras de xilose.....	33
2.4.3 - Fatores que influenciam a bioconversão de pentoses em etanol	35
3 - OBJETIVOS	40
3.1 - Objetivo Geral	40
3.2 - Objetivos Específicos.....	40
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	41
4.1 - Meio de cultura	42
4.2 - Coleta de amostras e isolamento de leveduras.	43
4.2.1 - Isolamento de leveduras de caldo de cana	43
4.2.2 - Isolamento de leveduras de Flores.....	44
4.3 - Avaliação biológica da produção de etanol a partir da xilose	44
4.4 - Identificação das leveduras.....	45
4.5 - Padronização do inóculo.....	45
4.5.1 - Padronização por peso para caracterização	45
4.5.2 - Padronização por número de células para fermentação	45
4.6 - Avaliação dos efeitos da temperatura e da acidez no crescimento e consumo de açúcares das leveduras selecionadas.	46
4.7 - Fermentação em meio semissintético.....	46
4.8 - Avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de etanol na viabilidade celular das leveduras selecionadas.	47
4.9 - Avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de furfural e 5 hidroximetilfurfural na viabilidade celular das leveduras selecionadas.	47
4.10 - Avaliação dos efeitos da agitação e de diferentes concentrações de células inoculadas na produção de etanol pelas leveduras selecionadas.	48

4.11 - Obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise ácida.	48
4.12 - Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	49
4.13 - Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão vegetal ativo.	49
4.14 - Preparo do meio de fermentação a base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	50
4.15 - Micro-organismos e preparo do Inóculo para Fermentação do hidrolisado hemicelulósico	50
4.16 - Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	50
4.17 - Fermentação em biorreator de cultivo submerso pela levedura <i>S. Meliponinorum</i>	51
4.18 - Métodos analíticos	51
4.18.1 - Massa celular.....	51
4.18.2 - Viabilidade Celular.....	51
4.18.3 - Determinação das concentrações de glicerol e ácido acético por HPLC	52
4.18.4 – Determinação das concentrações de Etanol por CG	52
4.18.5 - Determinação das concentrações de Glicose, arabinose, Xilose e Xilitol	52
4.18.5.1 - Método do Ácido Dinitrosalicílico - DNS	52
4.18.5.2 - Métodos Cromatográficos.....	53
4.18.6 - Determinação das concentrações de compostos fenólicos totais.....	53
4.18.7 - Determinação das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural	54
4.19 - Determinação dos parâmetros fermentativos	54
4.19.1 - Rendimento de etanol e xilitol ($Y_{p/s}$)	54
4.19.2 - Produtividade volumétrica de etanol e xilitol (Q_p).....	54
4.19.3 - Fator de conversão de xilose e glicose em biomassa ($Y_{x/s}$)	55
4.19.4 - Eficiência de conversão (η) de etanol.....	55
4.19.5 - Eficiência de conversão (η) de xilitol.....	55
4.20 – Estatística e análise dos resultados	55
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 - Isolamento, seleção e identificação das leveduras.....	56

5.2 - Avaliação dos efeitos da temperatura no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcares das cepas isoladas.....	57
5.3 - Avaliação dos efeitos da acidez no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcares das cepas isoladas.....	63
5.4 - Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica a partir da xilose	69
5.5 Avaliação dos efeitos do etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural sob a viabilidade celular das leveduras <i>S pombe</i> e <i>S. meliponinorum</i>	76
5.6 – Resistência das leveduras aos fatores estressantes	79
5.7 - Avaliação dos efeitos da agitação na produção de etanol a partir da xilose pelas leveduras <i>S. pombe</i> e <i>S. meliponinorum</i>	80
5.8 - Avaliação dos efeitos da concentração inicial de células na produção de etanol a partir da xilose pelas leveduras <i>S. pombe</i> e <i>S. meliponinorum</i>	85
5.9 - Caracterização química do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.....	91
5.10 - Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	94
5.11 - Fermentação em biorreator de cultivo submerso.....	97
6 - CONCLUSÕES	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
APÊNDICES.....	111
ANEXO.....	115

1 – INTRODUÇÃO

O etanol é produzido industrialmente a partir do caldo de cana-de-açúcar, melão ou a mistura de ambos, utilizando como micro-organismo fermentador a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Introduzida no Brasil no período colonial, a cana-de-açúcar se transformou em uma das principais culturas da economia brasileira, sendo cultivada em quase todas as regiões do Brasil para produção de açúcar e etanol, e seu cultivo continua em expansão. Esse aumento contínuo vem despertando a atenção de pesquisadores para um possível aumento excessivo da cultura canavieira e sua competição por área, com a produção de alimentos, além da devastação de matas nativas e extinção de espécies vegetais e animais.

Uma das alternativas para conseguir maior sustentabilidade é a inclusão de novas matérias-primas para aumentar a produção do etanol sem aumentar a área de plantio. Nesse contexto, o bagaço de cana é considerado matéria-prima de destaque para a produção de etanol de segunda geração, uma vez que contém açúcares polimerizados como celulose e hemicelulose, que podem ser liberados por hidrólise e, então, fermentados a etanol. Duas formas de hidrólise dos materiais lignocelulósicos são possíveis: a química e a enzimática. Qualquer que seja a via de hidrólise, o mosto conterá D-xilose por ser essa a pentose mais abundante na constituição do material hemicelulósico.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada no atual processo de produção de etanol, naturalmente não é capaz de metabolizar xilose liberada na sacarificação da hemicelulose, assim como é fortemente inibida por furfurais e compostos fenólicos derivados da lignina resultantes dos processos de hidrólise. Atualmente genes de leveduras que assimilam xilose foram utilizados para manipular a via de assimilação e fermentação de xilose em *S. cerevisiae* (STEENSEL et al.; 2014). Todavia as leveduras geneticamente modificadas precisam também ser tolerantes as condições industriais de fermentação. Alternativamente para o uso de pentoses seria a aplicação de linhagens capazes de transformar esses açúcares em etanol e serem tolerantes às condições estressantes do processo.

Diante do interesse na utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de matéria-prima e o desafio de tornar o etanol celulósico e hemicelulósico competitivo comercialmente, há a necessidade de buscar agentes melhor adaptados ao substrato

to. Esses micro-organismos deverão ser capazes de converter não apenas os açúcares fermentescíveis como a glicose, mas também os outros açúcares presentes no hidrolisado desse material, principalmente a xilose, derivada da hemicelulose, a qual encontra-se em grandes quantidades no bagaço.

Compreender o comportamento das leveduras durante o metabolismo de pentoses é um dos importantes requisitos para viabilizar a obtenção de etanol a partir dessas fontes renováveis. Dessa forma, as condições de cultivo da cepa utilizada no processo fermentativo de hidrolisados hemicelulósicos precisam ser bem estabelecidas. A concentração inicial de células, temperatura, taxa de aeração, pH e a agitação devem ser avaliados para se obter melhores rendimentos e produtividade em etanol. Além desses fatores, há também a necessidade de se avaliar a resistência das leveduras às condições estressantes no processo fermentativo, como altas temperaturas e presença de etanol, acidez, furfural e 5-hidroximetilfurfural.

Há uma grande diversidade de cepas de leveduras na natureza, as quais mesmo sendo da mesma espécie podem apresentar diferentes capacidades de adaptações às alterações ambientais. Em razão dessa diversidade, algumas leveduras podem apresentar melhor adaptação a uma determinada condição que outras. Sendo assim, a seleção de leveduras fermentadoras de pentoses, resistentes aos diversos fatores interferentes nesse processo, bem como o estabelecimento das condições ótimas de desenvolvimento dessas leveduras para conversão de xilose em etanol, é uma importante maneira de possibilitar o aumento da produtividade e melhorar a eficiência do processo.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Cana-de-açúcar

A cultura da cana-de-açúcar teve início na época do Brasil colônia, sendo uma das primeiras atividades econômicas brasileiras (CECCATO-ANTONINI, 2010) e possui uma valorização crescente em seu cultivo, sobretudo na demanda de produção de biocombustíveis (VOLTOLINI et al., 2012).

A cana-de-açúcar, uma planta advinda da Ásia Meridional, é a gramínea da qual se extrai o açúcar, um produto de suma importância para a economia brasileira (MOZAMBANI et al., 2006). Seus atuais cultivares são híbridos interespecíficos, sendo que, nas constituições genéticas, participam as espécies *Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sinense*, *S. barberi*, *S. robustum* e *S. edule* (JADOSKI et al., 2011). Trata-se de uma planta de reprodução sexuada, mas, quando cultivada comercialmente, é multiplicada assexuadamente, por propagação vegetativa. É caracterizada pela inflorescência do tipo panícula, flor hermafrodita, caule em crescimento cilíndrico composto de nós e entrenós, folhas alternas, opostas, presas aos nós dos colmos, com lâminas de sílica em suas bordas e bainha aberta (JADOSKI et al., 2011).

O clima ideal para a produção da cana-de-açúcar é aquele que apresenta duas estações distintas: uma quente e úmida para proporcionar a germinação, perfilhamento e desenvolvimento vegetativo; seguida de outra fria e seca, para promover a maturação e conseqüente acúmulo de sacarose (BRASIL, 2007).

As primeiras mudas chegaram ao Brasil em 1532, na expedição de Martim Afonso de Souza. Aqui, a planta espalhou-se no solo fértil de massapê, com a ajuda do clima tropical quente e úmido e da mão de obra escrava trazida da África. No mesmo ano, deu-se início ao cultivo na Capitania de São Vicente e foi construído o primeiro engenho de açúcar. Mas, foi através de forte incentivo do programa federal Proálcool (1975-79), premido pelas conseqüências da crise internacional do petróleo do início da década de 1970, que a cultura da cana-de-açúcar, até então concentrada no Nordeste brasileiro, região que mantinha a tradição dos grandes engenhos desde o período colonial, expandiu-se para o Centro-Sul do país (BRASIL, 2007).

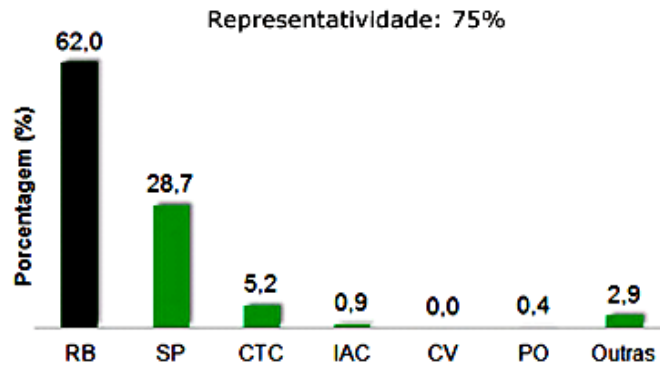
Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar respondendo por aproximadamente 33% da produção mundial (JADOSKI et al., 2011).

Quase todos os estados brasileiros são produtores e a lavoura continua em expansão no país. A área cultivada com cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2013/14 foi de aproximadamente 8.799.150 mil hectares, distribuídos em todos os estados produtores conforme suas características. O estado de São Paulo permanece como o maior produtor com 51,31% (4.515.360 hectares) da área plantada, seguido por Goiás com 9,3% (818.390 hectares), Minas Gerais com 8,0% (781.920 hectares), Paraná com 7,04% (620.330 hectares), Mato Grosso do Sul com 7,09% (624.110 hectares), Alagoas com 5,02% (442.590 hectares) e Pernambuco com 3,25% (286.030 hectares). Nos demais estados produtores, as áreas são menores, com representações abaixo de 3,0%. A área de cana-de-açúcar destinada à produção na safra 2013/2014 apresentou um crescimento de 3,70% ou 314.150 hectares em relação à anterior (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

A produção de cana-de-açúcar da Região Centro-Sul foi de aproximadamente 594,1 milhões de toneladas, 11,5% maior que a produção da safra anterior. A região Norte/Nordeste também apresentou um aumento em torno de 3,6%, passando dos atuais 55,93 milhões de toneladas da safra 2012/13 para 57,92 milhões na safra 2013/14. O total de cana-de-açúcar moída foi de 652,02 milhões de toneladas, com aumento de 10,7% em relação à safra 2012/13, que foi de 588,92 milhões de toneladas, 64,89 milhões de toneladas a mais que na safra anterior. A recuperação da produção, que foi severamente comprometida na safra passada, somando-se a um possível incremento de área, justifica essa estimativa de crescimento da produção (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013).

De acordo com dados da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (2013), ilustrados na Figura 1, as variedades de cana-de-açúcar mais cultivadas no Brasil são: RB, SP, CTC e IAC. O censo varietal 2009, realizado pela Ridesa (Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucrenergético) considerando todas as IFES (Instituições Federais de Ensino Superior) integrantes, mostrou que as variedades RB ocupam 62% dos canaviais do país, chegando, em algumas regiões, a representar áreas superiores a 70% da área cultivada.

Figura 1 - Variedades de cana-de-açúcar plantadas e cultivadas no Brasil, safra 2012



Fonte: Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro, 2013.

2.2 - Etanol de primeira e segunda geração

O setor sucroalcooleiro é uma das indústrias mais representativas do processo de desenvolvimento brasileiro (CECCATO-ANTONINI, 2010).

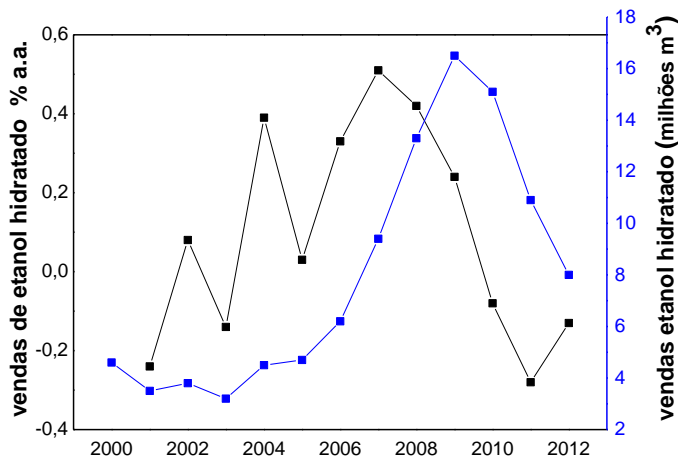
O conhecimento do Brasil na produção de etanol a partir da cana começou a ser desenvolvido no período colonial, quando os agricultores usavam-na para a produção de cachaça (BASSO; ROSA, 2010).

Porém, a produção de biocombustíveis foi insignificante até o fim da década de 1970. O panorama descrito mudou sensivelmente com a implantação, pelo governo brasileiro, em 1975, do Programa Nacional do Álcool (Proálcool), motivado, principalmente, pela grande elevação dos preços do petróleo, e desdobrou-se em duas etapas, que correspondem, aproximadamente, aos dois choques de oferta ocorridos. A primeira, que estabelecia a adição de álcool à gasolina, estendeu-se de 1975 a 1979, enquanto a segunda, orientada para veículos exclusivamente a álcool, foi de 1979 até a segunda metade da década de 1980. Após um período de estagnação de cerca de 15 anos – motivada, essencialmente, pela queda dos preços do petróleo – a produção mundial de etanol voltou a crescer acentuadamente. Dois fatores principais explicam esse crescimento: primeiro, a partir de 2003, a legislação de diversos estados norte-americanos determinou que o éter metil-terbutílico (TBE), utilizado como aditivo à gasolina causando problemas ambientais, fosse substituído pelo etanol; e, segundo, o Brasil introduziu, também em 2003, os veículos com motor flexível (ROSA; GARCIA, 2009). Hoje, mais de 80%

da frota nacional de veículos rodam ou somente com etanol ou com a mistura de gasolina e etanol. Além disso, também já foram desenvolvidos motores para aeronaves movidas por etanol (SOCCOL et al., 2010).

Os movimentos de demanda por etanol no período de 2000 a 2012 apresentaram pelo menos três momentos bastante marcantes (Figura 2): de 2000 a 2003, quando a frota de veículos a etanol apresentava queda; de 2004 a 2009, com a entrada no mercado dos veículos flex-fuel e preços competitivos em relação à gasolina; e de 2010 a 2012, anos em que as safras de cana e a produção de etanol não foram suficientes para manter a competitividade do produto (AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS E BIOCOMBUSTIVEL, 2013). Todavia, de acordo com levantamento feito pela Companhia Nacional de Abastecimento (2013), a produção de etanol, mesmo diante de uma nova crise, voltou a subir com um total de 23,64 bilhões de litros de etanol na safra 2012/2013, 0,91% maior que a produção da safra 2011/12, e de aproximadamente 27,17 bilhões de litros na safra 2013/14, com um incremento de 3,53 bilhões de litros, alta de 14,94% (Tabela 1). Desse total, 12,02 bilhões de litros foram de etanol anidro e 15,16 bilhões de litros, de etanol hidratado.

Figura 2 - Dados estatísticos anuais de vendas de etanol hidratado, 2000-2012



Fonte: Adaptado de Agência Nacional de Petróleo Gás e Biocombustível (2013).

Outro fator positivo para o setor sucroalcooleiro é o aumento no percentual de 25 para 27,5% de etanol anidro adicionado na gasolina. Esta mudança foi resultado da alteração da legislação, no ano passado, com a publicação da Lei nº 13.033, em 25 de setembro de 2014, que condicionou o aumento da mistura à comprovação de sua viabilidade técnica. A mudança foi concretizada após diversos testes os quais

apontaram a viabilidade técnica e ambiental da utilização de gasolina com 27,5% de etanol anidro (ÚNICA, 2015).

Tabela 1 - Produtos da indústria sucroalcooleira. Produção de etanol – safras 2012/13 e 2013/14

Região/UF	Safra 2012/13	Safra 2013/14
	Etanol total (em 1.000 Litros)	Etanol total (em 1.000 Litros)
Norte	206.807,2	263.603,0
Nordeste	1.640.584,6	1.629.356,7
Centro-Oeste	6.029.921,8	6.970.563,9
Sudeste	14.458.339,3	16.795.264,6
Sul	1.304.812,2	1.513.700,1
Norte/Nordeste	1.847.391,8	1.892.959,8
Centro-Sul	21.793.073,3	25.279.528,6
Brasil	23.640.465,1	27.172.488,4

Fonte: COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2013.

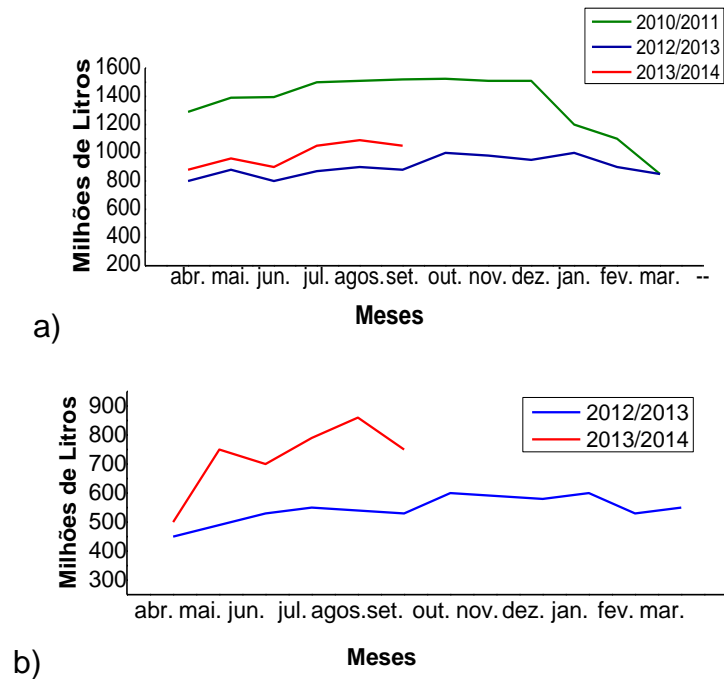
Houve um aumento na produção de etanol na safra 2012/2013 em relação à anterior; no entanto, as vendas de etanol carburante anidro e hidratado, de acordo com dados coletados até setembro de 2013 e divulgados pela UNICA (2013), somente voltaram a subir nos anos 2013/14 em relação a 2012/13, conforme mostra a Figura 3.

Os biocombustíveis têm sido objeto de grande interesse nos últimos anos, uma vez que sua utilização contribui para reduzir a emissão de gases ligados ao efeito estufa e, portanto, para a mitigação do aquecimento global. Além disso, os biocombustíveis poderiam constituir uma das alternativas ao petróleo, cuja oferta mundial deverá sofrer consideráveis restrições no futuro previsível. Os biocombustíveis, no entanto, enfrentam uma limitação fundamental na sua produção: originam-se, em geral, de plantas que exigem áreas de cultivo extensas. Assim, mesmo que no momento não haja conflito no uso da terra para biocombustíveis e alimentos, isso poderá ser verificado a longo prazo se o volume de petróleo a substituir for significativo (ROSA; GARCIA, 2009).

Os problemas associados à expansão do plantio de cana-de-açúcar explicam a atenção dos pesquisadores voltada aos processos avançados de

obtenção de etanol de segunda geração. De fato, tais processos permitem o uso de matérias-primas vegetais de baixo custo, como resíduos agrícolas e industriais.

Figura 3 - Dados de vendas de etanol carburante hidratado (a) e anidro (b) pelas unidades da região Centro-Sul



Fonte: Adaptado de ÚNICA (2013).

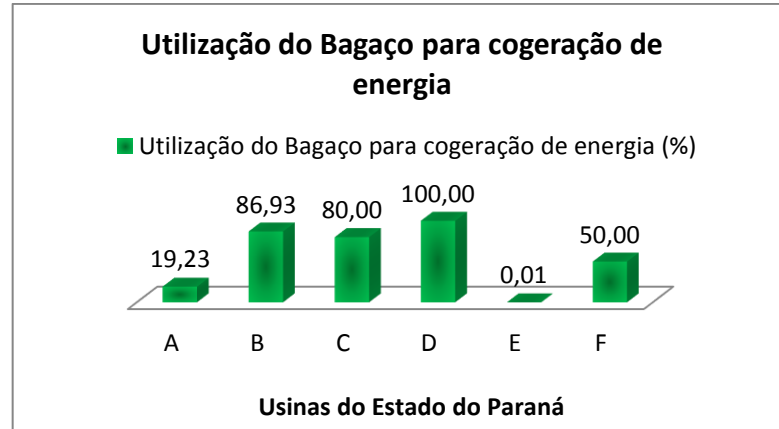
Com a tecnologia da hidrólise de materiais lignocelulósicos, o Brasil conseguirá aumentar ainda mais a produtividade agroindustrial da cadeia sucroalcooleira sem aumentar a área de plantio, principalmente se forem utilizados não apenas os açúcares da fração celulósica mas também as pentoses da fração hemicelulósica.

2.3 - Bagaço de cana-de-açúcar como alternativa para produção de etanol de segunda geração

Uma das alternativas das indústrias para continuar aumentando a produção de etanol sem aumentar a área de plantio é utilizar os resíduos formados. O bagaço de cana-de-açúcar certamente ocupa uma posição de destaque nas atividades agrícolas brasileiras. A produção anual de bagaço atinge enormes quantidades, levando

ao reconhecimento de que ele também pode ser utilizado na produção de combustível. De acordo com o levantamento da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2013), foram moídas, na safra 2013/14, aproximadamente 652 milhões de toneladas. Esses valores são correspondentes a aproximadamente 163 milhões de toneladas de bagaço de cana, considerando a proporção indicada por Procknor (2000). Com alto teor de fibras, o bagaço de cana, desde a revolução industrial, tem sido empregado na produção de vapor e energia elétrica para a fabricação de açúcar e etanol, garantindo a autossuficiência energética das usinas durante o período da safra. Mas, além de atender às necessidades de energia das usinas, desde a década de 1980, o bagaço tem permitido a geração de excedentes de energia elétrica que são fornecidos para o sistema elétrico brasileiro (SOUZA, 2013) e, mesmo assim, em muitas usinas há sobra de bagaço conforme mostra pesquisa feita por Silva, Garcia e Silva (2010), em seis usinas do estado do Paraná, ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Porcentagem da utilização do bagaço de cana para geração de energia por usinas do estado do Paraná



Fonte: Adaptado de Silva, Garcia e Silva (2010).

O bagaço é um subproduto obtido em grandes quantidades após moagem da cana para a extração do caldo, em um processo que ocorre nos ternos das moendas das empresas produtoras de açúcar e etanol. A utilização desse subproduto na produção de etanol hemicelulósico proporcionará um aumento significativo na produção nacional de biocombustíveis.

De maneira geral, as fibras do bagaço de cana são compostas por celulose, hemicelulose e lignina, bem como outros componentes em menor quantidade.

Afrações de celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos, uma fonte potencial de açúcares fermentáveis (MEDINA, 2013).

A celulose, componente estrutural presente na parede celular das plantas, é um homopolímero linear de subunidades de glicose associadas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo a celobiose a unidade repetitiva do polímero. Em uma molécula de celulose, pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares. Essas estruturas são formadas devido à presença de ligações covalentes, pontes de hidrogênio e forças de Van de Waals (AGBOR et al., 2011).

A Tabela 2 mostra a composição média característica do bagaço de cana na qual a fibra é a matéria insolúvel em água contida na cana-de-açúcar e o Brix, o teor de sólidos solúveis em água.

Tabela 2 - Composição média do bagaço de cana-de-açúcar

Composição química (%)	
Carbono	39,7 - 49
Hidrogênio	5,5 - 7,4
Oxigênio	40 - 46
Nitrogênio e cinzas	0 - 0,3
Propriedades fisico-químicas (%)	
Umidade	50
Fibras	46
Brix	2
Impurezas Minerais	2
Composição média da fibra do bagaço (%)	
Celulose	26,6 - 40,3
Hemicelulose	14,3 - 24,4
Lignina	22,7 - 29,7

Fonte: Rosa e Garcia, 2009.

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos ramificados, também encontradas na parede celular de plantas e classificadas de acordo com o açúcar presente em sua molécula. Também chamadas de polioses, diferem substancialmente da celulose por serem amorfas, com estrutura ramificada e composta pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxiexoses). Elas têm peso molecular menor comparadas com a celulose e ramificações de cadeias laterais pequenas mais facilmente hidrolisáveis (AGBOR et al., 2011). As polioses são classificadas de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomanas e galactanas. A cadeia principal pode ser um homopolímero,

como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas, e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal (AGBOR et al., 2011). A xilana pode ser hidrolisada em seus açúcares monômeros constituintes (glicose, xilose, arabinose, galactose, manose e outros oligossacarídeos). A xilose é o maior componente da hemicelulose da maioria das plantas, fazendo parte de um complexo de carboidratos poliméricos incluindo xilana, um polímero de xilose, e xiloglicana, um heteropolímero de D-xilose e D-glicose (SILVA et al., 2009).

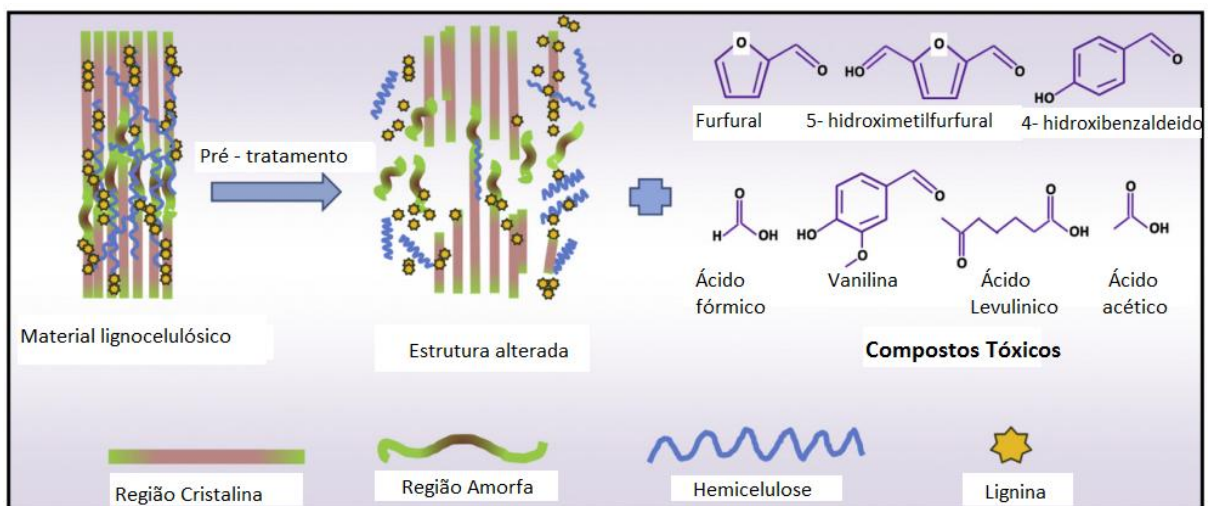
A lignina é constituída por ligações poliméricas tridimensionais entre unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações entre os monômeros, resultando em uma estrutura polifenólica complexa, a qual não pode ser convertida em açúcar fermentável. A lignina se comporta como uma rede tridimensional insolúvel, desempenhando um papel importante na resistência e desenvolvimento da célula e atuando também como ligante entre as células, criando um material composto que tem uma notável resistência ao impacto, compressão e flexão (HARMSEN et al., 2009).

Tendo em vista que materiais lignocelulósicos são compostos por complexos polímeros heterogêneos de carboidratos, densamente envolvidos pela lignina, sua utilização em aplicações biotecnológicas requer uma separação seletiva desses constituintes. A primeira etapa dessa separação é o chamado pré-tratamento, no qual diferentes métodos físicos e químicos, assim como suas combinações, podem ser empregados para promover a redução da cristalinidade da celulose, elevar a área superficial da biomassa e remover a hemicelulose e/ou a lignina (BINOD et al., 2010). Os métodos físicos geralmente são empregados como uma etapa inicial dos processos de fracionamento. Tratamentos físicos como a moagem e a trituração são processos que têm por finalidade a redução de tamanho, levando à redução da cristalinidade da celulose e facilitando etapas posteriores de tratamentos químicos e enzimáticos (SUN; CHENG, 2002; BINOD et al., 2010).

Entre os métodos químicos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos disponíveis, a hidrólise ácida é uma das tecnologias mais antigas e aplicadas para converter lignoceluloses em açúcares fermentáveis (JEFFRIES; JIN, 2000). Os ácidos utilizados como agentes hidrolíticos são os nítrico, clorídrico, fosfórico e o sulfúrico, sendo este último o mais usado no pré-tratamento (CORAL, 2009). Essa hidrólise é empregada para hidrolisar a hemicelulose e tornar a celulose mais acessível

ao agente hidrolítico, para um processo subsequente de hidrólise enzimática da celulose para sua utilização na produção de etanol celulósico (CANILHA et al., 2011). Na hidrólise ácida, utiliza-se geralmente H_2SO_4 , havendo uma variação no tempo e temperatura, empregando-se normalmente 120 a 130 °C para tempos de 30 minutos. No final do tratamento, o líquido contém açúcares, essencialmente pentoses provenientes da hidrólise da hemicelulose, enquanto o resíduo sólido contém a parte celulósica e a lignina (POURQUIE; VANDECASTEELE, 1985).

Figura 5 - Representação esquemática da ação do pré-tratamento sobre o material lignocelulósico.



Fonte: Phitsuwan et al., 2013.

Arruda (2011) descreve na Tabela 3 a constituição do bagaço de cana após hidrólise ácida. Como se vê, a pentose mais disponível é a xilose. Devido à grande quantidade produzida e as suas características físicas e químicas, o bagaço de cana tem sido alvo de vários estudos visando a seu potencial energético no que diz respeito à produção de biocombustível. Pode-se observar, também na Tabela 3, a presença, nos hidrolisados ácidos, de compostos que podem inibir a atividade fermentativa das leveduras.

Em função da formação e/ou liberação desses compostos nos hidrolisados, diferentes métodos de destoxificação são avaliados, havendo um destaque para o de adsorção por carvão vegetal ativado (MARTON, 2002). Esse método se baseia na capacidade desse material poroso de origem natural em adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas através de forças fracas denominadas de Van

Der Waals (COSIDINE, 1974). A eficiência desse método depende das condições sob as quais o processo de adsorção é realizado, principalmente quanto ao pH, tempo de contato, temperatura e concentração do carvão, conforme constatado por Marton (2002), em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Arruda (2011), utilizando a metodologia de adsorção por carvão vegetal ativado na concentração de 1,0% (m/v), em temperatura de 60 °C e tempo de 30 min, alcançou uma redução de 84% de furfural, 57% de 5-hidroximetilfurfural e 80% de fenólicos.

Tabela 3 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida.

Características	Original
Propriedades físicas	
pH	1,52
^o Brix	3 ^o
Açúcares (g-L⁻¹)	
Xilose	15,73
Glicose	1,82
arabinose	1,45
Ácidos carboxílicos (g-L⁻¹)	
Ácido acético	2,31
Furanos (g-L⁻¹)	
Furfural	0,188
5-hidroximetilfurfural	0,024
Fenóis totais (g-L⁻¹)	
	5,48
Inorgânicos (mg-L⁻¹)	
Mn	Nd.
Fe	161,85
Mg	51,05
Ni	38,98
Ca	34,85
Zn	Nd
Na	24,85
K	100,50

Fonte: Arruda, 2011.

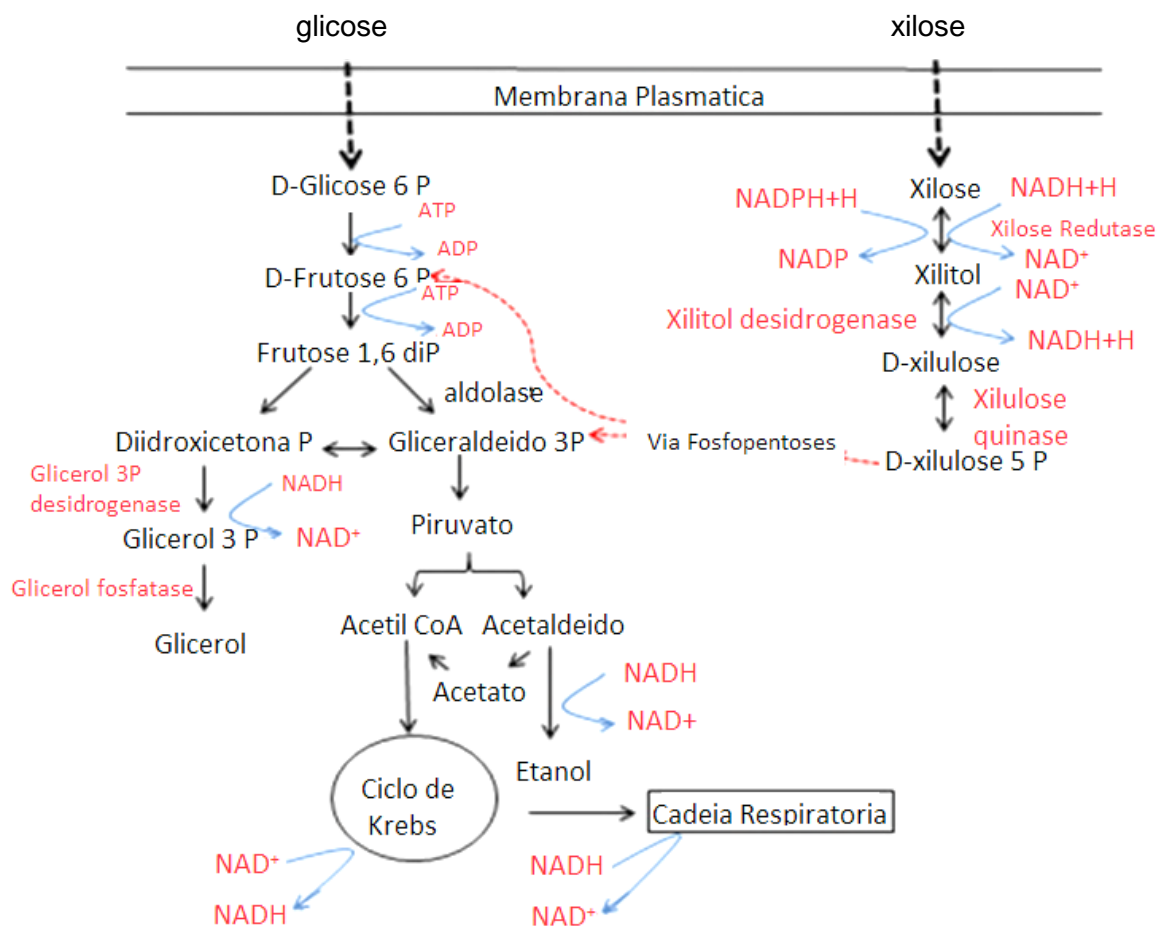
Ferreira (2010), utilizando uma maior concentração (2,5% m/v) de carvão numa temperatura de 30 °C por 1 hora, conseguiu uma redução de 83% de furfural e 92% de 5-hidroximetilfurfural, comprovando a eficiência desse método para destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

2.4 - Micro-organismos produtores de etanol: leveduras

2.4.1 - Metabolismo de xilose em leveduras

Entre as leveduras conhecidas como assimiladoras de D-xilose, um pequeno número é capaz de fermentar esse açúcar a etanol (VAN MARIS et al., 2006). A rota metabólica da xilose, descrita pela primeira vez por Gunsalus, Horecker e Wood (1955), ilustrada na Figura 6, relaciona o metabolismo da xilose à via das fosfopentoses por meio da conversão da xilose em xilulose 5-fosfato. Nesse processo, a xilose passa por duas reações sequenciais de oxi-redução. Conforme ilustrado na Figura 6, na primeira reação a xilose redutase (XR), na presença da coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não, em sua forma reduzida (NADPH e/ou NADH), transforma D-xilose em xilitol (TAYLOR et al., 1990).

Figura 6 - Fluxograma da via biotecnológica de obtenção de etanol e xilitol a partir de glicose e xilose



Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al. (1994).

O xilitol formado pode então ser excretado ao meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), com a participação de NAD^+ como coenzi-

Rosimeire Oenning da Silva

ma. A xilulose produzida é fosforilada pela enzima xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses (SLININGER; BOLEN; KURTZMAN, 1987). Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeídos-3P são metabolizados na glicólise (via Embden Meyerhof Parnas – EMP), sendo levados a piruvato, o qual pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, sendo, nesse processo, reoxidado o NADH resultante da oxidação de gliceraldeído 3P (FUGITA, 2010).

O metabolismo de xilose em leveduras é parcialmente regulado pela disponibilidade de oxigênio. As principais oxido-redutases do metabolismo de D-xilose, xilulose redutase e xilitol desidrogenase apresentam diferentes especificidades pelos cofatores necessários a essa conversão: XR é dependente de NADPH ou NADH como cofator, apresentando, em geral, uma maior preferência por NADPH; XDH é dependente de NAD⁺ ou NADP⁺, com maior preferência por NAD⁺. Dessa forma, na maioria dos micro-organismos fermentadores de xilose até então estudados, a conversão da xilose em xilulose implica na produção de um NADP⁺ e um NADH, sendo que NADPH e NAD⁺ necessitam ser regenerados a fim de se manter o balanço redox. Para o NADPH, isso pode ser obtido pelo desvio de parte da frutose 6-fosfato produzida na etapa oxidativa para a via da pentose fosfato (JEFFRIES; JIN, 2004).

Sob condições aeróbias, o NADH pode ser reoxidado via cadeia respiratória com o oxigênio molecular. Contudo, sob condições anaeróbias, outro aceptor de elétron é necessário para re-oxidar o NADH (JEFFRIES; JIN, 2004). A regeneração de NAD⁺ pela reação de xilitol desidrogenase pode ser efetuada por meio da redução de diidroxiacetona a glicerol, no entanto a formação de glicerol não é considerada ideal, visto que desvia o carbono da produção de etanol (JEFFRIES, 2006).

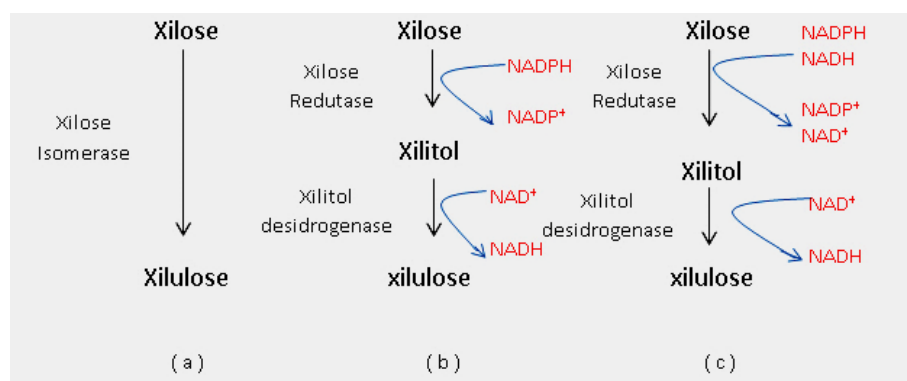
Conforme descrito acima, é conhecido que as enzimas xilulose redutase e xilitol desidrogenase, dependendo da levedura, podem ter especificidade diferentes em relação aos seus cofatores. Essa especificidade aos cofatores pode estar relacionadas ao tipo de produto de fermentação obtido da assimilação de xilose (FELIPE, 2013). As leveduras com as atividades de xilulose redutase ligadas ao NADH e NADPH regeneram o NAD⁺ consumido na segunda etapa do metabolismo da xilose. Nesse caso, o produto principal é o etanol e não há acumulação de xilitol devido ao

equilíbrio redox entre os cofatores. Em contrapartida, as leveduras que consomem D-xilose apenas por atividade de xilose redutase dependente de NADPH (com completa ausência de NADH ligada a xilose redutase) na primeira etapa do metabolismo de D-xilose acumulam xilitol (AMARAL-COLLAÇO et al., 1989). A exemplo do disposto, as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Pachysolem tannophilus* possuem especificidades para ambos os cofatores reduzidos (NADH e NADPH) e oxidados (NAD⁺ e NADP⁺) (BRUINENBERG et. al., 1984), enquanto a levedura *Candida guilliermondii* possui enzima xilose redutase dependente de NADPH e a xilitol desidrogenase é NAD⁺ ou NADP⁺ (SILVA et. al., 1996).

Segundo Agbogbo e Coward-Kelly (2008), *S. stipitis* é uma das poucas espécies de leveduras capazes de fermentar xilose a etanol sob condições anaeróbias. Isso pode ser explicado pela presença de mecanismos que visam diminuir a produção de xilitol, visto que esse é um subproduto gerado durante a conversão de xilose e que reduz o rendimento final de etanol. Esses mecanismos consistem na utilização de ambos os cofatores (NADH e NADPH) pela enzima xilose redutase, característica também presente em outros micro-organismos, como *Pachysolem tannophilus* (VERDUYN et al., 1985). O benefício da utilização do NADH pela xilose redutase é o equilíbrio total de cofatores e, portanto, ocorre baixa ou nenhuma produção de xilitol.

A Figura 7 mostra as vias de fermentação de xilose para a maioria das bactérias (7 a), para a maioria dos fungos e leveduras (7 b) e para algumas espécies de leveduras (7 c).

Figura 7 - Vias de fermentação da xilose



Fonte: Agbogbo e Coward-Kelly, 2008.

Em uma segunda via metabólica, a xilose pode ser isomerizada diretamente a xilulose, reação catalisada pela enzima xilose isomerase (XI). Essa via (ilustrada na Figura 7 a), que não produz xilitol, é funcional na maioria dos procariotos (ex.: *Escherichia coli*, *Streptomyces sp*), em alguns fungos (ex.: *Piromyces*) e nas plantas (*Hordeum vulgare*, *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*), mas até o presente não foi descrita em leveduras (MADHAVAN et al., 2009).

2.4.2 - Leveduras metabolizadoras de xilose

O conhecimento sobre espécies que fermentam pentoses ainda é limitado (HAHN-HARGERDAL et al., 1994). A Tabela 4 elenca as principais espécies que fermentam xilose com suas respectivas referências. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais frequentemente utilizado na produção industrial de etanol, a partir do caldo de cana, devido à sua capacidade de crescimento em meio com alta concentração de açúcar e ao seu alto rendimento de etanol (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2005).

No entanto, para produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, o micro-organismo ideal deve ser capaz de metabolizar pentoses e hexoses, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente apresenta eficiência apenas na fermentação de hexoses, não sendo indicada para fermentação de xilose, que é um dos principais constituintes da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos (HAMACHER et al., 2002).

As espécies *Scheffersomyces shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Scheffersomyces stipitis* são indicadas na literatura, como as mais aptas a alcançar altos rendimentos de etanol na fermentação alcoólica a partir de xilose com Yp/s em torno de 0,38, 0,36 e 0,49 g g⁻¹ respectivamente (ANTUNES et al., 2014; CHENG et al., 2008; YU et al., 2015).

Cheng et al. (2008), em pesquisa realizada com hidrolisado ácido de bagaço de cana contendo 45 g L⁻¹ de xilose, utilizando a levedura *Pachysolen tannophilus*, alcançaram uma concentração, rendimento (Yp/s) e produtividade (Qp) de etanol de 21,9 g L⁻¹, 0,36 g g⁻¹ de açúcar e 0,73 g L⁻¹h⁻¹, respectivamente. Nesses experimentos, a fermentação foi concluída em 30 horas com um consumo de 94% da xilose.

Outros resultados foram encontrados por Yu et al. (2015), quando avaliaram os efeitos de diferentes tratamentos de destoxificação em hidrolisado de bagaço de cana na produção de etanol por *S. stipitis* CBS 6054, alcançando um rendimento, produtividade e eficiência de conversão de 0,49 g g⁻¹, 0,09 g g⁻¹ h⁻¹ e 49%, respectivamente.

Tabela 4 - Leveduras fermentadoras de xilose

Leveduras	Referência
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	YU et al., 2015
<i>Rhodotorula glutinis</i>	ROVIERO et al., 2015
<i>Candida tropicalis</i>	CHENG et al., 2014
<i>Scheffersomyces shehatae</i>	ANTUNES et al. 2014
<i>Candida intermedia</i>	KALHORINIA et al., 2014
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	MARTINI, 2014
<i>Spathaspora roraimanensis</i>	MOURO, 2012
<i>Spathaspora suhii</i>	MOURO, 2012
<i>Candida xilofermentans</i>	MOURO, 2012
<i>Spathaspora arborariae</i>	Da CUNHA-PEREIRA et al., 2011
<i>Candida guilliermondii</i>	ARRUDA & FELIPE, 2009
<i>Pachysolen tannophilus</i>	CHENG et al., 2008
<i>Spathaspora passalidarum</i>	NGUYEN et al., 2006
<i>Candida blankii</i>	PETRUS, 1991
<i>Candida tenuis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Brettanomyces naardenensis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Pichia segobiensis</i>	TOIVOLA, 1984
<i>Kluyveromyces cellobivorus</i>	WALKER, 1998
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	WALKER, 1998
<i>Debaryomyces polymorpha</i>	WALKER, 1998
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	GONG et al., 1983

Fonte: Adaptado de Pereira, 2011.

Quatro formulações de meios de fermentação diferentes foram avaliadas para a produção de etanol por *S. shehatae* UFMG-HM 52,2 utilizando bagaço de cana hidrolisado hemicelulósico como a principal fonte de carbono. O hidrolisado com a

suplementação 5 g L⁻¹ sulfato de amônio, 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g L⁻¹ de extrato de malte apresentou um rendimento de etanol de 0,38 g g⁻¹ e produtividade de 0,19 g L⁻¹h⁻¹ (ANTUNES, 2014).

Chandel et al. (2007) avaliaram os efeitos de diferentes tratamento de desintoxicação em hidrolisado hemicelulósico sobre a produção de etanol por *Candida shehatae* NCIM 3501. A fermentação desses hidrolisados contendo 19,5 g xilose, 2,09 de glicose e 1,83 g de arabinose, somando um total de 23,41 g açúcares iniciais com *Candida shehatae* NCIM 3501, resultou em uma produção de 8,67 g de etanol com um rendimento máximo de etanol (0,48 g / g) a partir de hidrolisado ácido tratado com resina de troca iônica, seguido por adsorção por carvão ativado (0,42 g / g) e lacase (0,37 g / g).

Kalhorinia et al. (2014) avaliaram a produção de etanol pela levedura *Candida intermedia* MTCC 1404 em meio semissintético contendo xilose como fonte de carbono e encontraram uma produção de etanol de 9 g L⁻¹ com rendimento de 0,3 g g⁻¹, em temperatura de 30 °C, pH de 5,5 e rotação de 150 rpm.

Mouro (2012) pesquisou a capacidade fermentativa de diversas leveduras isoladas da biodiversidade brasileira. O meio de cultura era composto de 2% de peptona, 1% de extrato de levedura e concentrações variáveis de fonte de carbono de interesse (glicose, celobiose e/ou xilose), ajustando para o pH 5 com HCl incubadas em frascos erlenmeyers, contendo 1/5 do seu volume de meio, em agitadores orbitais a 28°C e 160 rpm. Os resultados obtidos revelaram que as leveduras do gênero *Spathaspora* foram capazes de fermentar eficientemente a xilose e glicose, consumindo esses açúcares em menos de 20 horas e produzindo 5-6 g L⁻¹ de etanol. Boa parte das leveduras *S. passalidarum* e alguns isolados de *Candida shehatae* apresentaram melhor produção de etanol a partir de xilose alcançando rendimentos de 0,41 e 0,48 g etanol g⁻¹ xilose, respectivamente. As leveduras *Scheffersomyces stipitis* apresentaram praticamente a mesma produção de etanol a partir de ambos os açúcares – 0,42 g etanol g⁻¹ xilose/glicose.

2.4.3 - Fatores que influenciam a bioconversão de pentoses em etanol

A bioconversão de pentoses em etanol é um processo complexo influenciado por vários fatores, como condições de cultivo (temperatura, pH inicial, aeração e agi-

tação), composição do meio de fermentação (concentração inicial de açúcares iniciais, nutrientes), cepa utilizada, concentração inicial de células, tipo de cepa (MEDINA, 2013), tolerância ao etanol e a outros compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósicos e presença de glicose, que pode atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose (WALKER, 1998). Diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de pentoses, por meio da compreensão e da otimização das condições de processo empregadas e dos diferentes micro-organismos utilizados (MEDINA, 2013).

Durante o processo de hidrólise ácida, pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação. A presença desses inibidores em hidrolisados hemicelulósicos também constitui uma barreira a ser superada nos processos fermentativos, visto que parte desses compostos são liberados durante o processo de hidrólise, a partir da degradação de açúcares e lignina. A presença de ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, compostos fenólicos, entre outros, pode afetar o crescimento celular e, conseqüentemente, a produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; MARTÍN et al., 2007).

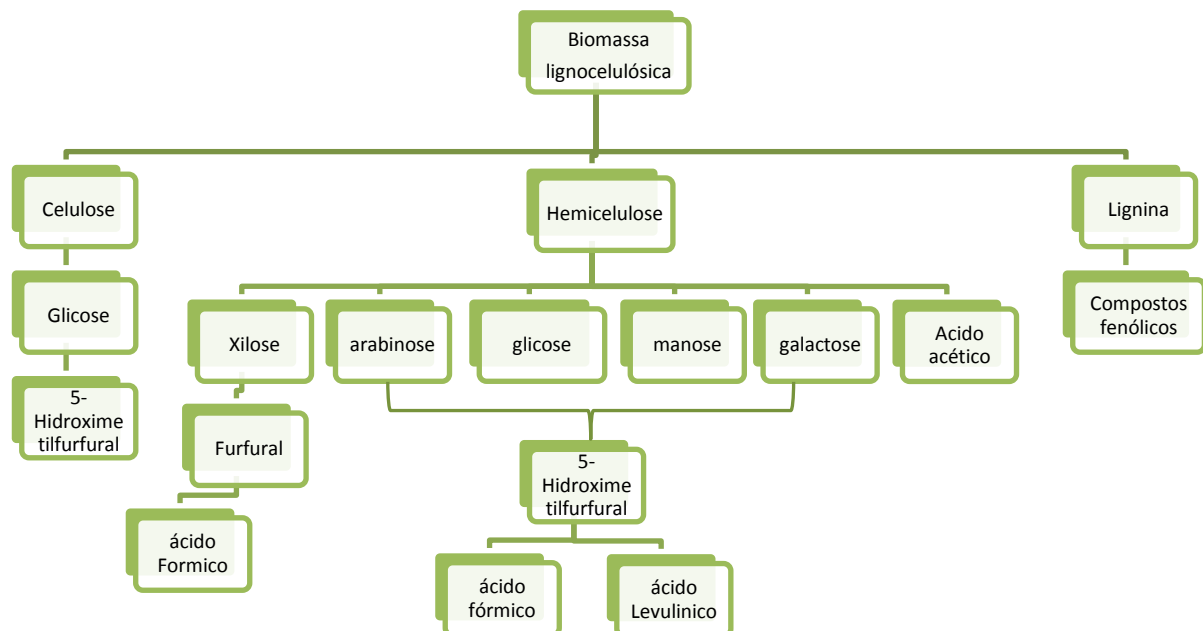
No processo de hidrólise os açúcares podem ser degradados a furfural formados a partir de pentoses e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), formados a partir de hexoses (LARSSON et al., 1999). Os compostos furânicos 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural são os inibidores mais potentes derivados da degradação da biomassa por hidrólise ácida diluída (ANTAL; LEESOMBOON; MOK, 1991). Esses compostos estão quimicamente relacionados na Figura 8. Em geral, esses inibidores afetam a fisiologia celular, podendo muitas vezes resultar em diminuição da viabilidade e da produção de etanol (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). A forma de inibição diferencia-se dependendo da estrutura química do inibidor. Por exemplo, o furfural inibe enzimas glicolíticas *in vitro* e tem um efeito adicional sobre atividade aldeído desidrogenase, resultando em um acúmulo de acetaldeído, que seria responsável pela fase de retardo do crescimento de *S. cerevisiae* na presença desse furano (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HÄGERDAL, 1999).

O furfural diminui severamente a taxa de crescimento específico e pode ser reduzido a álcool furfurílico menos inibitório (TAHERZADEH et al., 2000). Por outro lado, a conversão para o álcool furfurílico afeta o equilíbrio redox intracelular.

Estudos do fluxo metabólico têm mostrado que o furfural afeta os fluxos da via glicolítica e o ciclo do ácido tricarboxílico, que estão envolvidos no metabolismo de energia, pois a redução de furfural compete por NADH disponível, podendo levar a uma queda na produção de etanol (LIU; MA; SONG, 2009). O 5-hidroximetilfurfural é menos inibitório que o furfural, mas permanece no meio cerca de quatro vezes mais, devido à sua baixa taxa de conversão (TAHERZADEH et al., 2000).

O pH é um fator importante, capaz de exercer grande influência sobre o processo de bioconversão. Em pesquisas realizadas por Du Preez (1994) ficou evidenciado que o rendimento em etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 7126 foi fortemente afetado por variações de pH entre 2,5 e 6,5, sendo o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. O efeito do pH inicial para a produção de etanol a partir de xilose por *C. intermedia* MTCC-1404 foi investigado por Kalhorinia et al. (2014) dentro do intervalo de 3,5 - 7,5 em temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. O rendimento máximo de etanol de 0,3 (g g⁻¹) foi obtido com pH inicial de 5,5 utilizando xilose como fonte de carbono, sendo relativamente menor nos demais valores de pH.

Figura 8 - Reações que ocorrem durante a hidrólise de biomassa lignocelulósica



Fonte: Adaptado de Palmqvist, Almeida e Hahn-Hagerdal, 1999.

A presença de compostos inibidores como o ácido acético, em hidrolisados hemicelulósicos, apresenta forte efeito sobre o pH, sendo que concentrações de 2,0 a 5,0 g/L têm sido relatadas como sendo inibidoras de *P. stipitis*. Em meios de fermentação contendo ácido acético, observa-se a redução do pH, devido à sua dissociação dentro do citoplasma celular, influenciando tanto o consumo de açúcares quanto a conversão de biomassa e etanol (TELLI OKUR; EKEN SARAÇOGLU, 2006).

A temperatura consiste em um dos mais importantes fatores que podem interferir na atividade dos micro-organismos, podendo afetar a atividade das leveduras, principalmente se aliada à alta concentração de compostos gerados durante a fermentação, como a acidez e concentração de etanol (TORIJA et al., 2002).

A tolerância ao etanol é um fator relevante para o crescimento das leveduras. Visto que a fluidez da membrana, que está relacionada com a sua composição lipídica, é profundamente alterada na presença de etanol, e, como um resultado da permeabilidade da membrana, alguns íons (especialmente íons H⁺) entram na célula e ocorre uma dissipação do gradiente eletroquímico através da membrana, com conseqüente diminuição do pH intracelular. Além de afetar a composição da membrana de levedura, existem vários outros efeitos do etanol sobre a fisiologia de levedura durante a fermentação, incluindo a inibição de crescimento e inativação enzimática, o que leva a uma diminuição da viabilidade celular (BASSO, 2011).

Vários fatores podem interferir na resistência das linhagens ao estresse por etanol. O nível de tolerância ao etanol varia com as cepas e é influenciado pelas condições de cultivo, principalmente a temperatura. À medida que a temperatura aumenta, aumenta também a sensibilidade da levedura à toxidez do etanol (LIMA et al., 2001). Em temperaturas mais altas, o aumento da toxicidade poderá levar à interrupção prematura do processo fermentativo antes que os açúcares presentes no meio tenham sido totalmente consumidos (CHI; ARNEBORG, 2000).

A concentração inicial de células pode influenciar nos resultados da fermentação. Maiores concentrações de células viáveis podem ser empregadas como estratégia para amenizar o efeito tóxico de compostos inibidores presentes no hidrolisado (OLSSON; HÄHN-HAGERDAL, 1996; FERREIRA, et al., 2011). Adicionalmente, o aumento da concentração inicial de células pode resultar em valores superiores

de produtividade volumétrica em etanol. Se, por um lado, maiores concentrações de leveduras aumentam a produtividade, por outro lado, aumenta o consumo de açúcar e, conseqüentemente, resulta em maior competição por nutrientes, podendo levar a uma diminuição na viabilidade celular (LIMA et al.; 2001).

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Isolar, selecionar e caracterizar leveduras capazes de converter xilose e glicose presentes em meio semissintético e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em etanol, como forma de contribuir com o desenvolvimento de tecnologias visando à obtenção biotecnológica de etanol de 2ª geração a partir de pentoses.

3.2 - Objetivos específicos

Isolar leveduras capazes de crescer em meio contendo xilose como fonte de carbono.

Avaliar qualitativamente a capacidade das leveduras isoladas em produzir etanol a partir da xilose.

Otimizar as condições de cultivo (pH e temperatura) para produção de etanol a partir da xilose.

Avaliar quantitativamente a produção de etanol pelas leveduras selecionadas.

Selecionar cepas fermentadoras de pentoses quanto à sua capacidade fermentativa, considerando os parâmetros rendimento, eficiência de fermentação e produtividade volumétrica.

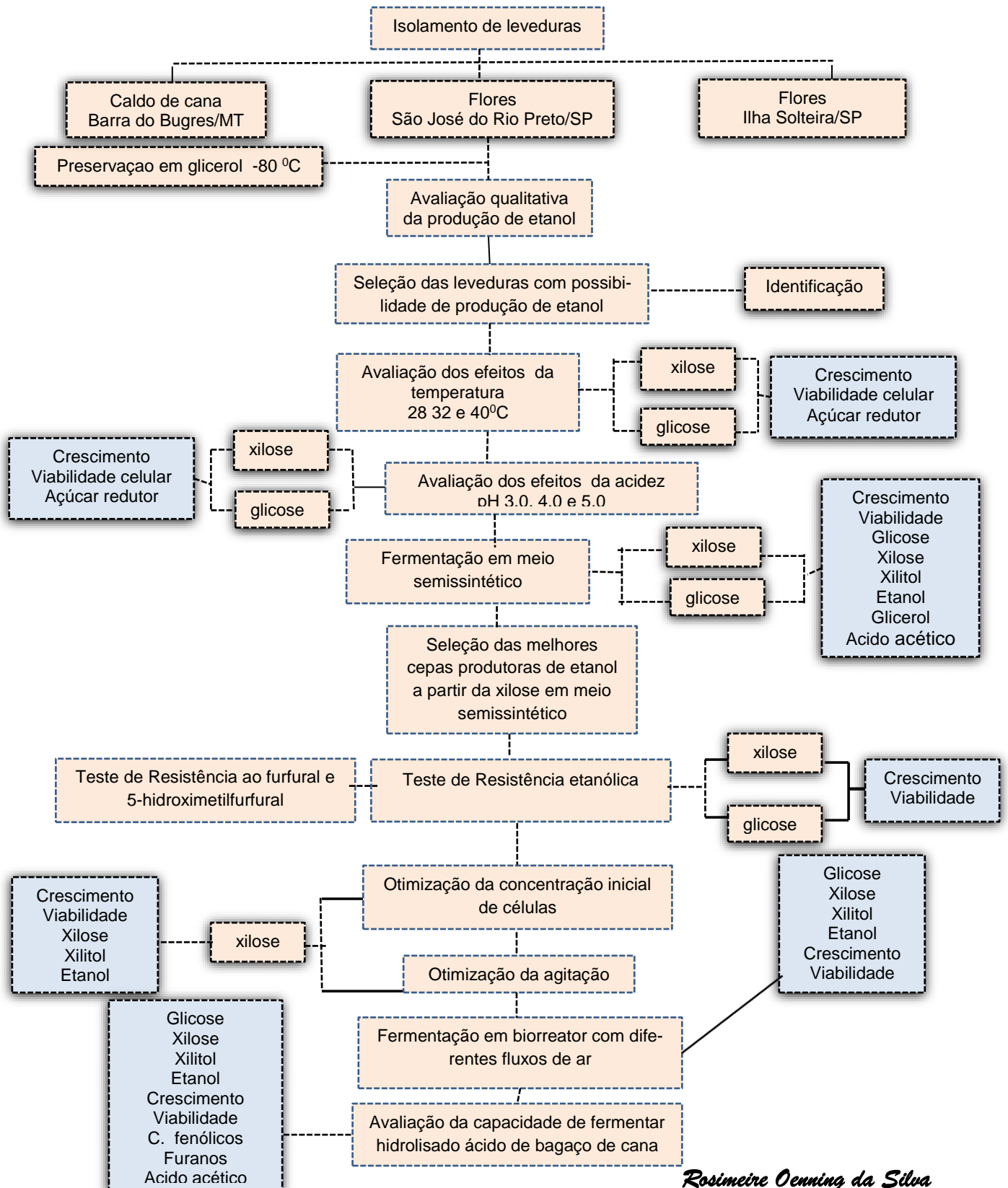
Avaliar a resistência das cepas selecionadas a estresse: etanólico, térmico, ácido e presença de furfural e 5-hidroximetilfurfural.

Otimizar as condições de cultivo (agitação e aeração) para produção de etanol pelas leveduras selecionadas.

4 – MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 9 resume as ações da pesquisa realizada.

Figura 9 - Fluxograma geral das atividades desenvolvidas neste trabalho.



4.1 - Meios de cultura

A composição dos meios de cultura utilizados nesta pesquisa encontra-se descrita abaixo.

Meio YNB (Yeast Nitrogen Base) g L⁻¹

Sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄): 5,00;
 Hidroclorato de L-histidina (C₆H₁₀CIN₃O₂.H₂O): 0,01;
 DL-metionina (C₅ H₁₁ O₂ NS): 0,02;
 DL-triptofano (C₁₁H₁₂N₂O₂): 0,02;
 Biotina (C₁₀H₁₆N₂O₃S): 0,000002;
 Pantetonato de cálcio (C₁₈H₃₂CaN₂O₁₀): 0,0004;
 Ácido fólico (C₁₉H₁₉N₇O₆): 0,000002;
 Inositol (C₆H₁₂O₆): 0,002;
 Niacina (C₆H₅NO₂): 0,0004;
 Ácido p-amino benzóico (C₇H₇NO₂): 0,0002;
 Hidroclorato de piridoxina (C₈H₁₁NO₃.HCl): 0,0004;
 Riboflavina (C₁₇H₂₀N₄O₆): 0,0002;
 Ácido bórico (H₃BO₃): 0,0005;
 Sulfato de cobre (CuSO₄): 0,00004;
 Iodeto de potássio (KI): 0,0001;
 Cloreto férrico (FeCl₃): 0,0002;
 Sulfato de manganês (MnSO₄): 0,0004;
 Molibdato de sódio (Na₂MoO₄): 0,0002;
 Sulfato de zinco (ZnSO₄): 0,0004;
 Fosfato monopotássico (KH₂PO₄): 1,00;
 Sulfato de magnésio (MgSO₄): 0,50;
 Cloreto de sódio (NaCl): 0,10;
 Cloreto de cálcio (CaCl₂): 0,10;
 Xilose: 30,0

Meio semissintético g L⁻¹

Sulfato de magnésio (MgSO₄): 0,5;
 Fosfato monobásico de potássio (KH₂PO₄): 1,0;
 Cloreto de sódio (NaCl): 0,1;
 Cloreto de cálcio (CaCl₂): 0,1;
 Sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄): 2,0;
 Extrato de levedura: 10,0;
 Ácido bórico (H₃BO₃): 0,0005;
 Sulfato de cobre (CuSO₄): 0,00004;
 Cloreto férrico (FeCl₃): 0,0001;
 Molibdato de sódio (Na₂MoO₄): 0,0004;
 Sulfato de zinco (ZnSO₄): 0,0002;
 Sulfato de manganês (MnSO₄): 0,0004;

Xilose ou glicose 60,0 na fermentação e 30,0 no isolamento.

YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) g L⁻¹

Peptona: 20,0
Extrato de levedura: 10,0
Dextrose: 20,0

YEPX (Yeast Extract Peptone xylose) g L⁻¹

Peptona: 20,0
Extrato de levedura: 10,0
Xilose: 20,0

4.2 - Coleta de amostras e isolamento de leveduras

Para o isolamento das leveduras, foram utilizadas amostras de caldo de cana coletadas em uma usina sucroalcooleira no Estado de Mato Grosso e flores coletadas no Estado de São Paulo.

4.2.1 - Isolamento de leveduras de caldo de cana

Amostras de caldo de cana foram coletadas quinzenalmente no período de setembro a dezembro de 2011 nos tanques de caldo misto da usina Barralcool localizada no município de Barra do Bugres/MT. A usina está localizada na rodovia 246, km 3,5 a 15°04'21" de latitude sul e a 57°10'52" de longitude oeste, a 171 km de Cuiabá. O caldo de cana utilizado foi proveniente das variedades SP79-1011, RB 86-7515, RB 75-5113, SP 83-5073, SP-8642, RB 92-8064. A coleta foi feita em triplicata em frascos esterilizados e as amostras encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Mato Grosso – Unemat. Para obtenção das colônias, foram realizadas diluições em série em solução salina 0,85% p/v, e 100 µL de cada diluição foram semeadas em superfícies de placas de Petri contendo meio de cultura YEPX 2% adicionado de ampicilina na concentração de 50 mg/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 48 horas (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 2001) e isoladas aleatoriamente aproximadamente 12 leveduras por amostras.

4.2.2 - Isolamento de leveduras de flores

As amostras de flores foram coletadas mensalmente no período de março a junho de 2012, em área urbana do município de São José do Rio Preto – SP, localizado a 20°49'13" de latitude sul e 49°22'47" de longitude oeste, e do município de Ilha Solteira – SP, localizado a 20°25'58" de latitude sul e 51°20'33" de longitude oeste.

Com o auxílio de pinças esterilizadas, as flores foram retiradas de vários locais da planta, acondicionadas em frascos estéreis e encaminhadas ao laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada da Unesp. Aproximadamente 500 mg de flores foram colocados em tubos de penicilina contendo 5 mL de meio de cultura semissintético descrito no item 4.1, tendo xilose como única fonte de carbono com pH inicial de 3,5, e incubados por 8 horas a 30 °C. Após período de incubação, foram feitas estrias em placas de Petri contendo YEPX, selecionadas aleatoriamente de quatro a seis colônias por amostra e repicadas novamente para obtenção de culturas puras. As culturas puras foram preservadas em glicerol a -80 °C.

4.3 - Avaliação biológica da produção de etanol a partir da xilose

Os testes de produção de etanol em placas foram executados conforme metodologia proposta por Grabek-Lejko et al. (2006). O método foi baseado na capacidade das leveduras fermentadoras de pentoses de crescerem e produzirem etanol em placas de ágar com D-xilose como única fonte de carbono. A produção de etanol é verificada quando outra levedura, que não cresce em presença de xilose, mas utiliza etanol como fonte de carbono, é semeada pelo método *pour plate* e se desenvolve formando um halo de crescimento ao redor da levedura que tenha capacidade de fermentar a pentose. O crescimento é atribuído à presença de etanol produzido pelas fermentadoras.

Em placas de Petri esterilizadas, foram inoculadas em *pour plate* 800 µL de uma suspensão da cepa da levedura *Candida silvae* BR3-3BY. Essa cepa é incapaz de crescer em meio contendo xilose como única fonte de carbono, mas tem habilidade de crescer em meio contendo etanol. Em seguida, verteu-se 20 mL de meio de cultura YNB (Yeast Nitrogen Base) fundido e maldito a 45 – 47 °C contendo 2% de

xilose. Após a solidificação, foram inoculados quatro pontos com cepas em testes e, como controle positivo, foi inoculada a cepa *Candida shehatae* CG8 8BY, capaz de produzir etanol a partir da xilose. As placas foram incubadas a 30 °C por 10 dias. Após o período de incubação, foram selecionadas as leveduras em que se observou formação de halo ao redor da colônia. As cepas de *Candida silvae* e *Candida shehatae* foram fornecidas pelo laboratório de Microbiologia – CEIS/IB/Unesp de Rio Claro.

4.4 - Identificação das leveduras

As cepas de leveduras foram identificadas no laboratório de Microbiologia – CEIS da Unesp de Rio Claro por meio do sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA (SCORZETTI et al., 2002).

4.5 - Padronização do inóculo

4.5.1 - Padronização por peso para caracterização

Para cada cepa, após cultivo por 24 h, em 25 mL de meio YEPD 2%, em frascos erlenmeyer de 125 mL, a 30°C e agitação de 150 rpm, diversas diluições do cultivo foram realizadas e as absorbâncias determinadas a 600 nm. Paralelamente, as mesmas suspensões foram centrifugadas a 10000 x g, por 15 minutos, sendo o sobrenadante descartado, as células foram suspendidas em água destilada e centrifugadas novamente. O precipitado de células foi, então, levado à estufa a 60°C, em microtubos de peso conhecido, até peso constante. A partir desses dados, foi construída uma curva de calibração, com valores de absorbância representando a densidade ótica e valores de peso seco correspondentes, obtendo-se uma equação de regressão linear. Esta foi utilizada para estimar a massa celular a ser utilizada como inóculo.

4.5.2 - Padronização por número de células para fermentação

Na padronização por número de células, efetuou-se a contagem do número de células viáveis mL⁻¹ em câmara de Neubauer (CECCATO-ANTONINI, 2010)

usando o corante azul de metileno citrato de sódio (LEE; ROBINSON; WANG, 1981) e calculado o volume necessário para inocular, no meio de cultura para fermentação, um número de células de aproximadamente $1,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$.

4.6 - Avaliação dos efeitos da temperatura e da acidez no crescimento e consumo de açúcares das leveduras selecionadas.

Para avaliar os efeitos da temperatura, as cepas foram cultivadas em meio YEPX e YEPD separadamente, com pH inicial de 4,0 e cultivadas em temperatura de 28 e 32 °C, citadas na literatura para leveduras, e, como temperatura limite que pode ocorrer em condições de usina, foi selecionada a de 40 °C (LIMA et al., 2001), incubadas em agitação de 150 rpm, por 12 horas. Os testes foram conduzidos em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 2 horas durante 12 horas de cultivo, para a determinação do consumo de açúcar, crescimento e viabilidade celular.

Para avaliar os efeitos da acidez no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcar das leveduras, seguiu-se a metodologia descrita para temperatura. Os valores de pH avaliados foram 4,0 e 5,0, citados na literatura como ideais para leveduras, e, como valor limite que ocorre em condições de usina, foi selecionado o pH 3,0 (LIMA et al., 2001). A temperatura de incubação foi a considerada ideal para cada cepa na avaliação dos efeitos de temperatura. O pré-inóculo foi feito cultivando-se cada cepa em caldo YEPD por 24 h e o inóculo inicial foi padronizado em 1 mg mL^{-1} .

4.7 - Fermentação em meio semissintético

Para avaliar a capacidade das cepas em produzir etanol a partir de xilose, utilizou-se a metodologia descrita por Martins (2011). As leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPD (2%), em frascos erlenmeyer de 125 mL, em temperatura considerada ótima para crescimento e agitação de 150 rpm, por 24 a 48 horas. Após esse período, alíquotas foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células inoculado (em uma concentração celular final de aproximadamente $1,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$) em 60 mL do meio semissintético descrito

no item 4.1 (com pH ideal para cada levedura), utilizando-se frascos erlenmeyers de 125 mL fechados com válvula própria para fermentação, contendo solução de metabisulfito de sódio a 1 mg/mL para permitir a saída de CO₂ e evitar a entrada de O₂. A fermentação foi realizada durante 96 horas sob agitação de 150 rpm em temperatura ideal para cada levedura. Para efeitos de comparação, a fermentação também foi conduzida utilizando meio contendo glicose como fonte de carbono. As amostras foram retiradas a cada 24 horas. Os parâmetros avaliados na fermentação foram: consumo de xilose e glicose, produção de etanol, xilitol, glicerol, ácido acético, crescimento e viabilidade celular. A partir dos resultados dessas análises, foram selecionadas as melhores cepas produtoras de etanol a partir da xilose para execução das próximas etapas da pesquisa.

4.8 - Avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de etanol na viabilidade celular das leveduras selecionadas.

A avaliação da resistência das leveduras selecionadas a diferentes concentrações de etanol foi feita em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL de meio de cultura YEPD e YEPX separadamente, com pH ajustado para 4,0 (valor de pH considerado ideal na avaliação de acidez descrita no item 5.3). Para o ajuste dos valores selecionados de álcool, foram feitas adições de volumes de etanol (Neon 95% INPM PA) de modo a proporcionar variações de 6%, 10% e 15% (v/v). Os erlenmeyers foram incubados em agitação de 150 rpm, na temperatura ideal de cada levedura, por 96 horas. A viabilidade celular das leveduras foi avaliada pela contagem na câmara de Neubauer, utilizando o corante azul de metileno citrato de sódio, em intervalos de 24 horas.

4.9 - Avaliação dos efeitos de diferentes concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural na viabilidade celular das leveduras selecionadas.

A avaliação da resistência das leveduras selecionadas a diferentes concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foi feita em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 15 mL de meio de cultura YEPX, com pH ajustado para 4,0 (valor de pH considerado ideal na avaliação de acidez descrita no item 5.3). Para o ajuste dos

valores selecionados, foram feitas adições de volumes de modo a proporcionar variações de 0,02%, 0,04% e 0,06% (v/v) de furfural e 5-hidroximetilfurfural separadamente (essas concentrações são equivalente a 0,2; 0,5 e 0,7 g L⁻¹ de furfural e 0,3; 0,5 e 0,8 g L⁻¹ de 5-hidroximetilfurfural). Os erlenmeyers foram incubados em agitação de 150 rpm, na temperatura ideal de cada levedura, por 96 horas. A viabilidade celular das leveduras foi avaliada pela contagem na câmara de Neubauer utilizando o corante azul de metileno citrato de sódio, em intervalos de 24 horas. As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural utilizadas nesta pesquisa foram selecionadas a partir de concentrações encontradas em pesquisas com hidrolisados hemicelulósicos (ARRUDA, 2011; MEDINA, 2013).

4.10 - Avaliação dos efeitos da agitação e de diferentes concentrações de células inoculadas na produção de etanol

Para avaliar os efeitos da agitação e de diferentes concentrações de células na produção de etanol pelas leveduras selecionadas, seguiu-se a mesma metodologia descrita no item 4.7, porém o volume do meio de fermentação foi de 15 mL e a amostragem foi feita apenas em 96 horas. Para avaliar os efeitos da agitação, as fermentações foram realizadas em frascos de 125 mL com 15 mL de meio de cultura, sob agitação de 150 e 200 rpm sem aeração forçada, comparadas a fermentações em sistema estático. Para avaliar os efeitos de diferentes concentrações iniciais de células na produção de etanol a partir da xilose, foi considerada a massa celular utilizada em avaliações anteriores, equivalente a aproximadamente 1,0 x 10⁸ mL⁻¹ que corresponde a aproximadamente 4 g L⁻¹ da levedura *S. meliponinorum* e 9 g L⁻¹ da levedura *S. pombe*. Foram inoculados 4, 6, 10 e 15 g L⁻¹ da levedura *S. meliponinorum* e 10, 15, 30 e 40 g L⁻¹ da levedura *S. pombe*.

4.11 - Obtenção do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar por hidrólise ácida

O bagaço de cana utilizado nesta pesquisa foi cedido pela Usina Açúcareira Virgolino de Oliveira S/A, situada na cidade de José Bonifácio – SP. O material foi lavado, seco ao sol, passado em triturador agroindustrial TRAPP 400, com tamanho

padronizado em peneira com malha de 3 mm de espessura. O bagaço triturado foi colocado em estufa a 60 °C até atingir uma umidade de 8% determinado em analisador de umidade OHAUS. Em seguida, o bagaço foi submetido à hidrólise ácida. As condições da hidrólise foram adaptadas da metodologia estabelecida por Pessoa Jr., Mancilha e Sato (1997), modificando a concentração de ácido sulfúrico conforme descrito a seguir: 10 mL de solução de ácido sulfúrico 2% por grama de bagaço (equivalente a 360 mg de ácido sulfúrico por grama de bagaço), a temperatura 121 °C por 15 minutos. Após o processo, o hidrolisado obtido foi filtrado a vácuo para remoção de massa residual de sólidos (celulose e lignina).

4.12 - Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Foi feita a caracterização do hidrolisado quanto ao pH, a concentração dos açúcares xilose, arabinose e glicose, bem como dos compostos tóxicos furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos. Em seguida, este foi concentrado a fim de aumentar a concentração inicial de açúcares e reduzir os compostos tóxicos voláteis. A concentração ocorreu em banho-maria na temperatura de 90 °C. O hidrolisado concentrado três vezes foi novamente caracterizado e submetido à destoxificação com carvão vegetal ativo.

4.13 - Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão vegetal ativo

As condições de destoxificação foram adaptadas da metodologia estabelecida por Marton (2002). Consistiu de elevação do pH inicial (1,7) para 7,0 com adição de NaOH, e redução para 2,5 com ácido sulfúrico (72% v/v). A cada alteração de pH o hidrolisado era centrifugado com subsequente remoção do precipitado. Em seguida foi submetido a adsorção com carvão vegetal ativo em pó – Merck (1% m/v), mantendo-se a mistura sob agitação de 200 rpm em temperatura de 50 °C por 60 minutos e novamente centrifugado (10000 x g) e o precipitado removido.

4.14 - Preparo do meio de fermentação na base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O meio de fermentação foi formulado na base do hidrolisado obtido por hidrólise ácida, concentrado e destoxificado. Esse hidrolisado, após correção do pH para 4,0, foi autoclavado e suplementado com os mesmos nutrientes (com exceção da xilose) do meio semissintético descrito no item 4.1.

4.15 - Preparo do inóculo para fermentação do hidrolisado hemicelulósico

Os experimentos de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foram realizados com cepas de leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum* selecionadas pela capacidade de produzir etanol a partir da xilose em meio semissintético. Para avaliar a capacidade das cepas em produzir etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar, as leveduras foram pré-cultivadas em meio YEPD (2%), em erlenmeyer de 125 mL, na temperatura de 28 °C para *S. meliponinorum* e 32 °C para *S. pombe* e agitação de 150 rpm, por 24 a 48 horas. Após esse período, alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células inoculado (em uma concentração celular final de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ mL⁻¹) em 15 mL de hidrolisado hemicelulósico com pH corrigido para 4,0.

4.16 - Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Para avaliar a capacidade das cepas em produzir etanol e/ou xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar, seguiu-se a mesma metodologia utilizada para fermentação em meio semissintético, porém com modificações no volume de meio e na agitação. Foram utilizados volumes de 15 mL de hidrolisado e agitação de 100 rpm para levedura *S. pombe* e 150 rpm para *S. meliponinorum*. As amostras foram analisadas somente em tempo inicial e com 96 horas de fermentação. Os parâmetros avaliados na fermentação foram: consumo de xilose, arabinose e glicose, produção de etanol, xilitol, crescimento e viabilidade celular.

4.17 - Fermentação em biorreator de cultivo submerso pela levedura *S. meliponinorum*

O biorreator (Cellingen 310 New Brunswick) de cultivo submerso com capacidade para 4 litros é equipado com controlador de temperatura, agitação, aeração e pH. Foi ajustado a 28 °C e pH 4,0 com ácido sulfúrico. A oxigenação do meio foi controlada por fluxo de ar e agitação que variaram nas seguintes condições: 0,1 vvm/100 rpm, 0,2 vvm/150 rpm, 0,5 vvm/200 rpm.

Para fermentação em biorreator, foi preparada previamente uma cultura em erlenmeyer de 2 litros contendo 1 litro de meio de cultura YEPD (2% de dextrose) a partir de 250 mL de suspensão de células pré-cultivadas por 24 horas. A cultura foi incubada a 28 °C por 48 horas a 200 rpm (rotação previamente estabelecida como ideal para formação de biomassa pela levedura *S. meliponinorum*). Após esse período, alíquotas foram centrifugadas a 10000 x g por 15 minutos, o sobrenadante descartado e o precipitado de células ressuspensos em 200 mL de meio de cultura semissintético. Essa suspensão de células foi inoculada na dorna de fermentação do biorreator contendo 1,9 L de meio de cultura atingindo um volume final de 2,1 L de mosto. A fermentação foi conduzida durante 96 horas e alíquotas foram retiradas a cada 24 horas para avaliação de crescimento, viabilidade celular, produção de etanol e xilitol.

4.18 - Métodos analíticos

4.18.1 - Massa celular

A concentração de massa celular foi determinada em espectrofotômetro a 600 nm a partir de uma curva de calibração relacionando-se à densidade ótica com a concentração de massa seca de células g L⁻¹.

4.18.2 - Viabilidade celular

A determinação da viabilidade celular foi periodicamente acompanhada através do método de coloração com azul de metileno descrito por Lee, Robinson e Wang (1981). Amostras de 200 µL foram transferidas para 200 µL da solução de

azul de metileno e homogeneizadas. Após 10 minutos, tempo necessário para que as células absorvam o corante, procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer. As células viáveis apresentaram-se incolores, enquanto as não viáveis, azuis.

4.18.3 - Determinação das concentrações de glicerol e ácido acético por HPLC

A quantificação de glicerol e ácido acético foi feita no Lanac (Laboratório de Análises Cromatográficas) da Universidade Federal da Grande Dourados/UFGD. As concentrações de glicerol e ácido acético foram determinadas em cromatógrafo líquido (Agilent Technologies 1290 Infinity) nas seguintes condições: coluna Rezex ROA Phenomenex mantida a 50 °C; detector índice de refração RID; eluente água acidificada e ácido trifluoroacético com um fluxo de 0,6 mL/min; volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas e filtradas em filtro Whatman 0,22 µm TF.

4.18.4 - Determinação das concentrações de etanol por cromatografia gasosa

A quantificação de etanol foi feita em cromatógrafo gasoso GC-FID Clarus 480, equipado com um detector de ionização de chama, um injetor split/splitless e com uma coluna capilar Elite-Wax (polietileno glicol) de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,15 µm de espessura de filme. a injeção foi no modo split (1:20) com fluxo de gás de arraste (nitrogênio) de 1 mL/min. As temperaturas dos blocos de injeção e detecção foram de 250 °C. Para quantificação, foi utilizado 6 mL do fermentado acondicionado em tubos de penicilina com septo de borracha lacrado e mantido a 40 °C por 10 minutos. Com uma seringa do tipo gas-tight de 500 µL, foram coletados 200 µL da fase vapor e injetados no cromatógrafo. A quantificação foi realizada utilizando a equação gerada na curva de calibração construída a partir de análises de solução aquosa de etanol em diferentes concentrações.

4.18.5 - Determinação das concentrações de glicose, arabinose, xilose e xilitol

4.18.5.1 - Método do ácido dinitrosalicílico – DNS

A quantificação de açúcares redutores nas análises dos efeitos da acidez e temperatura no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcar pelas leveduras foram feitas pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS), como proposto por Miller (1959). Em tubos de ensaios, foram colocados 1 mL de amostra diluídas convenientemente e 1 mL de DNS. A mistura foi levada em banho de ebulição por 10 minutos e esfriada em banho de gelo. Foram acrescentados 8 mL de água destilada, agitados em agitador de tubos, e feita a leitura da absorbância a 540 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em mg mL^{-1} de açúcar redutor utilizando as equações das curvas padrão de xilose e/ou glicose.

4.18.5.2 - Métodos cromatográficos

A quantificação de glicose, arabinose, xilose 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 centrifugadas, filtradas em membrana Whatman 0,22 μm , diluídas convenientemente e acondicionadas em volume de 5 mL em vials (injetados 10 μL) e colocadas no Sistema HPAEC-PAD (Dionex ICS 5000 SP, BR) equipado com uma coluna CarboPac PA1. Foi feita uma corrida isocrática com 500 mM de NaOH, com fluxo de 1 mL/min e temperatura de 25°C, os eluentes foram preparados com água deionizada ultra pura (18 M Ω .cm) e degaseificados. Os dados foram coletados e analisados utilizando-se o software Chromeleon, versão 6.8 (Dionex ICS 5000 SP, BR).

4.18.6 - Determinação das concentrações de compostos fenólicos totais

A concentração total dos compostos fenólicos foi quantificada colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). Em um tubo de ensaio, foram adicionados 3 mL da amostra e 200 μL do reagente Folin Ciocalteu. Após homogeneização por agitação, foi deixado em repouso no escuro por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 800 μL de solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% e, após homogeneização, foi deixado em repouso no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. Foi realizada a leitura da absorbância a 760 nm e os valores de absorbância

foram convertidos em µg de compostos fenólicos/mL por meio de curva padrão de ácido vanílico.

4.18.7 - Determinação das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) foram determinadas em HPLC – Uv-Vis, Dionex uHPLC 3000, com bomba P680, compartimento de coluna a 30 °C com fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e coluna EC 250/4.6 NUCLEOSIL 100-5 CN de fase reversa, a fase móvel isocrática foi composta por 90% de água e 10% de metanol, detecção em 276 nm a partir do detector UVD 340v-Dionex. O volume da amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtros (Whatman) com poros de 0,22 µm.

4.19 - Determinação dos parâmetros fermentativos

4.19.1 - Rendimento de etanol e xilitol (Y_{p/s})

O fator de conversão, que expressa a massa de etanol produzida por massa de xilose consumida em gramas, foi calculado pela seguinte equação:

$$Y \frac{p}{s} = \frac{P}{\Delta s} = \frac{P}{S_i - S_f}$$

onde P refere-se à concentração final de etanol (g L⁻¹) e S_i e S_f correspondem à concentração inicial e final de xilose presente no meio (g L⁻¹).

4.19.2 - Produtividade volumétrica de etanol e xilitol (Q_p)

A produtividade volumétrica de etanol foi expressa em quantidade de etanol produzida (g L⁻¹) por tempo (h) e calculada de acordo com a equação:

$$Q_p = \frac{P}{T}$$

onde P corresponde à concentração final de etanol (g L⁻¹) e T corresponde ao tempo da fermentação.

4.19.3 - Fator de conversão de xilose e glicose em biomassa ($Y_{x/s}$)

Esse parâmetro expressa a massa de células (g_{cel}) produzida por massa de xilose consumida (g) e foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

onde S_i e S_f correspondem à concentração inicial e final de xilose ($g L^{-1}$), respectivamente, e X_i e X_f correspondem à concentração inicial e final de biomassa celular ($g L^{-1}$), respectivamente.

4.19.4 - Eficiência de conversão (η) de etanol

Esse parâmetro fermentativo expresso em % representa a razão entre o fator de rendimento ($Y_{p/s}$) obtido experimentalmente e o fator de rendimento teórico (Y_T) de 0,511 $g g^{-1}$ de glicose e/ou xilose consumida (INGLEDEW, 1987).

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{0,511} \cdot 100$$

4.19.5 - Eficiência de conversão (η) de xilitol

Esse parâmetro fermentativo expresso em % representa a razão entre o fator de rendimento ($Y_{p/s}$) obtido experimentalmente e o fator de rendimento teórico (Y_T) de 0,905 $g g^{-1}$ calculado segundo Barbosa et al. (1988).

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{0,905} \cdot 100$$

4.20 – Estatística e análise dos resultados

As diferenças significativas entre as médias foram avaliadas pela análise de variância com pós-teste Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o software SISVAR (UFLA, Lavras, BR). Os gráficos foram gerados pelo software Oringin Pro 8.5.1 da University of Oxford.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - Isolamento, seleção e identificação das leveduras

A metodologia usada para o isolamento permitiu a obtenção de 165 cepas de leveduras, das quais cem (100) foram isoladas de caldo de cana (BB.09 a BB.109), trinta (30) isoladas de flores coletadas em São José do Rio Preto/SP (FRP.01 a FRP.30) e trinta e cinco (35) isoladas de flores coletadas em Ilha Solteira/SP (FIS.01 a FIS.35) (Tabela 5).

Tabela 5 - Local e substrato de isolamento das leveduras e identificação das leveduras selecionadas para produção de etanol a partir da xilose

Local de isolamento	Substrato de isolamento	Leveduras		
		Crescimento	Produção de etanol	Identificação
Barra do Bugres/MT	Caldo de Cana	BB.09 a BB.109	BB.10	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
			BB.92	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
São José do Rio Preto/SP	Flores	FRP.01 a FRP.30	FRP.04	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
			FRP.09	<i>Starmerella meliponinorum</i>
Ilha Solteira/SP	Flores	FIS.01 a FIS.35	Etanol negativo	

Do total de isolados, 2 cepas provenientes de caldo de cana e 2 provenientes de flores apresentaram respostas positivas na avaliação qualitativa de produção de etanol a partir da D-xilose (Tabela 5). Neste trabalho, nenhuma das leveduras isoladas de amostras de flores coletadas no município de Ilha Solteira produziu etanol a partir da D-xilose. As leveduras selecionadas foram identificadas conforme elencado na Tabela 5.

Há poucos registros de resultados de fermentação de xilose para as espécies *S. pombe* e *Wickerhamomyces anomalus*. A espécie *S. pombe* é citada na literatura como assimiladora de xilose com subsequente produção de etanol (GONG et al., 1983); em relação à *W. anomalus*, há descritos de cepas não produtoras e cepas que produzem pouco etanol a partir da xilose (BARBOSA et al. 1988). Não foi en-

contrado relato de pesquisa de fermentação de pentoses visando a produção de etanol com a levedura *Starmerella meliponinorum*.

As amostras de caldo de cana e de flores utilizadas neste trabalho não constituíram uma boa fonte de leveduras com possibilidades de permitir a seleção de uma grande quantidade de agentes eficientes na conversão de xilose a etanol.

5.2 - Avaliação dos efeitos da temperatura no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcares das cepas isoladas

Foram avaliados os efeitos da temperatura sobre o crescimento, viabilidade e consumo de açúcares das leveduras selecionadas em meio de cultura contendo xilose e meio com glicose como fontes de carbono, e os resultados encontrados para cada levedura avaliada estão ilustrados nas Figuras 10 a 13.

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,05$) no número de células das leveduras *S. pombe* e *Wickerhamomyces anomalus* FRP.04 quando incubadas nas temperaturas de 28, 32 e 40 °C em meio com xilose. E quando incubadas em meio com glicose apresentaram um menor número de células na temperatura de 40 °C. As leveduras *W. anomalus* BB.10 e *S. meliponinorum* apresentaram um melhor crescimento na temperatura de 28 °C nas duas fontes de carbonos avaliadas neste trabalho.

Houve influência da fonte de carbono na multiplicação celular das duas cepas de *W. anomalus* e da levedura *S. pombe*, que apresentaram menor crescimento em meio contendo xilose. Esses resultados estão de acordo com a menor taxa de xilose consumida por essas leveduras, conforme ilustrado nas Figuras 10 a,c, 11 a,c e 12 a,c.

Outros resultados foram encontrados por Martini, (2014) quando avaliou o crescimento da levedura *Meyerozyma guilliermondii* em meio sintético contendo xilose e meio contendo glicose nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C. A autora constatou que nas duas primeiras temperaturas a levedura cresceu melhor em meio com glicose, porém na temperatura de 40 °C a curva de crescimento não diferiu nas duas fontes de carbono.

O efeito negativo da temperatura de 40 °C na viabilidade celular foi verificado para as leveduras *W. anomalus* BB.10 e *S. meliponinorum*, e esse efeito foi essencial

almente maior em meio contendo xilose como fonte de carbono. A viabilidade celular da levedura *W. anomalus* BB.10, que inicialmente era de 100%, foi reduzida para 88% em meio com xilose e para 93% em meio de cultura com glicose. A levedura *S. meliponinorum* apresentou uma taxa de 55% de células viáveis em meio com xilose e 75% em meio com glicose no período de 12 horas.

O fato das leveduras *W. anomalus* BB.10 e *S. meliponinorum* apresentarem maior viabilidade em glicose que em xilose quando submetidas a estresse térmico pode ser devido ao fato da glicose ser um precursor na formação da trealose, um dissacarídeo não redutor constituído de duas unidades de glicose. A trealose possui função de proteção para a célula de levedura durante processos de estresse, tais como altas temperaturas, choque osmótico, efeitos tóxicos do etanol e desidratação (ALCARDE; BASSO, 1997).

As leveduras *S. pombe* e *W. anomalus* FRP.04 apresentaram resistência térmica em 12 horas de cultivo. A capacidade dessas leveduras de manter uma boa viabilidade em altas temperaturas é uma vantagem em bioprocessos visando à produção de etanol, considerando que, nos processos fermentativos, a temperatura na dorna de fermentação eleva-se, podendo atingir até 40 °C (LIMA et al., 2001).

Ao comparar os resultados encontrados para consumo das duas fontes de carbono, foi constatada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com resultados consideravelmente maiores no consumo de glicose que de xilose por todas as leveduras selecionadas. O consumo máximo de glicose variou de 98 a 100% nas primeiras 6 horas, enquanto o consumo de xilose variou de 22 a 60% em 12 horas, com o menor consumo apresentado pela levedura *S. pombe* e o maior consumo pela levedura *S. meliponinorum*. A variação na temperatura influenciou no consumo de xilose da levedura FRP.09, que mostrou uma menor taxa de consumo na temperatura de 40 °C, coerente com o menor número de células viáveis.

Figura 10 - Levedura *Wickerhamomyces anomalus* BB.10 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

—■— xilose 28 °C; —●— xilose 32 °C; —▲— xilose 40 °C; —▼— glicose 28 °C; —◆— glicose 32 °C; —◄— glicose 40 °C

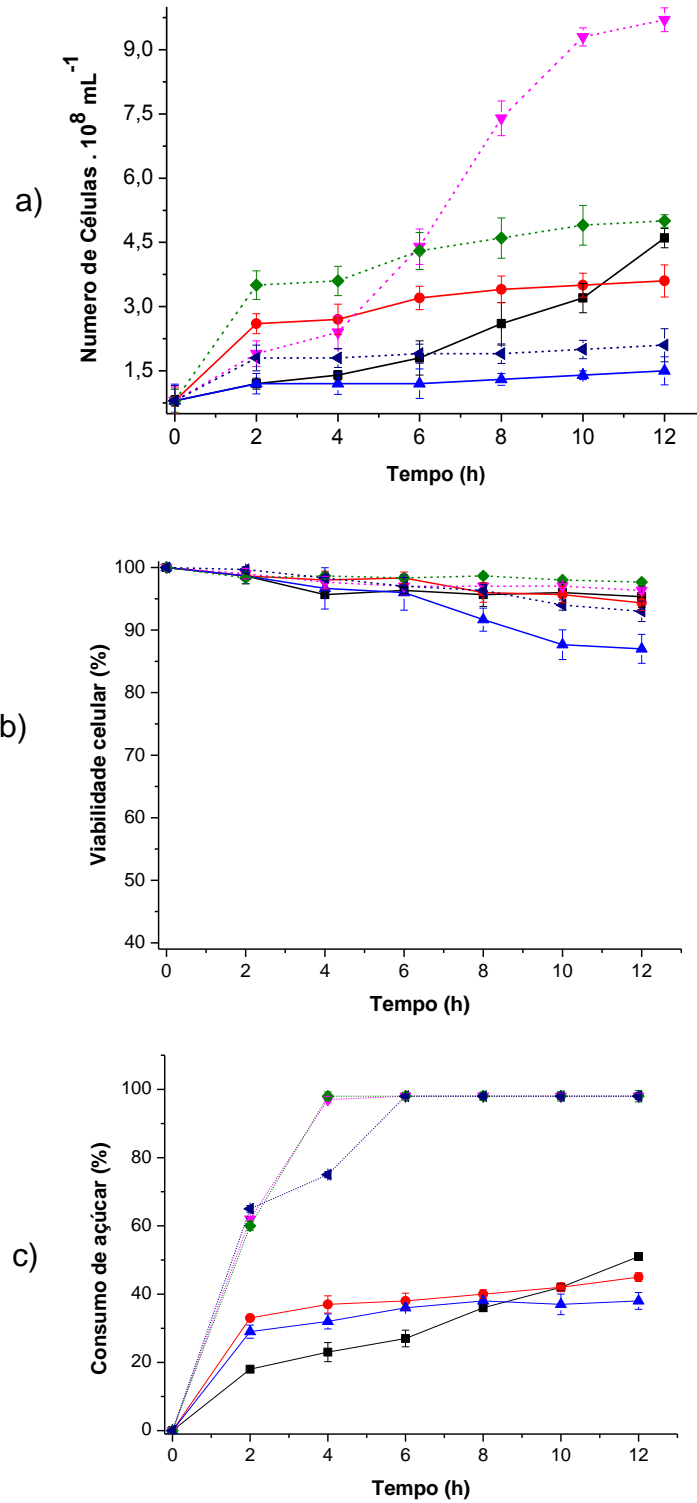


Figura 11 - Levedura *Schizosaccharomyces pombe* cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar.

■ xilose 28 °C; ● xilose 32 °C; ▲ xilose 40 °C; ▼ glicose 28 °C; ◆ glicose 32 °C; ◆ glicose 40 °C

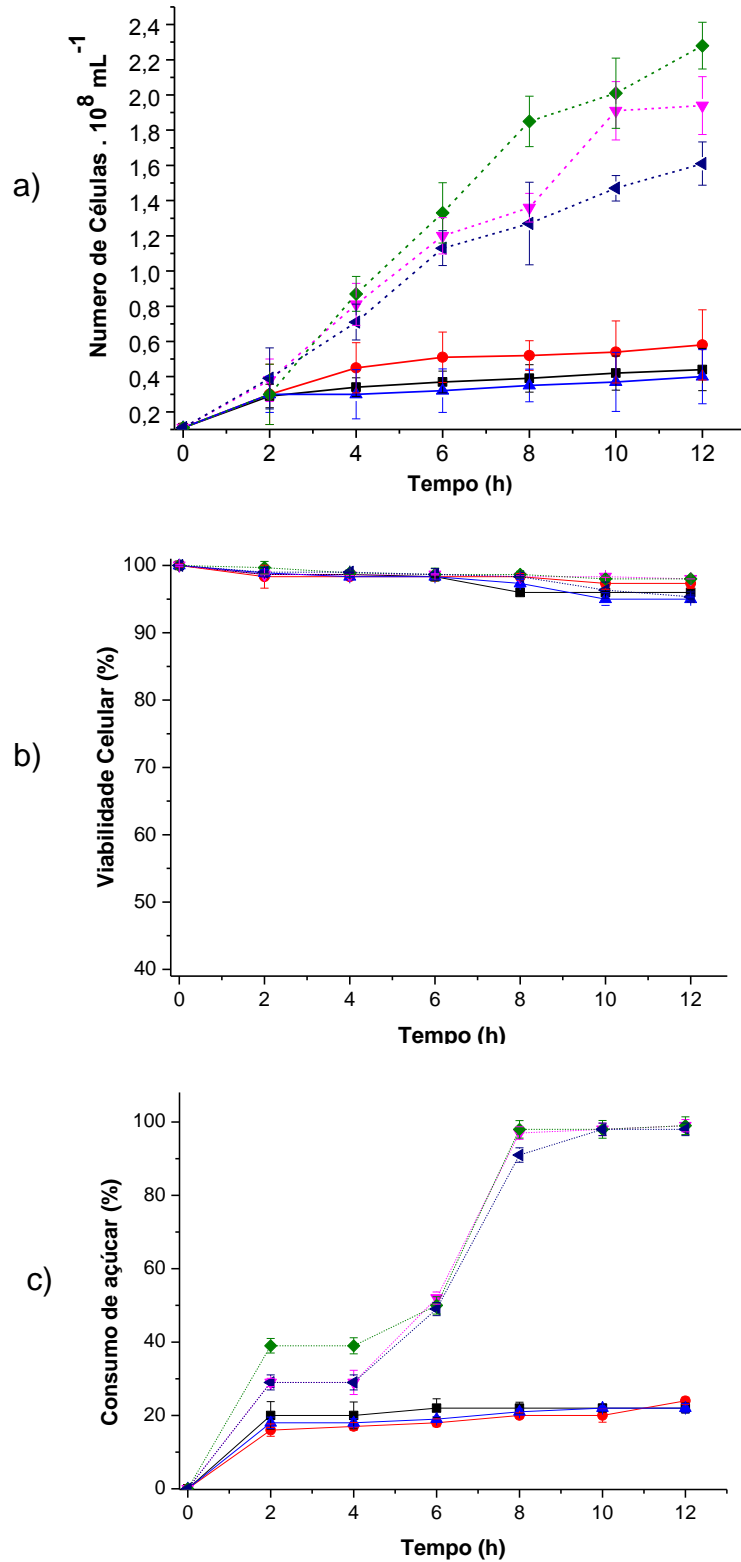


Figura 12 - Levedura *Wickerhamomyces anomalus* FRP.04 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

—■— xilose 28 °C; —●— xilose 32 °C; —▲— xilose 40 °C; —▼— glicose 28 °C; —◆— glicose 32 °C; —◄— glicose 40 °C

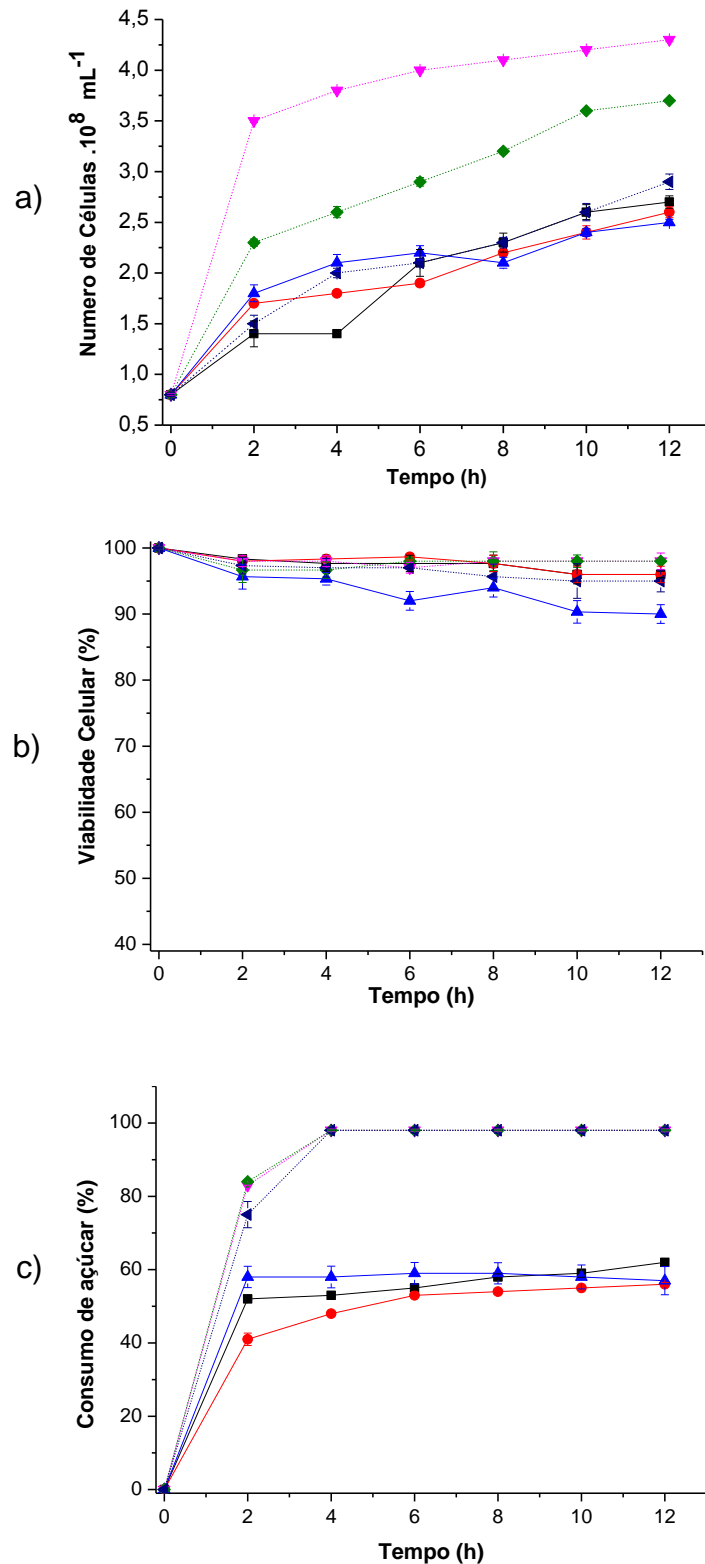
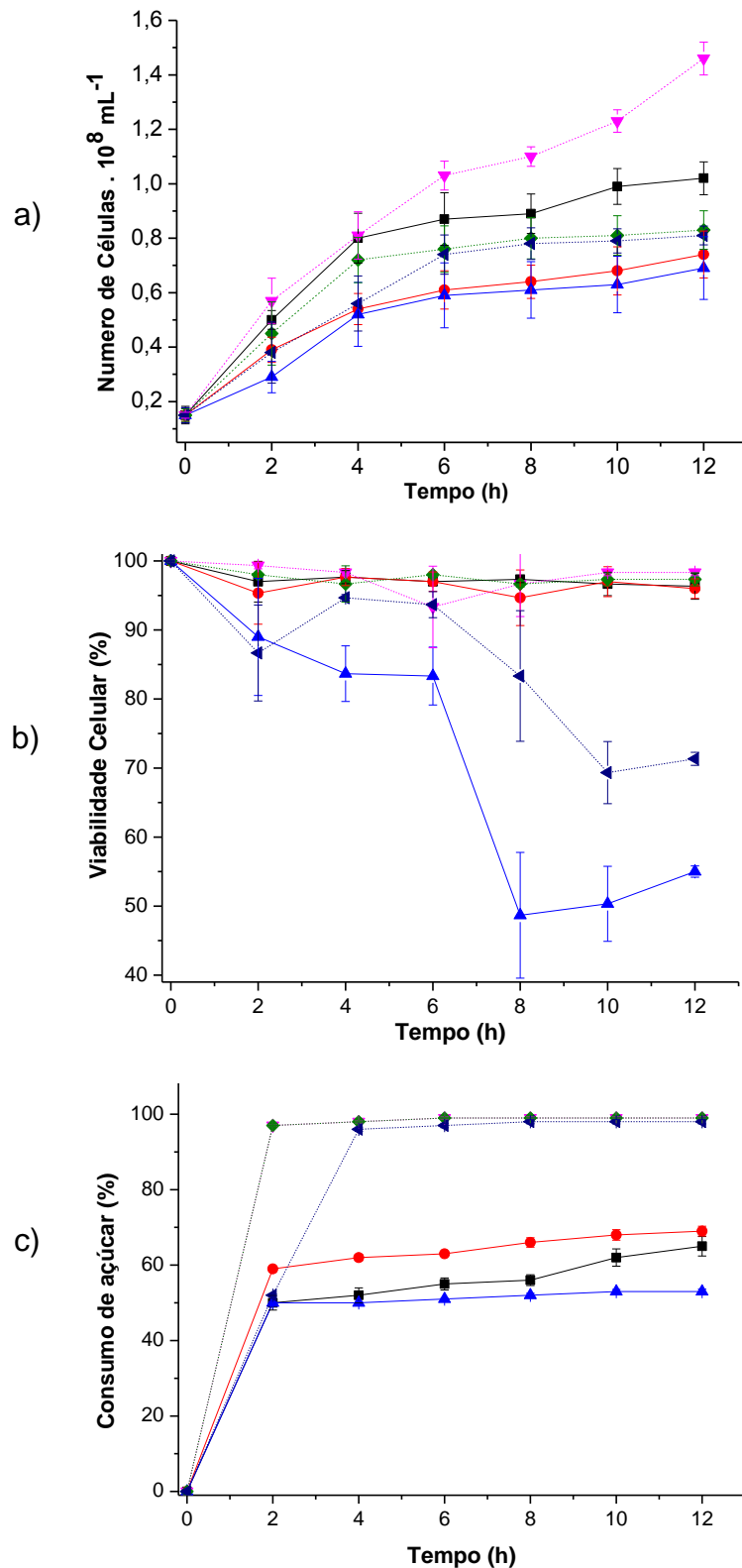


Figura 13 - Levedura *Starmerella meliponinorum* cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar, incubada nas temperaturas 28, 32 e 40 °C. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar.

—■— xilose 28 °C; —●— xilose 32 °C; —▲— xilose 40 °C; —▼— glicose 28 °C; —◆— glicose 32 °C; —◄— glicose 40 °C



5.3 - Avaliação dos efeitos da acidez no crescimento, viabilidade celular e consumo de açúcares das cepas isoladas

Na avaliação dos efeitos de temperatura definiu-se 28 °C para as duas cepas de leveduras *W. anomalous* BB.10 e FRP.04 e *S. meliponinorum* e 32 °C para a levedura *S. pombe* para a continuidade da pesquisa.

Foram avaliados os efeitos da acidez sobre o crescimento, viabilidade e consumo de açúcares das leveduras selecionadas em meio de cultura contendo xilose e meio com glicose como fontes de carbono e os resultados encontrados para cada levedura avaliada estão ilustrados nas Figuras 14 a 17.

De modo geral, pode-se considerar o pH 4,0 como ideal em todos os parâmetros analisados por todas as leveduras avaliadas neste trabalho. Ao analisar os resultados de crescimento da levedura *S. meliponinorum*, é importante mencionar que o número de células viáveis da levedura quando cultivada em xilose na temperatura de 28 °C foi maior que o número encontrado em glicose na temperatura de 32 °C. Uma situação similar ocorreu quando foram avaliados os efeitos da acidez na multiplicação celular dessa levedura. O número de células encontrados em pH 4,0 em xilose foi superior ao encontrado em pH 3,0 e 5,0 em glicose, indicando, nesse caso, que a temperatura e a acidez interferem mais do que a fonte de carbono no crescimento dessa levedura.

A variação nos níveis de acidez não apresentou efeito significativo na viabilidade celular das leveduras *S. pombe*, *W. anomalous* FRP.04 e *S. meliponinorum*, que mostraram-se resistentes à acidez. A capacidade dessas leveduras de manter uma boa viabilidade em meios ácidos é uma característica vantajosa em bioprocessos visando à produção de etanol, considerando que, nos processos fermentativos com reutilização de leveduras, é realizado tratamento com ácido sulfúrico em pH 2,0 a 3,5 durante uma ou duas horas, visando à redução da carga microbiana. Dessa forma, a fermentação alcoólica se inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0 (LIMA et al. 2001). Aliado a isso, em mostos de hidrolisados hemi-celulósicos de bagaço de cana, a presença do ácido acético interfere no pH do meio, tornando o meio mais ácido. Respostas de estresse de leveduras são de particular importância para bioprocessos em indústria sucroalcooleira, cujo ambiente é altamente variável e as condições estão longe de serem constantes.

A levedura *W. anomalus* BB.10 reduziu a viabilidade celular apenas no pH 3,0 em xilose com uma viabilidade de 88% e em meio contendo glicose a levedura manteve uma viabilidade de 93%. Dorta (2006), no estudo de fatores sinérgicos entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de leveduras, após análises de todos os parâmetros estressantes, verificou que o mais baixo valor de pH (3,6) foi o que mais interferiu no metabolismo das linhagens estudadas.

A sensibilidade das leveduras a meios ácidos pode ser explicada por Estruch (2000), que afirma que o pH interno da célula se mantém na faixa de 5,8 a 6,9 seja qual for o valor do pH extracelular, entretanto valores baixos de pH tornam o meio mais agressivo, uma vez que exigem das leveduras maior dispêndio de energia na manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que ficam expostas ao meio externo, fazendo com que algumas leveduras sejam intolerantes a ambientes muito ácidos.

Os resultados mostraram que houve uma influência do pH 3,0, assim como da temperatura de 40 °C na multiplicação e viabilidade celular da levedura *W. anomalus* BB.10 em meio contendo xilose. Em meio contendo glicose, os dois parâmetros influenciaram na multiplicação celular, mas não na viabilidade. A glicose influenciou na resistência térmica e resistência à acidez da levedura *W. anomalus* BB.10.

Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Martini (2014), no crescimento da levedura *Meyerozyma guilliermondii* em pH 3,5 – 4,5 e 5,5. A autora constatou que em pH 3,5 a levedura apresentou melhor produção de biomassa em meio com glicose enquanto que em pH 4,5 e 5,5 não foi observado diferença estatística significativa entre glicose e xilose.

Não houve diferença significativa no consumo de açúcares nos diferentes níveis de acidez pelas leveduras selecionadas. A diferença foi no consumo das duas fontes de carbono com um consumo de glicose que variou de 98 a 100% em até 6 horas e de 22 a 69% de xilose em 12 horas, com o menor consumo pela levedura *S. pombe* e o maior consumo pela levedura *S. meliponinorum*.

Figura 14 - Levedura *Wickerhamomyces anomalus* BB.10 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

—■— xilose pH 3,0; —●— xilose pH 4,0; —▲— xilose pH 5,0; —▼— glicose pH 3,0; —◆— glicose pH 4,0; —◄— glicose pH 5,0;

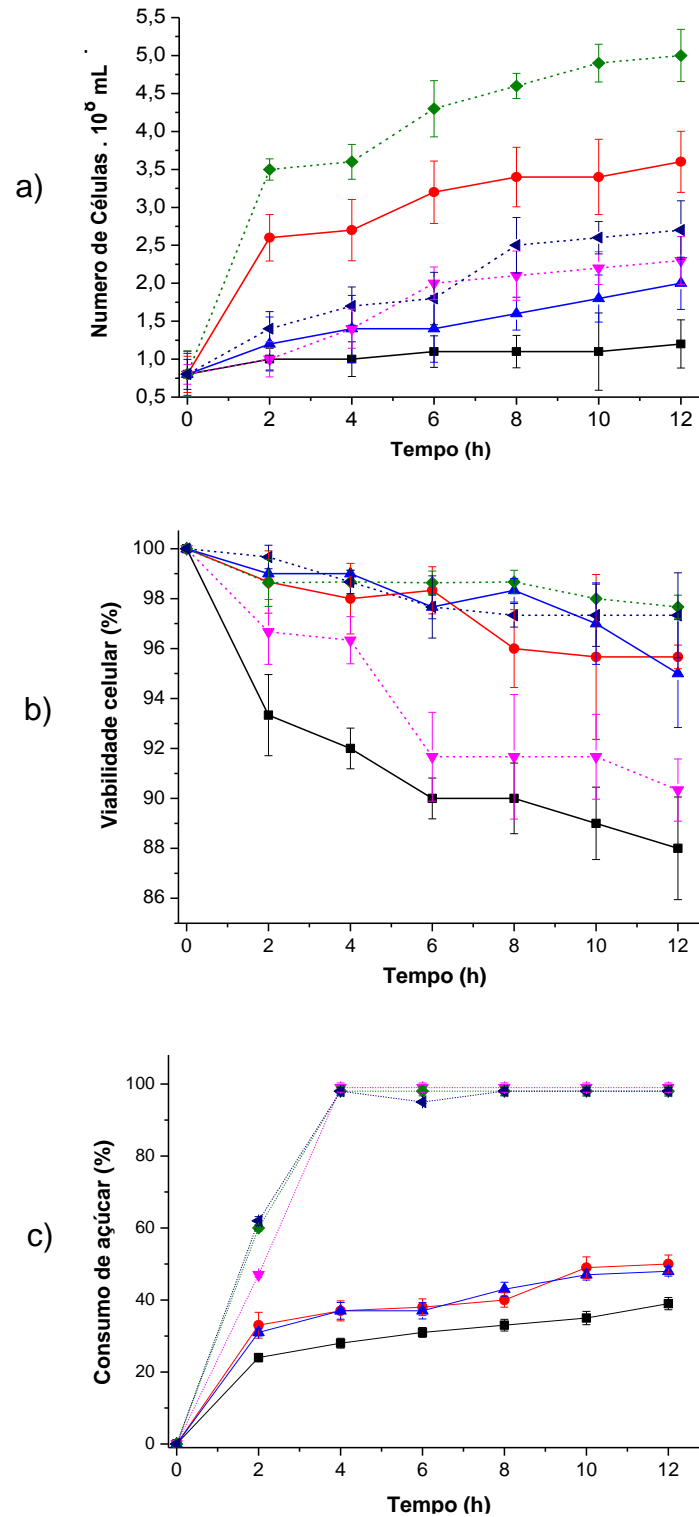


Figura 15 - Levedura *Schizosaccharomyces pombe* BB.92 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0. a) Biomassa; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

■ xilose pH 3,0; ● xilose pH 4,0 ▲ xilose pH 5,0 ▼ glicose pH 3,0 ◆ glicose pH 4,0 ◆ glicose pH 5,0;

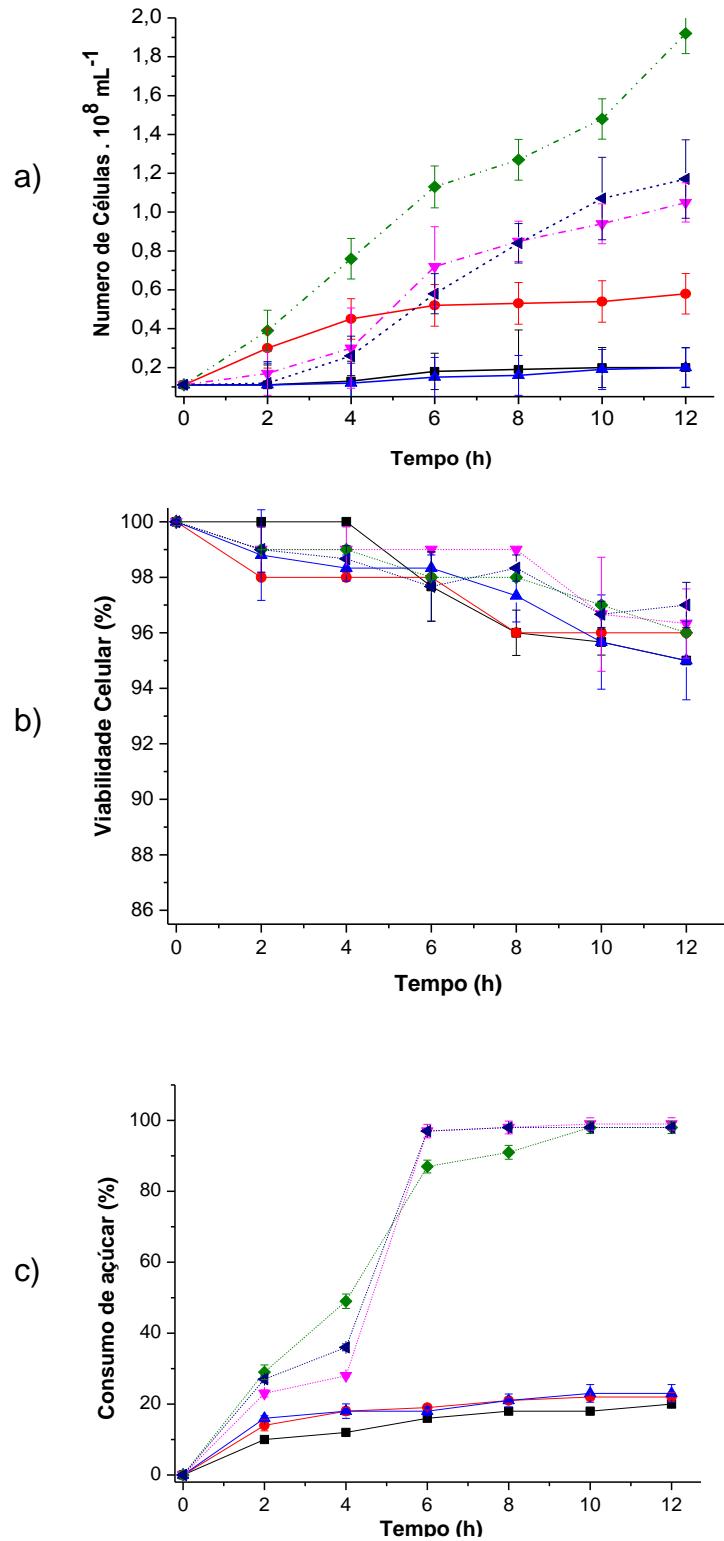


Figura 16 - Levedura *Wickerhamomyces anomalus* FRP.04 cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0. a) Crescimento celular; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

■ xilose pH 3,0; ● xilose pH 4,0 ▲ xilose pH 5,0 ▼ glicose pH 3,0 ◆ glicose pH 4,0 ◆ glicose pH 5,0;

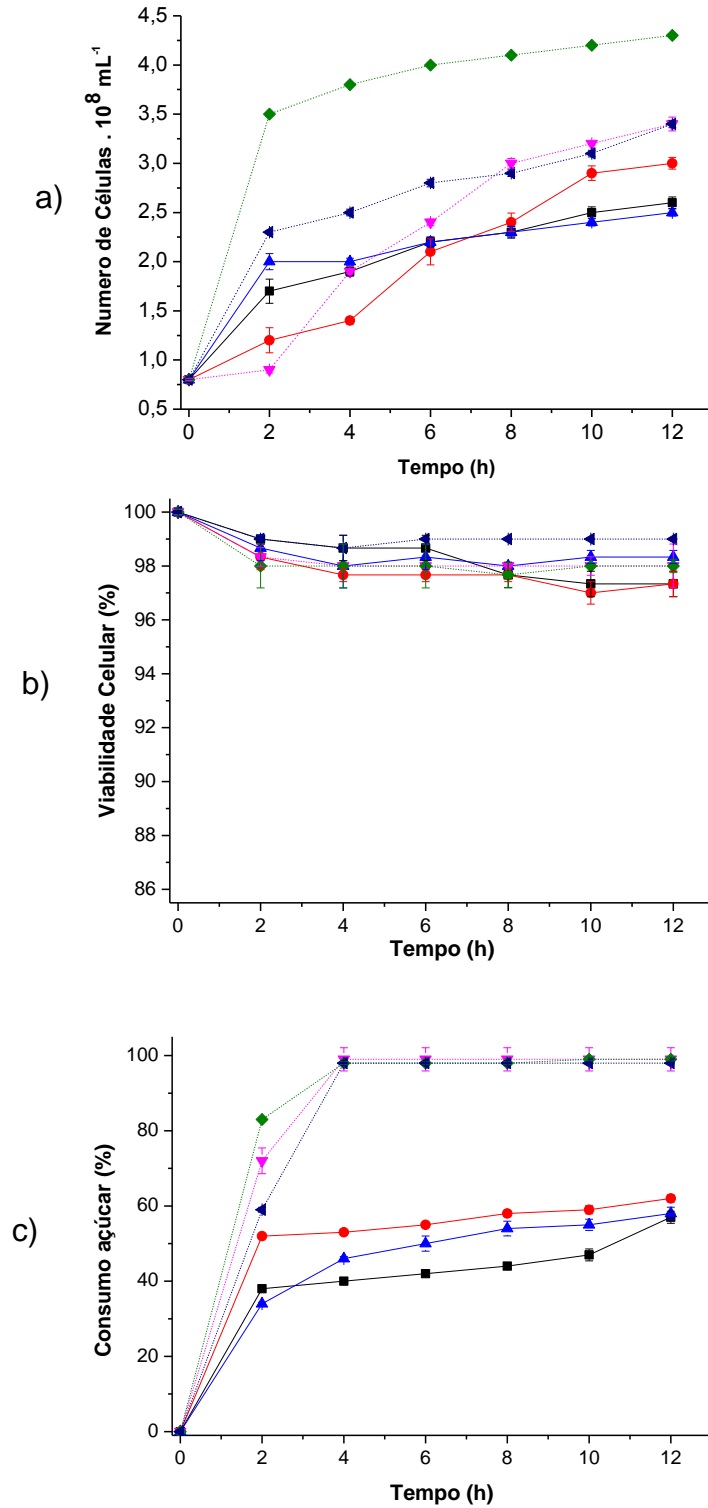
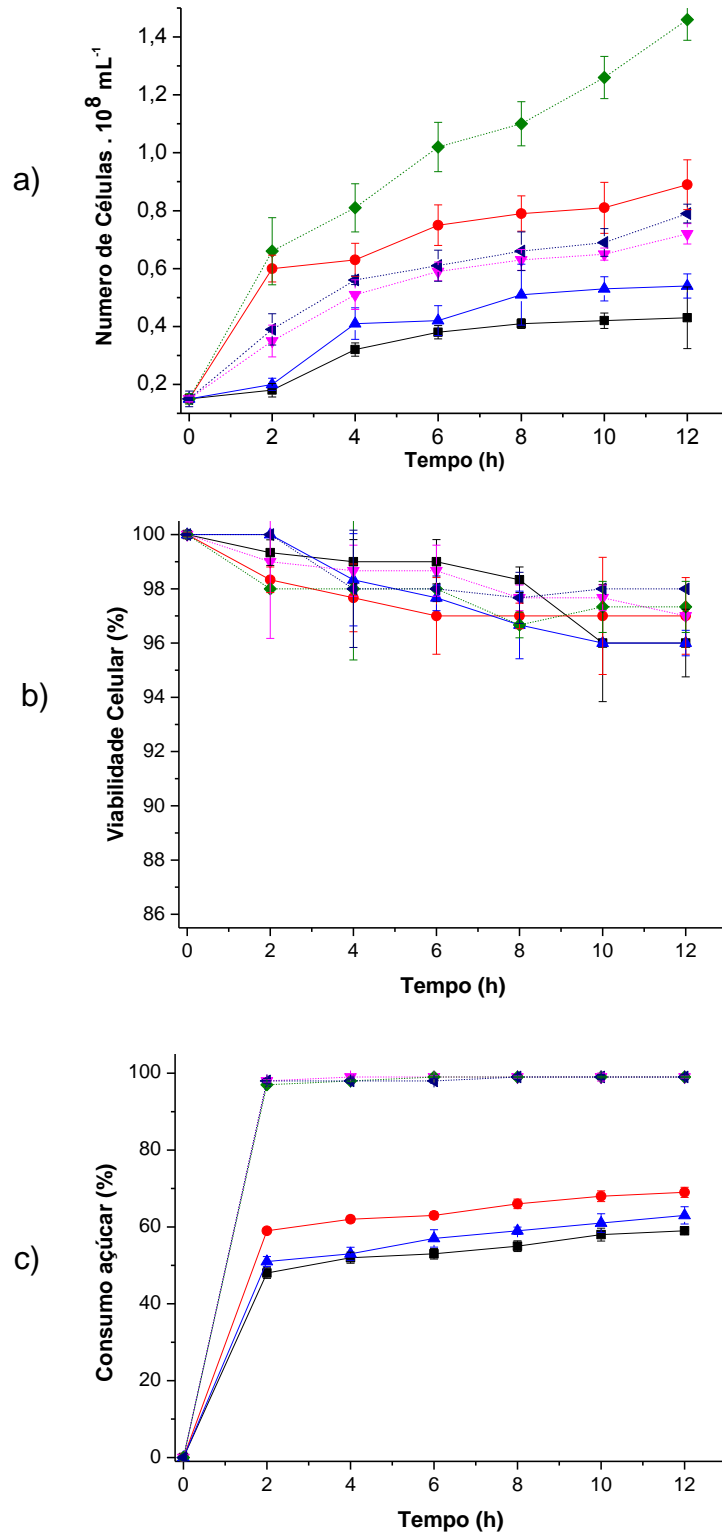


Figura 17 - Levedura *Starmerella meliponinorum* cultivada nos meios YEPD e YEPX contendo 2% de açúcar em pH 3,0 4,0 e 5,0. a) Biomassa; b) viabilidade celular; c) consumo de açúcar

—■— xilose pH 3,0; —●— xilose pH 4,0; —▲— xilose pH 5,0; —▼— glicose pH 3,0; —◆— glicose pH 4,0; —◄— glicose pH 5,0;



5.4 - Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica a partir da xilose em meio semissintético.

Nestes ensaios, em meio de cultura com xilose, foram avaliados o consumo de xilose, viabilidade celular, produção de etanol, xilitol e biomassa ilustrados na Figura 18 (linhas contínuas e símbolos fechados); a conversão de xilose em etanol (Y_p/s), produtividade volumétrica de etanol (Q_p) a conversão de D-xilose em biomassa (Y_x/s), conversão de xilose em xilitol (Y_p/s), produtividade volumétrica de xilitol (Q_p) e eficiência de conversão de xilitol e etanol (Γ) apresentados na Figura 19 (linhas contínuas e símbolos fechados).

Em meio de cultura contendo glicose, foram avaliados o consumo de açúcar, produção de etanol, glicerol e ácido acético, produção de biomassa e viabilidade celular ilustrados na Figura 18 (linhas pontilhadas e símbolos abertos), conversão de glicose em etanol (Y_p/s), produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e a conversão de glicose em biomassa (Y_x/s) na Figura 19 (linhas pontilhadas e símbolos abertos).

Conforme resultados apresentados na Figura 18 b, d, na fermentação em meio de cultura com xilose, as leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe* produziram 0,63 e 2,7 g L⁻¹ de etanol, respectivamente, enquanto as duas cepas de leveduras *W. anomalus*, BB.10 e FRP.04 produziram apenas resquícios de etanol.

A levedura *W. anomalus* BB.10 foi a que melhor consumiu xilose, com uma taxa de assimilação de 38,7 g L⁻¹, equivalente a 55,3% do açúcar em 96 horas. No entanto esse açúcar consumido não foi convertido a etanol, e sim a xilitol (8,0 g L⁻¹) e biomassa (com um aumento de 59,7%). Resultados semelhantes a estes foram encontrados por Barbosa et al. (1988), quando avaliaram nove cepas de *W. anomalus*, (anteriormente designada *Hansenula anomala*) e verificaram um consumo de 21 a 56% de xilose em 48 horas. Das nove cepas avaliadas, apenas uma (*H. anomala* IZ 1224) produziu etanol numa concentração de 0,2 g L⁻¹ em 48 horas. Todas produziram xilitol numa concentração que variou de 1,2 a 6,1 g L⁻¹ em 48 horas.

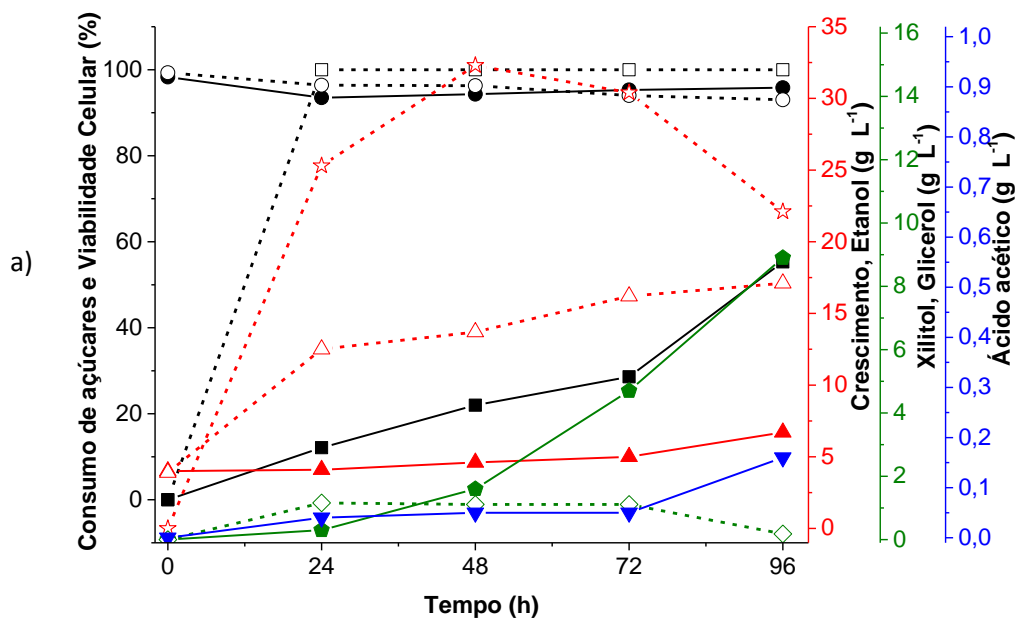
Para a compreensão da produção de xilitol e não de etanol por essa levedura, é importante lembrar do que dizem Yokoyama et al. (1995) sobre a especificidade das enzimas com os cofatores, fato que pode estar relacionado ao tipo de produto de fermentação obtido da assimilação da xilose. De acordo com esse autor, microorganismos que apresentam a enzima xilose redutase dependente de NADH são

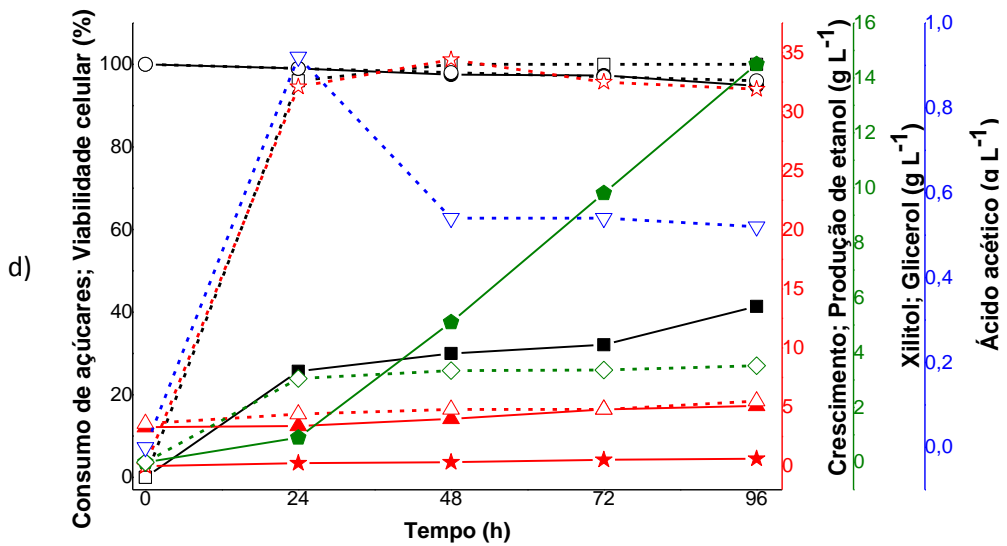
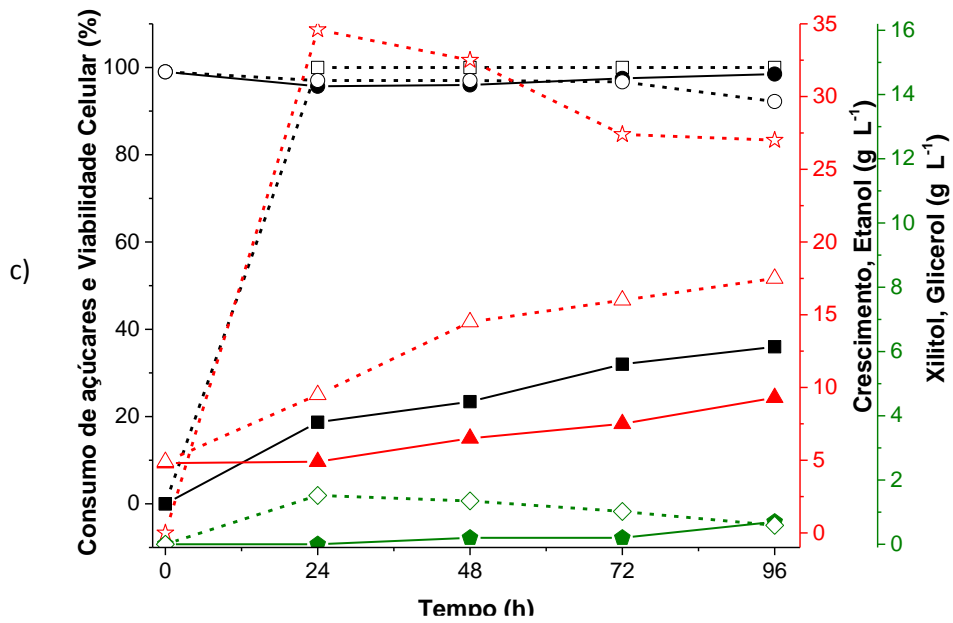
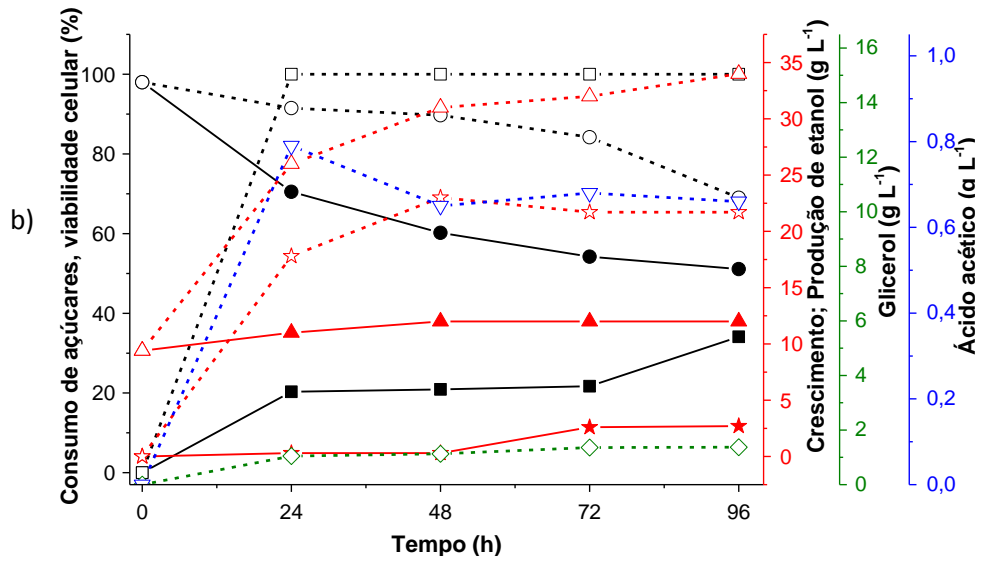
melhores produtores de etanol enquanto a dependência para NADPH propicia o favorecimento da produção de xilitol.

Diferentemente dos resultados da levedura BB.10 *W. anomalus*, a levedura *S. pombe* consumiu menos xilose, produziu menos biomassa, apenas resquícios de xilitol com produção de etanol, glicerol e ácido acético (Figura 18 a b).

Figura 18 - Média dos valores dos parâmetros analisados durante fermentação em meio semissintético com xilose (símbolos fechados e linhas contínuas) e glicose (símbolos abertos e linhas pontilhadas) como fonte de carbono, pelas leveduras *W. anomalus* BB.10 (a); *S. pombe* (b); *W. anomalus* FRP.04 (c); e *S. meliponinorum* (d)

■ Consumo (xilose) · □ · Consumo (glicose) —●— Viabilidade (xilose) · · ○ · Viabil. (glicose)
 ▲ Massa seca (xilose) · · △ · Massa seca (glicose) —★— Etanol (xilose) · · ☆ · Etanol (glicose)
 ● Xilitol (xilose) · · ◇ · Glicerol (glicose) · · ▽ · Ácido acético (glicose)





Em relação ao crescimento, com exceção da levedura *S. meliponinorum*, que não apresentou diferença entre as duas fontes de carbono, a xilose não foi um substrato muito eficiente para as demais leveduras se comparada à glicose, conforme é mostrado na Figura 18 d.

Há poucos trabalhos relatados com fermentação de xilose por *S. pombe*, porém estes já haviam descrito a capacidade dessa levedura de produzir etanol a partir de pentoses. Gong et al. (1983), avaliando a conversão de xilose em etanol por 8 estirpes de *S. pombe* em meio de cultura YMP (extrato de malte, extrato de levedura e peptona) suplementado com 5% de xilose e com um inóculo que variou de $1-3 \times 10^8$ células mL⁻¹ incubados a 30 °C em agitação de 200 rpm por 72 horas, alcançaram quantidades que variaram de 1 a 5 g L⁻¹ de etanol.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho com *S. pombe* foram apresentados por Tantirungkij 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.

É possível observar, ainda na Figura 18 a, c, que a levedura *W. anomalus* FRP.04, da mesma forma que a cepa BB.10, também não pode ser utilizada na produção de etanol a partir da xilose. Os resultados de baixa produção de xilitol e ausência de etanol pela levedura *W. anomalus* FRP.04 são condizentes com os resultados de maior formação de biomassa.

Da xilose presente no meio de cultura, 41,4 % foram assimilados pela levedura *S. meliponinorum*. A partir desse consumo, foram produzidos concomitantemente 0,63 e 14,5 g L⁻¹ de etanol e xilitol e um aumento de 54% na biomassa em 96 horas (Figura 18 d). Das leveduras avaliadas neste trabalho, a *S. meliponinorum* foi a que produziu a maior quantidade de xilitol, com baixa produção de etanol.

Pode-se observar, na Figura 18 que, contrariamente à xilose, 98 a 100% da glicose foram consumidos e convertidos a etanol por todas as leveduras. A levedura *W. anomalus* FRP.04, embora não possua capacidade de produzir etanol a partir da xilose, apresenta características atraentes para fermentação alcoólica a partir da glicose. Na avaliação dos efeitos de temperatura e acidez, mostrou-se resistente a pH baixo e a temperatura alta. É citada na literatura como álcool-tolerante, apresentando resistência em concentrações de até 14% de etanol (v/v) (TAO; GAO; LIU,

2011). Outra característica muito importante para fermentação alcoólica é que diferentes cepas dessa espécie podem produzir elevados níveis de toxina *killer* com um amplo espectro de atividades (SUN et al., 2012; PASSOTH et al., 2013).

A redução na concentração de etanol em glicose a partir de 48 horas observada para todas as leveduras é proporcional ao aumento de células (Figura 18), mostrando que as leveduras podem ter assimilado o etanol como fonte de carbono para crescimento, já que a glicose havia sido esgotada em 24 a 48 horas. Testes-controle já haviam evidenciado que não estava ocorrendo perda do etanol por volatilidade durante a execução dos experimentos (dados não apresentados). Pode ser que, além do consumo de etanol, as leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum* tenham consumido ácido acético, visto que este também apresenta uma redução a partir de 24 horas. Da mesma forma, as duas cepas de *W. anomalus*, além da redução do etanol, apresentaram redução no glicerol. Lynferd e Kermit (1948) já haviam evidenciado a capacidade da levedura *W. anomalus* – anteriormente identificada como *Hansenula anomala* – de assimilar glicerol e álcool etílico, além de glicose e xilose, como fonte de carbono.

Observa-se, na Figura 18 d, que a produção de glicerol pela levedura *S. meliponinorum* foi maior que a quantidade produzida pelas demais leveduras. A produção de 3,6 g L⁻¹ equivalente a 4,8% do açúcar consumido está de acordo com relatos de Lima et al. (2001), que, durante a fermentação alcoólica, de 2 a 5% do açúcar consumido pode ser convertido a glicerol a partir de um desvio da fosfodiidroxetona da glicólise. Ainda segundo esses autores, o glicerol é um produto secundário da fermentação e está associado à manutenção do equilíbrio oxido-redutor da célula, que pode ser alterado pela presença de ácidos orgânicos e excesso de biomassa. Sendo assim, a maior formação de glicerol pela *S. meliponinorum* é condizente com a menor formação de biomassa em relação às outras leveduras avaliadas nesta pesquisa. Pode ser observada, ainda na Figura 18 b, redução na viabilidade celular da levedura *S. pombe* em 96 horas, chegando a uma perda de 51% em meio com xilose, não diferenciando estatisticamente da taxa em meio com glicose. Vale lembrar que, nos experimentos para avaliar os efeitos da temperatura e acidez no desenvolvimento das leveduras descritos nos itens 5.2 e 5.3 em 12 horas, a levedura BB.92 manteve uma boa viabilidade mesmo em temperatura de 40 °C e pH 3,0, mostrando que a perda de viabilidade ocorre a partir desse tempo.

A maior produção de etanol a partir da xilose foi obtido pela levedura *S. pombe*. Porém, nessa fonte de carbono, o rendimento de etanol foi menor, sendo necessárias 72 horas para atingir um rendimento ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p) de etanol de 0,10 e 0,03, respectivamente, sendo que, em substrato com glicose, o rendimento ($Y_{p/s}$) máximo de etanol 0,32 deu-se com 48 horas (Figura 19).

O rendimento de etanol ($Y_{p/s} = 0,10$) e a produtividade volumétrica ($Q_p = 0,03$) pela *S. pombe* neste trabalho (Figura 19 b) é considerado muito baixo se comparado com resultados encontrados por outras leveduras, como *Candida Intermedia* e *Scheffersomyces stipitis*, com rendimentos em etanol de $Y_{p/s} = 0,33$ e 0,49 (KALHORINIA et al., 2014; YU et al., 2015).

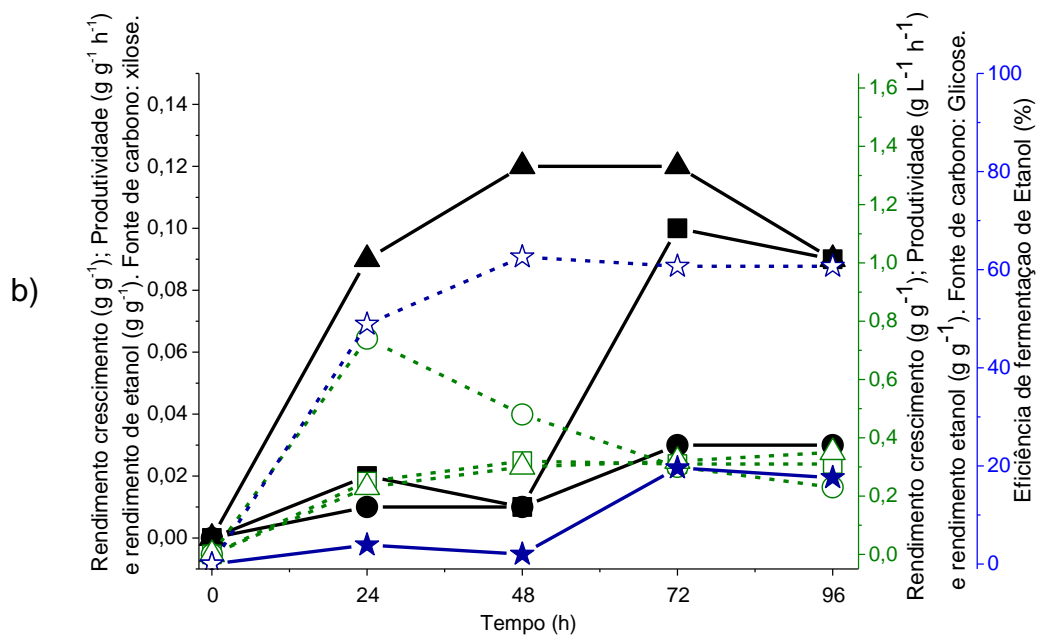
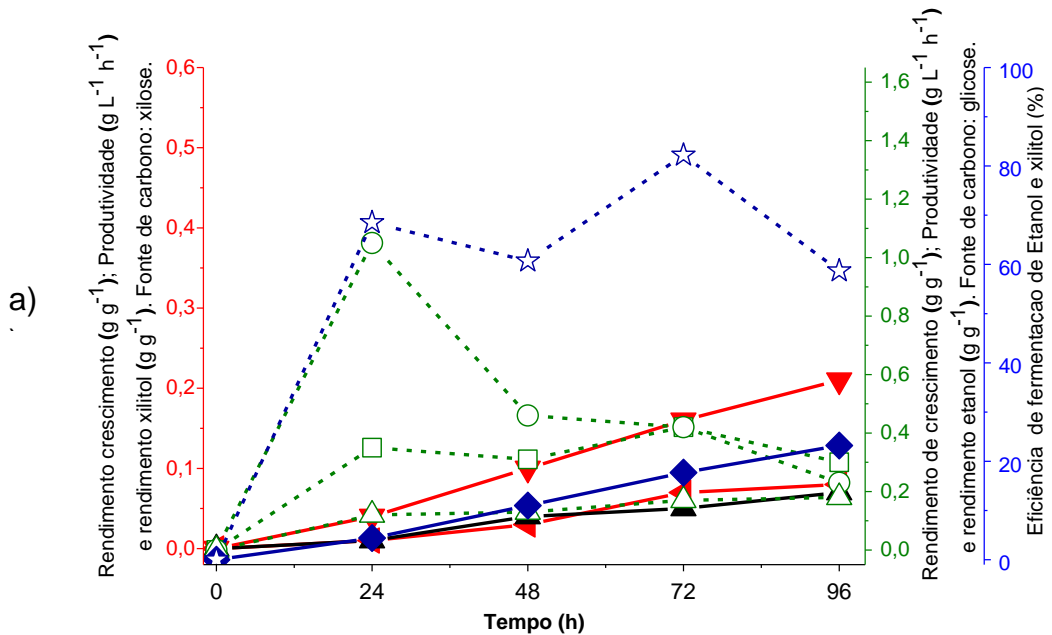
O fator de conversão relaciona a quantidade de etanol produzida em relação à concentração de açúcar consumido. Estequiometricamente, o rendimento teórico de etanol a partir da glicose e da xilose é de $0,511 \text{ g g}^{-1}$ de glicose ou xilose consumida.

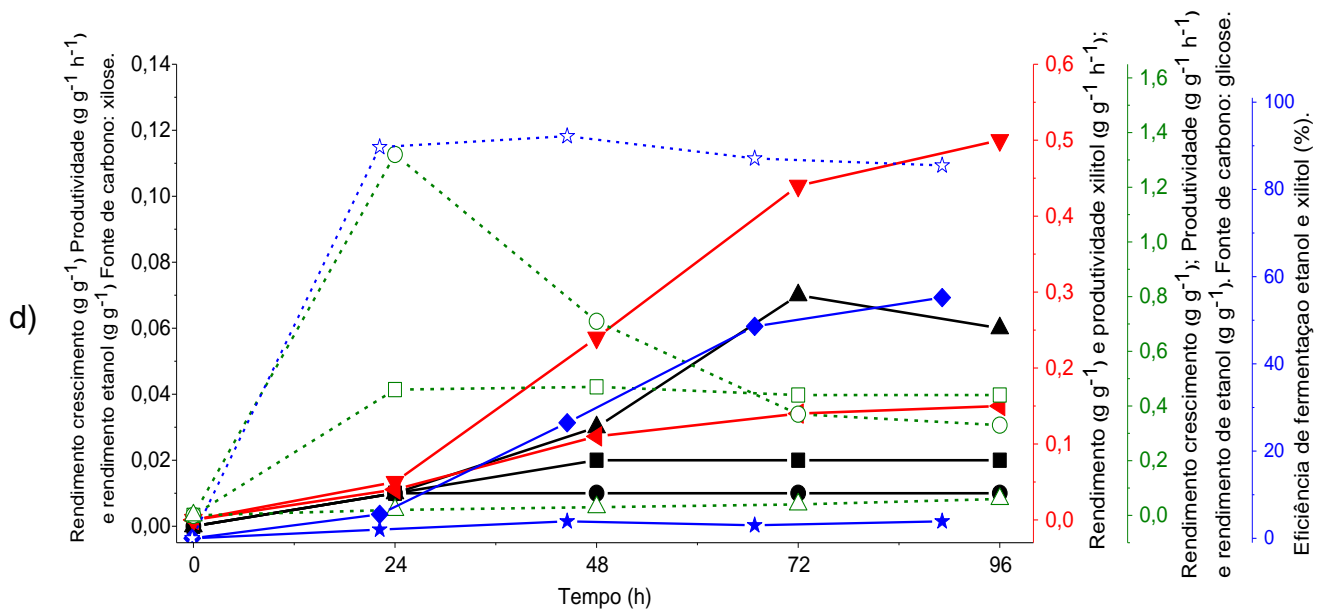
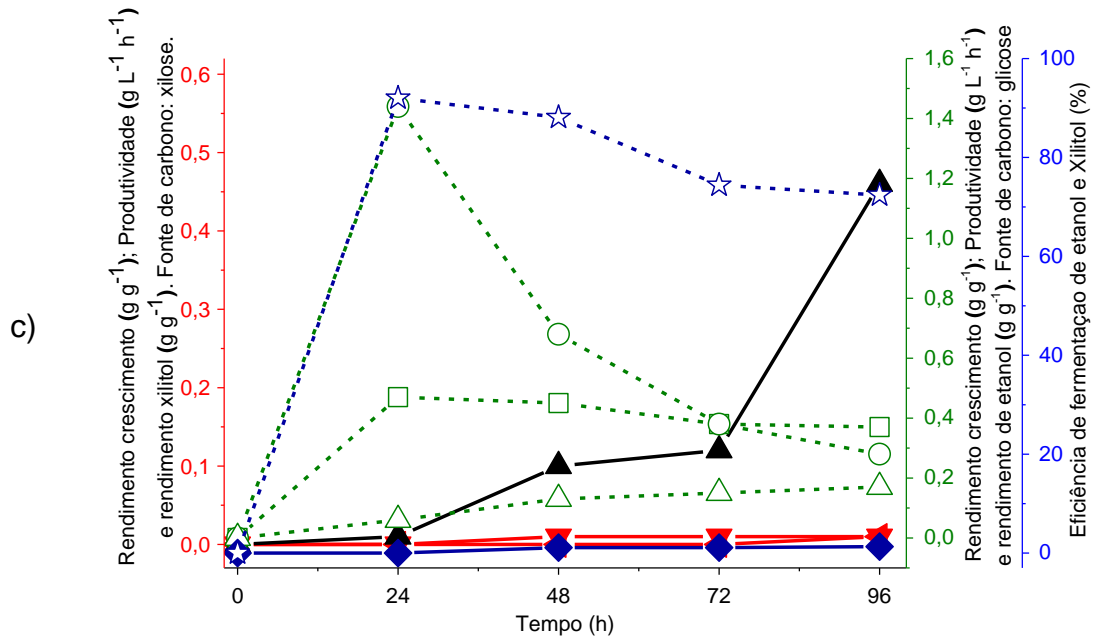
No entanto, em cultivo, mesmo quando todo o açúcar é consumido, o rendimento é menor que o teórico visto que parte do açúcar é utilizado para crescimento celular e produção de metabolitos secundários, podendo ser reduzido para 90 - 92% (LIMA; MARCONDES, 2002). Embora o rendimento de etanol a partir da xilose para as leveduras que a produziram seja considerado muito baixo, o mesmo não pode ser dito para rendimentos de etanol obtidos a partir da glicose. Os maiores rendimentos em etanol foram obtidos pelas duas cepas de leveduras *W. anomalus* e pela levedura *S. meliponinorum*, que ficou entre 0,42 e 0,47 g g^{-1} com uma eficiência fermentativa de 92% em relação ao rendimento teórico. Segundo Lima et al. (2001), valores de conversão de 90%, ou seja, rendimentos de 0,46, são considerados adequados no processo industrial.

Baseado nos resultados expostos e discutidos acima, foram selecionadas as leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe* para execução das próximas etapas da pesquisa.

Figura 19 - Média dos valores dos parâmetros analisados durante fermentação em meio semissintético com xilose (símbolos fechados e linhas contínuas) e glicose (símbolos abertos e linhas pontilhadas) como fonte de carbono, pelas leveduras *W. anomalous* BB.10 (a); *S. pombe* (b); *W. anomalous* FRP.04 (c) e *S. meliponinorum* (d)

- Rendimento etanol (xilose) ● Produtividade volumétrica (xilose) ▲ Rendimento de Crescimento (xilose)
 ▼ Rendimento de xilitol (xilose) ◀ Produtividade volumétrica de xilitol (xilose) □ Rendimento de etanol (glicose)
 ○ Produtividade volumetrica etanol (gl) △ Rendimento Crescimento (gl) ◆ Eficiência conversao xilitol (xilose)
 ★ Eficiência de conversao etanol (xilose) ☆ Eficiência de conversao etanol (glicose)

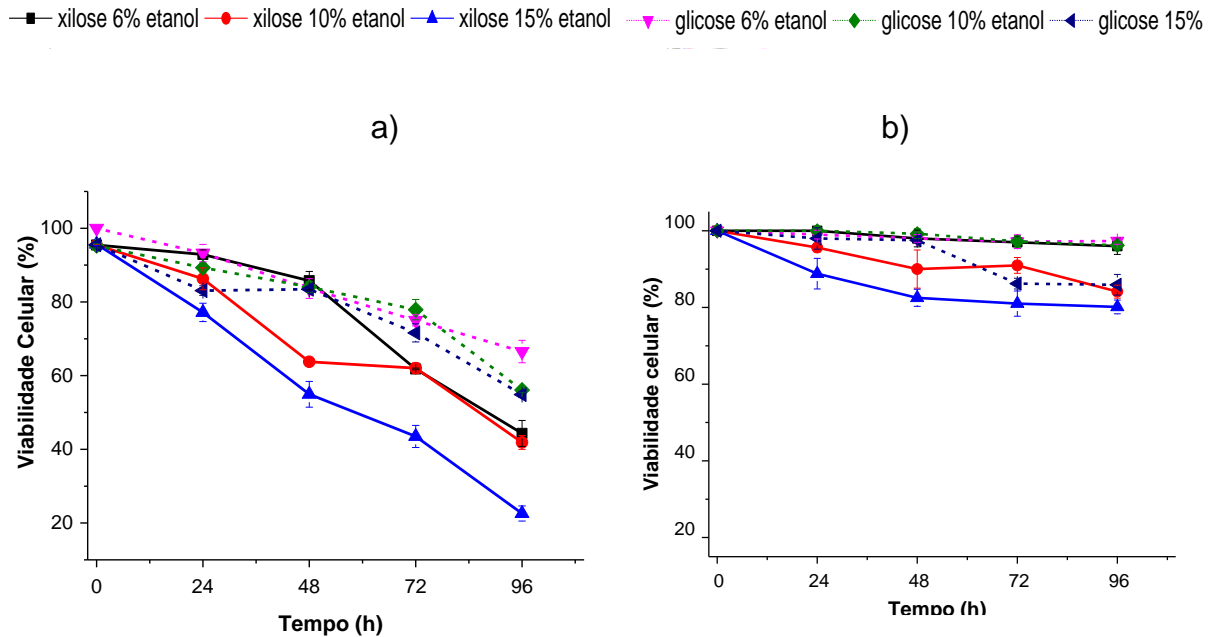




5.5 Avaliação dos efeitos do etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural sob a viabilidade celular das leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum*

Um método bastante utilizado para determinar a tolerância da levedura a diversos compostos tóxicos, como etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural, é a contagem de células vivas e mortas de leveduras cultivadas em meio de cultura suplementada com diferentes concentrações desses compostos. A avaliação da capacidade de sobrevivência de células expostas à compostos tóxicos é uma ferramenta útil para comparar a tolerância de diferentes cepas de leveduras.

Figura 20 - Levedura *S. pombe* (a) e *S. meliponinorum* (b) cultivadas em meio de cultura YEPD e YEPX contendo 6, 10 e 15% de etanol (v/v), incubadas em agitação de 150 rpm por 96 horas



Foram avaliados os efeitos das concentrações de etanol, 6, 10 e 15% (v/v), de furfural e 5-hidroximetilfurfural 0,02, 0,04 e 0,06 % (v/v) em meio de cultura YEPD e YEPX sob a viabilidade celular das leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe*. O pH do meio de cultura foi corrigido para 4,0 e a temperatura de incubação foi de 28°C para a primeira e 32°C para a segunda levedura. Os resultados podem ser observados nas Figuras 20 e 21.

A levedura *S. pombe* apresentou uma considerável redução na viabilidade celular em todas as concentrações de etanol em 96 horas, variando de 60 a 70% em meio com glicose e de 20 a 50% em meio com xilose.

A levedura *S. meliponinorum* mostrou-se menos sensível à toxidez do etanol que a levedura *S. pombe*, apresentando uma viabilidade celular de 80 a 85% nas concentrações de 10 e 15% de etanol (v/v) em meio com xilose. Em meio com glicose, a redução na viabilidade celular foi maior apenas na concentração de 15% de etanol, com uma viabilidade de 86%. Na concentração de 6% de etanol, não houve influência do etanol e da fonte de carbono, na viabilidade celular dessa levedura, mantendo em torno de 97,5% de células viáveis em 96 horas. Essa mesma viabilidade também foi encontrada na concentração de 10% de etanol em meio com glicose.

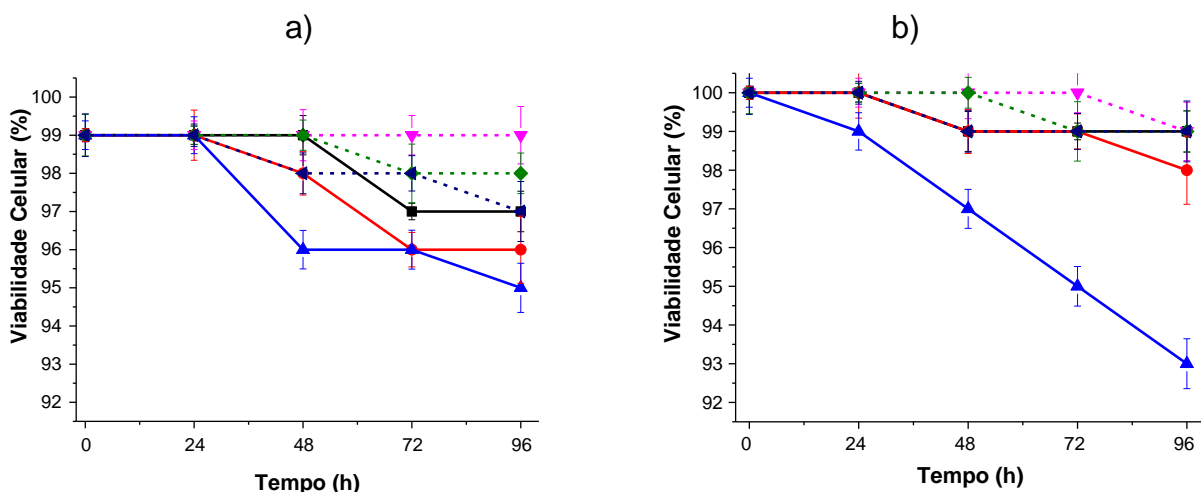
se. É importante destacar que, nestes testes, foram avaliados os efeitos do etanol sob a viabilidade celular das leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe* nas respectivas temperaturas de 28 e 32 °C. No entanto, vale lembrar que, à medida que a temperatura aumenta, aumenta também a sensibilidade da levedura à toxidez do etanol (LIMA et al., 2001). Em temperaturas mais altas, o aumento da toxicidade poderá levar à interrupção prematura do processo fermentativo antes que os açúcares presentes no meio tenham sido totalmente consumidos (CHI; ARNEBORG, 2000).

Guimarães (2005), utilizando o método de coloração com azul de metileno, estabeleceu uma viabilidade de 87% em leveduras incubadas a 37 °C, mas, quando elas foram incubadas em meios suplementados com 8% (v/v) de etanol em 30°C, a viabilidade caiu para 83%.

Outros resultados foram encontrados por Fernandes (2008), quando avaliou o efeito do binômio concentração de etanol/temperatura nas variações de 11% v/v etanol a 30° C e 20 % v/v etanol a 16 °C sobre a viabilidade celular de leveduras, estabelecida pela incapacidade da célula de se multiplicar, o que foi medido pela redução de unidades formadoras de colônias (UFC) em placa com meio sólido Yeast Malt (YM). Para todas as leveduras analisadas pelo autor, as taxas de viabilidade foram significativamente mais baixas sob o binômio 20 % v/v etanol a 16 °C do que as obtidas nas demais condições.

Figura 21 - Levedura *S. pombe* (a) e *S. meliponinorum* (b) cultivadas em meio de cultura YEPX contendo 0,02, 0,04 e 0,06% de furfural e 5-hidroximetilfurfural (v/v), separadamente, e incubadas em agitação de 150 rpm por 96 horas.

—■— Viab HMF 0,02% —●— Viab HMF 0,04% —▲— Viab HMF 0,06% ···▼··· Viab Furfural 0,02%
 ···◆··· Viab Furfural 0,04% ···◀··· Viab Furfural 0,06%



Diferentemente dos efeitos do etanol sobre a viabilidade celular, as concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural avaliadas nesta pesquisa não influenciaram na viabilidade celular, tendo em vista que as leveduras mantiveram uma viabilidade entre 98 e 99% em 96 horas quando expostas a diferentes concentrações de furfural. Uma pequena redução na viabilidade celular foi observada quando as leveduras foram submetidas às concentrações de 0,06 % de HMF, ficando as respectivas leveduras com 95 e 93% de viabilidade celular em 96 horas (Figura 21). Pode-se observar que as concentrações de HMF e furfural avaliadas neste trabalho não influenciaram na viabilidade celular das leveduras supracitadas.

Liu et al. (2004) verificaram que o crescimento de duas culturas de *S. cerevisiae* e *Scheffersomyces stipitis* foi completamente inibido a cerca de 15 g/L de HMF. O mesmo estudo revela ainda que, no caso da levedura *Scheffersomyces stipitis*, não foi verificado crescimento sequer na presença de 7,56 g/L de HMF, o que sugere que a levedura em questão apresenta uma menor tolerância a esse inibidor do que a levedura *S. cerevisiae*. Uma pesquisa realizada por Lee et al. (2011) sobre a resistência da levedura *S. cerevisiae* K35 a compostos derivados de lenhocelulose descreve uma forte inibição do crescimento desta na presença de concentrações de HMF superiores a 3 g/L após 12h de incubação. Os furanos são conhecidos por causar efeitos na viabilidade e fermentação de *S. cerevisiae* e serem convertidos por leveduras a compostos com menor capacidade inibitória, como álcool furfurílico, 2,5 bis-hidroximetilfurano (LIU; SLININGER; GORSICH, 2005). Entretanto, há diferenças importantes entre os efeitos causados por cada composto em diferentes cepas de leveduras (TAHERZADEH et al., 2000).

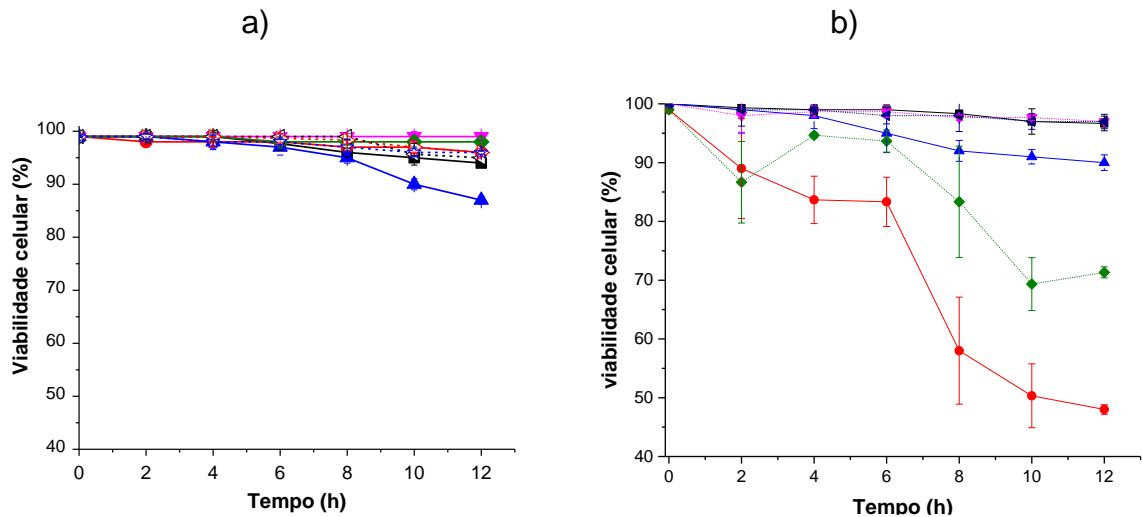
5.6 – Resistência das leveduras aos fatores estressantes

Fatores como temperatura de 40 °C, pH 3,0 e concentração etanólica de 15% (v/v), furfural e 5-hidroximetilfurfural são considerados estressantes para um grande número de leveduras no processo de fermentação alcoólica.

Ao sobrepor os resultados desses fatores para as leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum* (descrito anteriormente no item 5.2, 5.3 e 5.5), é possível visualizar (Figura 22) com clareza o fator que mais interfere na viabilidade celular das duas leveduras em questão, no tempo de 12 horas.

Figura 22 - Comparação dos resultados de viabilidade celular de todos os fatores estressantes pH 3,0, 40 °C, 15% etanol, 0,06% furfural e 0,06% HMF (v/v) da levedura *S. pombe* (a) e *S. meliponinorum* (b) em 12 horas de cultivo

—■— viab. xilose pH 3,0 —●— viab. xilose 40 °C —▲— viab. Xilose 15% etanol —▼— viab. xilose Furfural 0,06%
—◆— viab. xilose HMF 0,06% —◁— viab. glicose pH 3,0 —▷— viab. glicose 40 °C —☆— viab glicose 15% etanol



A levedura *S. pombe* embora tenha mostrado em avaliações anteriores uma redução considerável na viabilidade celular em 96 horas, nas primeiras 12 horas mantém uma boa viabilidade celular em todos os fatores considerados estressantes, com uma variância de 87 a 97%.

Em contrapartida, a levedura *S. meliponinorum* apresentou sensibilidade à temperatura de 40 °C, sendo este o fator que mais afeta essa levedura, principalmente em meio com xilose. Apresentou resistência à acidez, concentração de etanol 15% (v/v) e 0,06 % de furfural e 5-hidroximetilfurfural em 12 horas de cultivo.

5.7 - Avaliação dos efeitos da agitação na produção de etanol a partir da xilose pelas leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum*

Os resultados encontrados referentes a produção e rendimento de etanol e xilitol, massa seca e viabilidade celular, produtividade volumétrica e eficiência fermentativa em fermentação conduzida sem agitação (estática) e nos diferentes níveis de agitação estão ilustrados nas Figuras 23, 24 e 25.

Entre as condições avaliadas, verificou-se que a agitação de 200 rpm foi a que mais favoreceu o crescimento celular das leveduras *S. pombe* e *S. meliponino-*

rum, que atingiram um número de células de $2,1 \times 10^8$ e $1,9 \times 10^8$, respectivamente, em 96 horas. Na fermentação conduzida sem agitação, a levedura *S. meliponinorum* FRP.09 não apresentou nenhum crescimento, enquanto a levedura *S. pombe* BB.92 aumentou de 1,0 para $1,4 \times 10^8$ mL⁻¹.

Em uma cinética fermentativa não aerada, o oxigênio é transferido do espaço livre acima do líquido por meio da agitação que quebra continuamente sua superfície, aumentando, assim, a área de transferência do oxigênio. Se não há agitação, o acesso da levedura ao oxigênio fica comprometido. Diante disso, é importante lembrar que vários tipos de reações que ocorrem nos seres vivos requerem oxigênio como reagente, como, por exemplo, a biossíntese de esteróis em membranas de leveduras. De acordo com Madigan et al. (2010), essa reação não ocorre na ausência de oxigênio, de modo que organismos que crescem na ausência dessa molécula podem fazê-lo sem a presença desses lipídeos comprometendo a resistência e estabilidade da membrana plasmática. Adicionalmente, a falta ou uma taxa reduzida de oxigênio dissolvido podem causar muitos problemas na fermentação, como resultados de estresse nas leveduras (WHITE; ZAINASHEFF, 2010), o que pode explicar a redução da viabilidade celular encontrada nesta pesquisa quando incubadas sem agitação (Figura 23 a) com uma taxa de 29% para levedura BB.92 e 69% para a levedura *S. meliponinorum* FRP.09 em 96 horas.

Outro fator que pode ter contribuído para redução da viabilidade celular em fermentação conduzida sem agitação é que, nessas condições, as leveduras decantam, diminuem a superfície de contato com o meio e, conseqüentemente, com o acesso aos nutrientes necessários à sua sobrevivência.

Observando a Figura 23c, pode-se perceber que, diferentemente do perfil de crescimento celular das duas leveduras avaliadas, o rendimento de crescimento ($Y_{x/s}$) foi maior na fermentação conduzida sem agitação. Isso acontece porque, embora a taxa de assimilação de xilose (Figura 24) tenha sido baixa nessas condições, a maior parte do açúcar consumido foi convertido a biomassa.

Em agitação, a taxa de consumo de xilose foi muito maior, porém houve um desvio maior da fonte de carbono para produção de etanol e xilitol diminuindo assim o rendimento de crescimento.

Figura 23 - a) Número de células; b) = viabilidade celular; e c) rendimento de crescimento ($Y_{x/s}$) em fermentação sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm ■ = *S. meliponinorum*; ■ = *S. pombe*.

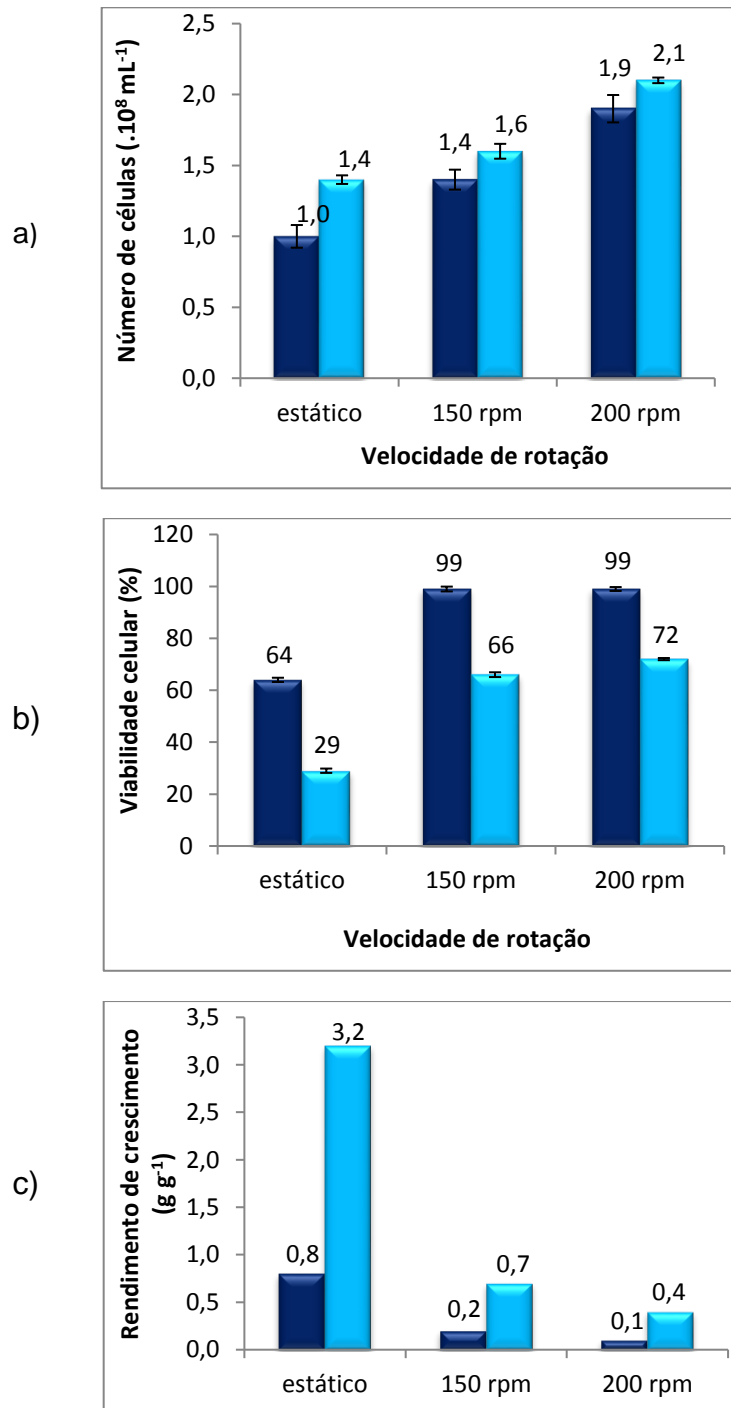
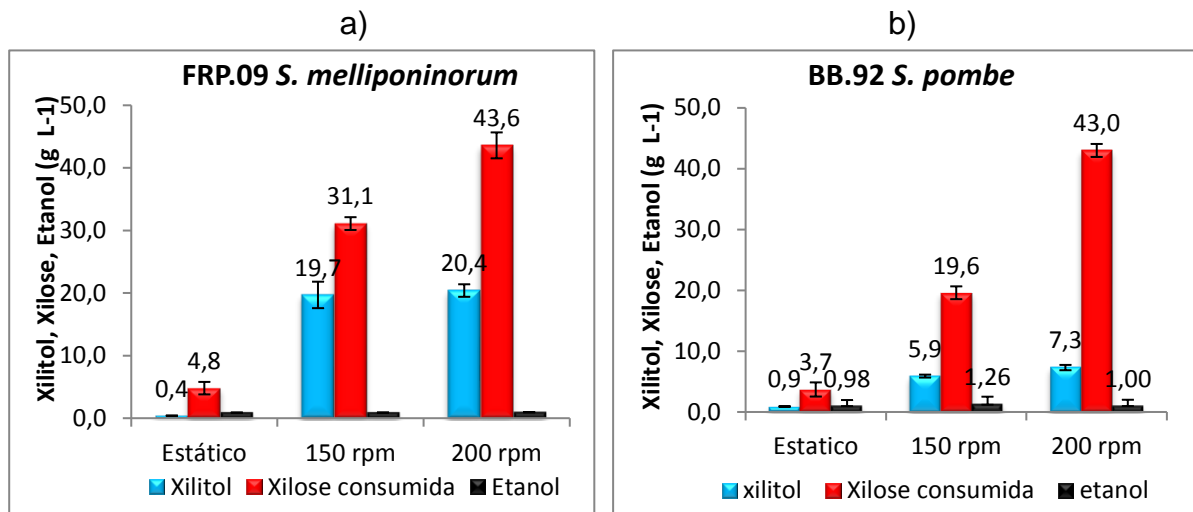


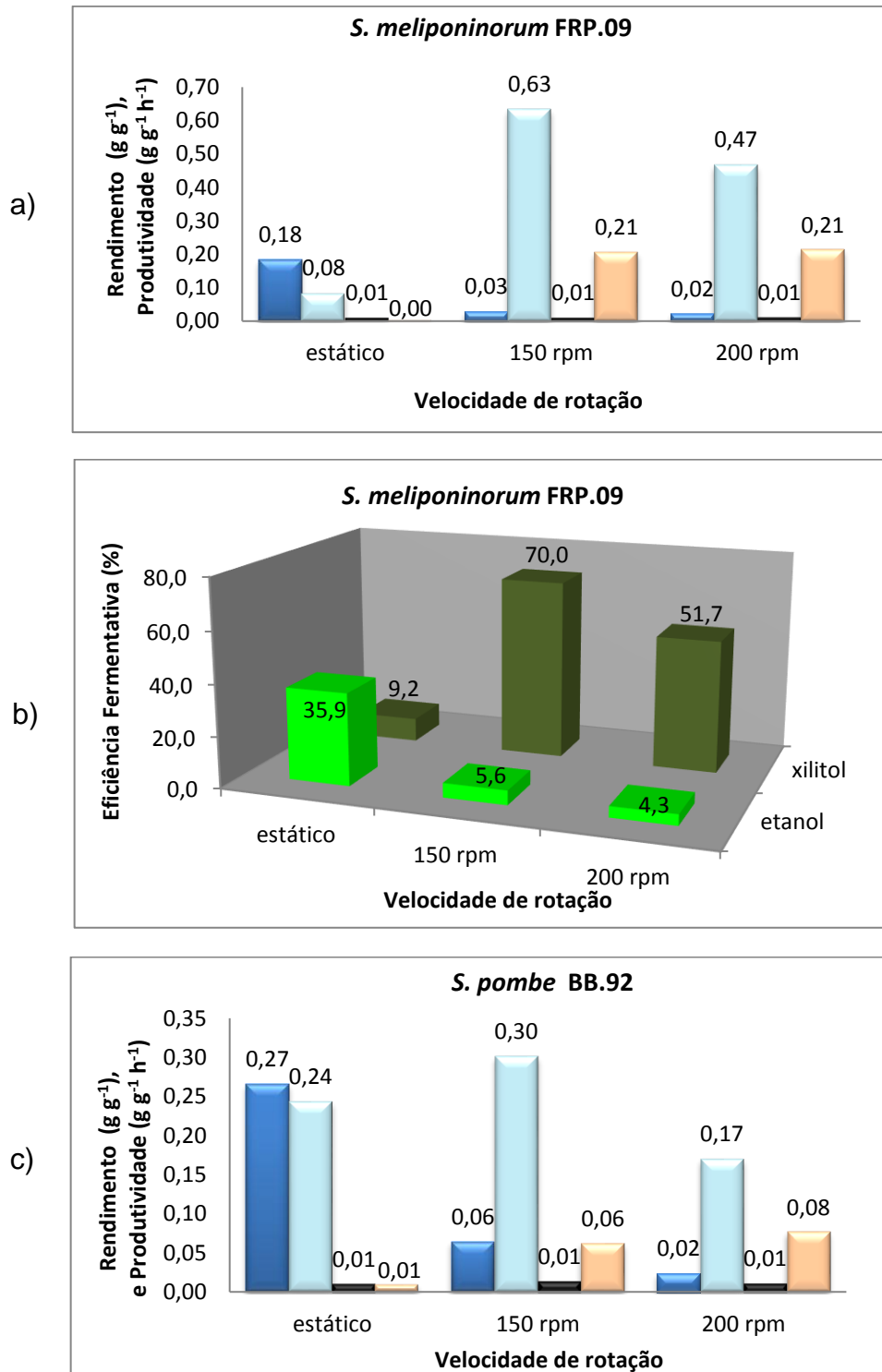
Figura 24 - Respostas metabólicas das leveduras *S. meliponinorum* (a) e *S. pombe* (b) em fermentação sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm em meio semis-sintético. ■ = Consumo de xilose; ■ = Produção de etanol; ■ = Produção de xilitol.

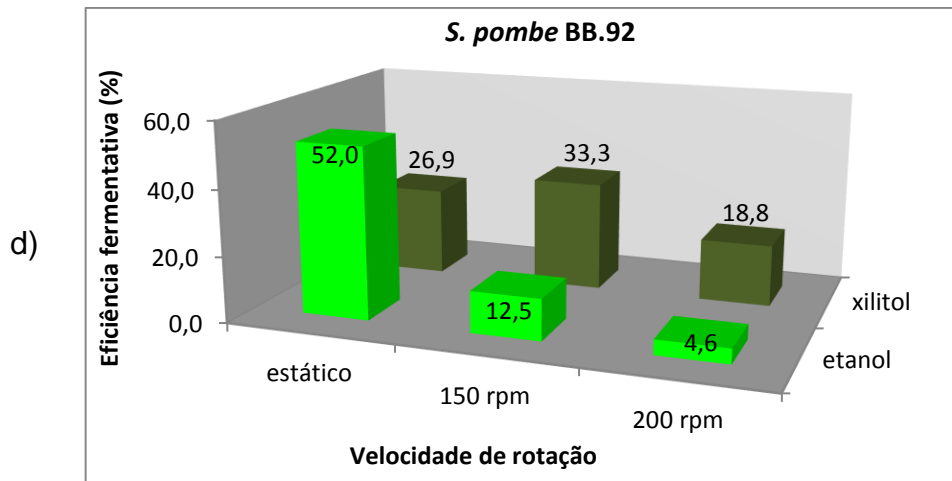


As leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum* apresentaram uma taxa de consumo de xilose significativamente diferente nas três condições avaliadas, alcançando respectivamente uma maior taxa de consumo de 66 e 67% a 200 rpm, com uma produção de etanol de 1,3 g L⁻¹ a 150 rpm e 1 g L⁻¹ a 200 rpm pelas respectivas leveduras. Os dois níveis de agitação não influenciaram na produção de xilitol por ambas as leveduras (Figura 24). O aumento da agitação contribuiu para um aumento no consumo de xilose (Figura 24) com um respectivo aumento na produção de biomassa.

Conforme pode ser observado nas Figuras 25a e 25c, a agitação de 150 rpm favoreceu o rendimento (Y_{p/s}) em xilitol para as leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe*, com uma eficiência fermentativa (η) de 70 e 33,3% (Figura 25 b, d) em relação ao rendimento teórico. Não houve diferença estatística significativa na produtividade volumétrica (Q_p) de etanol nas três condições avaliadas para ambas as leveduras.

Figura 25 – Parâmetros de fermentação em meio semissintético sem agitação e com agitação de 150 e 200 rpm com as levedura *S. meliponinorum* (a - b) e *S. pombe* (c - d). ■ = Rendimento de etanol (Y p/s); ■ = produtividade volumétrica de etanol (Qp); ■ = rendimento de xilitol (Y p/s); ■ = produtividade volumétrica de xilitol. ■ = Eficiência fermentativa xilitol; ■ = Eficiência fermentativa de etanol;





A produtividade volumétrica (Q_p) de xilitol para ambas as leveduras (Figura 25 a, c) foi muito lenta quando a fermentação foi conduzida sem agitação, o que pode ser devido principalmente ao baixo número de células viáveis (Figura 23 b).

Comparando os resultados das duas leveduras, verifica-se que o melhor rendimento em etanol foi obtido pela levedura *S. pombe* (Fig. 25 c), enquanto o melhor rendimento em xilitol foi alcançado pela levedura *S. meliponinorum* (Figura 25 a).

Gong et al. (1983) avaliaram o consumo de xilose e conversão para etanol e xilitol por oito cepas de *S. pombe* em erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultura com 50 g L^{-1} de xilose em condições de oxigênio limitado. Todos os frascos foram incubados em shaker a 200 rpm. Os pesquisadores verificaram que todas as cepas avaliadas consumiram mais xilose em condições aeróbicas (3,2 – 4,0 %) que em condições de oxigênio limitado (1,9 – 2,8 %), porém a produção de etanol por 7 das 8 cepas só ocorreu em condições de oxigênio limitado (0,1 a 0,5 %), a qual também favoreceu a produção de xilitol por 6 das 8 cepas, variando de 0,1 a 0,3 %.

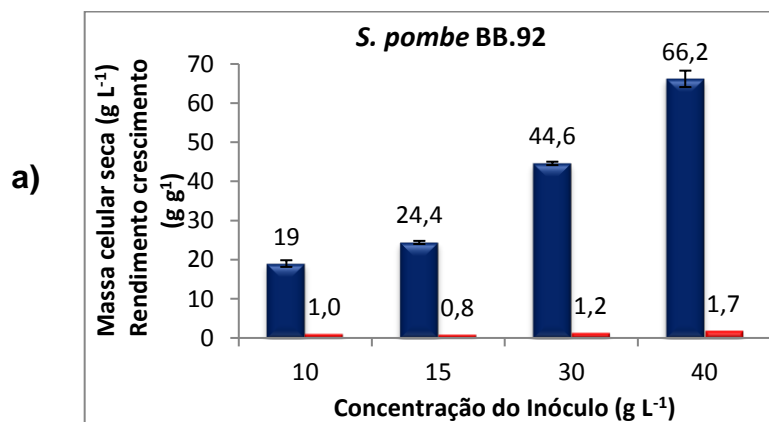
Halhorinia et al. (2014) avaliaram a produção de etanol pela levedura *Candida intermedia* MTCC 1404 em condições estáticas e agitação de 100 a 250 rpm, encontrando o melhor rendimento em etanol ($0,36 \text{ g g}^{-1}$) na agitação de 150 rpm em 96 horas.

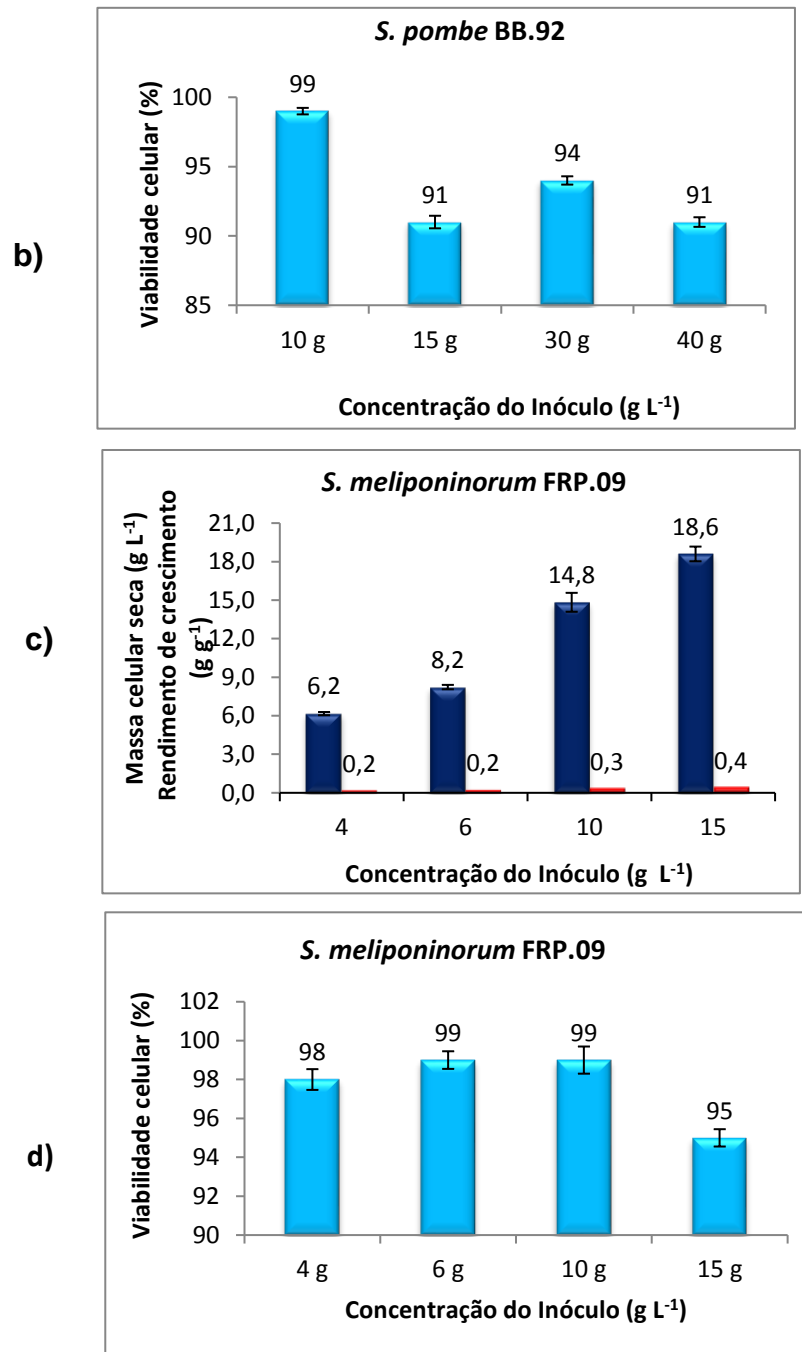
5.8 - Avaliação dos efeitos da concentração inicial de células na produção de etanol a partir da xilose pelas leveduras *S. pombe* e *S. meliponinorum*

Os valores da concentração inicial do inóculo foram calculados a partir do número de células de $1,0 \times 10^8 \text{ mL}^{-1}$, que é equivalente a aproximadamente 4 g L^{-1} da levedura *S. meliponinorum* e 9 g L^{-1} da levedura *S. pombe* (valores de inóculos utilizados em avaliações anteriores). Definiu-se os valores de 4, 6, 10 e 15 g L^{-1} da levedura *S. meliponinorum* e 10, 15, 30 e 40 g L^{-1} da levedura *S. pombe* como inóculo inicial, a fim de avaliar os efeitos dessas concentrações na produção de etanol.

Os resultados encontrados referentes a massa seca, viabilidade celular, rendimento de crescimento, produção, rendimento, produtividade volumétrica e eficiência fermentativa de etanol e xilitol, em fermentação conduzida com diferentes concentrações iniciais de células, estão ilustrados nas Figuras 26, 27 e 28. O melhor rendimento de crescimento para ambas as leveduras foi na fermentação com a maior concentração de células inoculadas, no entanto sua viabilidade celular diminuiu com o aumento da concentração de células (Figura 26). Esses resultados corroboram o que dizem Lima et al. (2001): “uma elevada concentração de leveduras pode levar a uma diminuição da viabilidade celular em consequência de uma maior competição por nutrientes”, pois nesses experimentos aumentou-se a concentração celular, mantendo a mesma composição do meio de cultura.

Figura 26 - Número de células, viabilidade celular e rendimento de crescimento ($Y_{x/s}$) da levedura *S. Pombe* BB.92 (a - b) e *S. meliponinorum* FRP.09 (c - d) em fermentação com diferentes concentrações de células inoculadas. ■ = Massa celular seca; ■ = Rendimento de crescimento; ■ = Viabilidade celular.





Ao analisar os resultados da Figura 27 a, verifica-se que, embora, a levedura *S. pombe* tenha alcançado o maior consumo de açúcar na fermentação com maior concentração de células inoculadas, era esperado que a taxa de aumento no consumo de açúcar fosse proporcional à taxa de aumento na concentração de células, no entanto isso não ocorreu com nenhuma das leveduras. A taxa de aumento de consumo de xilose foi de 35% com o aumento da concentração de células de 10 pa-

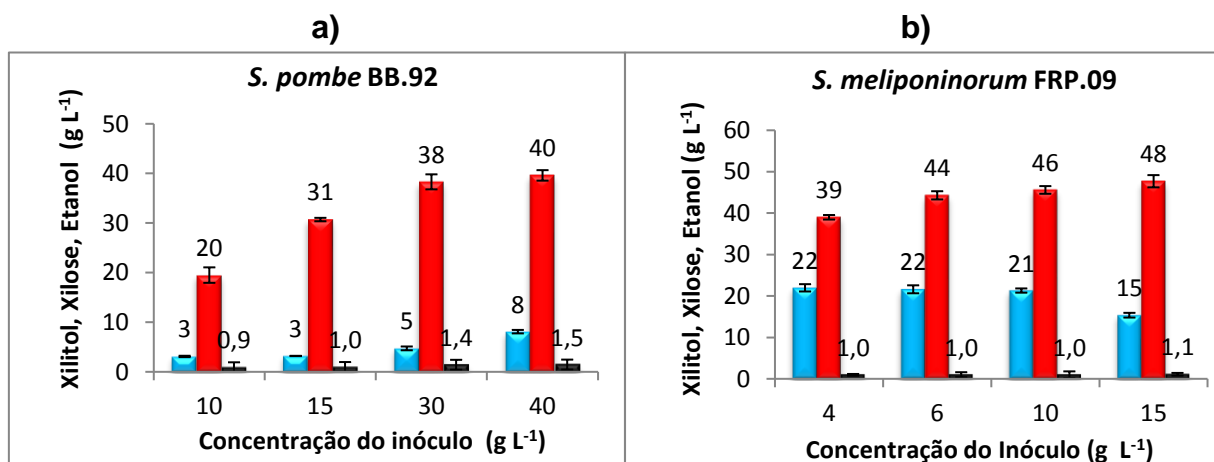
ra 15 g L⁻¹ de células, reduzindo para 18% de 15 para 30 g L⁻¹ e 5% de 30 para 40 g/L.

A maior taxa de produção de etanol e xilitol foi alcançada pela levedura *S. pombe* quando a cinética fermentativa iniciou com uma concentração de células de 40 g L⁻¹. Houve um aumento de 40% na produção de etanol, quando foi elevado à concentração celular de 10 para 40 g L⁻¹, e um aumento de 77% na produção de xilitol, conforme ilustrado na Figura 27 a. Na maior concentração de células, também foi alcançada uma maior taxa de produtividade volumétrica, 50% superior às outras concentrações de células avaliadas neste trabalho. Resultados semelhantes foram encontrados por Agbogbo e Coward-kelly (2008), que alcançaram um aumento de aproximadamente 50% nos valores de Q_p quando elevaram a concentração celular inicial de 1,82 para 6,45 g L⁻¹, na fermentação de xilose em meio semissintético por *Scheffersomyces stipitis*.

No entanto, o maior rendimento e maior eficiência fermentativa (Figura 28 a) foram alcançados na menor concentração inicial de células. Isso porque o consumo de açúcar da menor para maior concentração de células aumentou em 50% e o aumento na produção de etanol não foi proporcional ao aumento no consumo de açúcar, resultando em um menor rendimento na maior concentração.

Em relação ao xilitol, a maior produção, rendimento, produtividade volumétrica e eficiência fermentativa foram alcançados pela levedura *S. pombe* (Figura 28 a), em cinética fermentativa iniciada com uma concentração de inóculo de 40 g L⁻¹.

Figura 27 - Consumo de xilose, produção de etanol e xilitol pelas leveduras *S. pombe* (a) e *S. meliponinorum* (b) em fermentação com diferentes concentrações de células inoculadas. ■ = Consumo de xilose; ■ = Produção de etanol; ■ = Produção de xilitol.



A levedura *S. meliponinorum* apresentou maior consumo de xilose na maior concentração de células. No entanto, com o aumento da concentração celular inicial de *S. meliponinorum* 4 g L⁻¹ para 6 g L⁻¹, houve uma taxa de aumento no consumo de açúcar de 11,4%. Essa taxa de aumento no consumo de açúcar foi reduzida para 4,3% quando foi aumentada a concentração inicial de células de 6 para 10 e de 10 para 15 g L⁻¹, indicando que a taxa de aumento de consumo de açúcar alcançado por essa levedura também não foi proporcional à taxa de aumento de biomassa de uma concentração celular para outra. As concentrações iniciais de 4, 6 e 10 g L⁻¹ de células de *S. meliponinorum* não influenciaram no rendimento, produtividade volumétrica e eficiência fermentativa de etanol e produtividade volumétrica de xilitol (Figura 28 c, d). Foi verificada uma diminuição na produção de xilitol por essa levedura, resultando em menor rendimento, produtividade volumétrica e eficiência fermentativa quando a cinética foi iniciada com uma concentração de células de 15 g L⁻¹, essa redução é coerente com a redução na viabilidade celular ilustrada na Figura 26 d e com o aumento na produção de etanol e biomassa na maior concentração inicial de células ilustrado nas Figuras 23 a e 24 a. O melhor rendimento de xilitol (0,56 g g⁻¹) e a melhor eficiência fermentativa (62% em relação ao rendimento teórico) foram alcançados pela levedura *S. meliponinorum* na concentração inicial de células de 4 g L⁻¹ (Figura 28 c, d).

Halhorinia et al. (2014), avaliando os efeitos de diferentes tamanhos de inóculos (5, 10, 15 e 20%) na produção de etanol pela levedura *Candida Intermedia* MTCC 1404, observaram um aumento regular da produção de etanol com o aumento em tamanho 5-15 % e, a partir desse tamanho, diminuindo a produção.

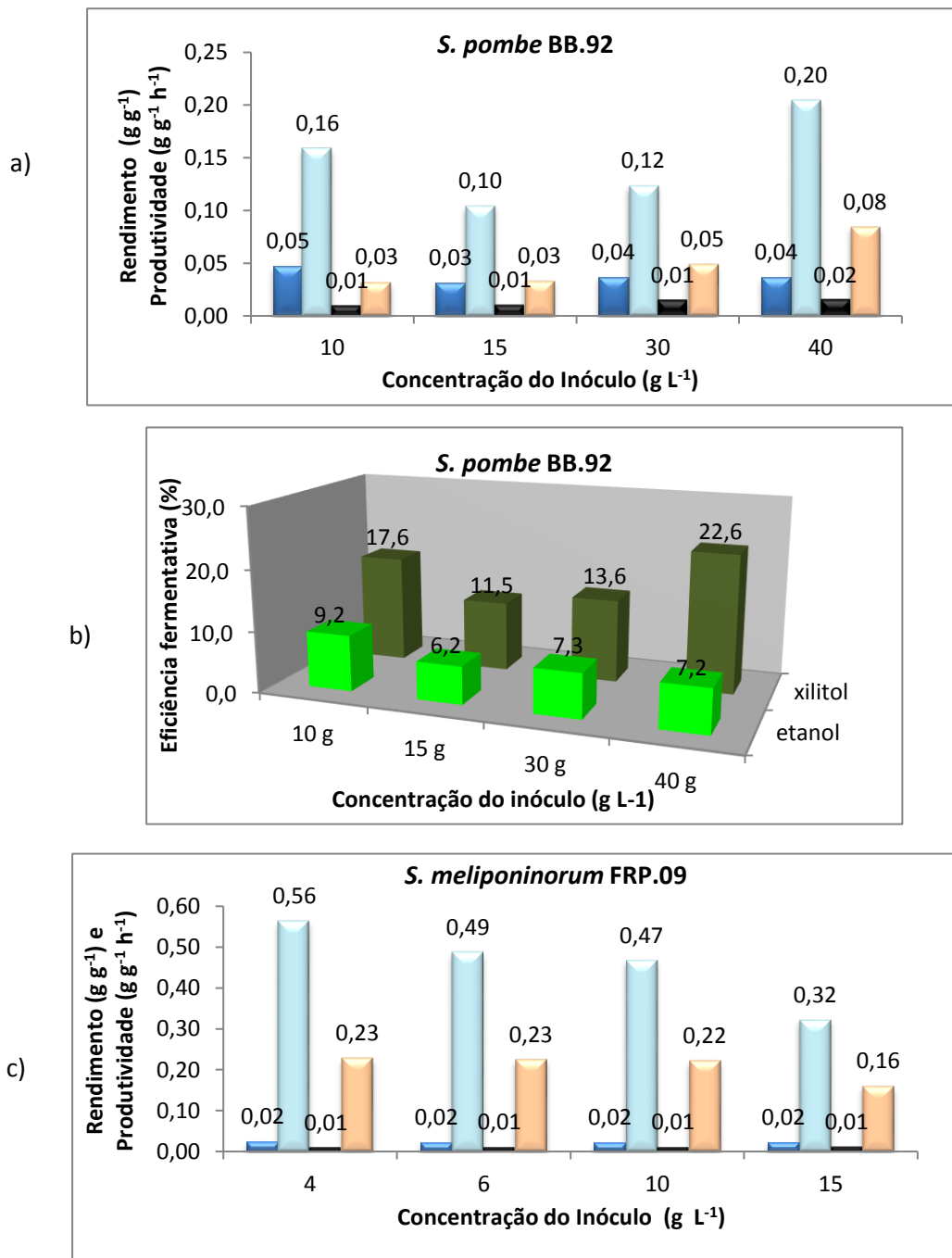
O rendimento máximo de etanol (0,4 g / g) foi registrado em 15% do tamanho do inóculo.

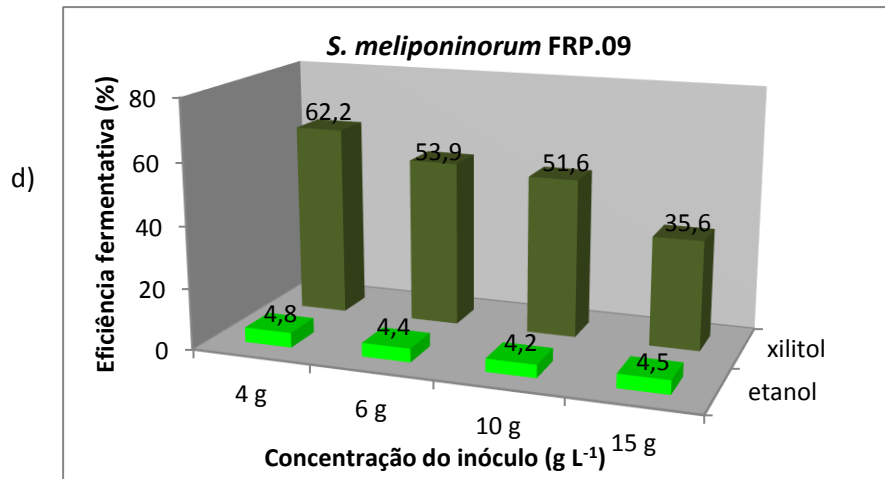
Comparando os resultados de etanol produzidos a partir de xilose pela levedura *S. pombe*, ilustrados na Figura 18, com os resultados demonstrados nas Figuras 24 e 27 a, pode-se notar uma redução na produção de etanol, com um aumento na produção de xilitol.

Essa mudança pode estar relacionada com a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, tendo em vista que os experimentos cujos resultados estão ilustrados na Figura 18 foram conduzidos em erlenmeyer de 125 mL com 60 mL de meio de cultura e uma agitação de 150 rpm. Os experimentos cujos resultados estão ilustra-

dos nas Figuras 24 e 27 foram conduzidos nas mesmas condições, porém o que variou foi a quantidade de meio de cultura no erlenmeyer – 15 mL.

Figura 28 - Parâmetros de fermentação em meio semissintético com diferentes concentrações de células inoculadas das leveduras *S. pombe* (a - b) e *S. meliponinorum* (c - d). ■ = Rendimento de etanol (Y p/s); ■ = produtividade volumétrica de etanol (Qp); ■ = rendimento de xilitol (Y p/s); ■ = produtividade volumétrica de xilitol. ■ = Eficiência fermentativa xilitol; ■ = Eficiência fermentativa de etanol.





Os resultados indicam que uma menor quantidade de oxigênio dissolvido para a levedura *S. pombe* diminui a quantidade de xilitol e aumenta a quantidade de etanol. Esses resultados corroboram os encontrados por Cheng et al. (2014) quando avaliaram a produção de etanol e xilitol pela levedura *Candida tropicalis* W103 em hidrolisados ácidos de sabugo de milho em duas condições: 100 rpm com 200 mL de meio em frascos de 500 mL e 160 rpm com 100 mL de meio em frascos de mesmo volume. Na primeira condição, houve uma produção de 7 g L⁻¹ de xilitol e 25,3 g L⁻¹ de etanol. Os pesquisadores observaram que, aumentando a rotação e diminuindo o volume de meio no frasco, aumentou-se a produção de xilitol (17,1 g L⁻¹) e diminuiu-se a de etanol (9 g L⁻¹). No caso da levedura FRP.09, o aumento nos dois produtos biotecnológicos foi concomitante com a diminuição do volume de meio, mantendo a rotação de 150 rpm, sugerindo que, para essa levedura, uma aeração maior aumentaria a produção.

5.9 - Caracterização química do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 6 apresenta os resultados referentes à caracterização do hidrolisado após etapa de hidrólise ácida (HCL 2%), concentração e destoxificação, antes e após a suplementação do meio. Observa-se a predominância da xilose no hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar, o que estimula as pesquisas com bioprospecção de leveduras com capacidade de fermentar pentoses. De acordo com os resultados, a hidrólise ácida feita com uma concentração de 2% de ácido sulfúrico (360

mg de ácido sulfúrico por grama de bagaço), utilizando temperatura de 121 °C por 15 minutos, liberou 20,8, 0,55 e 1,09 g L⁻¹ de xilose, glicose e arabinose, respectivamente, somando 22,4 g L⁻¹ de açúcares totais. Resultados semelhantes foram encontrados por Chandel et al. (2007), quando avaliaram diferentes concentrações de ácido clorídrico (HCL) no processo de hidrólise, utilizando temperatura de 140 °C por 30 minutos. Os pesquisadores em questão utilizaram concentrações de 0,5; 1,5; 2,5; e 3,5 % de HCL e obtiveram, respectivamente, 20,3; 23,6; 30,3; e 23,4 g L⁻¹ de açúcares totais, mostrando uma redução na liberação de açúcares a partir da concentração de 2,5 % de HCL.

Ferreira (2010) e Arruda (2011) submeteram o bagaço de cana a hidrólise ácida utilizando 100 mg de ácido sulfúrico por grama de bagaço a uma temperatura de 150 °C por 30 minutos. Essa mesma proporção de ácido sulfúrico foi utilizada por Medina (2013) e Antunes (2014), porém a uma temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Tabela 6 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida

Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar				
Características	Original	Concentrado	Destoxificado	Hidrolisado suplementado
Açúcares (g L⁻¹)				
Xilose	20,8 (±1,257)	65,5 (±0,987)	55,8 (±0,679)	51,93 (±0,340)
Glicose	0,55 (±0,766)	1,67 (±0,352)	0,77 (±0,543)	0,71 (±0,980)
Arabinose	1,09 (±0,218)	4,27 (±0,167)	3,54 (±0,340)	3,18 (±0,149)
Furanos (g L⁻¹)				
Furfural	0,081 (±0,002)	0,230 (±0,002)	0,0014 (±0,001)	0,0010 (±0,208)
5-hidroximetilfurfural	0,006 (±0,001)	0,015 (±0,001)	0,0004 (±0,002)	0,0003 (±0,198)
Fenóis totais(g L⁻¹)				
Ácido carboxílico (g L ⁻¹)				
Ácido acético	1,26 (±0,32)	2,97(±0,26)	2,04(±0,09)	1,85(±0,29)

O hidrolisado obtido nesta pesquisa foi concentrado aproximadamente 3 vezes e após suplementação com macro e micronutrientes ficou com uma concentração média final de 55,8 g L⁻¹ de açúcares totais.

Observa-se, ainda na Tabela 6, que, além dos açúcares, também estão presentes no hidrolisado compostos tóxicos aos micro-organismos, como o ácido acético ($1,26 \text{ g L}^{-1}$) proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose, furfural ($0,08 \text{ g L}^{-1}$) e 5-hidroximetilfurfural ($0,006 \text{ g L}^{-1}$) formados a partir da desidratação de pentoses e hexoses respectivamente (FENGEL, WEGENER, 1989) e compostos fenólicos ($3,01 \text{ g L}^{-1}$), que são produtos da degradação da lignina (PALMQVIST; ALMEIDA; HAHN-HAGERDAL, 1999).

Nesta pesquisa foi constatada a eficiência do carvão ativado (1% m/v) na remoção de tóxicos como furfural (99%), 5-hidroximetilfurfural (97%) e fenólicos (89%), podendo ser observada na Figura 29 b a clarificação do hidrolisado. Essa clarificação pela metodologia de alteração de pH combinada com adsorção com carvão vegetal ativada foi previamente constatada por Marton (2002).

Figura 29 - Aspecto visual do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar antes (a) e após (b) destoxificação com carvão ativado



Ainda de acordo com esse autor, a eficiência desse método de destoxificação depende das condições sob as quais o processo de adsorção é realizado, principalmente quanto ao pH, tempo de contato, temperatura e concentração do carvão, o que pode explicar uma maior eficiência da destoxificação do hidrolisado obtido neste trabalho (temperatura de $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 hora) em relação aos resultados encontrados em outras pesquisas. Arruda (2011), utilizando a mesma metodologia, porém com temperatura maior ($60 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e tempo menor (30 min), alcançou uma redução de 84% de furfural, 57% de 5-hidroximetilfurfural e 80% de fenólicos. Ferreira (2010), utilizando uma maior concentração (2,5% m/v) de carvão numa temperatura de 30°C

por 1 hora, conseguiu uma redução de 83% de furfural e 92% de 5 hidroximetilfurfural.

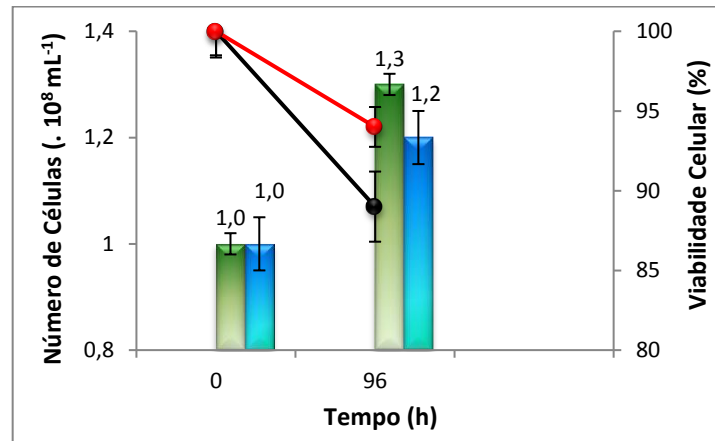
Em relação ao ácido acético, foi verificada menor adsorção pelo carvão, reduzindo apenas 31% desse composto nesta pesquisa. Esses resultados corroboram os resultados encontrados por Antunes et al. (2014), que atingiu uma redução de 33% do ácido acético. Uma menor redução do ácido acético foi encontrada por Arruda (2011) e Ferreira (2010) com uma respectiva redução de 14 e 5% desse composto. Além da redução dos compostos tóxicos, foi também observada uma redução na concentração dos açúcares (Tabela 6).

5.10 - Avaliação da capacidade de fermentação alcoólica em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Foram selecionadas as leveduras *S. meliponinorum* e *S. pombe* para atividade fermentativa em hidrolisado hemicelulósico, por apresentarem produção de etanol em meio semissintético contendo xilose como fonte de carbono. Nas Figuras 30, 31 e 32, estão ilustrados os perfis de crescimento e viabilidade celular, consumo de açúcares, produção de etanol e xilitol, rendimento de etanol e xilitol ($Y_{p/s}$ g g⁻¹), produtividade volumétrica (Q_p g g⁻¹ h⁻¹), rendimento de crescimento ($Y_{x/s}$ g g⁻¹) e eficiência de conversão ($\Gamma\%$) nos experimentos realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. É possível verificar, na Figura 30, que as leveduras apresentaram baixo crescimento em hidrolisado.

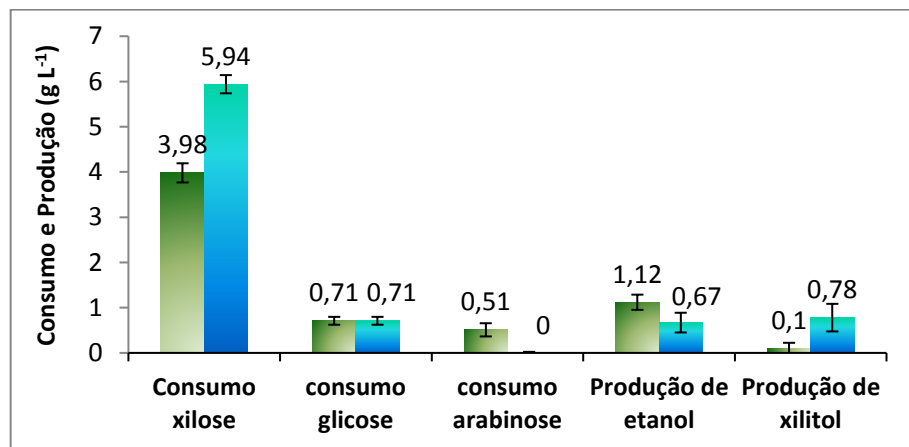
Uma pequena redução na viabilidade celular foi verificada para *S. pombe* (87%) em 96 horas de fermentação. Resultados semelhantes foram encontrados por Roviero et al. (2015), na viabilidade celular da levedura *Rhodotorula glutinis* (84%) e pela levedura *S. cerevisiae* (74%) após 72 horas de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Embora o hidrolisado hemicelulósico ainda tenha mantido uma baixa concentração de compostos tóxicos após o processo de destoxificação com carvão vegetal ativado, não é possível relacionar a presença desses compostos com o baixo crescimento e a redução na viabilidade celular das leveduras, já que estas haviam apresentado resultados semelhantes de crescimento em meio semissintético (Figura 18).

Figura 30 - Perfil de crescimento e viabilidade celular em 96 horas de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em temperatura de 28 °C e rotação de 150 rpm para *S. meliponinorum* e 32°C e 100 rpm para *S. pombe*. ■ = Número de células *S. pombe* ■ = Número de células *S. meliponinorum* ● = Viabilidade celular *S. pombe* ● = Viabilidade celular *S. meliponinorum*.



Pode-se observar na Figura 31 que o consumo de xilose pelas leveduras avaliadas foi muito baixo. A pequena quantidade de glicose presente no hidrolisado foi consumida na totalidade (0,71 g L⁻¹) e o consumo de arabinose deu-se apenas pela levedura *S. pombe* (0,5 g L⁻¹).

Figura 31 – Consumo de açúcares, produção de etanol e xilitol durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico por 96 horas a temperatura de 28 °C e rotação de 150 rpm para *S. meliponinorum* e 32°C e 100 rpm para *S. pombe*. ■ = *S. pombe* ■ = *S. meliponinorum*.



A via de assimilação de arabinose por leveduras é bastante similar à de xilose, no entanto, como observado neste trabalho, o consumo da arabinose é muito mais lento que o de xilose. Comportamento também observado por Silva (2001) e Lima (2004) durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com *C. guilliermondii*, assim como em meio sintético por Felipe et al. (1995).

A melhor produção de etanol foi alcançada pela levedura *S. pombe*. Em hidrolisado hemicelulósico, consumiu um total de 6,6 g L⁻¹ de açúcares e produziu 1,1 g L⁻¹ de etanol com um rendimento de 0,2 g de etanol g⁻¹ de açúcar consumido, resultando em uma eficiência fermentativa de 45,5% em relação ao rendimento teórico (Figuras 31 e 32).

É importante lembrar que a Figura 19 ilustrou menores resultados de rendimentos (0,1 Yp/s) e eficiência de conversão de etanol (19,6%) por essa levedura em meio semissintético devido a um maior consumo de xilose (24 g L⁻¹) para uma pequena produção de etanol (2,7 g L⁻¹).

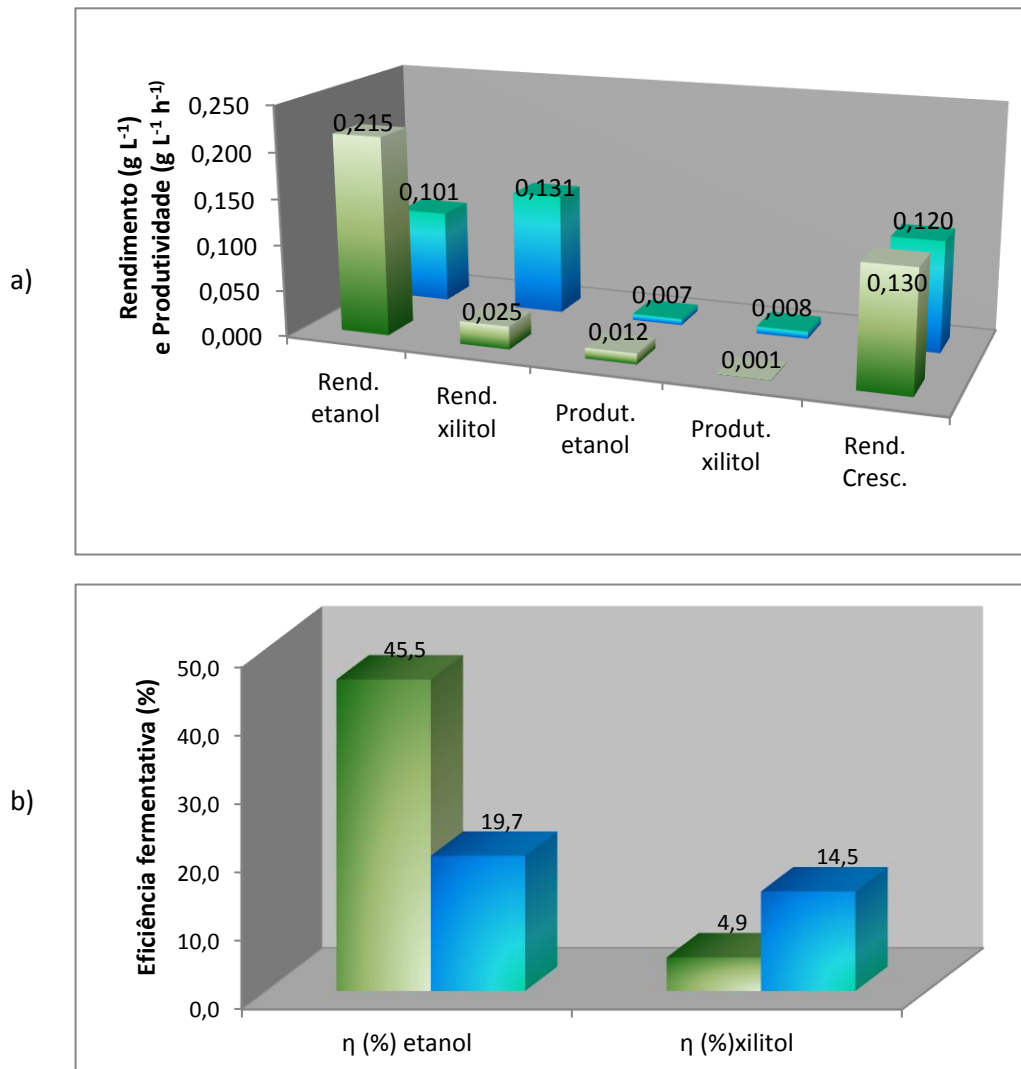
Resultados diferentes foram encontrados por Medina (2013) quando utilizou a levedura *S. stipitis* e *C. shehatae* em fermentação de hidrolisado de bagaço de cana em 72 horas de fermentação. As leveduras *C. shehatae* e *S. stipitis* consumiram 86 e 85% dos açúcares presentes no meio, produzindo 18 e 7,4 g L⁻¹ de etanol e alcançando um rendimento de 0,4 e 0,1 (g g⁻¹), respectivamente.

Fugita (2010) realizou experimentos com meio semissintético e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com três estirpes de leveduras (J19.1, J10 e CG). Nessa pesquisa, a autora encontrou uma variação nas concentrações de etanol de 1,1 a 1,3 g L⁻¹ em 12 horas, não encontrando diferença estatística significativa nos resultados entre o meio semissintético e o hidrolisado.

A melhor produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico foi obtida pela levedura *S. meliponinorum*, alcançando uma concentração de 0,78 g L⁻¹ em 96 horas com um rendimento de 0,13 g de xilitol g⁻¹ de xilose consumida, resultando em uma eficiência de 14,5% em relação ao rendimento teórico (Figuras 31 e 32).

A produção de xilitol (14,5 g L⁻¹), o rendimento (0,50 Y p/s) e a eficiência de conversão (55,2%) foram evidentemente maiores em meio semissintético (Figura 19).

Figura 32– Rendimento de etanol e xilitol, produtividade volumétrica de etanol e xilitol, rendimento de crescimento (a) e eficiência de conversão (b) durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar por 96 horas em temperatura de 32 °C para *S. pombe* e 30°C para *S. meliponinorum*. ■ = *S. pombe* ■ = *S. meliponinorum*.



5.11 - Fermentação em biorreator de cultivo submerso

Nos experimentos executados com *S. meliponinorum* em frascos erlenmeyer, foram observados perfis diferentes no consumo de xilose e crescimento celular entre 150 e 200 rpm e na condição estática. Sendo assim, experimentos foram efetuados em biorreator a fim de avaliar o consumo de xilose, produção de xilitol e etanol, crescimento e viabilidade celular em condições de aeração controlada de 0,1/100, 0,25/150, 0,5/200 vvm/rpm. Os resultados referentes a esses parâmetros encontram-se na Tabela 7.

Houve influência dos diferentes fluxos de ar/agitação na taxa de xilose consumida e xilitol produzido. Os resultados indicam que, quanto mais oxigênio disponível, maior o consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura *S. meliponinorum*. Foi observado um aumento de 98 % no consumo de xilose com o aumento do fluxo de ar e rotação de 0,1 vvm/100rpm para 0,25 vvm/150 rpm e um aumento de 123% no consumo quando aumentou o fluxo de 0,25vvm/150 rpm para 0,5 vvm/200rpm, conforme apresentado na Tabela 7. O oxigênio é necessário para o transporte de alguns dissacarídeos por muitas leveduras (SIMS; BARNETT, 1977) e também utilizado na produção de esteróis, ácidos graxos insaturados e de ácidos de nicotina, que são necessários para determinadas funções das membranas, como o transporte de açúcar (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1988).

Skoog e Hahn-Hägerdal (1990), em estudo sobre o requerimento de oxigênio no transporte de xilose para dentro da célula, observaram que a taxa de captação em condições de aerobiose foi maior em comparação com cultivos em anaerobiose, indicando que o oxigênio induz ou ativa o sistema de transporte.

Nos experimentos em biorreator, o aumento do fluxo de ar e da rotação aumentou a produção de xilitol sem nenhuma formação de etanol pela *S. meliponinorum* (Tabela 7), indicando que o menor volume de ar (0,1 vvm/100rpm) inserido no meio foi suficiente para inibir a produção de etanol por essa levedura. Esses resultados corroboram o que descrevem Skoog e Hahn-Hägerdal (1988) quando afirmam que a produção de xilitol e/ou etanol a partir de pentoses está estritamente ligada à presença de oxigênio em baixas concentrações. Entretanto, organismos diferentes respondem de forma diferente à oxigenação. Enquanto a levedura *S. meliponinorum* nesta pesquisa aumentou a produção de xilitol com o aumento do fluxo de ar, a levedura *S. arborariae* nos experimentos realizados por Pereira (2010) diminuiu a produção de xilitol com o aumento da aeração. Essa pesquisadora executou experimentos em 0,2 vvm/400rpm; 0,5vvm/200rpm; 0,33vvm/180 rpm; e 150 rpm sem fluxo de ar e observou que para, *S. arborariae*, o aumento foi simultâneo para etanol e xilitol à medida que diminuía a aeração. A autora encontrou as melhores produções em etanol (8,47 g L⁻¹) e xilitol (2,37 g L⁻¹) em condições de microaerofilia 0,33 vvm/100 rpm, e, no caso do etanol, não houve diferença nos resultados encontrados em microaerofilia (0,33 vvm/100 rpm) dos resultados em 150 rpm sem fluxo de ar.

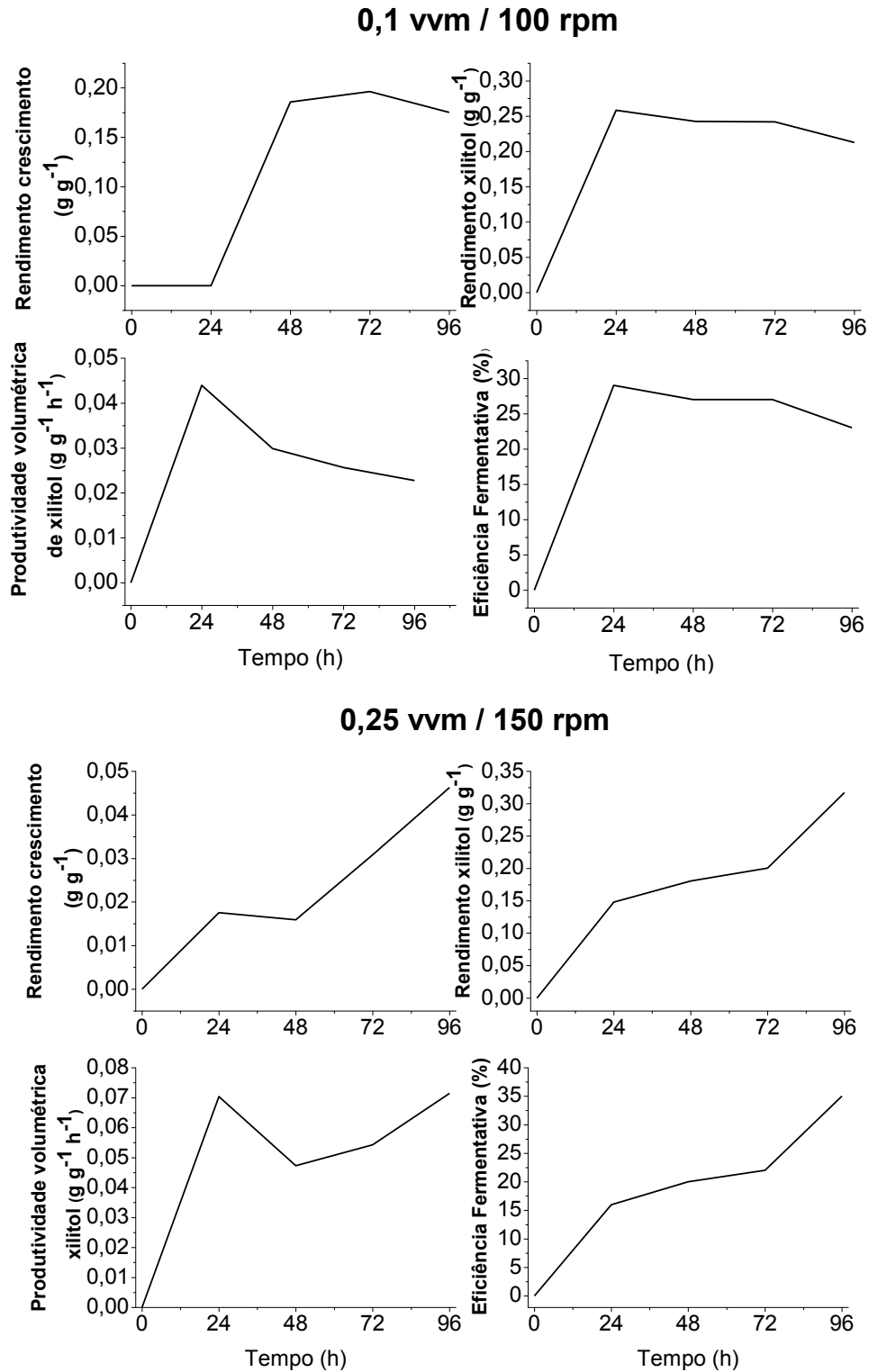
Assim como nos experimentos em frascos erlenmeyers, em biorreator os diferentes níveis de aeração não influenciaram na viabilidade celular da levedura *S. meliponinorum*, que manteve uma taxa entre 97 e 99% de viabilidade em 96 horas.

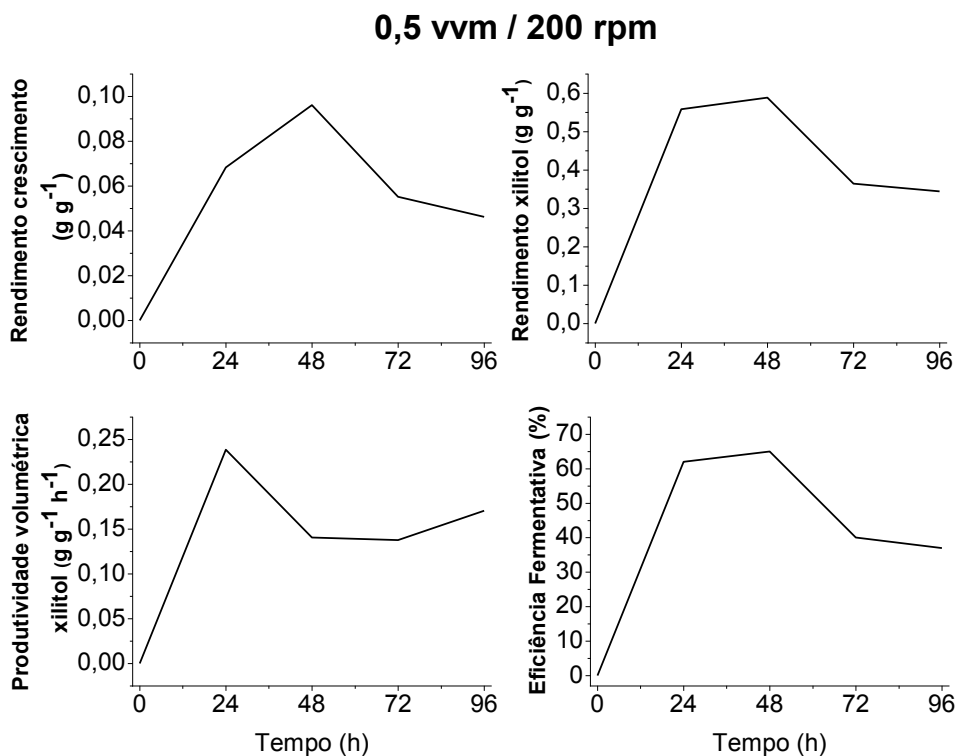
Tabela 7 – Média dos valores de consumo de xilose, produção de xilitol, etanol, número de células e viabilidade celular durante fermentação por 96 horas pela levedura *S. meliponinorum* em meio de cultura com 70 g L⁻¹ de xilose, pH 4,0, 28 °C, com um inóculo inicial de $1,0 \times 10^8$

	Tempo (h)	Xilose consumida (%)	Xilitol produzido g L ⁻¹	Etanol g L ⁻¹	Número de células 10 ⁸	Viabilidade celular (%)
0,1 vvm 100 rpm	0				0,9 ±0,198	99 ±0,087
	24	6,3 ±0,622	1,0 ±0,622	ND	0,9 ±0,918	98 ±0,471
	48	9,1 ±0,620	1,4 ±0,620	ND	1,2 ±1,286	98 ±0,498
	72	11,8 ±0,558	1,8 ±0,558	ND	1,3 ±0,987	97 ±0,021
	96	15,8 ±0,809	2,2 ±0,809	ND	1,4 ±0,047	97 ±0,046
0,25vvm 150 rpm	0		0,00		1,0 ±0,043	99 ±0,012
	24	16,5 ±0,919	1,7 ±0,919	ND	1,1 ±0,093	98 ±0,012
	48	18,2 ±0,729	2,3 ±0,729	ND	1,1 ±1,345	98 ±0,023
	72	28,3 ±0,740	3,9 ±0,740	ND	1,2 ±0,136	98 ±0,987
	96	31,3 ±0,526	6,9 ±0,526	ND	1,3 ±0,094	98 ±0,010
0,5 vvm 200 rpm	0		0,00		0,9 ±0,033	99 ±0,000
	24	9,9 ±0,712	5,7 ±0,712	ND	1,1 ±0,047	99 ±0,000
	48	16,8 ±0,632	6,7 ±0,632	ND	1,2 ±0,987	99 ±0,000
	72	40,0 ±0,776	9,9 ±0,776	ND	1,3 ±0,082	99 ±0,000
	96	69,9 ±1,178	16,4 ±1,178	ND	1,5 ±0,082	99 ±0,000

A Figura 33 apresenta os resultados de rendimento de xilitol ($Y=p/s$) e crescimento ($Y=x/s$), produtividade volumétrica (Q_p) e eficiência de conversão (η) nas três condições de aeração avaliadas.

Figura 33 - Rendimento de xitol ($Y = p/s$) e crescimento ($Y = x/s$), produtividade volumétrica de xitol (Q_p) e eficiência de conversão (η) em fermentação realizada em biorreator Cellingen 310 com meio semissintético com uma concentração de 70 g L^{-1} de xilose.





Foi alcançado um melhor rendimento de xilitol de $0,6 \text{ g g}^{-1}$ quando a fermentação foi conduzida com um fluxo de ar/rotação de $0,5 \text{ vvm}/200\text{rpm}$, que resultou em uma eficiência de conversão de 63% em relação ao rendimento teórico. A melhor produtividade volumétrica também foi alcançada nessas condições, atingindo $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Os melhores resultados em rendimento, produtividade e eficiência encontrados em biorreator não diferenciaram dos melhores resultados alcançados em frascos erlenmeyer em 150 rpm.

Rendimentos superiores a esses foram alcançados por Arruda (2011) com a utilização da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, obtidos durante fermentação do hidrolisado destoxificado por resinas com um rendimento de $Y_{P/S} = 0,81 \text{ g g}^{-1}$. Os rendimento encontrados por Roberto et al. (1991) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, utilizando também a *Candida guilliermondii*, variaram de $Y_{p/s} = 0,36$ a $0,48 \text{ g g}^{-1}$.

6 - CONCLUSÕES

Houve produção de etanol a partir da xilose pelas cepas *S. pombe* e *S. meliponinorum*, em meio semissintético e hidrolisado, porém o rendimento está aquém do alcançado por outras leveduras citadas na literatura. As quatro leveduras isoladas apresentaram potencial para produção de etanol a partir da glicose, com destaque para as cepas de leveduras *S. meliponinorum* e *W. anomalus* FRP.04, que apresentaram uma eficiência de conversão de glicose a etanol de 92% em relação ao rendimento teórico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R. ; BASSO, L. C. . Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 189-194, 1997.
- ANTUNES, F. A. F. et al. Bioethanol production from sugarcane bagasse by a novel Brazilian pentose fermenting yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG HM 52.2: Evaluation of fermentation médium. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1-8, 2014.
- AGBOGBO, F.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- AGBOR, V.B.; et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675-685, 2011.
- AMARAL-COLLAÇO, M. T., et al. In: COUGHLAN, M. P. Enzyme systems for lignocellulosic degradation. **Elsevier**: London, 1989. 221-230 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE PETRÓLEO GÁS E BIOCOMBUSTIVEL (ANP). **Evolução do Mercado de combustível e Derivados: 2000-2012**. p. 1-27, fev. 2013.
- ANTAL, M. J; LEESOMBOON, T.; MOK, W. S. Mechanism of formation of 2-furaldehyde from D-xylose. **Carbohydrate Research**, v. 217, p. 71-85, 1991.
- ARRUDA P. V. **Ampliação de escala da produção biotecnológica de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 168f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.
- _____; FELIPE M. G. A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 58, n.3, p. 274-278, 2009.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4thed. Washington, 2001.
- BARBOSA, M.F.S.; et al. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, n. 4, p. 241-251, 1988.
- BASSO, L.C.; BASSO T. O.; ROCHA, S.N. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. In: Bernardes MAS (ed) Biofuel production—recent developments and prospects. InTech, Rijeka, p. 85–100, 2011.
- _____; ROSA, C. A. **Sugar cane for potable and fuel ethanol**. In: Worldwide Distilled Spirits Conference - New Horizons: energy, environment and enlightenment. Walker GM and Hughes PS (eds). Nottingham: Nottingham University Press, p.1-7, 2010.
- BINOD, P.; et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767–4774, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Balanco nacional de cana de-açúcar e agroenergia**. Secretaria de Produção e Agroenergia. MAPA/SPA.E.

Brasília, 2007. Disponível em: <
http://www.udop.com.br/download/estatistica/publicacoes/balanco_nacional_cana_agroenergia.pdf> acesso em 12 agos. 2013.

BRUINENBERG, P.M.; et al. NADH-linked aldose reductase: The key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 256-260, 1984.

CANILHA, L.; et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467-1475, 2011.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica: a importância do monitoramento microbiológico**. 1. ed. São Carlos: EDUFSCar, 2010. v. 1. 105p .

CHANDEL, A.K. et al. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology**, v.6, n.1, p.8-20, 2011.

_____; et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**. v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.

CHENG, K.K.; et al. Sugarcane bagasse hemicelulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v.38, n. 1, p.105-109, 2008.

CHENG, K.K.; WU, J.; LIN, Z. N.; ZHANG, J. A. Aerobic and sequential anaerobic fermentation to produce xylitol and ethanol using non-detoxified acid pretreated corncob. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 166-175, 2014.

CHI, Z., ARNEBORG, N. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptative responses to produced ethanol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 24, n. 1, p. 75-78, 2000.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Acompanhamento da Safra Brasileira. 2º Levantamento de Cana de Açúcar – safra 2013/2014. Brasília, 2012. – disponível em:
 <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/13_08_08_09_39_29_boletim_cana_portugues_abril_2013_1o_lev.pdf> Acesso em 11 de março de 2015.

CORAL, D. S. O. **Indicadores Técnicos – econômicos das rotas termoquímicas e bioquímicas para obtenção de biocombustíveis utilizando bagaço de cana para as condições brasileiras**. 2009. 136f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, Minas Gerais, 2009.

DA CUNHA-PEREIRA, F., et al. Conversion of sugars presente in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, 2011.

DORTA, C. Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, PH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26. **2006. 135 f. Tese (Doutorado em Microbiologia aplicada)** - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Rio Claro, 2006.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 16, n. 11, p. 944-952, 1994.

_____; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 53-58, 1989.

ESTRUCH, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiology**, v.24, n. 4, p. 469-486, may, 2000.

FELIPE, M.G.A. **A Importância do ácido acético e da glicose na obtenção microbiológica de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 2013. 91 f. Tese (Livre docência) Lorena, 2013.

_____, et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 171-77, 1995.

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

FERNANDES, A. P. F. V. **Leveduras isoladas de produtos frutícolas: Capacidade Fermentativa e estudos sobre a H⁺ATPase da membrana plasmática**. 2008, 201 f. Tese (Doutorado em Biologia) Universidade Nova de Lisboa. Faculdade de Ciência e Tecnologia, Lisboa, 2008.

FERREIRA, A.D.; et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547-554, 2011.

_____. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010, 111 f. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010, 70 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2010.

GONG, C.S.; et al. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 85-102, 1983.

GUNSALUS, I.C.; HORECKER, B.L.; WOOD, W.A. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. **Bacteriological Reviews**, v. 19, n. 2, p. 79-128, 1955.

GUIMARÃES, T. M. **Isolamento, identificação e seleção de cepas de leveduras *saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho**. 2005 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

HAHN-HAGERDAL, B.; et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbiology Technology**, Woburn, v. 16, n. 11, p. 933-943, 1994.

HAMACHER, T.; et al. Characterization of the xylose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, n. 9, pag. 2783-2788, 2002.

HARMSSEN, P.F.H.; et al. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. **Wageningen: Food & Biobased Research**, 2009. 54 p.

JADOSKI, C.J. et al. Fisiologia do desenvolvimento do estágio vegetativo da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava, v. 3, n. 2, p. 169-176, 2011.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, n.3, p.320–326, 2006.

_____; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.

_____; JIN YS Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. **Advances Applied Microbiology**, v. 47, p. 221-268, 2000.

KALHORINIA, S.; GOLI, J. K.; RAO, L. V. Screening and parameters optimization of pentose fermenting yeasts for ethanol production using simulated media. **Biosciences Biotechnology Research Asia**. v. 11, p. 641-648, 2014.

LARSSON, S., et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 24, n. 3-4, p. 151- 159, 1999.

LEE H, et al. Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* K35 to lignocellulose-derived inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. v. 16, n. 4, p. 755-760, 2011.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v.11, n.1, p. 641-649, 1981.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). [Processos fermentativos e enzimáticos]. In: _____. **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.3, p.1-20.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Em álcool carburante: Uma estratégia brasileira**. 1ª ed, UFRP: Paraná, 2002.

LIMA, L. H. A. Effect of acetic acid presente in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied microbiology**, v. 65, p. 734-738, 2004.

LIU, Z. L; MA, M; SONG, M. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 3, p. 233-244, 2009.

LIU, Z. L., SLININGER, P. J., GORSICH, S. W. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, 451-460, 2005.

_____, et al. Adaptative response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, 345-352, 2004.

LYNFERD, J.; KERMIT, A. B. Carbon assimilation tests for the classification of yeasts. **Journal Bacteriology**, v. 56, n. 3, 363 p., 1948.

MADIGAN, M.T.; et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160p.

MADHAVAN, A.; et al. Xylose isomerase from polycentric fungus *Orpinomyces*: gene sequencing, cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of xylose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n.6, p. 1067-1078, 2009.

MARTIN, C.; et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1297, p. 33-39, 2007.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2002.

MARTINI, C. **Isolamento, identificação e caracterização de linhagem de levedura quanto ao crescimento e fermentação utilizando meios sintéticos com pentoses e hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2014. 122 f. Tese. (Doutor em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista - Campus de Rio Claro, 2014.

MEDINA, K. J. D. **Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético**. Tese (Doutor em Ciências) - Departamento de Biotecnologia-USP, Lorena, 2013.

MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 36, n. 2-3, p. 294 – 300, 2005.

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

MOZAMBANI, A. E.; et al. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SEGATO, S.V. et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Cadernos Planalsucar. 2006. p.11-18.

NGUYEN, N; et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesse* sp.nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E; ALMEIDA, J; HAHN-HAGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology Bioengineering**, v. 62, n.4, p. 447-454, 1999.

PASSOTH, V. et al. Enhanced ethanol production from wheat straw by integrated storage and pre-treatment (ISP). **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 52, n. 2, p. 105 – 110, 2013.

PEREIRA, B. F.; **Produção de bioetanol a partir do material celulósico e hemicelulósico**. 2011. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação do Curso de Tecnologia em Biocombustíveis) – Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza. Araçatuba, 2011.

PEREIRA, F. C. **Avaliação da capacidade de bioconversão de hexoses e Pentoses em bioetanol por *Spathaspora arborariae***. 2010. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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

PETRUS, S.; et al. Cultivation of *Candida blankii* in simulated bagasse hemicellulose hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, 109-113, 1991.

POURQUIE, J.; VANDECASTEELE, J. P. **Conversão dos compostos lignocelulósicos por hidrólise enzimática e fermentação acetona-butanol**. In: SCRIBAN, R. COORD. *Biotechnologia*. São Paulo: Manole, parte 6, Cap. 2, p. 427-428, 1985.

PHAFF, H. J.; STARMER, W. T. [Yeasts associated with plants, insects and soils]. In: Rose AH & Harrison JS (eds) **The Yeasts: Biology of the Yeasts**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1987. v. 1, p. 123- 180.

PHITSUWAN, P.; SAKKA, K.; RATANAKHANOKCHAI, K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. **Biomass and Bioenergy**, v. 58, p. 390–405, 2013.

PROCKNOR, C. “Subprodutos; o bagaco,” STAB, Acucar, Alcool e Subprodutos, v. 18, n. 4, p. 14, 2000.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROALCOOLEIRO (RIDESA). **Catálogo nacional de variedades “RB” de cana-de-açúcar**. Curitiba, 2010, 136 p.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource technology**, v. 36, n. 3, p. 271 – 275, 1991.

ROSA, S. E. S; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 32, p. 117 – 156, 2009.

ROVIERO, J. P. et al., Ethanol production using hemicellulosic hydrolyzate and sugarcane juice with yeast that converts pentoses and hexoses. **African Journal of Biotechnology**. v. 14, p. 519-524, 2015.

INGLEDEW, W.M. [Yeasts for Production of Fuel Ethanol]. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J.S. **The Yeast: Organelas**. 2nd ed. New York: Academic Press, 1987. V. 4, p. 245-287.

SCORZETTI, G. et al. Systematics of basidiomycetous yeasts: a comparison of large sub-unit D1D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. **Fems Yeast research**, v. 2, n. 4, p. 495-517, 2002.

SILVA, R.; et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 661-671, 2009.

SILVA, V. S.; GARCIA, C. A.; SILVA, C. M. O destino do bagaço de cana-de-açúcar: Um estudo a partir das agroindústrias sucroalcooleiras do paraná. **Agronegócios e Meio Ambiente**, v.3, n.1, p. 59-76, 2010.

SILVA, S. S. et al. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, n.3, p.187-191, 1996.

SIMS, A. P.; BARNETT, J. A. The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeast (Kluyver Effect). **Microbiology**, v. 106. n. 2, p. 277-288. 1977.

SKOOG, K.; HAHN-HÅGERDAL, B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 10, n. 2, p. 66-80, 1988.

SKOOG, K.; HAHN-HÅGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56. p. 3389 – 3394, 1990.

SLININGER, P. J., BOLEN, P. L., KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: Properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 9, n. 1, p. 5-15, 1987.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-179, 1999.

SOCOL, C. R.; et al. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SOUZA, Z. J. de. Bioeletricidade O que falta para essa alternativa energética deslançar. **ÚNICA. Opinião/Colunas**, São Paulo, 4 set. 2012. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/colunas/470156692036979688/bioeletricidade-por-cento3a-0o-que-falta-para-esta-alternativa-deslanchar/>> Acesso em: 12 agos. 2013.

STEESELS, J.; et al. Improving industrial yeasts strains: exploiting natural and artificial diversity. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, p. 947-995, 2014.

SUN, H. Y. et al. Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1-2 isolated from mangrove ecosystem. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 251-256, 2012.

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

TAGUCHI, v. Etanol 2G já está sendo produzido no Brasil. Revista Globo rural, 2014. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2014/12/usina-em-alagoas-comeca-produzir-o-etanol-de-segunda-geracao.html>> Acesso em: 20/01/2014.

- TAHERZADEH, M.J. et al. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, n. 3, p. 701-708, 2000.
- TOIVOLA, A.; et al. Alcoholic Fermentation of D-Xylose by Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1221-1223, 1984.
- TANTIRUNGKIJ, M.; et al. Construction of xylose assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **Jornal Fermentation Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 83-88, 1993.
- TAO, N; GAO, Y; LIU, Y. Isolation and characterization of a *Pichia anomala* strain: A promising candidate for bioethanol production. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 42, n. 2, p. 668 – 675, 2011.
- TAYLOR, K. B.; et al. The fermentation of xylose: studies by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Jornal of Industrial Microbiology**, Berlin, v. 6, n. 1, p. 29-41, 1990.
- TELLI OKUR, M.; EKEN SARAÇOĞLU, N. Ethanol Production from Sunflower Seed Hull Hydrolysate by *Pichia stipitis* under Uncontrolled pH Conditions in a Bioreactor. **Journal Engineering Environmental Science**, Turkish, v. 30, p. 317-322, 2006.
- TORIJA, M. J.; et al. Effects of fermentation temperature on de strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47-53, 2002.
- VAN MARIS, A.; et al. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.
- VERDUYN, C.; et al. Properties of the NAD(P) H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochemical Journal**, v. 226, n. 3, p. 669-677, 1985.
- VOLTOLINI, T.V.; et al. Valor nutritivo de cultivares de cana-deaçúcar sob irrigação. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 13, p. 894-901, 2012
- WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: John Wiley, 1998, 311p.
- WHITE, C; ZAINASHEFF, J. **Yeast, the practical guide to beer fermentation**. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 2010. 304 p.
- YOKOYAMA, S.; et al. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, n. 3, p. 217-223, 1995.
- YU, Q. et al. Xylo-oligoccharides and ethanol production from liquid hot water hydrolysate of sugarcane bagasse. **Bioresources**, v. 10, p. 30-40, 2015.
- ZALDIVAR, J; NIELSEN, J; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

APÊNDICES

Apêndice A - Tabela 9 - Número de células e peso seco correspondente das leveduras cultivadas em meio de cultura com xilose e meio com glicose como fonte de carbono incubados em temperatura e pH ideal para cada levedura e agitação de 150 rpm por 96 horas de incubação.

Linhagens	Tempo (h)	xilose		glicose	
		Número de células mL ⁻¹	Massa seca mg mL ⁻¹	Número de células mL ⁻¹	Massa seca mg mL ⁻¹
<i>W. anomalous</i> BB.10 *	0	9,9 x 10 ⁷	4,0	9,8 x 10 ⁷	3,9
	24	1,0 x 10 ⁸	4,1	3,0 x 10 ⁸	12,5
	48	1,1 x 10 ⁸	4,6	3,3 x 10 ⁸	13,7
	72	1,2 x 10 ⁸	5,0	3,9 x 10 ⁸	16,2
	96	1,6 x 10 ⁸	6,7	4,1 x 10 ⁸	17,1
<i>S. pombe</i> BB.92 **	0	1,2 x 10 ⁸	9,4	1,2 x 10 ⁸	9,4
	24	1,4x 10 ⁸	11,0	3,3 x 10 ⁸	26,0
	48	1,5 x 10 ⁸	12,0	4,0 x 10 ⁸	31,0
	72	1,5x 10 ⁸	12,0	4,1 x 10 ⁸	32,0
	96	1,5x 10 ⁸	12,0	4,4 x 10 ⁸	34,0
<i>W. anomalous</i> FRP.04 *	0	9,6 x 10 ⁷	4,8	9,9 x 10 ⁷	4,9
	24	9,8 x 10 ⁷	4,9	1,9 x 10 ⁸	9,5
	48	1,3 x 10 ⁸	6,5	2,9 x 10 ⁸	14,5
	72	1,5 x 10 ⁸	7,5	3,2 x 10 ⁸	16,0
	96	1,9 x 10 ⁸	9,3	3,5 x 10 ⁸	17,5
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	9,0 x 10 ⁷	3,3	9,8 x 10 ⁷	3,6
	24	9,2 x 10 ⁷	3,4	1,2 x 10 ⁸	4,4
	48	1,1 x 10 ⁸	4,0	1,3 x 10 ⁸	4,8
	72	1,3 x 10 ⁸	4,8	1,3 x 10 ⁸	4,8
	96	1,4 x 10 ⁸	5,1	1,5 x 10 ⁸	5,5

*Incubadas a 28°C; **incubada a 32°C.

Apêndice B - Tabela 10 – Média de valores de consumo de xilose, produção de etanol e xilitol durante o experimento de fermentação em meio com 70 g/L de xilose, pH 4,0 e temperatura ideal de cada levedura, agitação de 150 rpm por 96 horas com inóculo inicial de aproximadamente 1,0 x 10⁸ Células mL⁻¹

Linhagens	Tempo (h)	Xilose consumida (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Xilitol (g L ⁻¹)
<i>W. anomalous</i> BB.10 *	0	0	0	0
	24	12,1 (±0,031)	LND	0,3 (±0,986)
	48	22,0 (± 0,187)	resquícios	1,6 (±0,087)
	72	28,6 (±0,234)	resquícios	4,7 (±0,765)
	96	55,3 (±1,208)	resquícios	8,0 (±0,256)
<i>S. pombe</i> BB.92 **	0	0	0	0
	24	20,3 (±0,123)	0,3 (±0,129)	LND
	48	20,0 (±0,354)	0,3 (±0,236)	resquícios
	72	21,7 (±0,168)	2,6 (±2,448)	resquícios
	96	34,1 (±0,097)	2,7 (±2,513)	resquícios
<i>W. anomalous</i> FRP.04 *	0	0	0	0
	24	18,7 (±0,876)	LND	LND
	48	23,4(± 0,075)	resquícios	0,2 (±0,076)
	72	32,0 (±0,056)	resquícios	0,2 (±0,013)
	96	36,0 (±0,025)	resquícios	0,7 (±0,124)
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	0	0	0,0
	24	25,7 (±0,014)	0,25 (±0,108)	0,9 (±0,876)
	48	30,0 (±0,126)	0,33 (±0,234)	5,1 (±0,012)
	72	32,1 (± 1,087)	0,54 (±0,132)	9,8 (±0,034)
	96	41,4 (± 0,987)	0,63 (±0,321)	14,5 (±0,987)

LND – Limite Não Detectável *Incubadas a 28°C; **incubada a 32°C;

Apêndice C - Tabela 11 – Média dos valores de consumo de glicose, produção de etanol, glicerol e ácido acético em meio de cultura com concentração de glicose de 72 - 73 g/L, pH 4,0 e temperatura ideal de cada levedura, agitação de 150 rpm por 96 horas com inóculo inicial de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ Células mL⁻¹.

Linhasgens	Tempo (h)	Glicose Consumida (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)	Ácido acético (g L ⁻¹)
<i>W. anomalus</i> BB.10 *	0	0	0,0	0,0	0,0
	24	100 (± 0,087)	25,3 (±0,425)	1,16 (±0,104)	0,04 (±0,014)
	48	100 (± 0,076)	32,3 (±1,985)	1,11(±0,204)	0,05 (±0,017)
	72	100 (± 0,540)	30,4 (±1,803)	1,11 (±0,133)	0,05 (±0,002)
	96	100 (± 0,123)	22,1(±2,072)	0,18 (±0,016)	0,16 (±0,021)
<i>S. pombe</i> BB.92 **	0	0	0,0	0,0	0,0
	24	100 (±0,069)	17,8 (±1,795)	1,05 (±0,080)	0,79 (±0,019)
	48	100 (± 0,067)	23,0 (±0,604)	1,13 (±0,131)	0,65 (±0,011)
	72	100 (± 0,124)	21,7 (±0,601)	1,36 (±0,089)	0,68 (±0,021)
	96	100 (±0,213)	21,7 (±0,510)	1,37(±0,151)	0,66 (±0,021)
<i>W. anomalus</i> FRP.04 *	0	0	0,0	0,0	0,0
	24	100 (±0,012)	34,6 (±1,559)	1,52 (±0,015)	LND
	48	100 (±0,098)	32,5 (±1,794)	1,35 (±0,167)	LND
	72	100 (±0,361)	27,4 (±2,519)	1,02 (±0,281)	LND
	96	100 (±0,087)	27,0 (±2,843)	0,59 (±0,024)	LND
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	0	0,0	0,0	0,0
	24	96 (±0,985)	32,1 (±1,541)	3,05 (±0,178)	0,92 (±0,064)
	48	100 (±0,654)	34,4 (±0,808)	3,34 (±0,040)	0,54 (±0,021)
	72	100 (±0,567)	32,5 (±0,604)	3,36 (±0,099)	0,54 (±0,063)
	96	100 (±0,328)	31,9 (±1,207)	3,52 (±0,217)	0,52 (±0,115)

LND – Limite Não Detectável *Incubadas a 28°C; **incubada a 32°C;

Apêndice D - Tabela 12 – Crescimento e viabilidade celular das leveduras cultivadas em meio de cultura pH 4,0 com xilose e com glicose como fonte de carbono incubados em temperatura e pH ideal para cada levedura e agitação de 150 rpm por 96 horas de incubação.

Linhasgens	Tempo (h)	Xilose		Glicose	
		Massa seca mg mL ⁻¹	Viab. celular (%)	Massa seca mg mL ⁻¹	Viab. celular (%)
<i>W. anomalus</i> BB.10 *	0	4,0	98,3	3,9	99,3
	24	4,1	93,5	12,5	96,4
	48	4,6	94,3	13,7	96,3
	72	5,0	95,8	16,2	94,0
	96	6,7	95,3	17,1	93,0
<i>S. pombe</i> BB.92 **	0	9,4	93,7	9,4	98,0
	24	11,0	70,5	26,0	91,5
	48	12,0	60,2	31,0	89,7
	72	12,0	54,2	32,0	84,2
	96	12,0	51,2	34,0	69,0
<i>W. anomalus</i> FRP.04 *	0	4,8	99,2	4,9	99,0
	24	4,9	95,7	9,5	97,0
	48	6,5	96,0	14,5	98,2
	72	7,5	97,5	16,0	96,7
	96	9,3	98,5	17,5	92,2
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	3,3	99,8	3,6	100,0
	24	3,4	97,5	4,4	96,0
	48	4,0	99,0	4,8	96,0
	72	4,8	94,8	4,8	93,5
	96	5,1	97,3	5,5	92,8

*Incubadas a 28°C; **incubada a 32°C;

Apêndice E - Tabela 13 – Rendimento (Yp/s), produtividade volumétrica (Qp) e eficiência de fermentação de xilitol a partir da xilose no cultivo das levedura em pH 4,0 incubados a 150 rpm por 96 horas.

Linhasgens	Tempo (h)	^a Y p/s (g g ⁻¹)	^b Qp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	^c η (%)
<i>W. anomalus</i> BB.10 *	0	-	-	-
	24	0,04	0,01	4,4
	48	0,10	0,03	11,0
	72	0,16	0,07	17,7
	96	0,21	0,08	23,2
<i>W. anomalus</i> FRP.04 *	0	-	-	-
	24	0,00	0,00	0,0
	48	0,01	0,00	1,1
	72	0,01	0,00	1,1
	96	0,01	0,01	3,3
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	-	-	-
	24	0,05	0,04	5,5
	48	0,24	0,11	26,5
	72	0,44	0,14	48,6
	96	0,50	0,15	55,2

^a Yp/s (g g⁻¹) g xilitol produzida/g xilose consumida. ^b Qp (g L⁻¹ h⁻¹) g xilitol produzido/tempo

^c η (%) eficiência de fermentação calculado conforme Barbosa et al.,(1988).

Apêndice F - Tabela 14 – Rendimento (Yp/s), produtividade volumétrica de etanol (Qp), Rendimento de Crescimento (Yx/s) e eficiência de fermentação (η %) no cultivo das leveduras em meio de cultura contendo xilose como fonte de carbono, incubados a 150 rpm por 96 horas.

Linhasgens	Tempo (h)	^a Yp/s (g g ⁻¹)	^b Qp (g L ⁻¹ h ⁻¹)	^c Y x/s (g g ⁻¹)	^d η (%)
<i>W. anomalus</i> BB.10 *	0	-	-	-	-
	24			0,01	
	48			0,04	
	72			0,03	
	96			0,07	
<i>S. pombe</i> BB.92	0	-	-	-	-
	24	0,02	0,01	0,09	3,9
	48	0,01	0,01	0,12	2,0
	72	0,10	0,03	0,12	19,6
	96	0,09	0,03	0,09	17,6
<i>W. anomalus</i> FRP.04	0	-	-	-	-
	24			0,01	
	48			0,10	
	72			0,12	
	96			0,46	
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09	0	-	-	-	-
	24	0,01	0,01	0,01	2,0
	48	0,02	0,01	0,03	3,9
	72	0,02	0,01	0,07	3,0
	96	0,02	0,01	0,06	3,9

^a Yp/s (g g⁻¹) etanol produzido/xilose consumida ^b Qp (g L⁻¹ h⁻¹) g etanol produzido/tempo

^c Y x/s (g g⁻¹) massa celular produzida / xilose consumida ^d η eficiência de fermentação

Apêndice G - Tabela 15 – Rendimento (Y_p/s), produtividade volumétrica de etanol (Q_p), Rendimento de crescimento (Y_x/s) e eficiência de fermentação (η) a partir da glicose no cultivo das leveduras incubados a 150 rpm por 96 horas.

Linhagens	Tempo (h)	^a Y_p/s (g g ⁻¹)	^b Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	^c Y_x/s (g g ⁻¹)	^d η (%)
<i>W. anomalous</i> BB.10 *	0	-	-	-	-
	24	0,35	1,05	0,12	68,5
	48	0,31	0,46	0,13	60,7
	72	0,42	0,42	0,17	82,2
	96	0,30	0,23	0,18	58,7
<i>S. pombe</i> BB.92 **	0	-	-	-	-
	24	0,25	0,74	0,23	48,9
	48	0,32	0,48	0,30	62,6
	72	0,31	0,30	0,32	60,7
	96	0,31	0,23	0,35	60,7
<i>W. anomalous</i> FRP.04 *	0	-	-	-	-
	24	0,47	1,44	0,06	92,0
	48	0,45	0,68	0,13	88,1
	72	0,38	0,38	0,15	74,4
	96	0,37	0,28	0,17	72,4
<i>S. meliponinorum</i> FRP.09 *	0	-	-	-	-
	24	0,46	1,32	0,02	89,7
	48	0,47	0,71	0,03	92,2
	72	0,44	0,37	0,04	87,1
	96	0,44	0,33	0,06	85,5

^a Y_p/s (g g⁻¹) etanol produzida / glicose consumida. ^b Q_p (g L⁻¹ h⁻¹) etanol produzido/tempo
^c Y_x/s (g g⁻¹) massa celular produzida /glicose consumida. ^d η (%) eficiência de fermentação

ANEXO A – Artigo submetido a revista “PROCESS BIOCHEMISTRY”

Influence of agitation and aeration on xylitol production by the yeast *Starmerella meliponinorum*

Rosimeire Oenning da Silva^{a*}, Gisele Marta Martins^a, Tassia Chiachio Egea^a Marney Pascoli Cereda^b, Roberto da Silva^a, Eleni Gomes^a

^aLaboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, UNESP – São Paulo State University, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

² CeTeAgro – Center of Technology and Agribusiness Analysis, UCDB – Catholic University of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*corresponding author: rosimeireoenning@gmail.com

Summary

The production of xylitol from pentose yeast is closely related to the amount of oxygen present in the culture medium. Therefore to establish the culture conditions for fermenting yeast xylose, special attention should be given to this variable in order to obtain high yields and productivity. This study evaluated the effects of agitation and aeration in xylitol production using the yeast *S. meliponinorum* FRP.09, previously isolated and selected due to its capacity to produce ethanol and xylitol from xylose. Fermentations were conducted in 125 ml flasks with 15 ml of culture medium and shaken at 150 rpm and 200 rpm without forced aeration and compared to fermentation in a static system. To assess the forced, a aeration bioreactor was used with an air flow of 0.1 vvm and agitation of 100 rpm 0.25 vvm / 150 rpm and 0.5 vvm / 200rpm. Higher agitation and airflow significantly increased the xylose consumption. In bench experiments, there was no difference in the production of xylitol and ethanol between the two levels of agitation. In the bioreactor, most xylitol was produced at higher air flow/agitation levels and there was no ethanol production in any of the evaluated conditions.

Keywords: Yield of xylitol. Xylose. Fermentation. Aeration.

Introduction

Xylitol is a polyol that has attracted the attention of researchers due to its unique characteristics that allow its use in various industrial sectors. Besides presenting anticariogenic properties, xylitol is used as a less calorific sweetener and, because it doesn't pass through the cycle of insulin in the human body, it can be used by diabetics [1] Xylitol also helps to maintain the integrity of the red blood cells; treats and/or prevents osteoporosis and otitis; and stimulates the absorption of calcium from the intestine, facilitating its passage from the blood to the bone [2].

Rosimeire Oenning da Silva

This molecule is widely distributed in nature but its low concentration in plants makes its extraction uneconomical. A commercial xylitol production process occurs by chemical catalysis of xylose from plant biomass. The solution of xylose is hydrogenated using nickel as a catalyst and xylitol is recovered by chromatographic fractionation using an ion exchange resin [3]. This is a costly process due to the need for successive purification steps of the initial solution of xylose and also the xylitol produced [4].

Thus, the microbial conversion of xylose to xylitol is a good alternative to the conventional commercial method. This production can be achieved without the need for the initial purification of D-xylose. However, to make the process economically viable at the industrial level, the conversion must provide a high yield and rate of production and the environmental conditions must be adjusted to the yeast's metabolic needs. In submerged fermentation, agitation is important for several reasons: to obtain a good homogenization preventing settling of the cells; to provide greater surface contact with the medium; and to ensure the transfer of oxygen from the gas phase (air) into the liquid phase (medium) where it will be consumed by microorganisms in respiration and other biochemical reactions.

In fermentation kinetics without aeration, oxygen is transferred from the space above the liquid by agitation that continuously breaks the liquid surface and increase the oxygen transfer. Without agitation, the access to oxygen by microorganisms is limited. It is important to remember that several types of reactions require oxygen as a reagent, such as sterol biosynthesis on yeast membranes. According to Hammond [5], the production of lipids does not occur in the absence of oxygen, which affects the strength and stability of the plasma membrane. Moreover, the production of xylitol from yeast pentoses is closely related to the amount of oxygen present in the medium [6]. This is because the main oxidoreductases involved in D-xylose metabolism are xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH), which exhibit different cofactor specificities. Xylose reductase depends on NADPH or NADH

as a cofactor, in general, with a preference for NADPH, while xylitol dehydrogenase depends on NAD⁺ or NADP⁺, with a preference for NAD⁺. In most xylose fermenting microorganisms mentioned in the literature, the conversion of xylose to xylulose implies the production of NADP⁺ and NADH, while NADPH and NAD⁺ need to be regenerated so the redox balance is maintained. The regeneration of NADPH can be achieved by diverging part of the fructose 6-phosphate produced in the oxidation step in the pentose phosphate pathway. Under aerobic conditions, NADH can be reoxidized through the respiratory chain with molecular oxygen. However, under anaerobic conditions, another electron acceptor is needed to reoxidize NADH [7]. Therefore, the enzymes xylose reductase and xylitol dehydrogenase, depending on the yeast, may have different specificity related to their cofactors. This cofactor specificity may be related to the type of fermentation product obtained from xylose assimilation [7].

Yeasts with xylose reductase activities related to NADH and NADPH regenerate NAD⁺ and consumed in the second xylose metabolism step. In this case, the main product is ethanol and there is no xylitol accumulation due to the balance between the redox cofactors. In contrast, yeasts that ferment D-xylose only by NADPH-dependent xylose reductase (with the complete absence of xylose reductase connected to NADH), at the first step of D-xylose metabolism, accumulate xylitol [8].

Xylitol can be produced in fermentation processes from xylose as long as there is a microorganism capable of fermenting this carbon source. However, only a few yeasts are described in the literature as fermenting xylose, and producing xylitol, such as: *Debaryomyces hansenii* [9], *Candida parapsilopsis* [10], *Pichia capsulata*, *Pachysolen tannophilus*, *D.hansenii* [11], *C. magnoliae* [12] and *C. guilliermondii* [13, 14]. Among these, the highlight is the performance achieved by the strain *Candida guilliermondii*, one of the most studied

yeasts for the production of xylitol which can achieve a yield (Y_p/s) up to 0.90 g.g^{-1} , with productivity (Q_p) of $0.50 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ [14].

Until now, the xylose metabolism by the yeast *S. meliponinorum* is not known. This strain was previously isolated and selected because of its ethanol and xylitol production capacity, but in order to evaluate its performance in xylose metabolism the culture conditions need to be established. To this end, the effects of agitation and aeration on the production of xylitol from xylose in a semisynthetic medium were evaluated. Agitation at 150 and 200 rpm without forced aeration was evaluated and compared to fermentations in static and agitation systems (100, 150 and 200 rpm) with oxygen flows from compressed air (0.1, 0.25 and 0.5 vvm).

Material and Methods

Microorganisms

Starmerella meliponinorum FRP.09 was obtained from the Culture Collection of the Laboratory of Biochemistry and Applied Microbiology, São Paulo State University, Brazil. The yeast had previously been isolated from flowers collected in urban areas in São José Rio Preto, SP, and it was selected for its xylose fermentation capacity.

Culture medium for yeast growth

YEPD medium: 2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose or xylose, pH adjusted to 4.0 (15).

This medium was used for growing yeast *Starmerella meliponinorum*.

Culture medium for fermentation

Semi-synthetic medium (g.L⁻¹): 0,5 of MgSO₄; 1 of KH₂PO₄; 0,1 of NaCl; 0,1 of CaCl₂; 2,0 of (NH₄)₂SO₄; 10 of Yeast Extract and trace elements (mg L⁻¹): 0,5 of H₃BO₃; 0,04 of CuSO₄; 0,1 of FeCl₃; 0,4 of Na₂MoO₄; 0,2 of ZnSO₄; 0,4 of MnSO₄; adjusted to pH 4. Xylose were included, separately, in the basic formulation, as the carbon source, at a concentration of 60 g.L⁻¹.

Inoculum standardization for fermentation flask and bioreactor

The standardization was done using the number of viable cells per milliliter in a Neubauer counting chamber using methylene blue and sodium citrate dye [16]. The concentration of inoculum was established at approximately 1.0×10^8 cells.ml⁻¹

The influence of agitation and aeration in xylose consumption kinetics and production of xylitol/ethanol by *S. meliponinorum*.

To assess the effects of agitation on xylose consumption kinetics, growth, cell viability and production of xylitol/ethanol by *S. meliponinorum*, the yeasts were pre-cultivated in a YEPD culture in 125 ml Erlenmeyer flasks, at 28°C (the temperature and pH were previously established as optimal for this strain – data not shown) and agitation of 150 rpm for 24 to 48 hours. Aliquots were centrifuged at 10000 x g for 15 minutes. The supernatant was discarded and the pellet was used as inoculum.

Fermentation in flasks (13.7% culture volume)

125 mL erlenmeyer flasks were sealed with fermentation valve. Sodium metabisulfite solution at 1 mg.ml⁻¹ was added to allow the release of CO₂ and prevent the entrance of O₂. The flasks containing 15 ml of the semi-synthetic medium described above, with initial pH 4.0, were inoculated with sufficient pre culture supernatant to give a final cell concentration

of 1.0×10^8 cell.ml⁻¹. The flasks were incubated without any agitation, and also at 150 and 200 rpm (no airflow). Samples were taken after 96 hours and the fermentation parameters evaluated were: xylose consumption; cell growth and viability, and also ethanol and xylitol production.

Fermentation in a bioreactor

The bioreactor (Celligen 310 New Brunswick) has capacity for 4 liters and is equipped with temperature, agitation, aeration and pH controller. It was adjusted to 28 °C and pH 4.0. The medium oxygenation was controlled by agitation and airflow: 0.1 vvm/100 rpm, 0.2 vvm/150 rpm, 0.5 vvm/200 rpm. The inoculum was previously prepared in 2 liter flask containing 1 liter of YEPD culture medium (2% xylose) from a 250 ml suspension of cells that had been pre-cultured for 24 hours. The culture was incubated at 28 °C for 48 hours at 200 rpm (the previously-established ideal rotation). After this period, aliquots were centrifuged at 10,000 x g for 15 minutes, the supernatant was discarded and the cells were resuspended in 200 ml of semisynthetic culture medium. This cell suspension was inoculated into the bioreactor fermentation vat containing 1.9 L of culture medium to reach a final volume of 2.1 L. The fermentation proceeded for 96 hours and aliquots were removed every 24 hours for evaluation of growth, cell viability, and ethanol and xylitol production.

Cell biomass and viability

The concentration of cell biomass was determined using a spectrophotometer at 600 nm from a calibration curve showing the optical density of the dry weight cell concentration in g.L⁻¹. The determination cell viability was determined using the vital staining with methylene blue method described by Lee et al. [16]. A solution was prepared containing a sample

and methylene blue (1:1). This solution was homogenized and after 10 minutes, the colorless cells were counted in a Neubauer counting chamber.

Gas chromatograph

The ethanol was quantified using a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC-FID Clarus 480). The analysis was carried out in an Elite-Wax capillary column (polyethylene glycol – 0,25mm x 30m x 0,15 mm) with a split mode (1:20) using nitrogen as the carrier gas at a flow rate of 1 ml/min. The injection and detection temperatures were the same at 250°C. A volume of 6 ml of sample was packaged in penicillin tubes sealed with a rubber septum and kept at 40°C for 10 minutes. 200 µL of the vapor phase was collected using a gas-tight syringe and injected into the chromatograph. Quantitation was determined using the calibration curve from 0.02 to 4% of aqueous ethanol.

High Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEC-PAD)

The quantification of glucose, xylose and xylitol was carried out by HPAEC-PAD. All samples were centrifuged at 10000 x g, filtered through a 0.22 micron Whatman membrane, diluted and placed into 5 ml vials. 10 µL was injected into the HPAEC-PAD system (Dionex ICS SP 5000) equipped with a CarboPac PA1 column. An isocratic run was performed with 500 mM of NaOH at a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and 25 °C. The eluents were prepared using ultrapure deionized water (18 MΩ.cm) and degasified using an ultrasonic bath. Data were collected and analyzed using Chromeleon software, version 6.8 (Dionex ICS 5000 SP) (19).

Process efficiency

Ethanol and Xylitol Yield (Yp/s): The conversion factor, which expresses the mass of ethanol produced per unit mass of xylose consumed, in grams, was calculated by equation 1:

Equation 1

$$y \frac{p}{s} = \frac{P}{\Delta s} = \frac{P}{S_i - S_f}$$

P: final ethanol/xylitol concentration (g L⁻¹)

S_i: initial concentrations of xylose present in the medium (g L⁻¹).

S_f: final concentrations of xylose present in the medium (g L⁻¹).

Ethanol and Xylitol Volumetric Productivity (Q_p): The volumetric ethanol productivity was expressed as the amount of ethanol produced (g L⁻¹) per hour, and it was calculated according to the equation 2:

Equation 2

$$Q_p = \frac{P}{T}$$

P: final ethanol/xylitol concentration (g L⁻¹)

T: time of fermentation

Conversion factor of xylose in cell mass (Y_{x/s}): This parameter expresses the cell mass (g_{cel}) produced by consumed xylose mass (g), and was calculated according to equation 3:

Equation 3

$$y \frac{x}{s} = \frac{\Delta x}{\Delta s} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$$

S_i: initial concentrations of xylose (g L⁻¹)

S_f: final concentrations of xylose (g L⁻¹)

X_i: initial concentration of cell mass (g L⁻¹).

X_f: final concentration of cell mass (g L⁻¹).

Conversion efficiency (η) of ethanol: This fermentation parameter, expressed as a percentage, is the ratio between the experimental yield (Y_{p/s}) and the theoretical yield (Y_T) of 0,511 g g⁻¹ of glucose and/or xylose consumed (17) (Equation 4).

Equation 4

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{0.511} \cdot 100$$

Conversion efficiency (η) of Xylitol: This fermentation parameter, expressed as a percentage, is the ratio between the experimental yield ($Y_{p/s}$) and the theoretical yield (Y_T) of 0.905 g g^{-1} calculated by Barbosa et al. [18] (Equation 5).

Equation 5

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{0.905} \cdot 100$$

Statistical analysis

Analysis of variance was used to determine the significance of differences in xylitol production. The analysis was evaluated using Tukey's test at the 5% level of significance. All statistical analyses were performed using the SISVAR software, UFLA. The graphics were obtained by Oringin Pro 8.5.1 software from the University of Oxford.

Results and Discussion

Erlenmeyer flask fermentation

Among the evaluated conditions, it was observed that agitation at 200 rpm promoted cell growth of *S. meliponinorum* achieving 1.9×10^8 cells in 96 hours, while in the static fermentation it showed no growth (Fig. 1a). Absence or low concentration of oxygen dissolved in the medium can result in a stress of the microorganism [15], contributing to a reduction in the cell viability. The static experiment also resulted in the settling of cells, making access to the nutrients difficult.

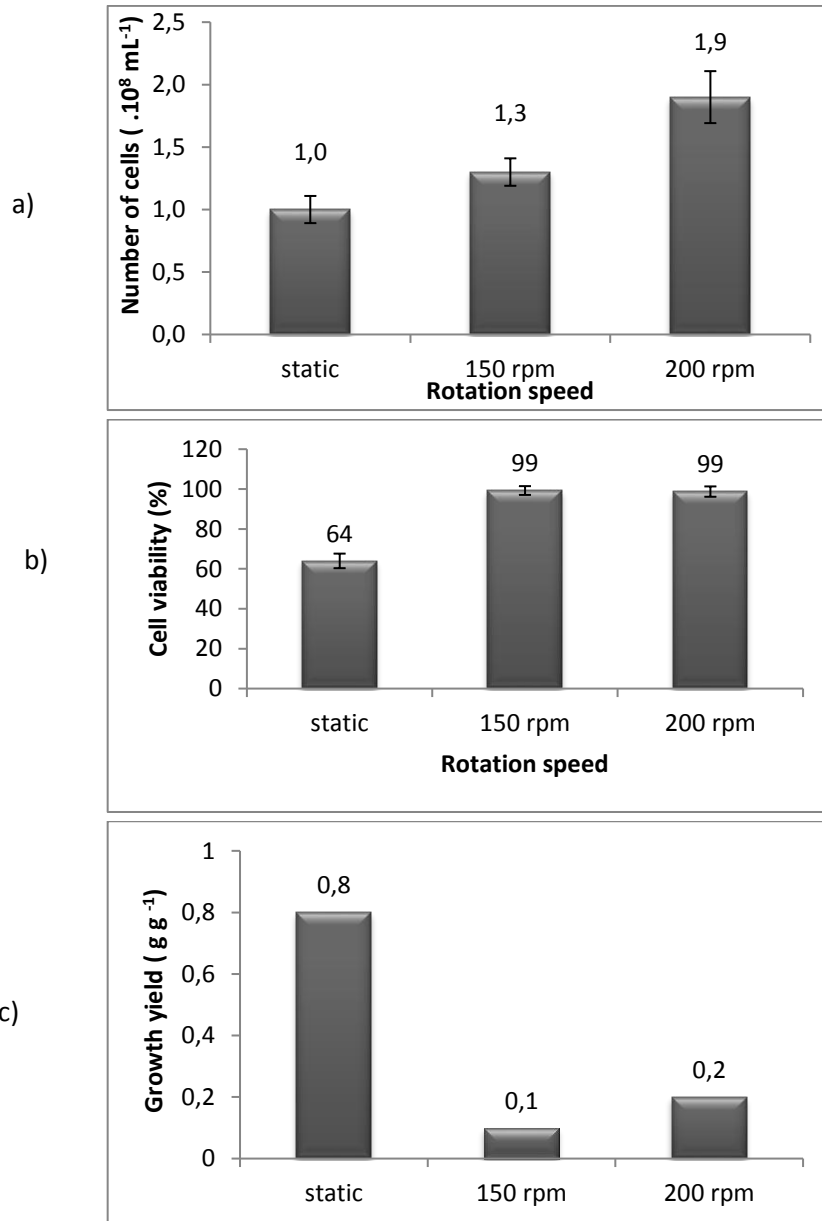


Figure 1: Quantification of a) = number of cells, b) = cell viability; and c) = growth yield ($Y_{x/s}$) of *S. meliponinorum* in static and agitated (150 and 200 rpm) flask fermentation.

Figure 1 shows the difference between cell growth and yield growth ($Y_{x/s}$). The latter was higher in the static fermentation because, although the xylose assimilation rate (Fig. 2) was lower under these conditions, most of the consumed sugar was converted into biomass. Under agitation, the xylose consumption rate was much higher but there was a wider range of carbon source to produce ethanol and xylitol, reducing the growth yield.

The yeast had significantly different xylose consumption rates in the three different sets of conditions evaluated, achieving the highest consumption rate of 67% at 200 rpm. There was no statistical difference in the xylitol and ethanol produced in the agitations at 150 and 200 rpm. None of the agitation levels significantly influenced the production of xylitol. The increased agitation contributed to a better consumption of xylose with a respective increase in biomass production (Fig. 2).

The agitation at 150 rpm favored the xylitol yield (Y p/s), providing a fermentation efficiency (η) of 63% of the theoretical yield (Fig.3). There was no statistical difference in volumetric productivity (Qp) of ethanol under the three conditions evaluated. The volumetric productivity (Qp) of xylitol (Fig. 2) was slower when the fermentation was conducted without agitation, which may primarily be due to the low number of viable cells (Fig. 1)

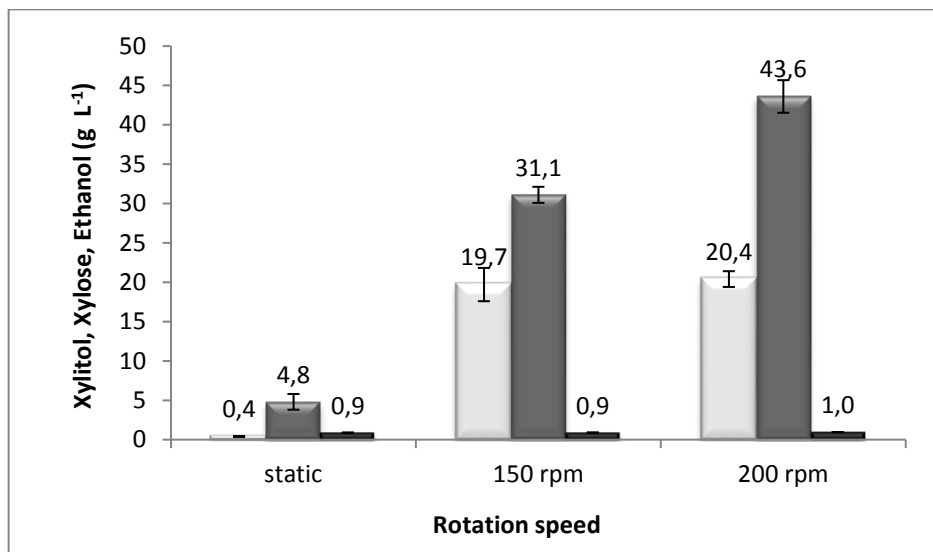


Figure 2: Consumption and production by *S. meliponinorum* in static and agitated (150 and 200 rpm) flask fermentation. ■ = Consumption xylose; ■ = production xylitol; ■ = production ethanol

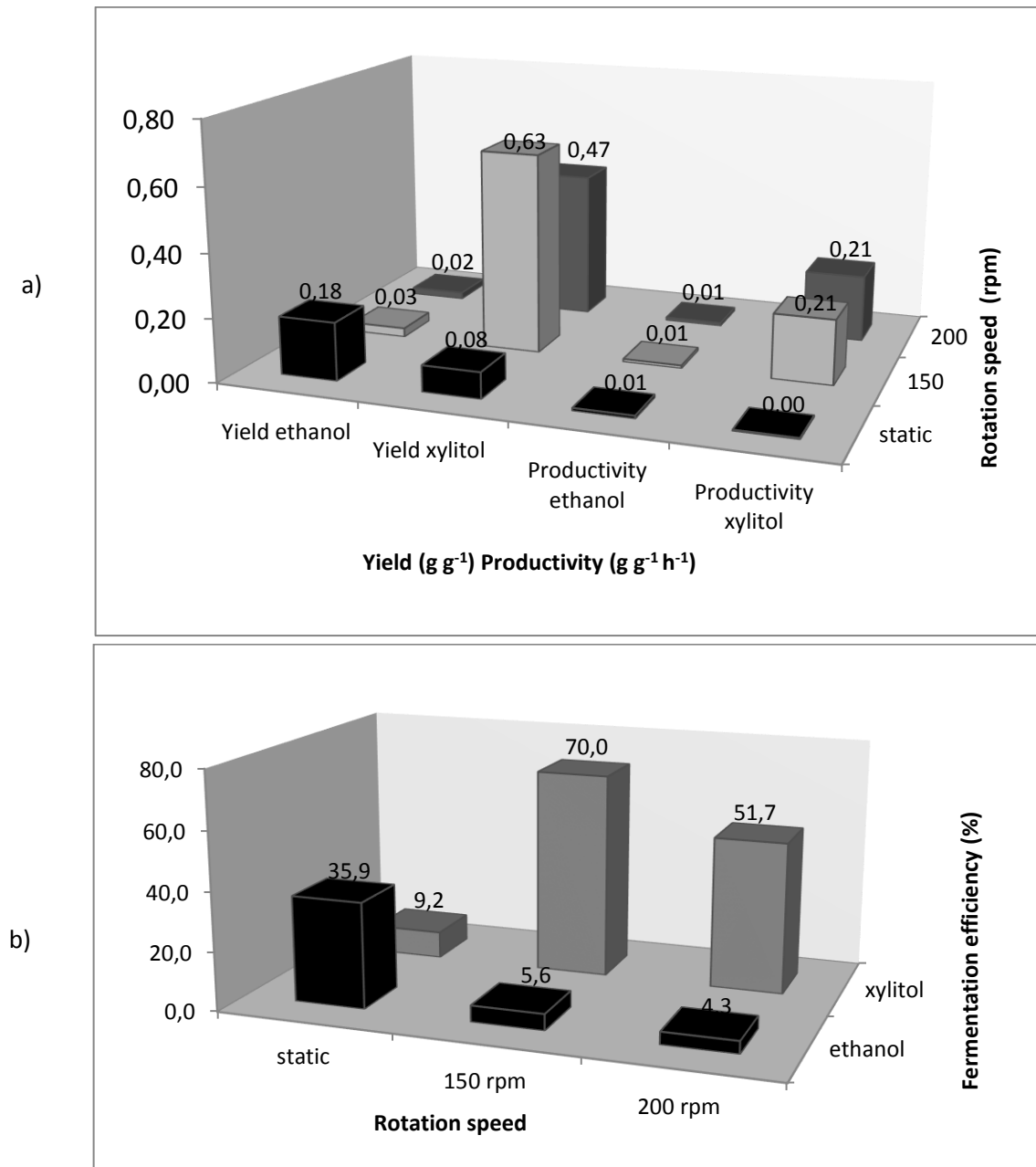


Figure 3: Fermentation parameters of ethanol and xylitol by *S. meliponinorum* in static and agitated (150 and 200 rpm) flask fermentation. **A)** = ethanol and xylitol yield, volumetric productivity of ethanol and xylitol in **static** fermentation; = ethanol and xylitol yield, volumetric productivity of ethanol and xylitol in **150 rpm** fermentation; = ethanol and xylitol yield, volumetric productivity of ethanol and xylitol in **200 rpm** fermentation. **B)** = Fermentation efficiency of ethanol (η); = Fermentation efficiency of xylitol (η).

Gong et al. [19] evaluated xylose consumption and conversion into ethanol and xylitol for eight strains of *S. pombe* in a 50 ml Erlenmeyer flask containing 10 ml of culture medium with 50 g L⁻¹ of xylose in limited oxygen conditions. They found that all the tested strains

consumed more xylose under aerobic conditions (32 to 40 g L⁻¹) than in limited oxygen conditions (19 to 28 g L⁻¹), but the production of ethanol for 7 of the 8 strains only occurred in oxygen limited conditions (1 to 5 g L⁻¹) the same condition that also favored the production of xylitol by 6 of 8 strains ranging from 0.1 to 0.3 g L⁻¹.

kalhorinia et al. (27) evaluated the production of ethanol by the yeast *Candida intermedia* MTCC 1404 in static conditions and agitation at 100-250 rpm finding the best ethanol yield (0.36 g g⁻¹) with agitation at 150 rpm at 96 hours. Cheng et al. (26) evaluated ethanol and xylitol production by the yeast *Candida tropicalis* W103 in hydrolyzed acid corn cob under two sets of conditions: 100 rpm with 200 ml of medium in 500 mL flasks and 160 rpm with 100 mL of medium in flasks same volume. Under the first set of conditions, there was an output of 1 g 7 L of xylitol and 25.3 g L⁻¹ of ethanol. The researchers found that increasing the speed and decreasing the volume of medium in the flask increased the production of xylitol (17.1 g L⁻¹) and decreased the ethanol (9 g L⁻¹).

Fermentation in a bioreactor

In the experiments performed with *S. meliponinorum* in Erlenmeyer flasks, different values of the xylose consumption and cell growth were observed for different levels of agitation. So, the bioreactor experiments were performed in order to evaluate the xylose consumption, xylitol and ethanol production, cell growth and cell viability under controlled conditions of aeration of 0.1/100; 0.25/150; 0.5/200 vvm / rpm. The results for these parameters are shown in Figure 4. Figure 5 shows the results of xylitol yield (Y_{p/s}) and growth (Y_{x/s}), volumetric productivity (Q_p) and conversion efficiency (η).

Different airflows and agitation influenced the xylose consumption rate and the amount of xylitol produced. The results indicate that the more oxygen available in the medium, the higher the consumption of xylose and production of xylitol by *S. meliponinorum*.

An increase of 98% in xylose consumption was observed when the air flow and speed was increased from 0.1vvm/100rpm to 0.25vvm/150 rpm, and there was an increase of 123% in consumption when they were increased from 0.25vvm/150 rpm to 0.5vvm/200rpm (Fig. 4)

Oxygen is required for the transportation of some disaccharides [20] and is also used in the production of sterols, unsaturated fatty acids and nicotinic acids, which are required for certain functions such as sugar transport through a membrane [6]. Hahn-Hägerdal & Skoog [21], in a study of the oxygen requirement in the transport of xylose into the cell, noted that the uptake rate under aerobic conditions was higher when compared to cultures in anaerobic conditions, indicating that oxygen induces or activates the transport system.

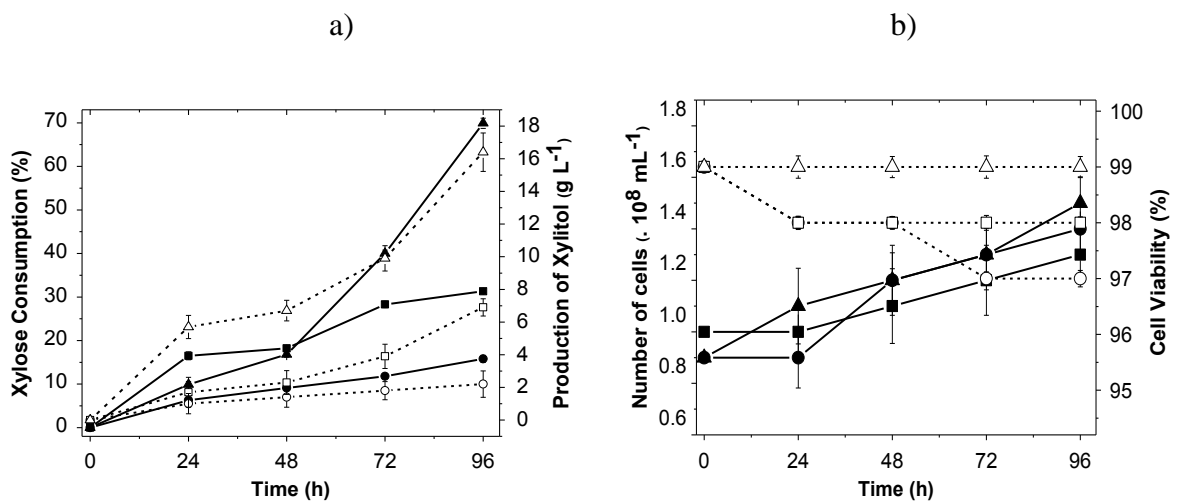


Figure 4: Metabolic responses to bioreactor fermentation for 96 hours with the yeast *S. meliponinorum* in culture medium with 70 g L⁻¹ xylose, pH 4.0, 28 °C, with an initial inoculum of 1.0 x 10⁸ cell mL⁻¹. (a) ● = xylose consumption 0,12 vvm ■ = xylose consumption 0,25 vvm ▲ = xylose consumption 0,5 vvm ○ = xylitol production 0,12 vvm □ = xylitol production 0,25 vvm △ = xylitol production 0,5 vvm. B) ● = number of cells 0,12 vvm ■ = number of cells 0,25 vvm ▲ = number of cells 0,5 vvm ○ = cell viability 0,12 vvm □ = cell viability 0,25 vvm △ = cell viability 0,5 vvm.

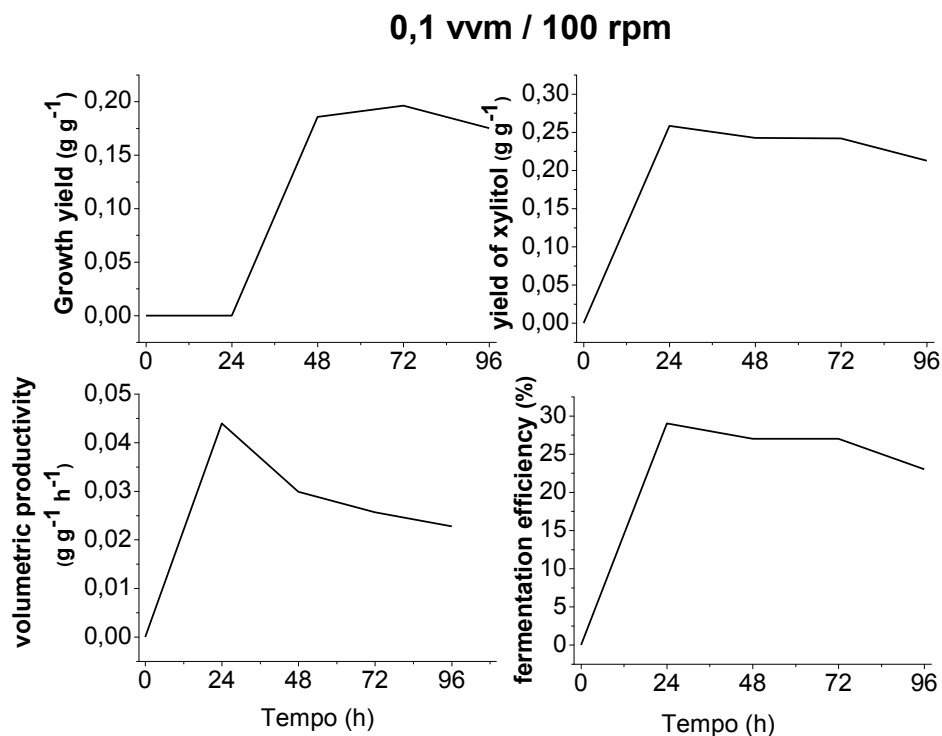
In the same way as the experiments in flasks, different levels of agitation in experiments using the bioreactor had no effect on the cell viability of *S. meliponinorum* yeast, that maintained a viability between 97 and 99% after 96 hours.

The significant increase in xylose consumption, with the increase of air flow, resulted in a higher yield growth (0.2 g g^{-1}) in the lower flow ($0.1 \text{ vvm}/100 \text{ rpm}$), without significantly increasing the number of cells.

In the experiments in the bioreactor, the increased airflow and rotation increased the xylitol production with no ethanol formation by *S. meliponinorum* (Figure 4). This indicates that a smaller volume of air ($0.1 \text{ vvm} / 100 \text{ rpm}$) is sufficient to inhibit ethanol production by this strain. However, different organisms respond differently to oxygen. Ethanol production was assessed by *Pichia stipitis* [22] in an agitated tank bioreactor using a semisynthetic medium containing xylose (90.0 g L^{-1}) as a carbon source. Experimental tests were conducted to evaluate the influence of aeration (0.25 to 0.75 vvm) and agitation (150 to 250 rpm) in ethanol production. The results showed that increased agitation and decreased aeration favored the production of ethanol, which was maximal (26.7 g L^{-1}) using 250 rpm and 0.25 vvm . Under these conditions, the ethanol yield and productivity, and process efficiency was 0.32 g g^{-1} , $0.32 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and 63% , respectively.

In this study, the yeast *S. meliponinorum* achieved the best xylitol yield of 0.6 g g^{-1} , when the fermentation was conducted with an air flow/rotation speed of $0.5 \text{ vvm}/200 \text{ rpm}$, resulting in a conversion efficiency of 63% of the theoretical yield. The best volumetric productivity was also achieved under these conditions, reaching $0.24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. The best results in performance, productivity and efficiency found in a bioreactor did not differ from the best results achieved in the experiments done in flasks at 150 rpm . Depending on the availability of oxygen, xylose can be directed to the production of xylitol, biomass growth, or respiration.

To obtain a high yield of xylitol, the flow of xylose to xylulose must be controlled by providing sufficient oxygen for the regeneration of NADPH, and maintenance of the cells. Low levels of oxygen favor the production of xylitol, decrease the NAD⁺/ NADH ratio, favor the reaction catalyzed by xylitol dehydrogenase and also favor the accumulation of xylitol by changing the equilibrium constant [23]. Complete aeration is also detrimental to the production of xylitol as proved in earlier studies (24, 25). Baz, Shetaia and Elkhouli (23) evaluated the effects of aeration and rotation in the production of xylitol from D-xylose by the yeast *Candida tropicalis* (AY 2007), using a semisynthetic medium. They observed that xylitol production (36 g L⁻¹ in 59h) was favored by oxygen-limited conditions, using an air flow of 0.3 vvm and rotation of 200 rpm. When the conditions were an air flow of 1.5 vvm and rotation of 500 rpm, the yeast production reached only 30.9 g L⁻¹ of xylitol after 66 h, but the yield and conversion efficiency were the same ($Y_p / s_g = 0.70 \text{ g}^{-1} - \eta = 77\%$) for both sets of conditions.



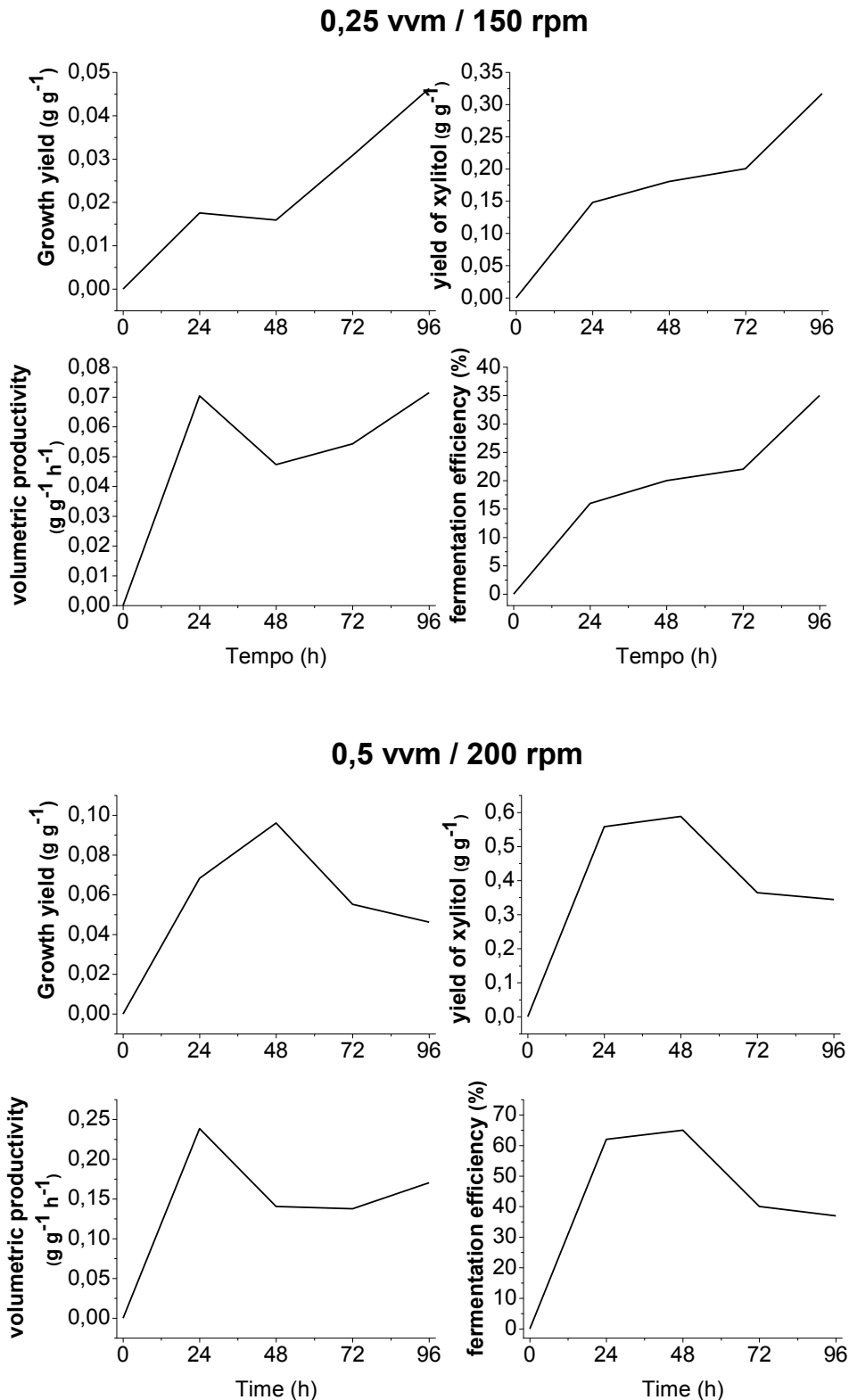


Figure 5: Xylitol yield ($Y_{p/s}$) and growth ($Y_{x/s}$), xylitol volumetric productivity (Q_p) and conversion efficiency (η) in bioreactor fermentation using semisynthetic medium with a concentration of 70 g L^{-1} xylose, for 96 hours, at a controlled temperature of 28°C and a pH of 4.0.

Conclusion

The *Starmerella meliponinorum* shows potential for the production of xylitol, reaching a yield of 0.6 g of xylitol per g of xylose consumed. This yield results in a conversion efficiency of 63% of the theoretical yield. This strain has its viability reduced in anaerobic conditions and stops the production of ethanol while increasing the production of xylitol when the concentration of oxygen and agitation are increased

References

- [1] **Huang CF, Jiang YF, Guo G L, Hwang WS.** 2011. 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*. **102**: 3322–3329. doi:0.1016/j.biortech.2010.10.111.
- [2] **Mattila PT, Kangasmaa H, Knuutila MLE.** 2005. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. *Metabolism Clinical Experiment*. **54**: 548-551.
- [3] **Melaja J, Hämäläinen L.** 1977. Process for Making Xylitol. *Metabolism Clinical and Experimental*, – USN 4.008.285.
- [4] **Parajó JC, Domínguez H, Domínguez JM.** 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. **65**: 191-201.
- [5] **Hammond JRM.** 1987. Brewer's Yeasts. P. 8-56. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J.S. *The Yeast: Yeast Technology*, 2th ed., vol 4. New York: Academic Press.
- [6] **Skoog K, Hahn-Hägerdal B.** 1988. Xylose fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. **10**: 66-80.
- [7] **Jeffries TW, Jin YS.** 2004. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **63**: 495-509.
- [8] **Amaral-Collaco MT, Girio FM, Peito MA.** 1989. P. 221-230. In: **Coughlan MP.** *Enzyme systems for lignocellulosic degradation*. Elsevier, London.
- [9] **Diz J, Cruz JM, Domínguez H & Parajó J.** 2002. Xylitol Production from Eucalyptus Wood Hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*. **40**: 191-197. doi:10.1016/S0032-9592 (97) 00016-2.
- [10] **Mayerhoff Z, Roberto I & Silva S.** 1997. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate using different yeast strains. *Biotechnology Letters*. **19**: 407-409.
- [11] **Converti A, Perego P & Dominguez JM.** 1999. Xylitol Production from hardwood hemicelluloses hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **82**: 141-151. doi: 10.1385/ABAB:82:2:141.
- [12] **Tadaa K, horiuchi JI, Kannob T & Kobayashia M.** 2004. Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. *Journal Bioscience and Bioengineering*. **98**: 228-230.
- [13] **Canilha L, Carvalho W, Almeida FM. & De Almeida e Silva J.** 2008. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian Journal of Microbiology*. **39**:333-336. doi: 10.1590/S1517-838220080002000025.
- [14] **Dominguez JM, Cao NJ, Krishnan MS, Gong CS & Tsao GT.** 1997. Xylitol production from hybrid poplar wood chips pretreated by the ammonia steeping process. *Biotechnology. Tech*. **11**: 339-341.

- [15] **White, C; Zainasheff, J.** 2010. *Yeast the Practical Guide to Beer Fermentation*. Boulder, Colorado: Brewers Publications, 304 p.
- [16] **Lee SS, Robinson FM, Wang HY.** 1981. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnology and Bioengineering. Symp.* **11**: 641-649.
- [17] **Ingledeu WM.** 1987. Yeasts for Production of Fuel Ethanol. P. 245-287. In: ROSE, A. H.; HARRISON, J.S. *The Yeast: Yeast Technology*, 2th ed., vol 4. New York: Academic Press.
- [18] **Barbosa MFS, Medeiros MB, Mancilha IM, Schneider H, Lee h.** 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal. Industrial Microbiology*, **3**: 241-251. Doi: 10.1007/BF01569582.
- [19] **Gong CS, Chen C, Mccracken LD, Maun CM, Ueng P P, Tsao GT.** 1983. Conversion of Pentoses by Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering.* **25**: 85-102.
- [20] **Sims AP, Barnett JA.** 1997. The requeriment of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and D-galactose by certain anaerobically fermenting yeast (Kluyver Effect). *Microbiology.* **106**:277-288. doi: 10.1099/00221287-106-2-277.
- [21] **Skoog K, Hahn-Hägerdal B.** 1990. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology.* **56**: 3389 – 3394.
- [22] **Silva JPA, S. I. Mussatto SI, Roberto IC, Teixeira JA.** 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank biorreactor. *Brazilian Jornal of Chemical Engineering.* **28**: 151-156.
- [23] **Baz A F El, Shetaia YM, Elkhoul RR.** 2011. Kinetic behavior of *Candida tropicalis* during xylitol production using semi-synthetic and hydrolysate based media. *African Journal of Biotechnology* **10**: 16617-16625. DOI: 10.5897/AJB11.1766.
- [24] **Faria LF, Gimenes MA, Nobrego R, Pereira N** (2002). Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **100**: 449-458.
- [25] **Martinez EA, Silva SS, Felipe MG** (2000). Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by continuous stirred- tank reactor fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* **86**: 633-641.
- [26] **Cheng, K.K.; Wu, J.; Lin, Z. N.; Zhang, J. A.** (2014). Aerobic and sequential anaerobic fermentation to produce xylitol and ethanol using non-detoxified acid pretreated corncob. *Biotechnology for Biofuels*, **7**: 166-175.
- [27] **Kalhorinia, S.; Goli, J. K.; Rao, L. V.** (2014). Screening and Parameters Optimization of Pentose Fermenting Yeasts for Ethanol Production using Simulated Media. *Biosciences Biotechnology Research Asia.* **11**: 641-648. doi.org/10.13005/bbra/1317.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, 02/06/2015

Rosimeire Oenning da Silva

Rosimeire Oenning da Silva