UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Natália Novais Ribeiro

Tecnóloga em Biocombustíveis

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

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

Natália Novais Ribeiro

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton

Coorientadora: Dra. Lidyane Aline de Freita

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

2019

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

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

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

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

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

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

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

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

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

Jaboticabal, 07 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

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

Epígrafe

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

- *Madame de Staël*

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

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

Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

Aos membros da banca examinadora pela participação e considerações;

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

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

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

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

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

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

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

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

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

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 8. Desdobramento de interações para concentração de etanol; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5. 29
Figura 9. A. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn.....33
Figura 10. A. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de xilose. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 35
Figura 11. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn.....36
Figura 12. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro concentração de ácido acético. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 37

Figura 13. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de etanol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn; N6- N+P+Mg+Mn+Zn; N7- N+K+Mg+Mn+Zn; N8- P+K+Mg+Mn+Zn; N9- N; N10- P; N11- K; N12- Mg; N13- Mn e N14- Zn. 38
Figura 14. A. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2–Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3-Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 41
Figura 15. A. Interação entre mosto e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre mosto e tempo para concentração de xilose. C. Interação entre mosto e tempo para concentração de arabinose. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 44
Figura 16. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 46
Figura 17. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de etanol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado. 47

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

LISTA DE TABELAS

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Etanol no Brasil e no mundo

O consumo de combustíveis fósseis é considerado um dos principais responsáveis pela grande emissão de dióxido de carbono (CO_2) na atmosfera (Carneiro, 2015). Nas últimas décadas, questões ambientais como redução de gases poluidores e causadores do efeito estufa tem sido abordados, provocando uma crescente procura por energia limpa e sustentável.

Visando diminuir o uso do petróleo e renovar a matriz energética mundial, a bioenergia proveniente da biomassa demonstra grande potencial de utilização a curto e médio prazo (Espíndola, 2009).

Observando a mudança no cenário mundial, a partir do ano de 2000 o Brasil estabeleceu e reativou políticas de produção e uso de biocombustíveis (Costa e Burnquist, 2016). O bioetanol atualmente produzido em larga escala pertence a "primeira geração" (Carneiro, 2015), sendo denominado etanol 1G e produzido principalmente a partir do processamento de matérias-primas sacaríneas (açucaradas) e amiláceas (De Castro, 2013).

O país possui uma agricultura privilegiada que apresenta características climáticas e geográficas favoráveis à produção de biomassa em larga escala com os menores custos de produção, principalmente em relação a cultura de cana-de-açúcar (Espíndola, 2009; Alvim e Hoppe, 2016; Dias e De Carvalho, 2017).

A produtividade da cana-de-açúcar em massa de biomassa por área ($ton.ha^{-1}$) e quantidade de biocombustível produzido por área ($L.ha^{-1}$), dentro dos limites da tecnologia atuais, é significativamente superior à de qualquer outra cultura (Leite e Cortez, 2008).

Em 2015 ocorreu em Paris a 21ª Conferência das Partes (COP21) da United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC) ou Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima na qual os governos dos 195 países participantes aprovaram e adotaram o Acordo de Paris (Paris Agreement) reconhecendo formalmente a necessidade urgente de ampliar a resposta global às mudanças climáticas. Os principais objetivos traçados foram a redução de emissões

de gases do efeito estufa e emprego de esforços para limitar o aumento da temperatura global em até 1,5°C até 2100 (United Nations Framework Convention on Climate Change, 2016).

A adoção deste acordo ocasionará o aumento substancial da demanda interna de biocombustíveis em diversas regiões do mundo na próxima década, entretanto não há previsões de que a oferta interna dos Estados Unidos e União Europeia consiga acompanhar este ritmo. Consequentemente, diversos países devem começar a aumentar a quantidade de biocombustíveis importados (Silva, 2017).

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

Neste contexto, a utilização de biomassas lignocelulósicas para produção do etanol de segunda geração é uma atividade promissora. A adoção da utilização do bagaço e palha de cana-de-açúcar para produção de etanol poderá suprir a demanda necessária para atender o mercado interno e externo (Silva, 2017).

2.2 Biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas são compostas de três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, possuindo também cinzas, pectina, extrativos e gorduras como parte de sua composição (Balat, 2011; Tomás-Pejó et al., 2014).

A celulose é um polímero linear composto por moléculas de D-glicose ligadas por ligações do tipo β-1,4. A hemicelulose é um polímero ramificado composto por diversos tipos de moléculas, entre elas pentoses como D-xilose e L-arabinose; e hexoses como D-glicose, D-manose e D-galactose. A lignina é um polímero mono cristalino com ρ-coumaryl, confenil e álcool sinapil como unidades de construção (Rudolf et al., 2008; Tomás-Pejó et al., 2014).

Devido à particularidade de sua estrutura as biomassas lignocelulósicas podem ser utilizadas para produzir um amplo espectro de produtos químicos, sendo o etanol de um dos compostos mais desenvolvidos (Tomás-Pejó et al., 2014). Entretanto, a

composição química é um fator chave que afeta a eficiência da produção de biocombustível durante os processos de conversão (Balat, 2011).

A cana-de-açúcar é uma excelente matéria-prima para a produção de álcool etílico, principalmente se as frações lignocelulósicas forem tratadas e utilizadas para produção de etanol de segunda geração (Macrelli et al., 2014; Alvim e Hoppe, 2016). Por se tratar de uma biomassa rica em xilana, produz grandes quantidades de xilose em pré-tratamentos, gerando a necessidade de uma levedura que seja eficiente em fermentação de pentoses (Rudolf et al., 2008).

2.3 Leveduras

Os fungos são micro-organismos unicelulares ou pluricelulares que vivem em diversos ambientes, podendo ser encontrados associados a outros organismos vivos, materiais em decomposição ou detritos (Takahashi et al*.,* 2017). No Brasil são atualmente reconhecidas 5.719 espécies de fungos que são distribuídas em 1.246 gêneros, 102 ordens e 13 divisões (Maia et al*.,* 2015).

Fungos são normalmente associados a degradações e contaminações, entretanto os benefícios atingidos pelo seu uso em processos industriais supera os danos que são por eles normalmente causados. O grande número de espécies de fungos com importância na área química, alimentícia, ambiental, agrícola, farmacológica e ecológica mostra o alto potencial biotecnológico destes micro-organismos (Takahashi et al*.,* 2017).

Leveduras são classificadas como fungos unicelulares pertencentes ao filo dos ascomicetos e basidiomicetos que possuem crescimento assexual resultante predominantemente de brotação ou fissão binária, e cujo estados sexuais não são formados dentro ou sobre um corpo de frutificação (Kurtzman et al., 2011).

As leveduras possuem uma história muito importante no desenvolvimento de biotecnologias, tendo grande importância em processos fermentativos da indústria alimentícia, farmacêutica e química (Johnson e Echavarri-Erasun, 2011; De Abreu et al. 2015). São os maiores produtores de produtos obtidos pelo uso de biotecnologia em comparação a qualquer outro grupo de micro-organismos industriais, excedendo

a produção, a capacidade e as receitas econômicas de outras espécies (Kurtzman et al., 2011).

2.4 Leveduras fermentadores de pentoses

Atualmente a importância das leveduras na geração de novas fontes de energia têm crescido expressivamente. Algumas espécies estão sendo atualmente estudadas e analisadas para a produção de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (Johnson e Echavarri-Erasun, 2011).

Presente nas biomassas em geral, a hemicelulose é constituída por diferentes substâncias, dentre elas açúcares de cinco carbonos como a D-xilose e L-arabinose (Tomás-Pejó et al., 2014). A D-xilose é o segundo açúcar mais abundante nos materiais lignocelulósicos e corresponde a cerca de 81% de todos os açúcares produzidos durante o pré-tratamento (Dussán et al., 2016).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente utilizada em processos de fermentação alcoólica, entretanto, apesar de poder utilizar todos os tipos de açúcares C6 presentes nas biomassas lignocelulósicas, não apresenta capacidade para fermentar açúcares C5 (Tomás-Pejó et al., 2014). Neste contexto, os fungos e bactérias que possuem metabolismo xilulolítico são excelentes opções para produção de bioetanol 2G.

A busca por melhores processos tecnológicos e maiores rendimentos industriais tem incentivado a busca por leveduras capazes de fermentar D-xilose, obtendo-se como consequência descrições cada vez maiores de novas espécies dotadas dessa habilidade (Varize et al., 2018). Embora existam registrados um grande número de leveduras que metabolizam xilose, somente cerca de 1% delas são capazes de fermentar xilose em etanol (Hahn-Hägerdal et al., 2007).

Um fator determinante para obtenção de uma produção de etanol eficiente é a escolha da linhagem de levedura que realizará o processo fermentativo (Moreira et al., 2015). Os gêneros de leveduras que fermentam xilose diretamente são*: Pichia, Candida, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces, Brettanomyces, Clavispora* e *Pachysolen* (McMillan, 1993).

2.5 Metabolismo de xilose em leveduras

Um excelente processo de metabolização de pentoses em álcool etílico é um dos principais pré-requisitos para a produção de etanol 2G de baixo custo (Macrelli et al. 2014). De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (2007) e Matsushika et al. (2009), a via metabólica de D-xilose em fungos pode ser resumida nos passos descritos abaixo (Figura 1).

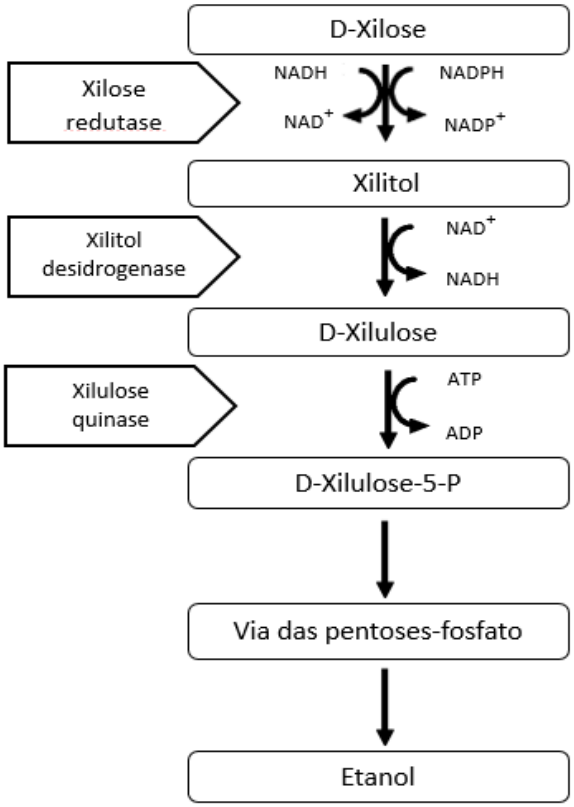


Figura 1. Esquema da via metabólica de D-xilose em fungos (Adaptado de Matsushika et al., 2009).

I. Redução de D-xilose em xilitol através da enzima xilose redutase;
II. Oxidação de xilitol em D-xilulose pela ação da enzima xilitol desidrogenase;
III. Fosforilação de D-xilulose pela ação da enzima xilulose quinase formando D-xilulose-5-P;
IV. Metabolização de D-xilulose-5-P na via das pentoses-fosfato obtendo-se ao final gliceraldeído-3P e frutose-6P (Fugita, 2010);

V. Metabolização de gliceraldeído-3P e frutose-6P na via da glicólise (via Embden Meyerhof Parnas) obtendo-se ao final moléculas de piruvato **(**Fugita, 2010);

VI. O piruvato pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxilicos ou sofrer ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase levando a produção de etanol (Fugita, 2010).

2.6 Gênero *Pichia*

Leveduras do gênero *Pichia* são normalmente encontradas em habitats naturais e como contaminantes em uma variedade de alimentos, bebidas e produtos contendo alto teor de açúcar. Algumas espécies podem utilizar os ácidos orgânicos presentes em conservas, ocasionando problemas de deterioração destes alimentos (Gava et al., 2008).

Desde que E. C. Hansen estabeleceu o gênero *Pichia* em 1904, a definição desse táxon sofreu alterações consideráveis para acomodar o crescente número de novas espécies que a ele foram sendo atribuídas. Antigamente era considerado um dos maiores gêneros de levedura, sendo a ele relacionados 91 tipos de espécies (Kurtzman, 1998).

P. membranifaciens é a espécime-tipo do gênero *Pichia* utilizada para definir o clado (Kurtzman, 2011). Características peculiares apresentadas por esta levedura, tais como: pequenas diferenças no fenótipo, formação de ascosporos que podem variar de forma e assimilação de poucas fontes de carbono utilizadas para identificação de leveduras, levaram a descrições equivocadas de novas espécies de micro-organismos (Kurtzman, 2011).

Kurtzman et al. (2008) realizaram uma análise multigênica para entender as relações entre as espécies de *Pichia* e seus anamorfos. A partir dos dados obtidos, o gênero foi reduzido a somente 20 espécies, não incluindo espécies relacionadas a *Candida* (Kurtzman, 2011).

As espécies aceitas são: *P. barkeri, P. cactophila, P. cecembensis, P. cephalocereana, P. deserticola, P. eremophila, P. exígua, P. fermentans, P. heedii, P. kluyveri, P. kudriavzevii, P. manshurica, P. membranifaciens, P. nakasei, P.*

norvegensis, P. occidentalis, P. pseudocactophila, P. scutulata, P. sporocuriosa e P. terrícola (Kurtzman, 2011).

2.7 Pichia membranifaciens

Pichia membranifaciens é uma levedura amplamente distribuída na natureza, considerada um microrganismo de degradação de alimentos e bebidas, sendo encontrada em materiais vegetais, frutas estragadas e bebidas fermentadas (Kurtzman, 2011).

P. membranifaciens já foi descrita como possível agente de controle biológico de doenças de pós-colheita de diversas frutas (Wang et al., 2013; Zhou et al., 2014; Niu et al., 2016; Gramiscia et al., 2018) e identificada como parte da microbiota de processos de fermentação espontânea para produção de licores destilados na China (Wu et al., 2013; You et al., 2016), produção de vinhos (Šuranská et al., 2012; Stefanini et al., 2016) e fermentação de azeitonas pretas (Pereira et al., 2015; Grounta et al., 2016) e verdes (Benítez-Cabello et al., 2015). Entretanto sua capacidade de fermentação alcoólica é pouco explorada e descrita na literatura.

2.8 Parâmetros da fermentação

A escolha de um micro-organismo que se adapte ao mosto é muito importante, mas deve ser complementado pelo estudo de parâmetros que podem prejudicar a fermentação se não forem ajustados corretamente. De Sousa e Monteiro (2011) e Steinle (2013) citam os principais fatores que afetam a produção de etanol, dentre eles pode-se destacar: pH, temperatura e nutrientes.

2.8.1 pH

Os processos fermentativos podem se desenvolver em uma ampla faixa de pH. Consequentemente a faixa de trabalho utilizada nas plantas produtivas podem influenciar a taxa de fermentação e os produtos finais obtidos (Lima et al., 2001).

O pH tem grande influência nas fermentações industriais, pois pode influenciar na velocidade da bioconversão dos açúcares em álcool etílico, auxiliar no controle da contaminação bacteriana e afetar o crescimento das leveduras (Du Preez et al., 1986).

Por serem microrganismos acidófilos, em geral as leveduras crescem melhor em meios na faixa de pH entre 4,5 e 5,0 (Chieppe Junior, 2012), sendo característica das leveduras industriais a tolerância aos meios ácidos (Lima et al., 2001). Entretanto, a faixa na qual o crescimento e a produção de etanol são igualmente favorecidos é estreita (Du Preez et al., 1986).

De acordo com Bonassa et al. (2014), o pH do mosto em que as células de leveduras se encontram também pode influenciar no desenvolvimento do fenômeno de floculação, onde as células se agrupam e sedimentam-se ao fundo.

2.8.2 Temperatura

A temperatura é um dos fatores mais importantes da fermentação. O estudo e conhecimento desta grandeza é de suma importância, pois exerce efeitos no crescimento, viabilidade, metabolismo e fermentação das leveduras. Na literatura, encontram-se divergências sobre a definição de seu valor ótimo na fermentação (Souza, 2009). Segundo De Sousa e Monteiro (2011) a temperatura deve ser controlada entre 25 à 30ºC; entretanto segundo De Mello (2012) a temperatura deve ser estar entre 28ºC e 32ºC.

O controle da temperatura durante os processos fermentativos possui grande importância, pois valores acima de 35°C podem enfraquecer as leveduras, causar a evaporação do etanol produzido e fornecer condições ótimas para a propagação de bactérias (Cardoso, 2006). Em contrapartida, valores abaixo de 26°C tendem a causar a diminuição das atividades dos microrganismos, podendo levar a estagnação do processo de desenvolvimento e produção de etanol ou ocasionar a morte celular (Bonassa et al., 2014).

2.8.3 Nutrientes

Para a realização de seus processos metabólicos as leveduras requerem que elementos químicos específicos estejam presentes no meio (Chieppe Junior, 2012). Por este motivo, para que possam crescer e se desenvolver dentro do processo fermentativo, é necessário que além de fontes de carbonos assimiláveis, estejam disponíveis algumas vitaminas e nutrientes no mosto, tais como: nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês, zinco, ferro, cobalto, enxofre, cálcio, cobre, iodo; entre outros elementos em pequenas quantidades (Pavani et al., 2013). A ausência de alguns destes nutrientes pode afetar diretamente a velocidade da fermentação (Silva, 2010).

Entretanto esta adição deve ser realizada em proporções específicas para cada processo, dependendo ainda da matéria-prima que produzirá o mosto a ser fermentado. Basicamente todos os nutrientes podem causar limitação na velocidade da fermentação. De modo geral, nota-se que sob baixas concentrações de nutrientes ocorrerá pequeno crescimento celular e sob altas concentrações pode ocorrer efeito inibitório sobre os micro-organismos. Deve-se ressaltar que a nutrição a ser realizada nos processos fermentativos industriais depende de vários fatores, dentre eles o tipo e linhagem do micro-organismo fermentador (Silva, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Açúcar e do Álcool e Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, campus de Jaboticabal – SP, em parceria com o Laboratório de Biotecnologia, na Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP, campus de Lorena - SP.

3.2 Microrganismo

A levedura utilizada foi *Pichia membranifaciens* LJ4, pertencente ao banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia das Fermentações, do Departamento de Tecnologia, localizado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, campus de Jaboticabal–SP.

3.3 Preparo do inóculo

Para crescimento de massa celular os microrganismos foram inoculados com uma alça de platina em erlenmeyers com 200 mL de meio YPXD (Yeast Extract-Peptone-Xylose-Dextrose) contendo 20 $g.L^{-1}$ de peptona, 10 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura, 10 $g.L^{-1}$ de glicose e 10 $g.L^{-1}$ de xilose (Govindaswamy e Vane, 2007).

Os frascos foram incubados por 72 horas à temperatura de 32ºC sob agitação orbital (125 RPM). Ao final deste período o meio de cultura foi centrifugado, descartando-se a fração líquida. A massa celular obtida foi suspendida em solução salina (NaCl 0,85%) e armazenada à 4°C. Todos os procedimentos foram repetidos até que se obtivesse quantidade suficiente para realizar os processos fermentativos com concentração celular de 10^8 células.mL^{-1}.

3.4 Preparo do mosto sintético

Para a realização dos ensaios foram diluídos 45 $g.L^{-1}$ de xilose e 25 $g.L^{-1}$ de glicose em água destilada, sendo posteriormente suplementados de acordo com seus tratamentos com sulfato de amônio, fosfato de sódio, sulfato de potássio, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e sulfato de zinco. Os reagentes foram adicionados proporcionalmente para obtenção de 0,3 $g.L^{-1}$ de Nitrogênio, 0,3 $g.L^{-1}$ de Fósforo, 0,3 $g.L^{-1}$ de Potássio, 0,05 $g.L^{-1}$ de Magnésio, 0,01 $g.L^{-1}$ de Manganês e 0,01 $g.L^{-1}$ de Zinco nos mostos, valores essenciais para realização de fermentação alcoólica pelas leveduras segundo Pavani et al. (2013).

3.5 Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico

O licor hemicelulósico rico em pentoses utilizado nesta etapa foi preparado por Roviero (2016) utilizando-se bagaço, palha e ponteiras de cana energia IACBIO 1249 submetidos à pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído.

De acordo com análise realizada em HPLC, calculou-se a concentração necessária para obtenção de açúcares (glicose+xilose+arabinose) próxima a 70 $g.L^{-1}$, e, em seguida, o licor foi colocado em um rotaevaporador de simples efeito a 60ºC com sistema de vácuo a 635 mmHg.

Para a remoção de compostos inibidores gerados no pré-tratamento o licor concentrado passou por um processo de destoxificação. Inicialmente, o pH do licor concentrado foi ajustado para 7,0 pela adição de óxido de cálcio (CaO), seguido de redução até pH 4,0 utilizando ácido fosfórico (H_3PO_4). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido ao processo de adsorção empregando-se 1% (m/v) de carvão ativo em incubadora a 50ºC durante 30 min. Ao final de cada etapa de alteração de pH o hidrolisado foi centrifugado, recebendo a adição de carvão, e posteriormente filtrado (Marton, 2002).

3.6 Determinação de nutrientes no licor

Amostras do licor hemicelulósico concentrado e destoxificado foram encaminhadas para análise de macro e micronutrientes no laboratório Ribersolo Laboratório de Análises Agrícolas.

Nitrogênio Total foi determinado pelo método de Kjeldahl (Morries, 1983; Jones Junior, 1987) e Fósforo, Potássio, Magnésio, Manganês e Zinco em espectrômetro de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), após decomposição ácida do licor.

3.7 Processo fermentativo

Para preparo dos inóculos foram pesados 3 g de massa úmida da levedura *Pichia membranifaciens,* visando a obtenção da concentração de 10^8 células.mL^{-1} após a adição do mosto.

Após o inóculo ser adicionado à erlenmeyers de 250 mL ocorreram duas alimentações de 50 mL de mosto a cada 40 minutos para aclimatação da levedura, obtendo-se um volume final de 100 mL. Alíquotas de 2 mL foram coletadas de cada repetição após 40 minutos da última alimentação para realização das análises microbiológicas e de cromatografia líquida de alta eficiência do período inicial da fermentação (0h).

Os frascos foram mantidos em mesa agitadora, com controle da temperatura e controle de rotação (125 RPM).

3.7.1 Ensaio 1 – Teste de pH e temperatura

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado num esquema de parcelas subdivididas, com 3 repetições. No primeiro ensaio, os tratamentos principais foram caracterizados pelas temperaturas 32°C, 37°C e 40°C nos pHs 3,5, 4,0 e 4,5 e os secundários aos tempos (0, 6, 12 e 24h).

Para a realização do processo fermentativo foi utilizado mosto sintético suplementado com nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco, sendo

as condições fermentativas controladas e adequadas de acordo com o esquema descrito a seguir:

1) pH 3,5 a 32ºC;
2) pH 3,5 a 37ºC;
3) pH 3,5 a 40ºC;
4) pH 4,0 a 32ºC;
5) pH 4,0 a 37ºC;
6) pH 4,0 a 40ºC;
7) pH 4,5 a 32°C;
8) pH 4,5 a 37°C;
9) pH 4,5 a 40°C.

3.7.2 Ensaio 2 – Teste de nutrientes

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado num esquema de parcelas subdivididas, com 3 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pela suplementação de nutrientes isolados e associados (N, P, K, Mg, Mn e Zn) e os secundários aos tempos (0, 6, 12 e 24 h).

Para a realização do processo fermentativo foi utilizado mosto sintético com suplementação controlada e adequada de acordo com o esquema descrito a seguir:

1) Sem suplementação;
2) N+P+K+Mg+Mn+Zn;
3) N+P+K+Mg+Mn;
4) N+P+K+Mg+Zn;
5) N+P+K+Mn+Zn;
6) N+P+Mg+Mn+Zn;
7) N+K+Mg+Mn+Zn;
8) P+K+Mg+Mn+Zn;
9) N;
10) P;
11) K;
12) Mg;
13) Mn;
14) Zn.

Foram utilizados pH e temperatura ideais para produção de etanol, encontrados no ensaio realizado anteriormente.

3.7.3 Ensaio 3 - Fermentação de licor hemicelulósico

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado num esquema de parcelas subdivididas, com 4 repetições. Os tratamentos principais foram caracterizados pelos mostos e os secundários aos tempos (0, 6, 12, 24, 48 e 72 h).

Para a realização do processo fermentativo foram utilizados os seguintes mostos:

1) Mosto sintético sem suplementação (M1);
2) Mosto sintético com suplementação por Pavani et al. (2013) (M2);
3) Mosto sintético com N, P, K, Mg, Mn e Zn idêntico ao licor (M3);
4) Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado (M4).

Foram utilizados os parâmetros ideais para produção de etanol, encontrados nos ensaios realizados anteriormente.

3.8 Análises microbiológicas

Foram determinadas a viabilidade celular, a viabilidade dos brotos e o índice de brotamentos em câmara de Neubauer, segundo Lee et al. (1981), do inóculo e períodos de fermentação dos ensaios. Os cálculos foram realizados através das seguintes fórmulas:

$$\text{Viabilidade celular } (\%) = \frac{\text{Células vivas x } 100}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}}$$

$$\text{Índice de brotamento } (\%) = \frac{\text{Brotos vivos x } 100}{\text{Células vivas} + \text{Células mortas}}$$

$$\text{Viabilidade dos brotos } (\%) = \frac{\text{Brotos vivos x } 100}{\text{Brotos vivos} + \text{Células mortas}}$$

3.9 Cromatografia líquida de alta eficiência

Amostras retiradas durante o processo fermentativo foram analisadas em Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE ou HPLC) para determinação das concentrações de glicose, xilose, glicerol, ácido acético, etanol e arabinose, segundo metodologia proposta por Hernández-Pérez et al. (2016).

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e de comparação de médias pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando-se o Software AgroEstat (Barbosa e Maldonado Junior, 2015).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Viabilidade dos inóculos

Para a realização de todo e qualquer processo fermentativo é de extrema importância que as células dos microrganismos contidas no inóculo se encontrem viáveis para produção do produto de interesse. Por este motivo, é essencial que o fermento a ser utilizado seja analisado para quantificação do número de células e brotos vivos.

Todos os inóculos utilizados durante os ensaios possuíam valores superiores à 85% de viabilidade e 5% de índice de brotamento, valores mínimos recomendados por Amorim (2005) para a realização de processos fermentativos (Tabela 1). Desta forma a levedura encontrava-se apta a ser utilizada.

Tabela 1. Resultados das análises de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos dos inóculos utilizados nos ensaios de fermentação.

	Viabilidade celular (%)	**Índice de brotamento (%)**	**Viabilidade dos brotos (%)**
Ensaio 1	89,51	29,91	88,19
Ensaio 2	91,77	38,86	90,67
Ensaio 3	99,21	13,09	100,00

4.2 Ensaio 1 – Teste de pH e temperatura

As análises dos resultados observados para os parâmetros de viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade dos brotos, encontram-se nas Tabelas 2 à 4. Os desdobramentos para as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados nas Figuras 2 e 3.

Os resultados demonstram que os parâmetros índice de brotamento e viabilidade dos brotos não apresentaram diferenças significativas entre as temperaturas testadas no pH 3,5 (Tabela 2).

O número de brotamentos de *Pichia membranifaciens* não foi afetado durante o período deste ensaio, entretanto nota-se que a viabilidade dos brotos sofreu quedas constantes ao longo do processo.

Tabela 2. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 3,5.

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de brotos (%)
Temperatura (TP)			
32°C	75,03ab	27,66a	69,56a
37°C	79,20a	27,99a	69,67a
40°C	67,78b	35,51a	63,96a
Teste F	6,24*	5,45*	$1,46^{ns}$
DMS	10,04	8,26	11,73
C.V	10,84	21,69	13,82
Tempo (TS)			
0h	82,45a	32,91a	83,41a
6h	72,56ab	33,86a	68,32b
12h	76,01a	30,36a	68,55b
24h	64,99b	24,41a	50,65c
Teste F	7,74**	$1,07^{ns}$	19,87**
DMS	10,45	16,39	12,01
C.V	10,60	40,48	13,31
Interação			
Inter. TP x TS	4,93**	$1,73^{ns}$	$1,38^{ns}$

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p<0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01=<p<0,05$); ns não significativo ($p>=0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos.

A viabilidade celular de *P. membranifaciens* é altamente estável em fermentações à pH 4,0, permanecendo estatisticamente constante independentemente da temperatura ou tempo analisados durante o estudo (Tabela 3).

A viabilidade dos brotamentos inicialmente superior à 90%, sofreu uma queda acentuada após às primeiras 6h de fermentação, sem haver uma recuperação significativa neste parâmetro ao longo do ensaio.

Na fermentação estabelecida à pH 4,5 verificou-se que a viabilidade dos brotos sofreu queda após o período de 6h, sem que houvesse mudanças significativas induzidas pelas temperaturas analisadas (Tabela 4).

Os resultados encontrados (Tabela 2, 3 e 4), demonstram que, para a viabilidade dos brotamentos, o tempo é um fator importante nos processos fermentativos à pH 3,5, 4,0 e 4,5.

Tabela 3. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 4,0.

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de brotos (%)
Temperatura (TP)			
32°C	74,25a	30,23a	71,93a
37°C	73,37a	19,69a	70,13a
40°C	75,57a	26,80a	75,40a
Teste F	1,06^{ns}	4,18^{ns}	0,93^{ns}
DMS	4,65	11,42	12,02
C.V	4,99	35,65	13,24
Tempo (TS)			
0h	81,31a	22,13a	91,60a
6h	68,41a	30,60a	64,39b
12h	72,37a	26,35a	63, 60b
24h	75,49a	23,19a	70,36b
Teste F	2,77^{ns}	3,13^{ns}	11,72**
DMS	13,09	8,59	15,29
C.V	13,20	25,23	15,83
Interação			
Inter. TP x TS	1,24^{ns}	3,79*	0,70^{ns}

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos.

Tabela 4. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, brotamentos e viabilidade de brotos para pH 4,5.

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de brotos (%)
Temperatura (TP)			
32°C	75,78a	27,25ab	70,57a
37°C	74,94a	19,17b	62,48a
40°C	73,72a	38,59a	72,39a
Teste F	0,24^{ns}	10,44*	1,82^{ns}
DMS	9,38	13,10	16,98
C.V	10,01	36,91	19,79
Tempo (TS)			
0h	83,19a	25,58a	83,14a
6h	73,30b	27,77a	66,11b
12h	72,44b	32,58a	66,12b
24h	70,29b	27,42a	58,55b
Teste F	10,55**	1,66^{ns}	12,95**
DMS	7,05	9,26	11,56
C.V	7,08	24,53	12,67
Interação			
Inter. TP x TS	3,17*	2,75*	2,58^{ns}

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos.

A temperatura é um fator importante que interfere diretamente sobre a atividade dos microrganismos. Torija et al. (2003) relataram que valores superiores às temperaturas de trabalho das leveduras podem levar as células ao colapso, havendo diminuição na viabilidade celular para valores acima de 35°C).

A viabilidade celular apresentou estabilidade estatística durante às 24h analisadas para os tratamentos à 32 e 37°C condicionados à mostos com pH 3,5 (Figura 2.A) e à 32°C à mosto com pH 4,5 (Figura 2.B).

Todos os tratamentos obtiveram decréscimo ao longo do ensaio na viabilidade celular independentemente da temperatura testada, havendo queda média de 11,85% nas primeiras 6h, que pode ter ocorrido em virtude do processo de adaptação do microrganismo ao mosto. Entretanto, nota-se o tratamento com 40°C à pH 3,5 continuou sofrendo quedas constantes, obtendo-se ao final uma perda total de 49,09%.

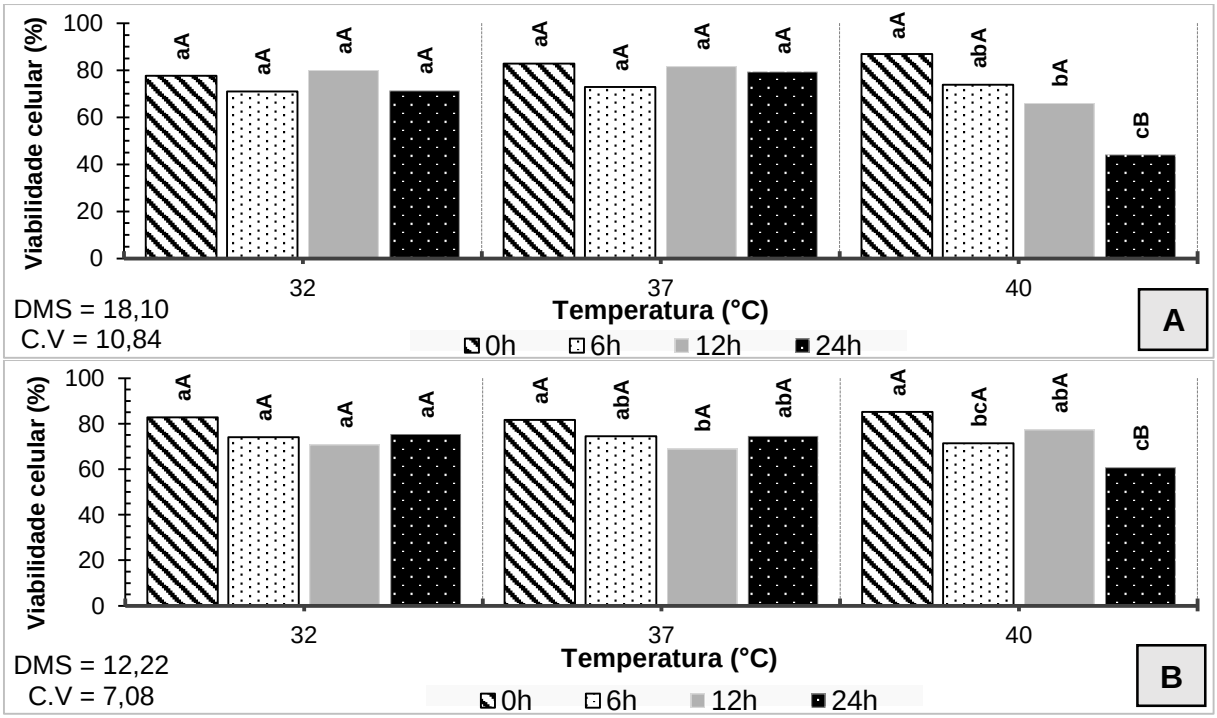


Figura 2. Desdobramento de interações para o parâmetro viabilidade celular; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5

Verifica-se que dentre os tratamentos testados, 40°C foi a única temperatura que apresentou resultados que indicam o aumento no índice de morte celular da

células da levedura. Em contrapartida, a temperatura de 32°C, não apresentou diferença estatística na viabilidade celular durante às 24h deste ensaio, demonstrando que *P. membranifaciens* possui maior estabilidade nesta temperatura.

O decréscimo deste parâmetro sob temperaturas elevadas observado no presente trabalho corroboram com os relatos de Torija et al. (2003) e Bonassa et al. (2013), que verificaram que a viabilidade celular da levedura *S. cerevisiae* diminui à medida que a temperatura do processo fermentativo aumenta.

Observa-se que no tratamento a pH 4,0, a levedura possui maior estabilidade em seus índices de brotamento na temperatura de 32°C, não obtendo diferenças significativas durante os tempos analisados (Figura 3.A).

Por outro lado, dentre os mostos condicionados à pH 4,5, os maiores índices de brotamentos foram observados na temperatura de 40°C até as 12h, havendo uma diminuição brusca de 40,42% após este período (Figura 3.B). Segundo Mutton (1998), a elevação da temperatura na fermentação acarreta em um aumento na atividade metabólica das leveduras e consequentemente ocorre o aumento do índice de brotamento.

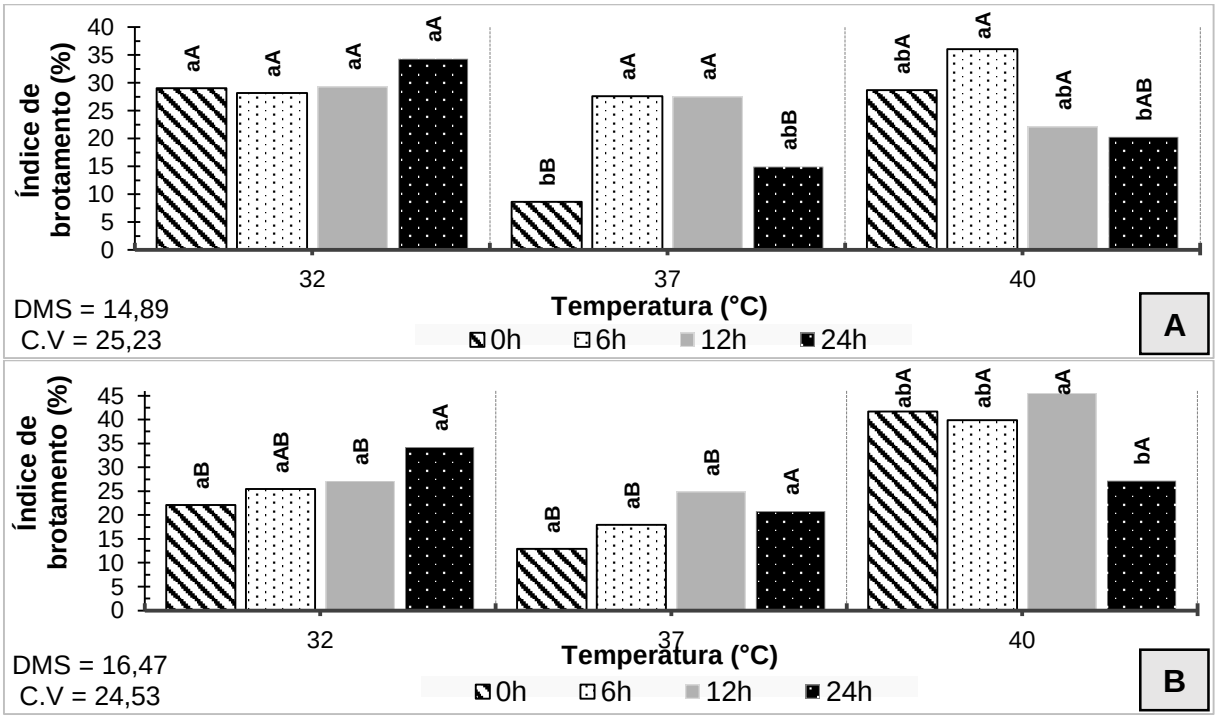


Figura 3. Desdobramento de interações para o parâmetro índice de brotamentos; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5

Observa-se que o tratamento com pH 3,5 foi o que mais afetou a viabilidade dos brotos, dado que, embora sejam acidófilas (ácido-tolerantes), algumas espécies de levedura podem apresentar sensibilidade quanto a concentração e ao período de exposição (Bregagnoli, 2006).

Deve se ressaltar que quando há a presença de outros agentes de estresse na fermentação alcoólica, tais como como alto teor de etanol, alta temperatura e presença de ácidos orgânicos, o baixo pH afeta ainda mais as leveduras (Narendranath et al., 2001).

Durante a fermentação é natural que ocorra a redução do pH do mosto através de produtos ácidos excretados pelos microrganismos (BASSO et al., 2011) desta forma a utilização do pH 3,5 no início do processo fermentativo aumentou a exposição das células a um meio com elevados teores de ácido, tendo como consequência a redução do número de brotos vivos de *P. membranifaciens*.

As análises dos resultados observados para concentração de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol, encontram-se na Tabela 5 à 7.

Tabela 5. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 3,5.

Causas de variação	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido Acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Temperatura (TP)					
32°C	6,79a	36,98c	1,37a	1,69b	4,60b
37°C	6,23b	39,00b	1,29b	1,75a	5,18a
40°C	6,47ab	39,09a	1,28b	1,61c	4,26c
Teste F	10,04*	35399,57**	38,48**	461,29**	108,21**
DMS	0,53	0,04	0,05	0,02	0,27
C.V	3,87	0,05	1,68	0,56	2,72
Tempo (TS)					
0h	24,47a	42,08a	0,00c	0,00d	0,00d
6h	0,68b	39,87b	1,70b	1,31c	8,41a
12h	0,44b	36,80c	1,70b	2,09b	5,54b
24h	0,41b	34,68d	1,83a	3,35a	4,78c
Teste F	12220,40**	79120,76**	10478,28**	30447,58**	7033,71**
DMS	0,48	0,05	0,04	0,04	0,18
C.V	4,08	0,07	1,60	1,17	2,18
Interação					
Inter. TP x TS	8,35**	1845,22**	18,00**	460,98**	77,71**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos.

Tabela 6. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 4,0.

Causas de variação	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido Acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Temperatura (TP)					
32°C	6,76a	39,48b	1,28c	1,68 c	5,57a
37°C	6,51b	38,76c	1,42a	1,91a	4,82b
40°C	6,78a	39,66a	1,25b	1,73b	3,83c
Teste F	391,03**	5432,55**	666,38**	707,71**	262,75**
DMS	0,05	0,04	0,02	0,03	0,32
C.V	0,33	0,05	0,89	0,71	3,20
Tempo (TS)					
0h	25,14a	43,30a	0,00d	0,00d	0,00d
6h	0,74b	40,77b	1,67 c	1,35c	7,27a
12h	0,46c	38,26c	1,77b	2,07b	6,52b
24h	0,40d	34,86d	1,81a	3,68a	5,17c
Teste F	6884753,13**	55321,06**	11915,12**	50078,46**	2901,02**
DMS	0,02	0,07	0,04	0,03	0,27
C.V	0,17	0,10	1,50	0,94	3,14
Interação					
Inter. TP x TS	1868,22**	1017,96**	55,37**	111,84**	160,70**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos

Tabela 7. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para pH 4,5.

Causas de variação	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido Acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Temperatura (TP)					
32°C	6,72a	39,45a	1,25b	1,59c	4,63ab
37°C	6,32a	38,41b	1,21c	1,73b	5,13a
40°C	6,44a	38,40b	1,30a	1,87a	4,48b
Teste F	$1,60^{ns}$	10167,14**	153,48**	1761,86**	10,89*
DMS	0,97	0,04	0,02	0,02	0,61
C.V	7,14	0,04	0,81	0,54	6,14
Tempo (TS)					
0h	24,51a	42,46a	0,00c	0,00d	0,00c
6h	0,62b	39,37b	1,69a	1,37c	7,14a
12h	0,46b	37,66c	1,65b	2,12b	6,63a
24h	0,39b	35,52 d	1,68a	3,42a	5,20b
Teste F	4126,37**	41148,27**	26255,61**	32656,57**	730,08**
DMS	0,83	0,06	0,02	0,04	0,53
C.V	7,05	0,09	1,01	1,12	6,24
Interação					
Inter. TP x TS	$1,19^{ns}$	666,28**	198,91**	97,05**	29,16**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. Inter. TPxTS – Interação entre temperaturas e tempos.

Os desdobramentos para as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados nas Figuras 4 a 8.

Em relação ao consumo de glicose (Figura 4), nota-se que para todas temperaturas testadas nos pHs 3,5 e 4,0 houve o consumo médio de cerca de 98,33% nas primeiras 6h de fermentação. Este resultado demonstra a facilidade com que a levedura estudada possuí para assimilar este açúcar num intervalo de tempo pequeno independentemente da temperatura do processo.

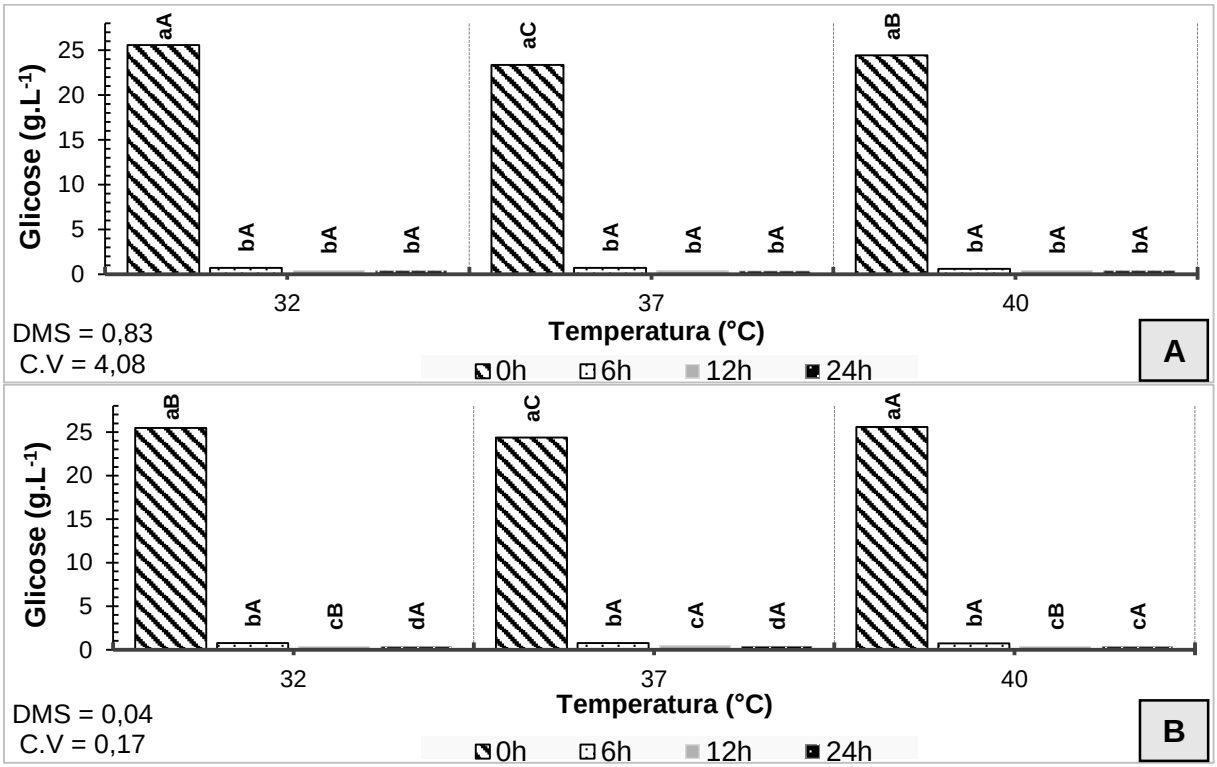


Figura 4. Desdobramento de interações para concentração de glicose; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0.

O consumo de xilose realizado por *P. membranifaciens* mostra-se mais lento em comparação ao apresentado na glicose, havendo grandes quantidades residuais desta pentose ao término do período de 24h. Verifica-se que houve o maior consumo de xilose na temperatura de 40°C no tratamento adequado com pH 4,0, havendo um decréscimo total de 22,62% (Figura 5.B).

A temperatura ideal para assimilação de pentoses para as leveduras do gênero *Pichia spp* podem variar de acordo com a cepa utilizada, entretanto geralmente são verificadas temperaturas ótimas na faixa de 30 à 32°C (Du Preez et al., 1986). Durante este ensaio notou-se que as temperaturas de 32°C à pH 3,5 e 40°C à pH 4,0 e 4,5 contribuíram para um maior consumo de xilose (Figura 5.A, 5.B e 5.C).

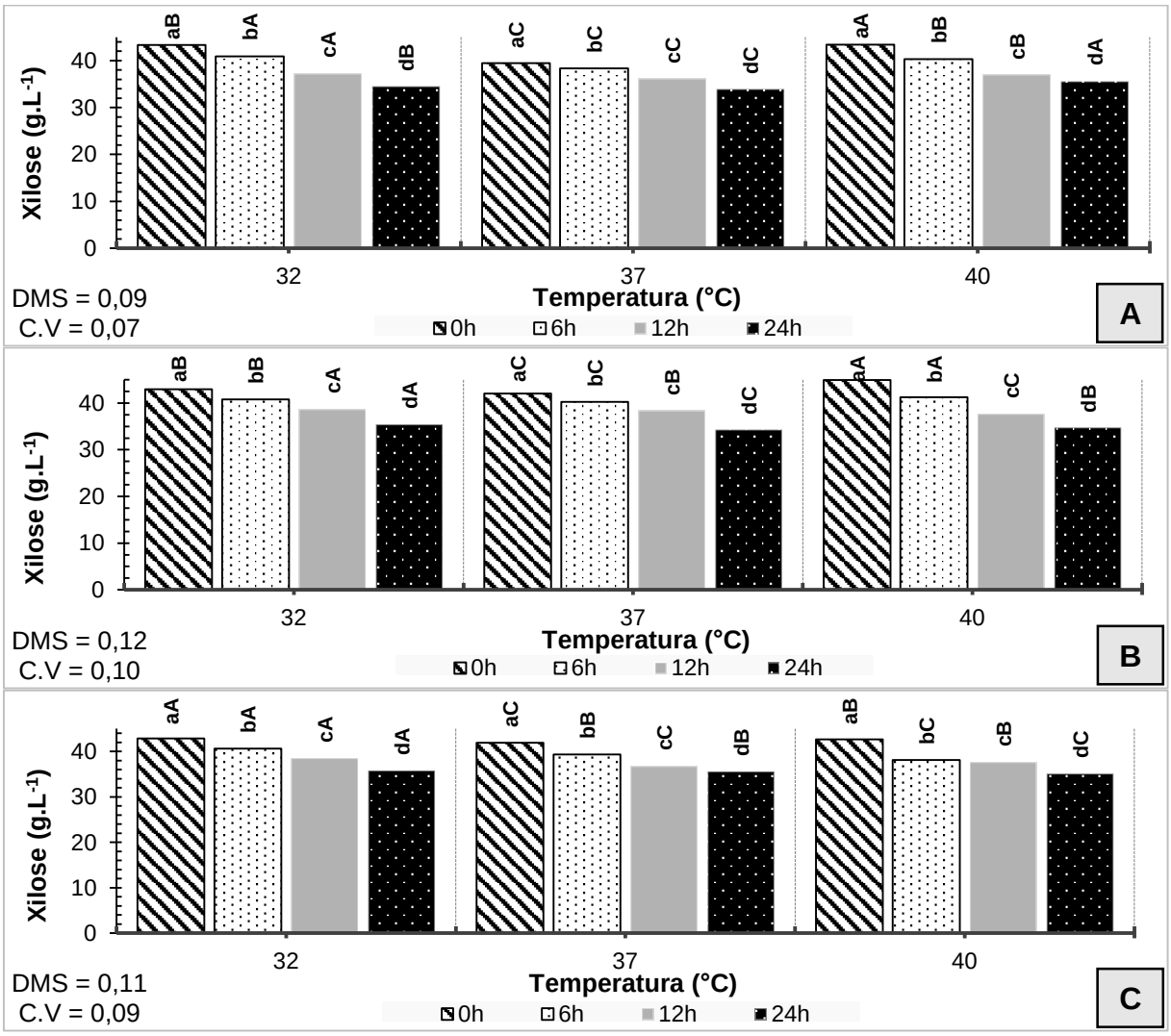


Figura 5. Desdobramento de interações para concentração de xilose; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C.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

O glicerol é um osmoregulador metabolizado por leveduras em situações de estresse osmótico. Sua produção está relacionada a espécie do microrganismo, pH,

temperatura, fonte de nitrogênio e concentração de oxigênio disponível (Remize et al., 2000). Apesar de indesejável, a produção de etanol por fermentação alcoólica não ocorre sem que haja a formação de glicerol (Ferrari, 2013), desta forma deve-se avaliar os parâmetros diretamente relacionados a sua produção para que baixos teores sejam produzidos.

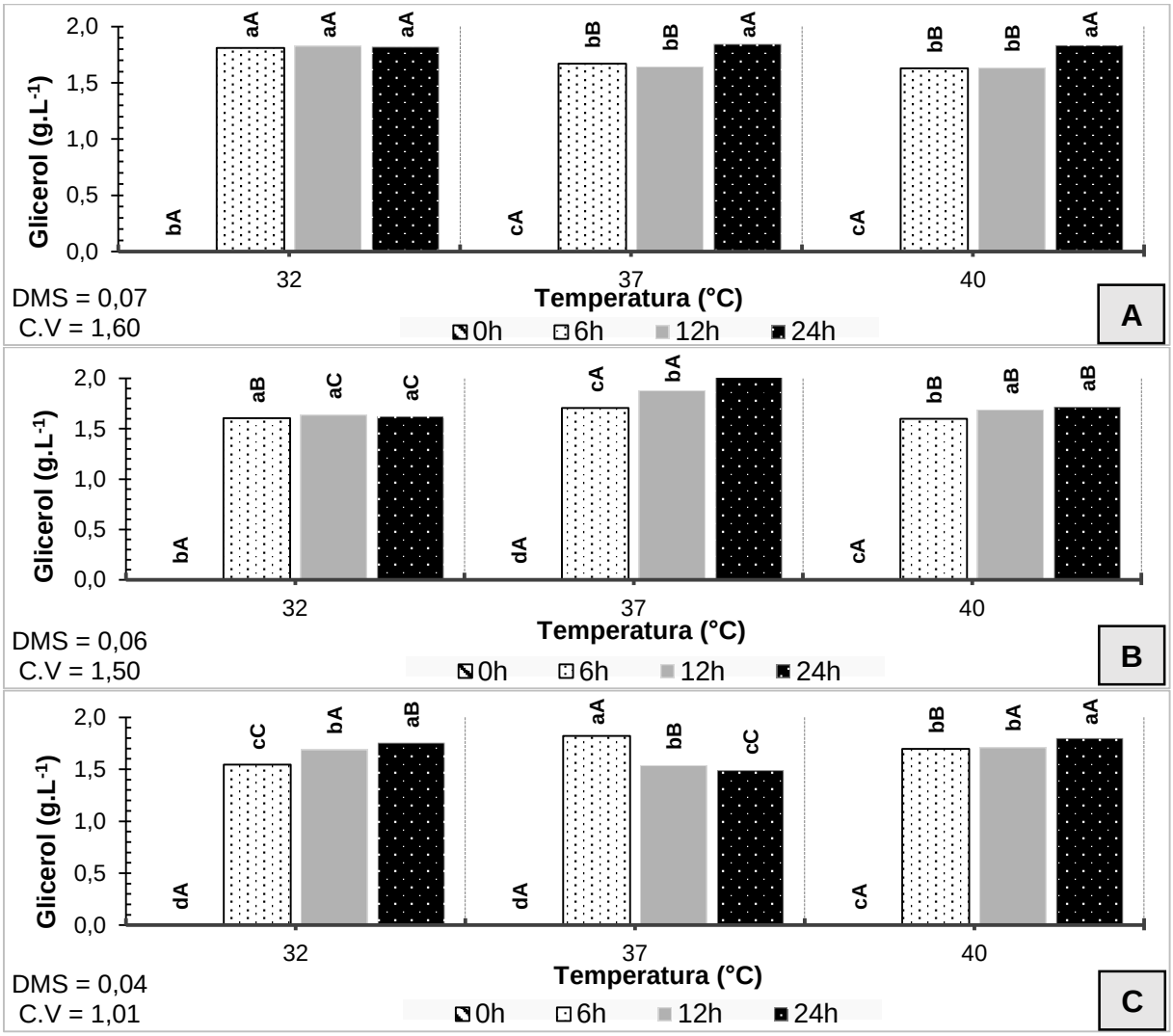


Figura 6. Desdobramento de interações para concentração de glicerol; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5.

Após às 24h de fermentação, as maiores concentração de glicerol são encontradas nos tratamentos com 32°C em pH 3,5, 37°C em pH 4,0 e 40°C em pH

4,5 (Figura 6.A, 6.B e 6.C). Os resultados demonstram que a levedura possui maior estabilidade osmótica quando exposta à 32°C em pH 4,0, não havendo a produção de glicerol significativa após o período de 6h.

A maior concentração de ácido acético foi gerada no período de 24h pelo tratamento com pH 4,0 e 37°C e a menor no pH 3,5 à 40°C (Figura 7.A e 7.B).

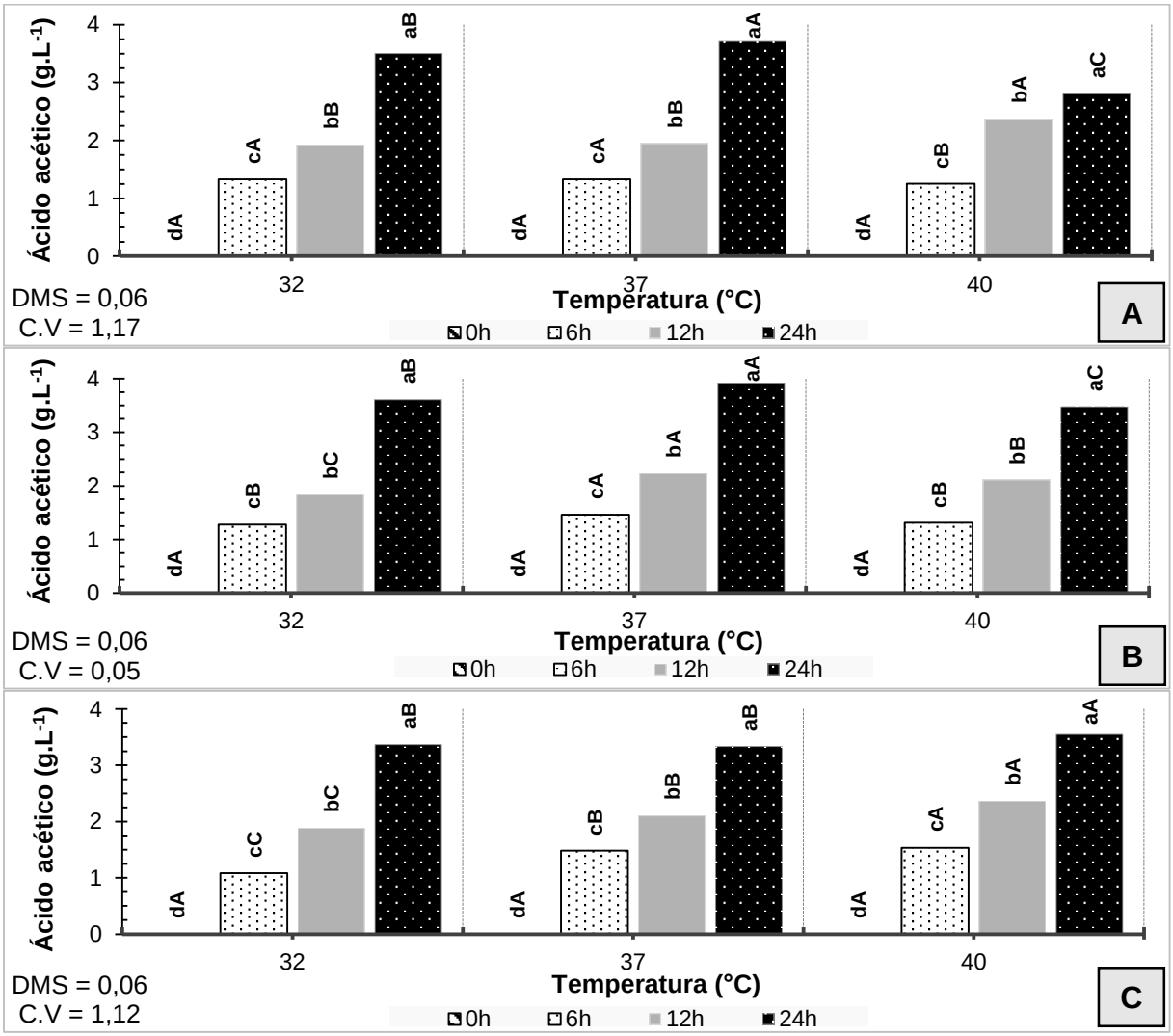


Figura 7. Desdobramento de interações para concentração de ácido acético; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,5.

A presença de ácido acético é extremamente indesejável em processos de fermentação alcoólica, uma vez que para sua produção parte do etanol metabolizado

pelas leveduras é oxidado (Aquarone et al., 2001). Desta forma quanto maior a quantidade de ácido acético produzido menor será o rendimento fermentativo do processo.

Nota-se que quanto maior a temperatura utilizada no processo fermentativo, menor é a concentração de etanol após o término da fermentação. Segundo Lima et al. (2001), o aumento da temperatura dos processos pode levar a perdas de etanol por volatização.

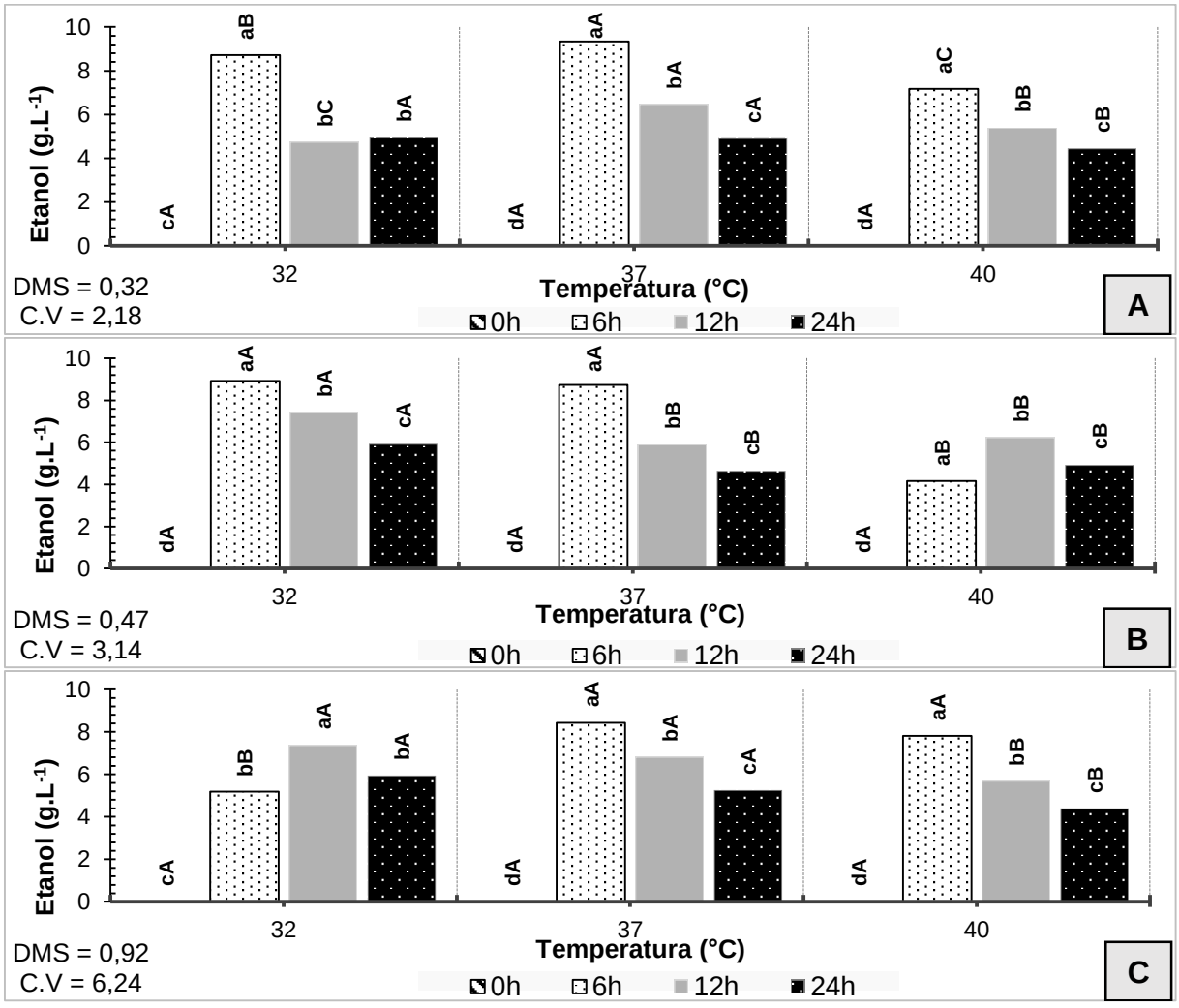


Figura 8. Desdobramento de interações para concentração de etanol; letras minúsculas comparam tempos dentro de cada temperatura e letras maiúsculas comparam temperaturas dentro de cada tempo. A. Interação entre temperatura e tempo para o pH 3,5. B. Interação entre temperatura e tempo para o pH 4,0. C.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

Os maiores teores de etanol foram obtidos no intervalo de 6h de fermentação, sendo observado que após este período sua concentração sofreu decréscimos constantes até o final do ensaio (figura 8.A, 8.B e 8.C). Por este motivo, a maior concentração de etanol ao final do ensaio foi encontrada no tratamento com pH 4,5 à temperatura de 32°C (Figura 8.C).

Dentre os fatores químicos, o pH apresenta-se como um dos parâmetros mais relevantes a ser considerado, pois pode influenciar a velocidade da bioconversão dos açúcares em álcool etílico e afetar o crescimento das células. A faixa de pH na qual o crescimento e a produção de etanol ocorre com grande velocidade é estreita (Du Preez et al., 1986). Desta forma, para que a utilização desta levedura seja viabilizada, faz-se necessário o estudo deste parâmetro.

Em seus estudos Du Preez et al. (1986) relataram que a faixa de pH ótimo para a levedura *Pichia stipitis* foi de 4,0 à 5,5, apresentando um pico máximo de produtividade de etanol sob pH 4,0.

Deve-se ressaltar que o presente estudo priorizou o tratamento que ofereceu maior estabilidade à levedura e obteve as menores perdas de etanol ao longo da fermentação. À vista disso, definiu-se que a melhor faixa de trabalho para *Pichia membranifaciens* foi temperatura de 32°C e pH 4,5, pois nestas condições houve altas taxas de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos e a maior concentração de etanol após o período de 24h do processo fermentativo.

4.3 Ensaio 2 – Teste de nutrientes

As análises dos resultados observados para os parâmetros de viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade dos brotos, encontram-se na Tabela 8. Os desdobramentos para as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados na Figura 9.

Para que as leveduras possam crescer, se desenvolver e realizar o processo fermentativo é de extrema importância que haja a disponibilidade de nutrientes no meio em que estão presentes (Pavani et al., 2013). Entretanto, antes da suplementação é necessário que primeiro haja uma compreensão da nutrição para que as informações coletadas sejam utilizadas para otimização do desenvolvimento

das atividades metabólicas dos microrganismos sem que as células sejam afetadas (Jones e Gadd,1990).

Para um bom rendimento fermentativo é necessário que a levedura se mantenha em condições ideais que proporcionem taxas de crescimento satisfatórias caso estas não sejam observadas, ocorrerá o aumento substancial do número de morte celular e consequentemente perda do fermento (Walker, 2004).

Tabela 8. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos para o ensaio de nutrientes

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade dos brotos (%)
Nutriente (TP)			
Sem suplementação	70,56cde	14,31e	43,80ef
N+P+K+Mg+Mn+Zn	74,26cd	20,62cde	60,912cd
N+P+K+Mg+Mn	71,34cde	21,06cde	58,00de
N+P+K+Mg+Zn	60,97fg	13,82e	41,47f
N+P+K+Mn+Zn	52,33g	17,81de	41,76f
N+P+Mg+Mn+Zn	73,48cd	19,41cde	62,54cd
N+K+Mg+Mn+Zn	72,69cd	23,262bcd	65,17cd
P+K+Mg+Mn+Zn	91,16a	19,89cde	92,44a
N	52,49g	19,83cde	58,30de
P	69,47def	26,76abc	71,43bcd
K	78,75bc	29,26ab	75,10bc
Mg	84,16ab	32,50a	82,09ab
Mn	73,83cd	33,23a	67,31cd
Zn	63,54ef	33,10a	70,48bcd
Teste F	47,83**	24,95**	33,07**
DMS	8,80	7,95	14,53
C.V	6,25	16,55	11,46
Tempo (TS)			
0h	85,57a	31,28a	82,00a
6h	75,57b	20,56c	68,74b
12h	67,44c	23,59b	56,99c
24h	53,99d	21,04bc	46,78d
Teste F	395,46**	43,86**	241,97**
DMS	2,54	2,83	3,69
C.V	5,03	16,42	8,11
Interação			
Inter. TP x TS	14,71**	6,20**	8,86**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre nutrientes e tempos.

Na ausência de nutrientes a fisiologia das leveduras pode ser gravemente afetada, em razão da necessidade de determinados elementos químicos essenciais para a regulação de seu metabolismo (Pavani et al., 2013). Conforme apresentado

pela Tabela 8, o mosto sem suplementação possui viabilidade dos brotos baixa em relação aos demais tratamentos deste ensaio, entretanto os resultados demonstram que a ausência de nutrientes afeta principalmente o brotamento das leveduras, havendo uma grande diminuição em seus índices.

De acordo com a Figura 9, a associação de P+K+Mg+Mn+Zn (N8) foi a única suplementação que manteve a viabilidade celular e viabilidade dos brotos acima de 90% ao longo período de fermentação. Nota-se que este tratamento apresenta alguns dos melhores valores de índice de brotamento, mesmo havendo uma diminuição significativa no intervalo de 6h no número de brotos. Estes resultados demonstram que, mesmo com a ausência de nitrogênio, os nutrientes presentes no mosto foram capazes de manter as principais funções necessárias as células, garantindo sua manutenção e suas principais funções durante as 24h deste ensaio.

Os mostos tratados com N+P+K+Mg+Zn (N4) e N+P+K+Mn+Zn (N5) mostram que a ausência de manganês e magnésio provocaram a diminuição da viabilidade celular de *P. membranifaciens*, entretanto seu principal efeito é visualizado nos baixos valores do índice de brotamento e viabilidade dos brotos (Figura 9).

A importância do magnésio fica evidenciada quando se observa que o tratamento onde foi suplementado isoladamente apresenta valores de viabilidade dos brotos acima de 80% ao longo do período de fermentação e alto índice de brotamento ao final do ensaio.

Cátions bivalentes como Mn^{2+} e Mg^{2+} são essenciais para crescimento e regulação do metabolismo e, portanto, precisam ser acumulados a partir do meio em que se encontram (Jones e Gadd, 1990). O manganês é um importante cofator de enzimas, já o magnésio possui importância na atividade enzimática e na divisão celular, pois é utilizado para completar a mitose, não sendo encontrado qualquer outro íon metálico na tabela periódica que possa substitui-lo (Walker, 2004). Desta forma, a ausência destes nutrientes comprometem a atividade metabólica e reprodução das células, o que explica a baixa na taxa de crescimento e aumento no índice de mortes.

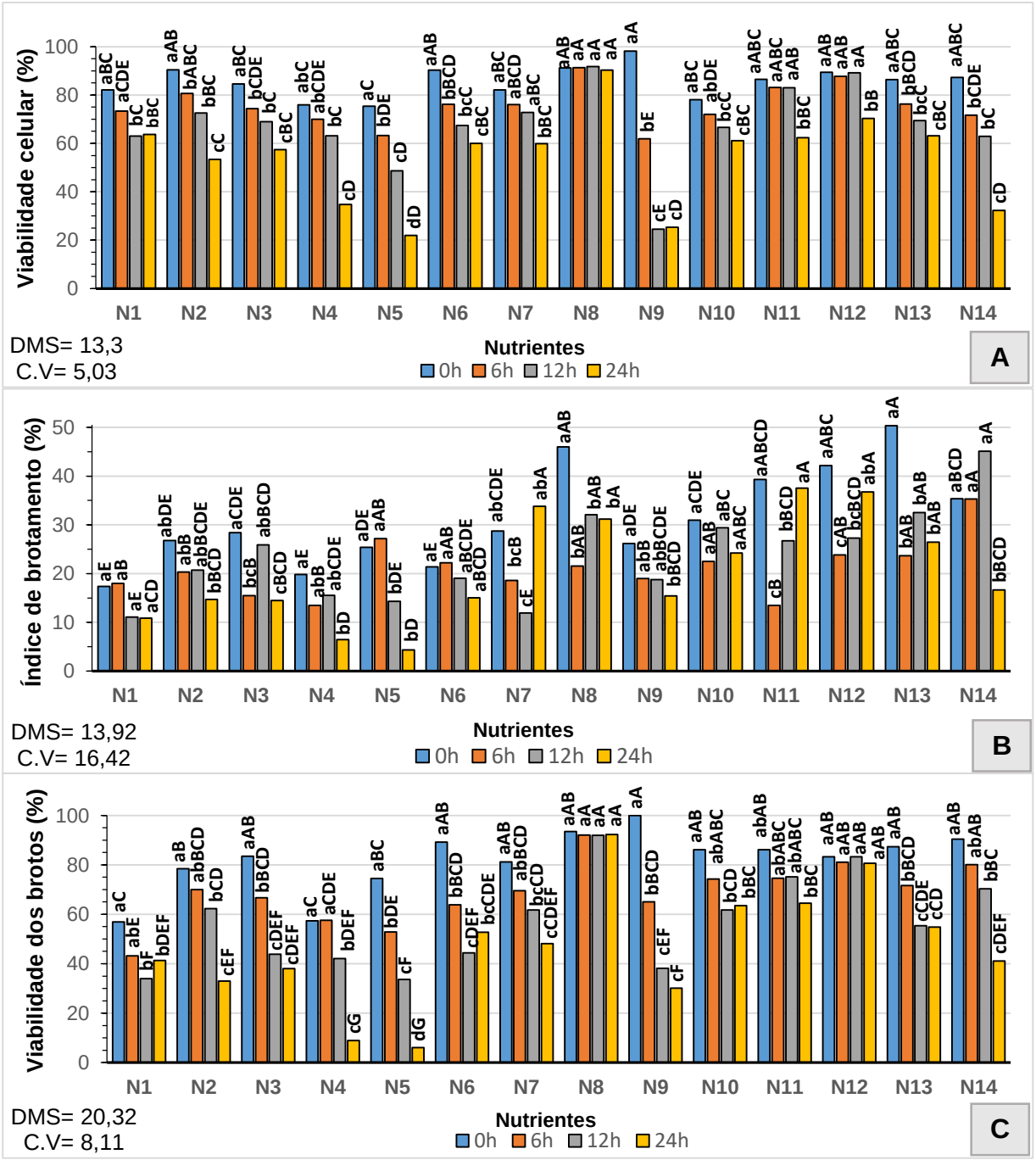


Figura 9. A. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo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

As análises dos resultados observados para concentração de glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol, encontram-se na Tabela 9. Os desdobramentos para

as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados nas Figuras 10 a 13.

Tabela 9. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para glicose, xilose, glicerol, ácido acético e etanol para o ensaio de nutrientes

Causas de variação	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Nutrientes (TP)					
Sem suplementação	6,11g	38,30b	1,17bcd	1,69cde	5,63a
N+P+K+Mg+Mn+Zn	7,25abc	38,25b	1,33ab	1,71cd	4,10bc
N+P+K+Mg+Mn	6,79de	38,12b	1,32ab	1,78bcd	4,59abc
N+P+K+Mg+Zn	6,66ef	36,80d	1,28abc	1,47de	5,23ab
N+P+K+Mn+Zn	7,58a	37,17c	1,43a	1,91bc	5,06abc
N+P+Mg+Mn+Zn	7,18bc	38,11b	1,31ab	1,33e	5,51a
N+K+Mg+Mn+Zn	6,21g	38,31b	1,04de	0,88f	3,86c
P+K+Mg+Mn+Zn	7,50ab	35,78e	1,34ab	2,08ab	4,95abc
N	7,10cd	39,06a	0,97e	0,94f	5,50a
P	6,94cde	38,47b	1,10cde	1,73bcd	5,60a
K	6,14g	37,05cd	1,10cde	1,67cde	4,39abc
Mg	6,29fg	37,15cd	1,04de	1,78bcd	3,80c
Mn	6,13g	36,81cd	1,41a	2,33a	5,60a
Zn	6,09g	35,99e	1,02de	1,65cde	5,48a
Teste F	68,54**	226,55**	19,92**	35,09**	9,13**
DMS	0,37	0,37	0,20	0,37	1,26
C.V	2,80	0,49	8,29	11,43	12,78
Tempo (TS)					
0h	24,93a	42,48a	0,00d	0,00d	0,00c
6h	0,73b	37,13b	1,39c	1,10c	7,43a
12h	0,63b	36,16c	1,60b	1,84b	6,36b
24h	0,57b	34,33d	1,83a	3,61a	6,01b
Teste F	50558,80**	9500,94**	2506,75**	1888,42**	854,36**
DMS	0,20	0,14	0,06	0,13	0,43
C.V	4,26	0,51	7,22	11,29	12,27
Interação					
Inter. TPxTS	2,22**	47,61**	6,91**	14,13**	9,05**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p<0,01$); *significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01=<p<0,05$); ns não significativo ($p>=0,05$). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre nutrientes e tempos de duração

A glicose foi altamente consumida pelas leveduras em todos os tratamentos utilizados, havendo um consumo médio de cerca de 96% da glicose presente no mosto nas primeiras 6h de fermentação (Figura 10). Estes resultados demonstram a facilidade e a preferência da assimilação deste carboidrato por *P. membranifaciens*.

O consumo de xilose apresentou comportamento diferente entre os tratamentos estudados (Figura 11). A assimilação desta pentose mostrou-se ser mais eficiente no

mosto contendo P+K+Mg+Mn+Zn (N8) em relação as demais suplementações, havendo um decréscimo de 23,61% ao final do ensaio.

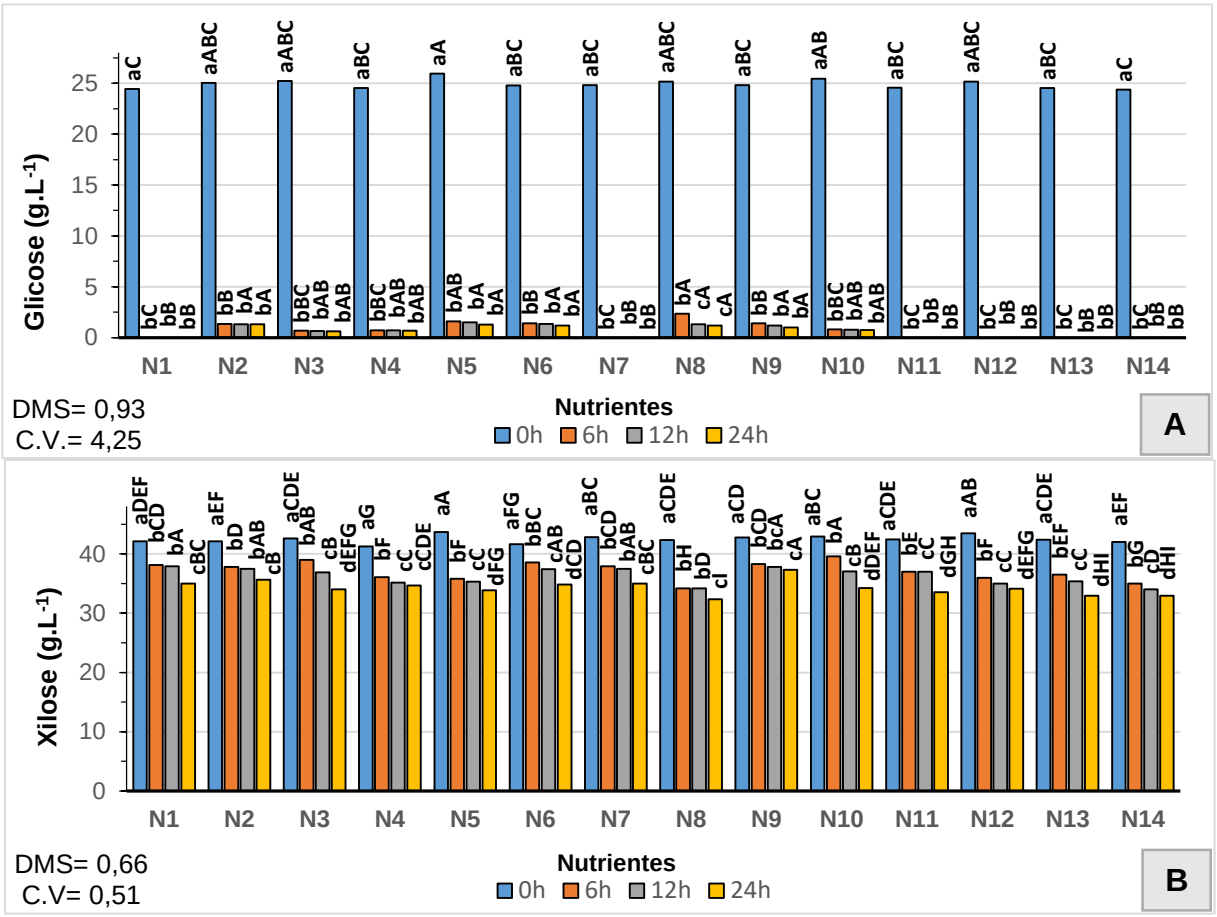


Figura 10. A. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre nutrientes e tempo para concentração de xilose. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn;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

Em relação à concentração final de xilose, observa-se que o mosto contendo somente nitrogênio (N9) teve consumo de 12,76%, o tratamento sem suplementação 16,87% e o mosto suplementado com N+P+K+Mg+Mn+Zn (N2) 15,40%. Os resultados demonstram que esta levedura pode ter seu metabolismo afetado na presença do nitrogênio suplementado, reação que pode ser causada pela fonte de nitrogênio utilizada.

Segundo Kurtzman (2011), o gênero *Pichia spp* não utiliza nitrato como fonte de nitrogênio. Os mostos utilizados neste ensaio foram suplementados com sulfato de amônio, consequentemente estavam disponíveis as formais amoniacais de nitrogênio, não havendo a presença de nitrogênio orgânico. Martini et al. (2016) perceberam que a suplementação com 3 $g.L^{-1}$ de extrato de levedura exerceu um efeito notável sobre os parâmetros de fermentação, podendo otimizar o processo e oferecer os nutrientes essenciais em suas formas orgânicas.

A maior concentração de glicerol foi encontrada nos mostos suplementados com N+P+K+Mg+Zn (N4), N+P+K+Mn+Zn (N5) e N+P+Mg+Mn+Zn (6) (Figura 11).

Os íons metálicos são vitais para todos os organismos vivos, desta forma os transportadores destes íons têm um papel crucial na manutenção da homeostase das células (Dos Santos, 2008). Consequentemente, a ausência de cátions e ânions específicos podem levar a célula ao estresse osmótico, forçando as leveduras a produzir glicerol para proteger suas células.

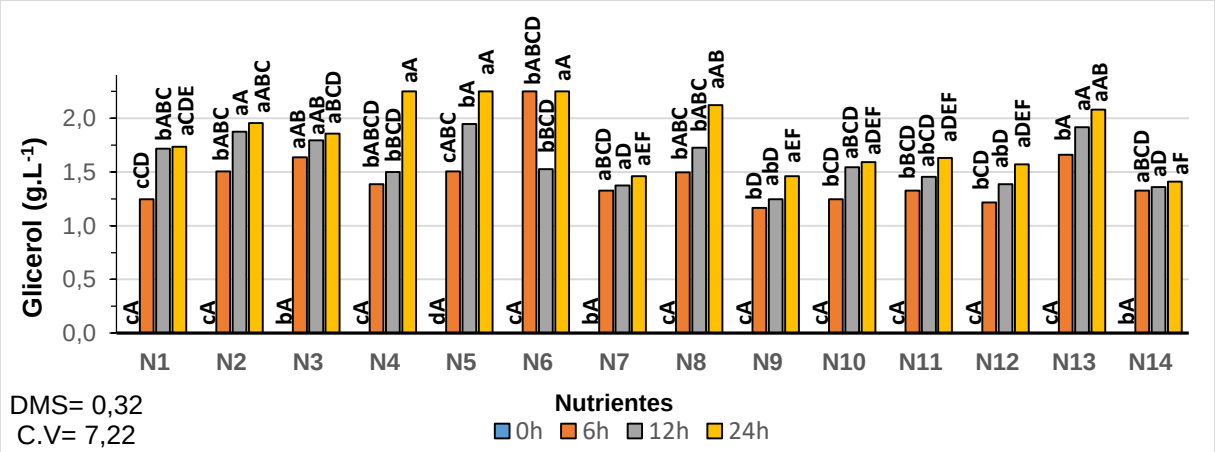


Figura 11. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn;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

A produção de ácido acético teve seu pico às 24h de fermentação no mosto suplementado com manganês (N13), obtendo valores superiores à 5 $g.L^{-1}$ (Figura 12). A produção de ácido acético em processos de fermentação alcoólica não é desejável,

pois as fontes de carbono disponíveis acabam sendo desviadas do objetivo inicial (Roviero, 2016), levando a perdas no rendimento fermentativo.

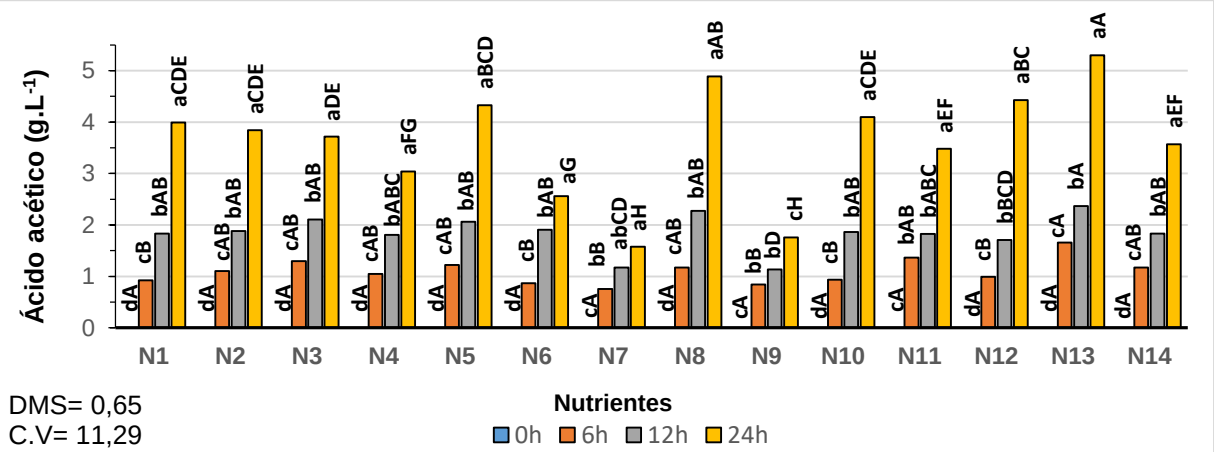


Figura 12. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para o parâmetro concentração de ácido acético. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn;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

Em relação a produção de etanol, as maiores concentrações foram encontradas nos tratamentos com N+P+Mg+Mn+Zn (N6) e N (N9) (Figura 13). Entretanto somente o mosto suplementado com nitrogênio possui baixos teores de glicerol e ácido acético.

O tratamento sem suplementação (N1) apresentou formação de etanol, entretanto, conforme demonstrado na Figura 13, os nutrientes são importantes para obtenção de altas taxas deste produto, sendo a presença de manganês um fator importante para incremento da concentração final de etanol.

As análises realizadas demonstram que a levedura *Pichia membranifaciens* LJ04 consegue realizar o desdobramento dos açúcares em etanol e manter seus níveis de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos altos no tratamento com P+K+Mg+Mn+Zn (N8) ao longo das 24h. Entretanto deve-se ressaltar que a presença de nitrogênio é essencial para a manutenção de toda e qualquer forma de vida, não sendo possível que haja crescimento celular em mostos que possuam ausência deste nutriente, desta forma, neste tratamento ocorreu somente a preservação das leveduras e brotos provenientes do inóculo.

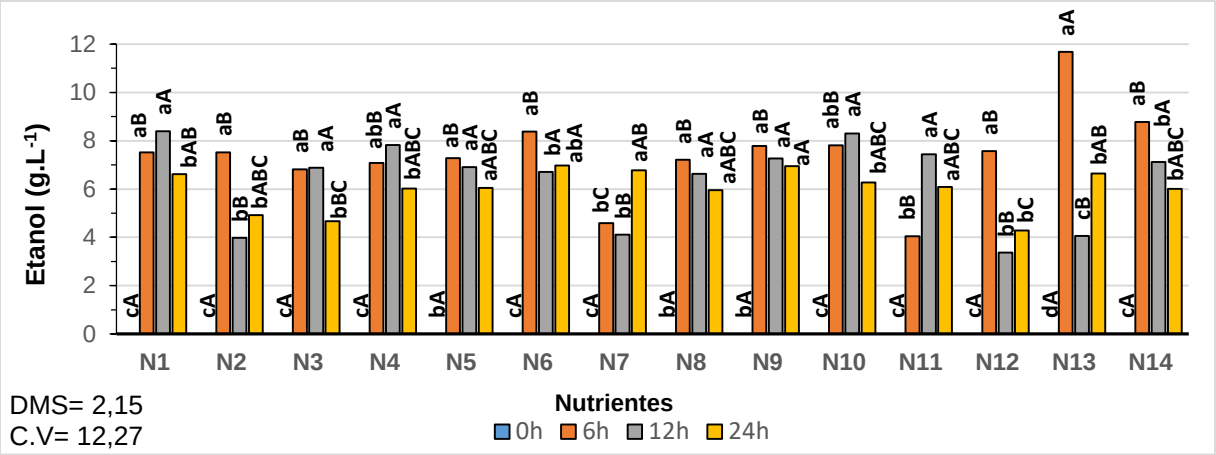


Figura 13. Desdobramento da interação entre nutrientes e tempo para a concentração de etanol. Letras minúsculas comparam nutrientes dentro de cada tempo e letras maiúsculas comparam tempos dentro de cada nutriente. N1- Sem suplementação; N2- N+P+K+Mg+Mn+Zn; N3- N+P+K+Mg+Mn; N4- N+P+K+Mg+Zn; N5- N+P+K+Mn+Zn;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

Neste contexto, a presença de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco mostram-se essenciais para conservação e crescimento das células de leveduras e alta produção de etanol.

4.4 Concentração e destoxificação do licor hemicelulósico

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, a quantidade de açúcares atingida após a concentração e destoxificação do licor foi 61,50 $g.L^{-1}$. Apesar de abaixo do teor calculado inicialmente, encontra-se dentro dos valores esperados, uma vez que nutrientes e açúcares podem ser perdidos ao longo do processo de destoxificação.

Tabela 10. Resultado da análise de HPLC da concentração de glicose, xilose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol presentes no licor hemicelulósico *"in natura"* e licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.

	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Arabinose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Licor *"in natura"*	1,9655	7,3840	1,4705	0,6345	1,2820	0,0015
Licor destoxificado	15,2800	39,3800	6,9400	2,4800	3,38	0,0000

O processo de destoxificação elaborado por Marton (2002), não obteve a máxima eficiência na retirada dos compostos inibidores do processo fermentativo.

Entretanto as quantidades presentes no licor *"in natura"* indicam que havia altos teores de compostos secundários que aumentaram substancialmente após a concentração. Deste forma uma realização de novas etapas com carvão ativado podem diminuir estes compostos para quantidades próximas a zero.

4.5 Determinação de nutrientes no licor

Para verificação das quantidades de nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, manganês e zinco presentes no licor concentrado e destoxificado, foram realizadas análises de macro e micronutrientes, os resultados encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Resultado da análise de macro e micronutrientes presentes no licor hemicelulósico concentrado e destoxificado

Nutrientes	Quantidade ($g.L^{-1}$)
Nitrogênio (N)	1,1415
Fósforo (P)	2,1805
Potássio (K)	1,9840
Magnésio (Mg)	0,5800
Manganês (Mn)	0,0271
Zinco (Zn)	0,0039

A disponibilidade de nutrientes no mosto para o processo de produção de etanol 1G é um conhecimento há muito difundido e pesquisado, podendo ser encontradas diversas informações acerca deste assunto. No entanto, não há relatos na literatura sobre à necessidade de suplementação no licor após as etapas de concentração e destoxificação (Freita, 2017).

As quantidades encontradas demonstram que a cana energia utilizada para produção do licor hemicelulósico recebeu uma boa suplementação de nutrientes enquanto estava em campo, sendo possível a obtenção de licor rico em minerais, mesmo após todos as etapas a que foi submetido.

As concentrações encontradas nas análises são maiores que os valores utilizados durante o ensaio de nutrientes do presente trabalho. A única exceção encontrada foi o zinco, sendo desta forma o único micronutriente necessário a ser adicionado.

4.6 Ensaio 3 - Fermentação de licor hemicelulósico

As análises dos resultados observados para os parâmetros de viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos, encontram-se na Tabela 12. Os desdobramentos para as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados na Figura 14.

Tabela 12. Resultados da análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey para viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade de brotos para ensaio de fermentação com licor hemicelulósico

Causas de variação	Viabilidade celular (%)	Brotamentos (%)	Viabilidade de brotos (%)
Mostos (TP)			
M1	80,79c	17,54bc	84,32bc
M2	87,09b	23,35b	80,62c
M3	93,73a	40,51a	95,75a
M4	92,74a	9,14c	86,65b
Teste F	46,91**	48,69**	44,02**
DMS	5,02	10,95	5,59
C.V	3,41	29,10	3,87
Tempo (TS)			
0h	96,26a	24,57ab	97,17a
6h	84,19b	20,22b	85,42b
12h	93,69a	27,64a	87,63b
24h	86,60b	18,38b	80,24b
48h	86,91b	22,72ab	87,33b
72h	83,89b	22,29ab	83,23b
Teste F	27,38**	4,47**	8,12**
DMS	4,38	6,83	8,99
C.V	3,15	19,21	6,59
Interação			
Inter. TP x TS	2,96*	5,31**	4,74**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre mostos e tempos. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2–Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3-Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.

De acordo com De Sousa e Monteiro (2011), a concentração de nutrientes disponíveis no mosto é muito importante, pois se em quantidades exageradas ou insuficientes, podem prejudicar o processo fermentativo.

O mosto sintético com N, P, K, Mg, Mn e Zn idêntico ao licor (M3) e o licor hemicelulósico (M4) foram os únicos tratamentos que obtiveram viabilidade celular superior a 85% em todo o período de fermentação (Figura 14.A). Estes resultados

demonstram que as altas concentrações de nutrientes presente no mosto sintético e no licor hemicelulósico não afetaram as células, sendo possível realizar fermentações pelo período de 72h com alto número de células viáveis.

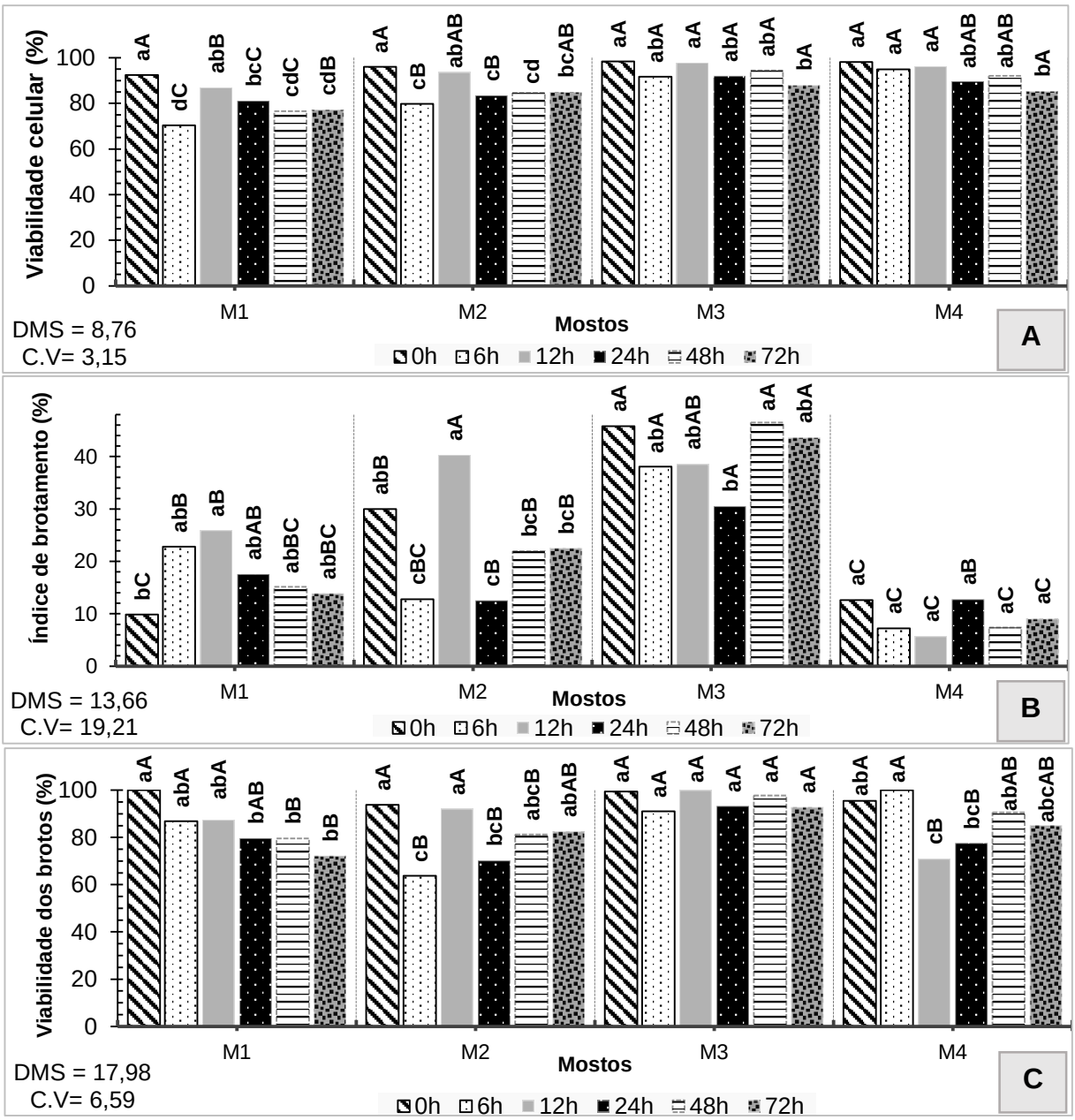


Figura 14. A. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade celular. B. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro índice de brotamento. C. Interação entre mosto e tempo para o parâmetro viabilidade dos brotos. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas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

Observa-se que para todos os tratamentos houve redução da viabilidade celular às 6h de fermentação, este intervalo de tempo caracterizasse como um período de adaptação da levedura ao meio e à alta concentração de etanol presente no mosto (Roviero, 2016). A metabolização de grandes quantidades de etanol em um pequeno intervalo de tempo pode ocasionar pequenos desequilíbrios na membrana celular dos microrganismos (Silva, 2006).

Todos os tratamentos apresentaram aumento na viabilidade celular ás 12h, entretanto após este período ocorreu quedas constantes nos valores do mosto sintético sem suplementação (M1) até o final do ensaio. Esta redução observada, indica que a presença de nutrientes é um fator importante para manutenção das células da levedura.

Para *S. cerevisiae*, a porcentagem máxima ideal de brotamentos é 15%, uma vez que, valores superiores indicam a possibilidade de baixa manutenção do fermento das dornas ou aumento da temperatura na fermentação (Amorim, 2005). Entretanto, todas as análises realizadas ao longo dos ensaios do presente estudo indicam que altos índices de brotos é uma qualidade intrínseca a cepa de *Pichia membranifaciens* utilizada durante o experimento.

O mosto sintético com N, P, K, Mg, Mn e Zn idêntico ao licor (M3) obteve maior índice de brotamento em relação ao demais tratamentos e valores superiores à 90% de viabilidade dos brotos ao longo de todo o processo fermentativo. Por outro lado, nota-se que para o licor hemicelulósico (M4) os índices de brotamento são os menores entre os mostos testados, apresentando viabilidades dos brotamentos próximas à 70% às 12 e 24h.

Desta forma, a presença de produtos secundários provenientes da hidrólise ácida que não foram totalmente retirados na destoxificação do licor hemicelulósico (M4) explicam os baixos valores de índice e viabilidade dos brotos presentes no mosto, uma vez que estes compostos são inibidores do metabolismo das leveduras (Silva, 2006).

As análises dos resultados observados para concentração de glicose, xilose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol, encontram-se na Tabela 13. Os

desdobramentos para as interações foram realizados na forma de gráficos e estão apresentados nas Figuras 15 a 17.

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

Causas de variação	Glicose ($g.L^{-1}$)	Xilose ($g.L^{-1}$)	Arabinose ($g.L^{-1}$)	Glicerol ($g.L^{-1}$)	Ácido Acético ($g.L^{-1}$)	Etanol ($g.L^{-1}$)
Mostos (TP)						
M1	4,26c	37,76a	0,00b	1,29d	2,43a	5,75b
M2	4,76b	37,69b	0,00b	1,41c	2,96a	5,77b
M3	5,58a	37,31a	0,00b	1,71b	3,83a	6,44a
M4	2,54d	29,63d	6,52a	3,75a	12,07a	4,72c
Teste F	121608,03**	335668,01**	6799925,47**	20941,67**	$2,96^{ns}$	12500,34**
DMS	0,02	0,04	0,01	0,05	15,18	0,04
C.V	0,30	0,07	0,27	1,36	171,79	0,39
Tempo (TS)						
0h	23,22a	41,43a	1,73a	0,62f	0,85a	0,00f
6h	0,68b	36,82b	1,63b	1,91e	1,73a	9,42a
12h	0,66c	35,70c	1,62b	2,12d	2,26a	8,75b
24h	0,53d	34,73d	1,61c	2,34c	11,71a	7,41c
48h	0,52d	32,88e	1,61c	2,53b	6,57a	5,20d
72h	0,10e	32,02f	1,57d	2,70a	8,80a	3,24e
Teste F	5196622,15**	157952,09**	334,87**	12188,23**	1,86NS	345165,43**
DMS	0,02	0,04	0,01	0,03	14,33	0,03
C.V	0,27	0,07	0,51	0,94	171,43	0,31
Interação						
Inter. TPxTS	64833,31**	7300,93**	334,87**	164,46**	$1,05^{ns}$	2896,87**

**significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01); *significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01=<p<0,05); ns não significativo (p>=0,05). As médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey. D.M.S = desvio mínimo significativo. C.V = coeficiente de variação. Inter. TPxTS – Interação entre mostos e tempos. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2–Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3-Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor; M4-Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.

A glicose foi esgotada em todos os tratamentos antes das 12h de fermentação, havendo um consumo mínimo de 93,94% deste açúcar somente nas 6h iniciais, demonstrando elevada velocidade de assimilação deste açúcar pela levedura (Figura 15.A).

O licor hemicelulósico (M4) foi o tratamento que obteve o maior decréscimo da concentração de xilose ao longo da fermentação, totalizando um consumo de 35,43% (Figura 15.B). Percebe-se que somente nas primeiras 6h do ensaio, as leveduras haviam consumido cerca de 23,19 g de xilose, valor superior ao mosto sintético sem suplementação (M1), mosto sintético com suplementação por Pavani et al. (2013) (M2) e mosto sintético com N, P, K, Mg, Mn e Zn idêntico ao licor (M3), que obtiveram

uma assimilação total de 15,65%, 19,38% e 21,09%, respectivamente, após as 72h do ensaio.

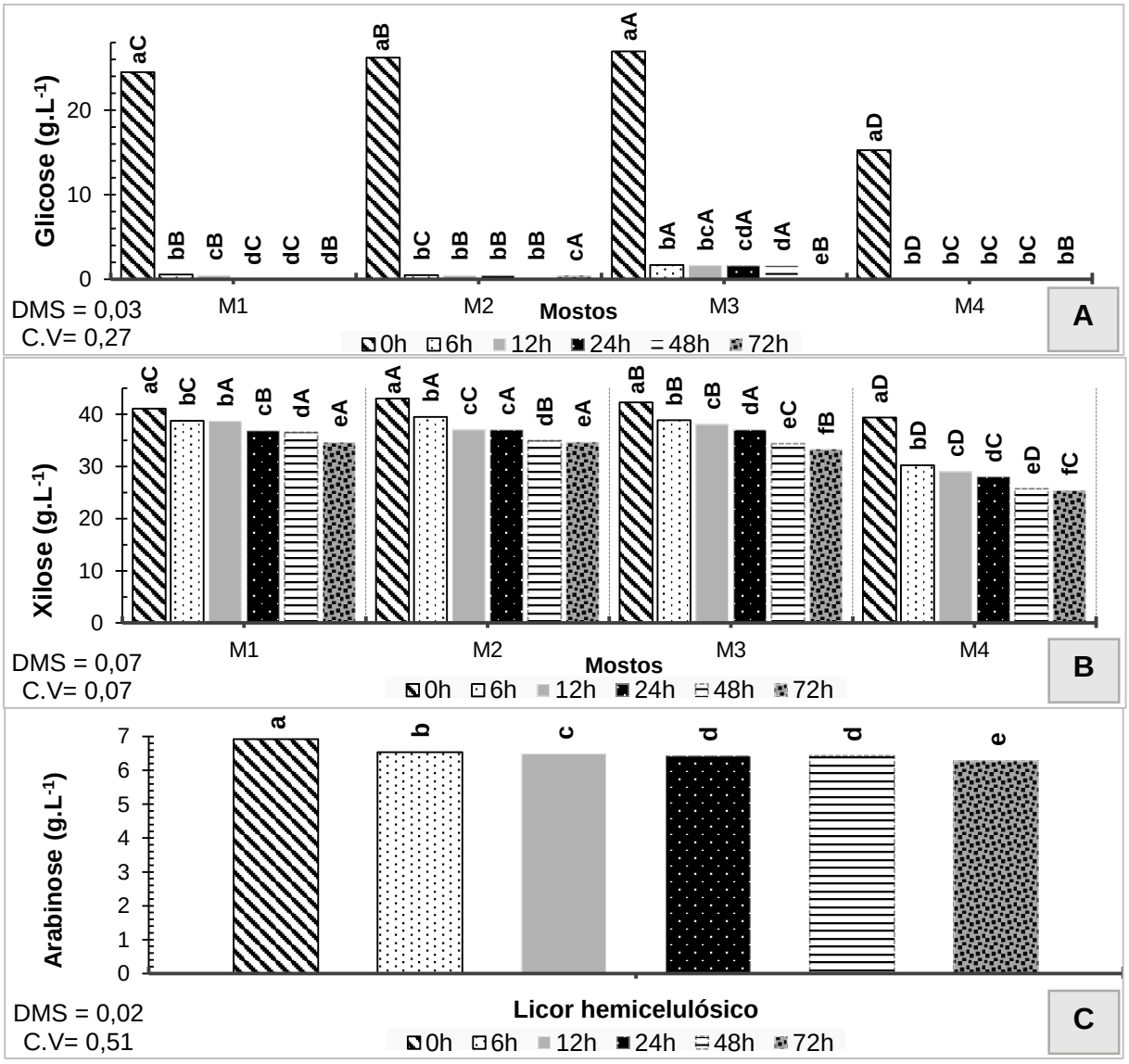


Figura 15. A. Interação entre mosto e tempo para concentração de glicose. B. Interação entre mosto e tempo para concentração de xilose. C. Interação entre mosto e tempo para concentração de arabinose. M1–Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto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

O consumo de xilose apresentado neste tratamento foi superior a todos os valores encontrados ao longo dos ensaios desta pesquisa. Estes resultados implicam que outros nutrientes presentes neste hidrolisado são essenciais para uma melhor

assimilação deste açúcar. O licor utilizado possuía valores de cálcio, enxofre, boro, cobre e ferro que podem fazer parte da via metabólica da levedura que metaboliza pentoses.

Segundo Betancur (2010), o sistema de transporte utilizado pelas leveduras é constitutivo para glicose e indutivo para xilose, podendo acarretar na repressão do consumo da xilose na presença da glicose. Entretanto observou-se que o esgotamento de glicose ocorreu nas primeiras 6h de fermentação do licor, mesmo período onde a velocidade de consumo de xilose foi maior. À vista desse resultado, pode-se concluir que a glicose pode exercer um efeito contrário ao da repressão catabólica, havendo maior consumo de xilose na presença da glicose.

Em seus estudos Freire (2012), percebeu que a velocidade de assimilação da xilose era maior na presença de glicose, em relação ao consumo apresentado somente na presença de pentose em uma cepa de suas bactérias recombinantes utilizadas para produção de etanol de segunda geração.

Mesmo em baixas concentrações, a arabinose é um açúcar pouco utilizado pela levedura durante o processo fermentativo, obtendo uma taxa de assimilação total de apenas 9,09% (Figura 15.C). O baixo consumo desta pentose por leveduras já foi relatado anteriormente em licores obtidos de bagaço de cana-de-açúcar (Felipe et al., 1997; Roviero, 2016) e de bagaço de sorgo (Freita, 2017

A produção de glicerol é principalmente uma resposta metabólica das células de levedura à elevadas concentrações de etanol (Goshadrou et al., 2011). Entretanto, mesmo com concentrações de etanol parecidas, verifica-se que mosto sintético com N, P, K, Mg, Mn e Zn idêntico ao licor (M3), obteve maiores valores de glicerol em relação aos tratamentos com mosto sintético sem suplementação (M1) e mosto sintético com suplementação por Pavani et al. (2013) (M2). À vista disto, a alta concentração de íons dissociados e disponíveis no meio podem ter causado estresse osmótico, levando as células a produzirem glicerol para se protegerem.

Analisando a concentração inicial de glicerol no licor hemicelulósico (M4), pode-se notar que durante o ensaio houve somente a produção de 1,89 $g.L^{-1}$, valor próximo aos tratamentos com mosto sintético sem suplementação (M1) e mosto sintético com suplementação por Pavani et al. (2013) (M2).

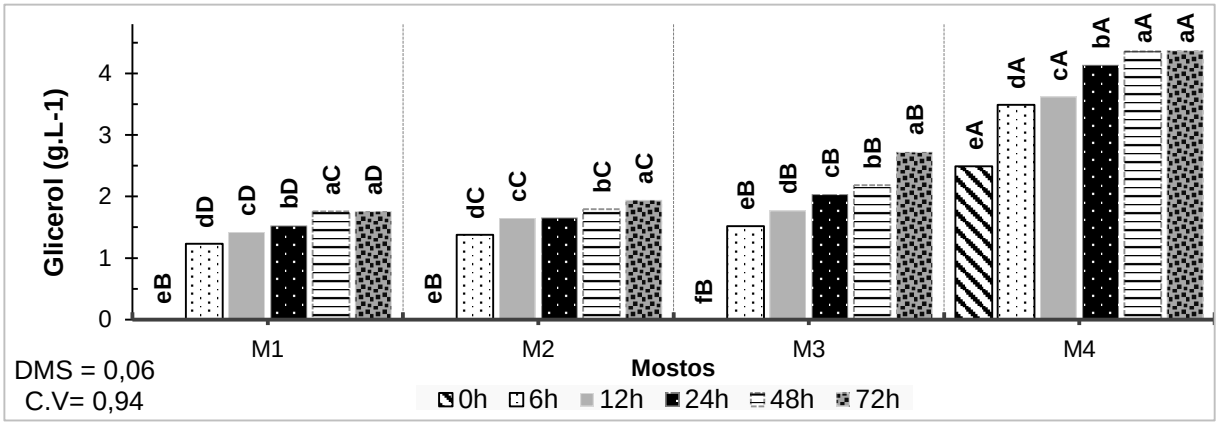


Figura 16. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de glicerol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3-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

O pico de produção de etanol para todos os tratamentos ocorreu à 6h de fermentação, havendo perda substanciais em sua concentração após este período. Sendo encontrados concentrações finais 4 vezes menores aos teores analisados inicialmente.

Desempenhos similares já foram relatados em algumas cepas de *Scheffersomyces parashehatae, Scheffersomyces illinoinensis* e *Spathaspora arborariae* utilizadas para a produção de etanol de segunda geração em hidrolisados sintéticos e hidrolisados hemicelulósicos de cana-de-açúcar, demonstrando que após chegar ao pico máximo de produção de etanol as concentrações exibiram diminuição constantes. Este comportamento foi atribuído à assimilação de etanol pelas cepas devido ao rápido esgotamento de açúcar do meio durante o tempo em que o oxigênio estava disponível (Cadete et al., 2012; Cadete et al., 2016; Cadete e Rosa, 2017).

Para que as leveduras garantam sua sobrevivência é necessário que realizem a assimilação de uma ou mais fontes de carbono, consequentemente o esgotamento de glicose em um curto período pode induzir à metabolização de outros compostos presentes no meio. *Pichia membranifaciens* já foi descrita por Kurtzman (1998, 2011) como uma levedura capaz de assimilar e crescer em meios com etanol.

À vista desses fatores, as altas concentrações de ácido acético encontradas nos tratamentos, podem ser indícios da utilização do etanol como substrato pelas leveduras, uma vez que ele é convertido em acetaldeído, que pode ser transformado em acetato ou sofrer oxidação e gerar ácido acético (Walker, 1998).

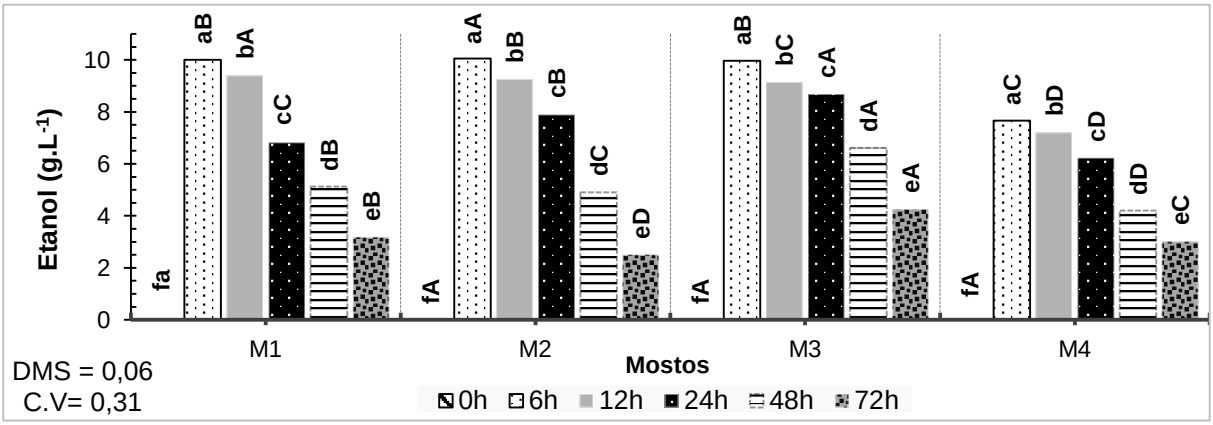


Figura 17. Desdobramento da interação entre mosto e tempo para concentração de etanol. Letras minúsculas comparam tempos dentro de cada mosto e letras maiúsculas comparam mostos dentro de cada tempo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto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

O licor utilizado durante o ensaio foi destoxificado segundo metodologia proposta por Marton (2002), entretanto notou-se que o procedimento não foi totalmente eficaz, pois apresentou altos teores de resíduos de glicerol e ácido acético, conforme apresentado anteriormente na Tabela 6.

Desta forma, é esperado que outros componentes inibidores da fermentação possam estar presentes no licor destoxificado utilizado no ensaio. Hipótese sustentada pela produção de etanol ligeiramente menor no licor hemicelulósico em comparação aos teores observados nos outros tratamentos. Apesar disto a levedura conseguiu se manter com alto número de células viáveis ao longo do experimento.

A alta viabilidade observada ao longo do processo fermentativo mostra que a levedura estudada é tolerante à altas concentrações de ácido acético, já que mesmo com concentrações próximas a 12 $g.L^{-1}$ apresenta viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos nos parâmetros ideais após 72h de fermentação. *P. membranifaciens* já foi descrita como uma levedura tolerante à ácidos orgânicos,

sendo encontradas cepas que resistiram até 30 g/L de ácido acético em soluções de vinagre (Štornik et al., 2016).

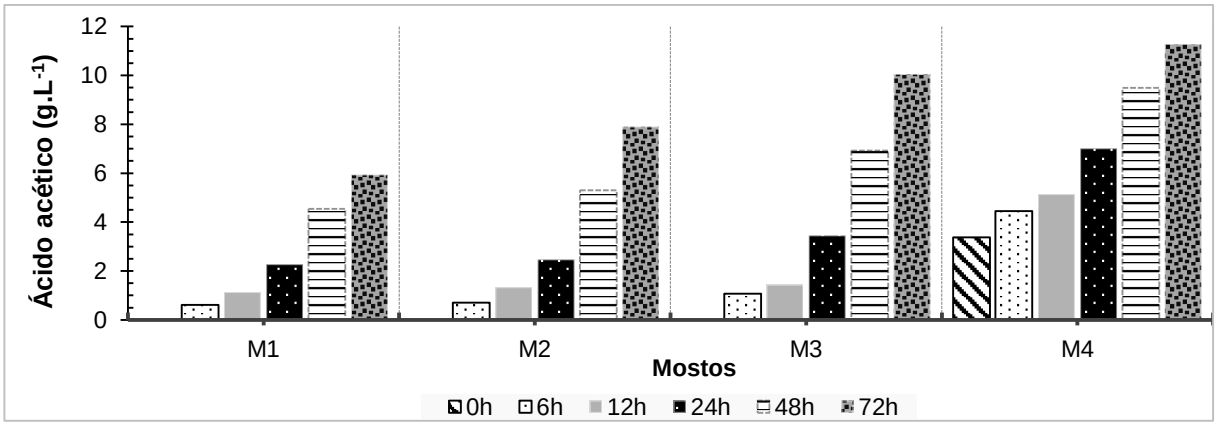


Figura 18. Concentração de ácido acético ao longo do processo fermentativo. M1– Mosto sintético: sem suplementação; M2– Mosto sintético: suplementação ideal de nutrientes; M3- Mosto sintético: suplementação idêntica ao licor hemicelulósico; M4- Licor hemicelulósico concentrado e destoxificado.

5. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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