UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

KÁTIA CAROLINE FRANÇA DALANHOL

Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e
Kluyveromyces marxianus em hidrolisado hemicelulósico de bagaço
de maçã

Lorena - SP
2014

KÁTIA CAROLINE FRANÇA DALANHOL

Avaliação do Desempenho das Leveduras *Candida guilliermondii* e
Kluyveromyces marxianus em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço
de Maçã

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria das Graças de Almeida Felipe.

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Dalanhol, Kátia Caroline França

Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. / Kátia Caroline França Dalanhol. – Versão original. – 2014.

71 p.: il.

Dissertação (Mestre em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2014.

Orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

663.12 - CDU

*Aos meus pais, Ivanir e
Evelize, e à minha irmã Ana
pelo amor incondicional e
paciência inesgotável.*

AGRADECIMENTOS

Seria humanamente impossível lembrar e agradecer a todas as pessoas que fizeram parte desta trajetória, e tornaram esse trabalho possível. Cada um teve sua particular importância e muito deste trabalho não estaria pronto se não fosse pelo apoio, auxílio e cooperação de pessoas as quais sou imensamente grata.

Não poderia deixar de mencionar neste espaço nomes como o do Professor Mário Cunha, quem cedeu a ideia de trabalhar com uma nova biomassa, o bagaço de maçã. A Professora Maria das Graças, por abraçar esta ideia e por todo o tempo, orientação e conhecimentos a mim dedicados e finalmente, a Débora Danielle por ter me acompanhado e ensinado tanto.

Aos amigos Andrés e Angela, a verdade é que nem sei como agradecê-los por todos os debates literários, os bons conselhos e especialmente a paciência e o ombro sempre amigo.

Estaria sendo injusta se não agradecesse as meninas (joaninhas) com quem eu dividi não só a casa, mas parte da minha vida, as quais me fizeram sentir em família nos momentos difíceis.

Agradeço especialmente aos meus pais, avós, a minha irmã Ana e meus amigos, em especial a Mariani e o Rafael que sempre acreditaram em mim e acima da saudade sempre me deram forças.

Por fim a CAPES pelo auxílio financeiro e à empresa de sucos Fischer Fraiburgo pelo bagaço cedido.

Resumo

Dalanhol, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.** 2014. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

Em um contexto de sustentabilidade onde resíduos devem ser aproveitados na tentativa de gerar novos produtos, energéticos ou não encontra-se o bagaço de maçã, o resíduo oriundo da prensagem do fruto no processo de produção de suco. Tal biomassa é composta por cascas, polpa, talos e sementes. Representa cerca de 30% da produção anual de maçã no Brasil e tem como opção de utilização, suplementação de ração animal e adubação orgânica. Uma alternativa de aproveitamento para esta biomassa está na sua utilização em bioprocessos como na produção de etanol, xilitol, dentre outros. O xilitol e o etanol vêm sendo amplamente investigados, o xilitol por suas diversas aplicações nos setores odontológico, farmacêutico e alimentício e o etanol pela sua utilização em substituição aos combustíveis fósseis. Desta forma o presente trabalho avaliou o aproveitamento do bagaço de maçã como matéria-prima em bioprocessos. Para tanto, foram desenvolvidas etapas de caracterização da biomassa; obtenção por hidrólise ácida (1% H_2SO_4 , 121°C, 20 min.), concentração a vácuo e, destoxificação (1% de carvão vegetal ativo e ajuste de pH), do hidrolisado hemicelulósico; e fermentação deste hidrolisado por *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus*. As fermentações foram desenvolvidas em frascos Erlenmeyer (125mL), em shaker rotatório (200 rpm, 30°C) por 96 horas, empregando como meio de cultivo o hidrolisado hemicelulósico suplementado com (g.L⁻¹) solução de extrato de farelo de arroz (20); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1) e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0). No presente trabalho, o bagaço de maçã apresentou teores (%) de 32,62 de celulose, 25,38 de lignina e 23,60 de hemicelulose, enquanto o hidrolisado o qual foi destoxificado em separado para as fermentações com as leveduras teve como constituintes (g.L⁻¹): xilose (29,65), glicose (20,79), arabinose (19,93), ácido acético (2,07), furfural (0,03) e hidroximetilfurfural (0,11). Foi constatado que ambas as leveduras consumiram totalmente a glicose (12h) e parcialmente as pentoses, xilose e arabinose, sendo a última consumida lentamente por *C. guilliermondii* e apenas nas últimas 24 horas de cultivo por *K. marxianus*. Como resultado, *C. guilliermondii* produziu xilitol (9,35g.L⁻¹) e *K. marxianus* tanto xilitol (9,10g.L⁻¹) quanto etanol (10,47 g.L⁻¹) como principais bioprodutos. As máximas atividades enzimáticas (U/mg_{prot}) de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) das leveduras empregadas foram 0,23 e 0,53 para *C. guilliermondii* e 0,08 e 0,08 para *K. marxianus*, respectivamente. Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que o bagaço de maçã é uma biomassa promissora para ser aproveitada como matéria-prima em bioprocessos que visam a produção de xilitol e/ou etanol.

Palavras-Chaves: Bagaço de maçã. Hidrolisado hemicelulósico. *Candida guilliermondii*. *Kluyveromyces marxianus*. Bioprodutos.

Abstract

Dalanhol, K. C. F. **Evaluation of the performance of the yeasts *Candida guilliermondii* and *Kluyveromyces marxianus* in apple pomace hemicellulosic hydrolysate.** 2014. 71 p. Dissertação (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

In a sustainability context in which residues must be used for obtaining new energetic or non-energetic products, vegetal biomass becomes an important feedstock for bioprocess. One of those residues is apple pomace, which is produced in the fruit milling during the juice production process. This biomass is composed by skin, pulp, stalk and seeds. It represents about 30% of apple annual production in Brazil, and the conventional uses are animal feeding and organic fertilization. One alternative to use this biomass is its utilization as feedstock in bioprocesses, such as ethanol and xylitol production. Extensive research is being performed in xylitol and ethanol production due to the important applications of xylitol in odontological, pharmaceutical and food industries, as well as because of the utilization of ethanol as substitute of fossil fuels. In this way, the present work evaluated the use of apple pomace as feedstock for bioprocess, through the development of stages of biomass characterization; dilute-acid hydrolysis (1% H_2SO_4 , 121°C, 20 min.), vacuum concentration and detoxification (pH adjustment and activated charcoal adsorption) of the hemicellulosic hydrolysate and fermentation of this hydrolysate by *Candida guilliermondii* and *Kluyveromyces marxianus*. The fermentations were performed in Erlenmeyer flasks (125mL) in a rotatory shake (200rpm, 30°C) for 96h, employing as culture medium the hemicellulosic hydrolysate supplemented with (g.L⁻¹) rice bran extract (20), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1) and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2.0). In this work, the composition (%) of apple was 32.62 of cellulose, 25.38 of lignin and 23.60 of hemicellulose. The hydrolysate was separately detoxified for the fermentations with the yeasts, and has the following composition (g.L⁻¹): xylose (29.65), glucose (20.79), arabinose (19.93), acetic acid (2.07), furfural (0.03) and 5-hydroxymethylfurfural (0.11). It was verified that both yeasts consumed totally glucose (12h) and partially pentoses, i.e. xylose and arabinose, the latter being consumed slowly by *C. guilliermondii* and only in the last 24h of fermentation by *K. marxianus*. The main products for *C. guilliermondii* was xylitol (9.35g.L⁻¹) while for *K. marxianus* it was ethanol (10.47g.L⁻¹) and xylitol (9.10 g.L⁻¹) as well. The maximum enzymatic activities (U/mg_{prot}) of Xylose Reductase (XR) and Xylitol Dehydrogenase (XDH) were 0.23 e 0.53 for *C. guilliermondii* and 0.08 and 0.08 for *K. marxianus*, respectively. Based on the results of the present work, it can be stated that apple pomace is a promissory biomass to be used as feedstock in bioprocess for xylitol and/or ethanol production.

Keywords: Apple pomace. Hemicellulosic hydrolysate. *Candida guilliermondii*. *Kluyveromyces marxianus*. Bioproducts.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. Biomassa Vegetal	13
2.1.1. Bagaço de Maçã	14
2.2. Utilização de Hidrolisados Hemicelulósicos em Bioprocessos.....	16
2.3. Metabolismo de Pentoses e Enzimas Chaves da Via das Pentoses Fosfato (PPP)	20
2.4. Micro-organismos.....	23
2.4.1. <i>Candida guilliermondii</i>	23
2.4.2. <i>Kluyveromyces marxianus</i>	24
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo geral	26
3.1.1. Objetivos específicos	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Determinação do teor de umidade do bagaço de maçã.....	27
4.2. Caracterização química do bagaço de maçã	27
4.3. Hidrólise do Bagaço de Maçã	29
4.4. Destoxificação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã	30
4.5. Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã	30
4.5.1. Preparo do Inóculo	31
4.5.2. Meio e Condições de Fermentação	31
4.5.3. Métodos Analíticos	32
4.5.3.1. Determinação da Concentração de Açúcares Metabolitos e Compostos Tóxicos.....	32
4.5.3.2. Viabilidade das Culturas e Morfologia Celular.....	32
4.6. Determinação das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH).....	33
4.6.1. Rompimento Celular	33
4.6.2. Determinação das Atividades Enzimáticas	33
4.6.3. Determinação de Proteína Solúvel.....	34
4.7. Determinação dos Parâmetros Fermentativos	34
4.7.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{(P/S)}$).....	34
4.7.2. Produtividade Volumétrica de Produto (QP)	35
4.7.3 Eficiência da Fermentação (η)	35
4.7.4. Velocidade Volumétrica de Crescimento (r_x).....	36

4.7.5. Velocidade Volumétrica de Consumo de Açúcares (r_s)	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Caracterização do Bagaço de Maçã	38
5.2. Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã com Relação aos Teores de Açúcares e Compostos Tóxicos.....	39
5.3. Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã por <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i>	44
5.3.1. Consumo de Açúcares por <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã.....	45
5.3.2. Crescimento Celular de <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã	47
5.3.3. Produção de Xilitol e Etanol por <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã.....	50
5.3.4. Concentração de Ácido Acético, Furfural, Hidroximetilfurfural, e Variação de pH Durante Cultivo de <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã	53
5.3.5. Atividade Enzimática de Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH) de <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Kluyveromyces marxianus</i> em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã	55
6. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	60

1. INTRODUÇÃO

A incorporação do conceito de desenvolvimento sustentável por empresas de diferentes setores industriais e a preocupação geral da comunidade científica em dar diferentes opções de aproveitamento a resíduos agroindustriais e/ou florestais, visando produtos de maior valor agregado, vem justificando muitas das pesquisas no campo biotecnológico. Neste sentido, novas tecnologias tem sido implementadas, as quais contribuem para evitar problemas ligados ao meio ambiente e armazenamento final. Além disso, a ampla variedade de espécies vegetais confere ao Brasil certa diversidade de biomassas lignocelulósicas, propiciando assim uma gama de possibilidades de pesquisas nesse campo. Biomassas como o bagaço de maçã, resíduo final da indústria de sucos, são muitas vezes pouco exploradas e podem apresentar alto potencial de aproveitamento como matéria-prima em bioprocessos em virtude da presença de carboidratos na sua composição.

Tais bioprocessos consistem inicialmente na separação das principais frações constituintes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina) através de processos de hidrólise para obtenção dos hidrolisados, os quais são ricos em açúcares e substratos para processos fermentativos. Em se tratando de fermentação de materiais lignocelulósicos, especialmente da fração hemicelulósica, constituída na sua maioria por xilose, seguida de arabinose e glicose, os produtos resultantes do metabolismo de micro-organismos assimiladores de pentoses são principalmente o etanol e o xilitol. O etanol, um combustível atualmente produzido através da fermentação de materiais como cana-de-açúcar, milho e beterraba capazes de reduzir a emissão de gases tóxicos quando comparado aos combustíveis fósseis, sendo tão energético quanto. Este mostra-se promissor uma vez que pode ser obtido através da fermentação de hidrolisados, contribuindo assim para o aumento da produção para melhor atender a demanda energética sem aumentar a área de cultivo. O xilitol, um adoçante com diversas aplicações clínicas, comercialmente obtido por via química a partir da xilose proveniente de biomassas vegetais, tem também

como alternativa de produção os processos biotecnológicos o que poderia diminuir os custos de produção.

Nesse contexto, visando à exploração de uma nova biomassa vegetal, a qual vem sendo erroneamente descartada pela indústria de sucos, o que favorece o crescimento de fungos indesejados, o presente trabalho busca avaliar o bagaço de maçã como matéria-prima em bioprocessos. Para tanto foram empregadas tecnologias já utilizadas em outras biomassas, como o bagaço de cana-de-açúcar, em particular quanto à avaliação da utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã como meio de fermentação para as leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus*.

Dessa forma, avaliou-se o comportamento microbiano quando o hidrolisado hemicelulósico é utilizado na formulação de meio de cultivo em condições adequadas. Os resultados contribuem para ampliar os conhecimentos ainda escassos sobre esta biomassa principalmente em relação ao seu uso em bioprocessos de forma a contribuir para o mercado com bioprodutos de alto valor agregado como o etanol e o xilitol.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa Vegetal

O termo biomassa foi introduzido por volta de 1975 para descrever os materiais que podem ser utilizados como combustível (WEREKO-BROBBY; HAGEN, 1996). De acordo com estes autores, biomassa é um termo genérico referente a todo material produzido por todo e qualquer ser vivo (animais, vegetais, fungos e protista) em seus diferentes processos, isto é a matéria orgânica viva, desde quando é capaz de fixar carbono nas moléculas constituintes de suas células passando por todas as etapas da cadeia alimentar, ou trófica, excluindo assim combustíveis fósseis deste conceito. Atualmente cerca de 15% da energia gerada em todo mundo, podendo chegar até 35% da energia gerada em países em desenvolvimento como China e Brasil, é proveniente de processos que se utilizam de biomassas (SEYE et al., 2003). Assim, do ponto de vista energético, o Centro Nacional de Referência em Biomassa (CENBIO) define biomassa como todo recurso renovável oriundo de matéria orgânica (animal ou vegetal) que pode ser utilizado para a produção de energia. Nesse contexto, segundo Couto et al (2004), a biomassa proveniente de atividades, especialmente a agrícola, utilizada como matéria-prima em processos biotecnológicos é conhecida no meio científico como biomassa vegetal.

Biomassas vegetais variadas vêm sendo estudadas e exploradas em pesquisas científicas resultantes de diferentes processamentos. Estas são utilizadas em bioprocessos diversos sempre procurando obter produtos de maior valor agregado como etanol, xilitol, ácido cítrico, dentre outros. A exemplo disto temos a produção biotecnológica de xilitol utilizando hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE et al., 1997a), palha de arroz (ROBERTO et al., 1994), casca de aveia (CANILHA et al., 2008), biomassa de sorgo (SENE et al., 2011), sabugo de milho (PING, et al., 2013). Quanto a produção de etanol temos em bagaço de cana-de-açúcar (CANILHA et al., 2010), palha de arroz e poda de oliveira (FONSECA et al., 2013) dentre outros. Por outro lado há ainda um desafio ao se estabelecer quantidades suficientes de biomassas a serem empregadas

para outros fins, mantendo o processo energeticamente autossuficiente (FURLAN et al., 2012).

2.1.1. Bagaço de Maçã

O Brasil está entre os dez maiores produtores de maçã do mundo, ocupando a oitava posição nesse ranking em 2012, sendo que esta, em suma, concentra-se na região sul do País. Na safra 2010/2011 foram produzidas mais de 1,3 milhões de toneladas de maçã no País e cerca de 30% desse total é destinado a indústria de sucos gerando em torno de 390 mil toneladas de bagaço de maçã por ano (ABPM, 2012). Estes números são ainda maiores em países como Índia, China e Canadá ocupantes das primeiras posições do ranking.

Figura 1 - Bagaço de maçã

Fonte: Arquivo pessoal

O bagaço de maçã (Figura 1) é o resíduo oriundo da prensagem do fruto na produção de suco e extração da essência, composto por cascas, polpa, talos e sementes. De acordo com Vendruscolo et al. (2008) e Bai et al. (2013) o bagaço

de maçã possui altas quantidades de fibra e baixas concentrações proteicas e vitamínicas, tal biomassa é rica em carboidratos insolúveis em água como a celulose e a hemicelulose e compostos estruturais como a lignina. Estudos anteriores divulgaram diferentes composições físico-químicas desta biomassa, as quais se encontram resumidas na Tabela 1. É importante ressaltar que há diversas variedades do fruto no mercado, sendo que estas são produzidas e utilizadas em diferentes escalas, de acordo com a região em que são produzidas, dessa maneira é comum encontrar variações na composição do bagaço, sempre de acordo com a variedade de maçã a que este procede (VENDRUSCULO et al., 2008).

Tabela 1 - Composição físico-química do bagaço de maçã encontrada em diferentes trabalhos.

Composição	Albuquerque (2003)	Hang & Woodams (1987)	Jin et al. (2002)	Joshi & Shandu (1996)	Villas-Bôas & Esposito (2000)
Umidade (%)	79,2	75,6	5,8*	3,97*	80
Proteínas (%)	3,7	5,1	4,7	5,8	4,1
Lipídeos (%)	n.d	4,2	4,2	3,9	n.d
Fibras (%)	38,2	4,3 – 10,5	n.d	14,7	40,3
Cinzas (%)	3,5	2,8	1,5	1,82	2,0
Carboidratos (%)	59,8	9,5 - 22	83,8	48	n.d
Açúcares reduzidos (%)	10,8	5,7	n.d	n.d	15
Pectina (%)	7,7	1,5 – 2,5	n.d	n.d	5,5
pH	4,0	n.d	n.d	2,6	n.d

Adaptado de Vendruscolo et al. (2008). n.d., Não Determinado. *bagaço seco previamente ao ar.

Villas Boas e Esposito (2000) avaliaram a utilização do bagaço de maçã como complementação alimentar em ração animal, porém seus altos teores de açúcares redutores e de fibras somado aos baixos teores vitamínicos e proteicos limitaram sua utilização nesse campo, uma vez que a presença de celulose e de lignina dificulta a digestibilidade em animais não ruminantes.

Alternativas de destino para o bagaço de maçã já foram estudadas e divulgadas em diferentes áreas. No campo alimentício podemos citar a produção de *Thepla* (uma espécie de pão indiano sem fermento) utilizado em dietas especiais para pessoas diabéticas (ASHISH et al., 2013), barra de cereal (CICHACZEWSKI, 2012) e fabricação de cidra, vinho e alguns destilados (MADRERA et al., 2013). Na área ambiental esta biomassa foi aplicada na remoção de chumbo (Pb) por adsorção em águas contaminadas (CHANDE; PAKADE, 2013) ou como substituto de nutrientes para produção de larvas de mariposas raras, utilizadas no controle biológico de *Cydia pomonella*, uma praga amplamente conhecida em climas tropicais, a qual atinge árvores frutíferas como pereira e mangueira (GNEPE et al., 2013). Também foi verificada a possibilidade da utilização do bagaço de maçã como nutriente em meio de fermentação, com emprego de fungos, para a produção biológica de enzimas capazes de hidrolisar a porção hemicelulósica e lignocelulósica como xilanases (WALIA et al., 2013a e b) e β -mananase (YIN et al., 2013) por fungos decompositores de madeira.

Recentemente Parmar e Rupasinghe (2013) constataram a capacidade de produção de etanol e ácido acético por *Saccharomyces cerevisiae* e *Acetobacter aceti*, respectivamente, ao utilizarem hidrolisado de bagaço de maçã, resultante de hidrólise enzimática, como meio de cultura. No caso de fermentação em estado sólido (SSF), Dhillon et al. (2012) estudaram diferentes biomassas para a produção de ácido cítrico com *Aspergillus niger*, encontrando maior produção deste ácido quando utilizado o bagaço de maçã como meio de cultivo. Estes mesmos autores, realizaram fermentação do bagaço de maçã em biorreator na obtenção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* (DHILLON et al., 2013), demonstrando assim o grande potencial biotecnológico dessa biomassa.

2.2. Utilização de Hidrolisados Hemicelulósicos em Bioprocessos

Como citado anteriormente, hidrolisados provenientes de diferentes biomassas vegetais tem sido alvo de pesquisas que buscam o desenvolvimento de tecnologias para obtenção de bioprodutos. Esses hidrolisados são provenientes da hidrólise das frações encontradas na parede vegetal dessas

biomassas, a citar celulose, hemicelulose e lignina e são obtidos por diferentes etapas hidrolíticas. Segundo Fengel e Wegener (1989), a celulose é um homopolissacarídeo linear composta por monômeros de glicose, é o principal constituinte da parede celular e representa cerca de 33% da massa total dos vegetais. Por sua vez, a lignina é uma estrutura complexa que confere proteção e rigidez à planta, formada em suma por fenóis, corresponde de 15 a 25% da biomassa, de acordo com a espécie. A fração hemicelulósica, por sua vez, é formada por uma cadeia principal de pentoses, como xilose e arabinose dentre outros, e ramificações de pentoses, hexoses, ácidos urônicos e grupos acetila dispostos irregularmente entre si e compõe 20 a 30% da parede vegetal da biomassa. Em geral esta cadeia principal pode ser formada por uma única pentose ou a combinação de duas ou mais destas (FENGEL, WEGENER 1989).

O processo de hidrólise baseia-se na quebra das moléculas formadoras da parede celular vegetal, utilizando um catalisador e buscando liberar no meio os carboidratos presentes na biomassa. Diferentes processos hidrolíticos têm sido avaliados, dentre eles estão o ácido, o alcalino, o hidrotérmico e o enzimático (CARDONA et al., 2010). A escolha do método está relacionada aos carboidratos a que se deseja utilizar como meio de cultivo. No caso de pentoses, a porção a ser hidrolisada é a hemicelulósica e para isso costuma-se empregar hidrólise utilizando ácido como catalisador, principalmente o ácido sulfúrico (ROBERTO et al., 1995; FELIPE et al., 1997a; SILVA et al., 2004). Esta fração passou a ser bastante utilizada a partir da descoberta de micro-organismos capazes de assimilar pentoses e o meio resultante é conhecido como hidrolisado hemicelulósico, constituído principalmente por pentoses e hexoses em menores quantidades (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Cardona et al (2010) ainda considera, na utilização de hidrolisados hemicelulósicos em bioprocessos, uma etapa anterior à fermentação denominada destoxificação que é destinada à remoção de compostos inibidores aos micro-organismos formados durante o processo hidrolítico, a citar, furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácidos acético, fórmico e levulínico dentre outros, conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, liberação de carboidratos e formação de tóxicos por Arruda (2011).

Com relação aos efeitos inibitórios dos compostos tóxicos há relatos na literatura associando a presença destes com o declínio do rendimento de produto final (FELIPE et al., 1997b; PEREIRA et al., 2011). O ácido acético oriundo dos grupos acetil presentes na fração hemicelulósica do bagaço, teve seu efeito inibitório estudado em meio semi-definido, dentre outros, por Felipe et al. (1995) e em hidrolisado de bagaço de cana por Silva et al. (2004) e Lima et al. (2004), estes autores afirmaram que a presença deste em concentrações superiores a $3,0 \text{ g.L}^{-1}$, interfere na produção de xilitol, podendo reduzir em cerca de 50% o rendimento do processo durante pesquisa com *Candida guilliermondii*. Felipe et al. (1995) afirmaram que este efeito poderia estar relacionado à utilização deste ácido por vias metabólicas dependentes de energia, como o ciclo do glicoxilato, o que resultaria em falta de energia para a manutenção do metabolismo da levedura. Outros autores acreditam que este efeito inibitório deve-se ao acúmulo

intracelular de ânion, quando presente em altas concentrações, resultando na diminuição do pH intracelular (PALMQVIST, HAHN-HAGERDAL; 2000).

No caso da lignina, a qual é composta por ácidos e fenóis, os efeitos tóxicos podem estar relacionados à perda da permeabilidade seletiva da membrana celular, mesmo quando presentes em baixas concentrações ($0,1\text{g.L}^{-1}$), diminuindo drasticamente a capacidade do transporte intracelular de carboidratos (PALMQVIST, HAHN-HAGERDAL; 2000).

Quanto aos inibidores provenientes da degradação de pentoses (furfural) e hexoses (5-hidroximetilfurfural) constituintes da fração hemicelulósica, estes exercem efeito inibitório por atuarem sobre enzimas como a triose fosfato desidrogenase e álcool desidrogenase mesmo presentes em baixas concentrações ($1,0\text{g.L}^{-1}$) (PALMQVIST, HAHN-HAGERDAL; 2000).

Em função da toxicidade dos hidrolisados, ao longo dos anos pesquisadores vem testando diferentes métodos de destoxificação. Marton et al. (2006), trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, avaliou a adsorção por carvão vegetal ativo obtendo redução de inibidores significativa, no entanto outros métodos já foram testados, como a adição de polímeros vegetais (ARRUDA et al., 2008), utilização de micro-organismos como agentes destoxificantes (FONSECA et al., 2011), resinas de troca iônica (CARVALHO et al., 2005) ou associação de diferentes métodos como Chaud (2010) que ao utilizar adsorção por carvão ativo e variação de pH obteve maior produção de xilitol por *C. guilliermondii*, atribuindo a este método uma maior redução de compostos fenólicos, quando comparado à destoxificação por polímeros vegetais. Métodos de custo acessível, capazes de reduzir consideravelmente a concentração dos compostos tóxicos, com uma menor perda de açúcares e interferência no processo são os mais procurados, embora não se tenha conhecimento de um método que envolva todas essas características (CARDONA et al., 2010).

A utilização de hidrolisados hemicelulósicos em bioprocessos requer também a disponibilidade de micro-organismos capazes de metabolizar principalmente pentoses, convertendo-as em diferentes bioprodutos. Nestes processos são envolvidas vias metabólicas específicas, como a via das pentoses

fosfato, com enzimas chaves, as quais possibilitam o metabolismo destes açúcares.

2.3. Metabolismo de Pentoses e Enzimas Chaves da Via das Pentoses Fosfato (PPP)

A via das pentoses fosfato é uma alternativa para o metabolismo de carboidratos, sendo utilizada tanto para degradação de pentoses como de hexoses. Na primeira parte desta via ocorre a conversão de glicose 6-P a ribulose 5-P através de duas oxidações, diminuindo o poder redutor da célula (NELSON; MICHAEL, 2008). A segunda compreende reações não oxidativas que convertem as pentoses fosfato em frutose 6-P. Pode-se utilizar do ciclo das pentoses fosfato para fins específicos de fermentação, obtendo-se nestes casos produtos como etanol e xilitol, dependendo dos micro-organismos utilizados e condições de fermentação a que estes são submetidos. (JACKSON; NICOLSON, 2002).

Nos bioprocessos envolvendo a via das pentoses fosfato, diferentes produtos podem ser obtidos, conforme pode ser observado no fluxograma proposto por Hahn-Hägerdal et al., (1994) e Fonseca et al., (2007) na Figura 3.

Figura 3 - Metabolismo de glicose, xilose e arabinose em *c. guilliermondii* baseado em Hahn-Hägerdal et al., 1994 e Fonseca et al., 2007

Fonte: Adaptado de HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; FONSECA et al., 2007

No esquema apresentado na Figura 3, verifica-se que a produção de etanol ocorre a partir da assimilação de hexoses e pentoses como a xilose e arabinose. Nesse tipo de fermentação, o NADH formado na glicólise, é recuperado (NAD^+) em uma reação de oxidação pela atuação da enzima álcool desidrogenase (ADH), formando o etanol. Este encontrado em fermentação de hidrolisado contendo estes açúcares (CANILHA et al., 2010). Já o xilitol é um intermediário da assimilação de pentoses que ocorre na maioria das leveduras e fungos filamentosos pela ausência da enzima xilose isomerase. A xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR), e a seguir é oxidado em xilulose, pela xilitol desidrogenase (XDH). A xilulose formada é fosforilada a xilulose 5-P que pode ser convertida, na via das Pentoses Fosfato, a piruvato, produto final da via Glicolítica (SILVA et al., 1998).

A xilose redutase (XR) e a xilitol desidrogenase (XDH) são enzimas chaves que auxiliam na compreensão do metabolismo da xilose, por micro-organismos. Em geral são enzimas não constitutivas às quais são induzidas pela presença do substrato e reguladas por feedback negativo (WEBB; LEE, 1992). No caso da XR sua indução ocorre pela presença de xilose e esta é inibida quando há alta concentração intracelular de xilitol, enquanto a XDH é induzida pela presença de

xilitol e inibida em altas concentrações de xilulose (WEBB; LEE, 1992). Essas enzimas são dependentes de cofatores NADH e NAD⁺, seja este na sua forma fosforilada ou não (NADPH ou NADP⁺). Desta forma o metabolismo da xilose em leveduras opera em um ciclo fechado e coordenado assegurando a geração de NADPH necessários para a conversão de xilose em xilitol. As leveduras catabolizam uma quantidade de xilitol suficiente para produzir glicose-6-fosfato (G6P) necessário para a regeneração de NADPH e manutenção do ciclo (SILVA et al.; 1996). Yablochkova et al. (2003) afirmaram que a dependência do tipo de cofator da XR pode afetar a proporção entre as quantidades produzidas de xilitol e xilulose, baseando-se no fato de que micro-organismos cuja XR era específica tanto para NADH quanto para NADPH produziram xilitol e etanol em quantidades comparáveis, enquanto as leveduras cuja XR tinha maior especificidade por NADH que NADPH produziram maiores concentrações de etanol.

Além da especificidade do cofator, a produção de etanol ou xilitol por parte de uma levedura em um determinado bioprocessamento requer condições específicas de cultivo e micro-organismos capazes de expressar, naturalmente ou não, as enzimas necessárias a estes processos metabólicos (YABLOCHKOVA et al.; 2004). Trabalhos anteriores, utilizando *Pichia stipitis* relataram o favorecimento da produção de etanol em meio de cultivo contendo hidrolisado hemicelulósico suplementado com nutrientes em condições de pH inicial 5,5, a 30°C em shaker rotatório 200rpm (VICENTE et al., 2012). Para o xilitol há uma vasta pesquisa que estabelece condições de cultivo para *Candida guilliermondii* com suplementação inicial do hidrolisado com solução de extrato de farelo de arroz (CHAUD et al., 2009), concentração de xilose acima de 50g/L (RODRIGUES et al., 2003), temperatura, pH e agitação semelhantes aos citados anteriormente para etanol (FELIPE et al., 1997b; MUSSATO et al., 2006; CANILHA et al., 2006) . Estas condições são utilizadas tanto para frascos agitados, como para reatores (CANILHA et al., 2003) incluindo reatores de escala industrial (ARRUDA, 2011). Tais condições são baseadas na natureza do micro-organismo e principalmente nas condições ótimas de atuação das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) (BARBOSA et al., 1988).

Quanto à escolha do micro-organismo, existe uma vasta pesquisa mostrando o emprego de *Candida guilliermondii* na produção de xilitol em

hidrolisados hemicelulósicos (ROBERTO et al, 1991; FELIPE et al, 1997a; LIMA et al., 2004; GURPILHARES et al, 2009). Esta levedura é capaz de produzir naturalmente essas enzimas. (SILVA et al., 1996). No caso da levedura *Kluyveromyces marxianus*, não tão pesquisada quanto *C. guilliermondii*, pesquisas demonstram a capacidade desta, em expressar naturalmente as enzimas XR e XDH (YABLOCHKOVA et al., 2003) e produzir etanol (SILVA et al., 2013) ou xilitol (SILVA et al., 2014).

2.4. Micro-organismos

2.4.1. *Candida guilliermondii*

Candida guilliermondii, também conhecida por *Meyerozyma guilliermondii*, é pertencente aos *Ascomycetes* e tem sido estudada ao longo dos últimos 40 anos devido ao seu potencial biotecnológico, de controle biológico e importância clínica (PAPON et al., 2013). Estes mesmos autores afirmaram que parte de toda a versatilidade industrial dessa levedura deve-se a alta adaptabilidade e capacidade de resistência relatada ao gênero, e está ainda entre as espécies de leveduras capazes de utilizar *n*-alcanos como única fonte de carbono para obter energia sendo assim capaz de produzir *single-cell protein* a partir de hidrocarbonetos.

O potencial desta levedura na produção de xilitol em diferentes hidrolisados hemicelulósicos é conhecido há algum tempo, sendo este um micro-organismo utilizado no reaproveitamento de biomassas como bagaço de cana-de-açúcar (ROBERTO et al., 1991), palha de arroz (ROBERTO et al., 1995), casca de aveia (CANILHA et al., 2006), biomassa de sorgo (SENE et al., 2011) e sabugo de milho (PING et al., 2013).

Mussato et al. (2006) ao estudarem o comportamento de *Candida guilliermondii* durante fermentação em meio sintético contendo uma mistura de fontes de carbono de glicose, xilose e arabinose, demonstraram que esta levedura assimila concomitantemente glicose e xilose. Segundo estes autores a

glicose é utilizada como fonte energética para crescimento celular enquanto a xilose é desviada para a produção de xitol e manutenção celular quando há ausência de glicose; no entanto, a arabinose foi assimilada pela levedura apenas quando não havia presente no meio outra fonte de carbono. Porém, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, *C. guilliermondii* demonstrou habilidade em degradar arabinose lentamente, mesmo na presença de baixas concentrações das demais fontes de carbono (ARRUDA, 2011).

A capacidade que este micro-organismo possui em metabolizar diferentes fontes de carbono e a ampla pesquisa deste em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas torna *C. guilliermondii* um potente micro-organismo a ser testado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

2.4.2. *Kluyveromyces marxianus*

Dentre as leveduras não convencionais com potencial para aplicações industriais estão aquelas que pertencem ao gênero *Kluyveromyces* (FONSECA et al., 2008). No caso da *Kluyveromyces marxianus*, esta é descrita como uma levedura ascomiceta, homotálica, filogeneticamente relacionada à *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* (LORENTE et al., 2000). Entre outras características esta levedura utiliza uma vasta gama de substratos que incluem xilose e arabinose, e é termotolerante, podendo crescer em temperaturas que variam entre 25 e 45°C (BANAT et al., 1992; WILKINS et al., 2008; MATZUSAKI et al., 2012). De acordo com Castro (2011) existem linhagens de *K. marxianus* capazes de produzir etanol em temperaturas acima de 40°C e com temperatura máxima de crescimento a 47°C, 49°C e até 52°C. Apesar de tolerar temperaturas acima de 52°C, segundo Lark et al (1997), esta levedura apresentou melhor desempenho quanto à produção de etanol a partir de glicose quando cultivada a 30°C.

Essa é uma levedura muito versátil e que poderia ser explorada economicamente para uma grande variedade de aplicações como a produção de etanol, proteína, bioingredientes entre outros (ZHANG et al., 2006; KANG et al., 2012). Diferentes aplicações biotecnológicas têm sido investigadas utilizando

K.marxianus incluindo a produção de enzimas (β -galactosidase, β -glicosidase, inulinase e poligalacturonases) e oligonucleotídeos (empregados como realçadores de sabor). Além destas aplicações, sua biomassa celular tem sido utilizada como aditivo de rações para animais (*single-cell protein*) e na biorremediação de efluentes da indústria de laticínios (FONSECA et al., 2008).

Ainda sobre a versatilidade desta levedura, Silva et al (2014) obtiveram etanol como produto do cultivo desta levedura em hidrolisado celulósico de bagaço de cana e xilitol quando utilizado hidrolisado hemicelulósico como meio de cultivo, assim demonstrando a importância biotecnológica desta levedura em diferentes meios de cultivo, o que a faz um importante micro-organismo a ser utilizado em processos fermentativos que se utilizam de meios de cultivo ainda não testados, como é o caso do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã no presente estudo.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Avaliar o aproveitamento do bagaço de maçã como matéria-prima em bioprocessos a partir do estudo da fermentabilidade do hidrolisado resultante de sua fração hemicelulósica pelas leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus*.

3.1.1. Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente o bagaço de maçã;
- Obter, caracterizar, concentrar e destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã;
- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã por *Kluyveromyces marxianus* e *Candida guilliermondii*;
- Determinar os parâmetros fermentativos durante o cultivo das duas leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã;
- Determinar atividade enzimática de xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) das leveduras *K. marxianus* e *C. guilliermondii* cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Fermentação do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP). O bagaço de maçã utilizado neste trabalho foi cedido pela indústria de sucos Fischer Fraiburgo situada na cidade de Fraiburgo/SC, este foi seco e armazenado em temperatura ambiente.

4.1. Determinação do teor de umidade do bagaço de maçã

O teor de umidade do bagaço de maçã foi determinado a 105°C em termobalança BEL modelo Top Ray de acordo com as instruções do fabricante.

4.2. Caracterização química do bagaço de maçã

A caracterização química do bagaço de maçã foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida para bagaço de cana desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

Primeiramente o bagaço de maçã passou por processo extrativo via soxlet, posteriormente foi moído e peneirado (20 “mesh”). Transferiu-se 2 g do material para béquer, adicionou-se 10 ml de H₂SO₄ 72% (p/p) e manteve-se em banho-maria (45°C) sob agitação contínua por 7 minutos. Interrompeu-se a reação adicionando-se 225mL de água destilada e transferindo-se os conteúdos para frascos Erlenmeyer (500mL). Estes frascos foram autoclavados a 121°C, 1 atm por 30 minutos. Após resfriados foram filtradas em papel de filtro qualitativo em balões volumétricos de 500 mL tendo o volume completado com água destilada. As porcentagens de celulose e hemicelulose presentes na fração líquida do material foram determinadas segundo as equações 1 e 2, respectivamente levando-se em consideração as concentrações de glicose, xilose e arabinose determinadas em cromatografia líquida (HPLC).

$$\%celulose = \frac{C_{gli} * 50}{ma * ps(\%)} * 0,9 * 1,055 * 100 \quad (1)$$

$$\%hemicelulose = \frac{(C_{xil} * 50 + C_{ara} * 50)}{ma * ps(\%)} * 0,88 * 1,155 * 100 \quad (2)$$

onde:

C_{gli} =concentração de glicose (g/L)

C_{xil} = concentração de xilose (g/L)

C_{ara} = concentração de arabinose (g/L)

ma =massa da amostra seca (g)

ps =percentual de massa seca (%)

A lignina insolúvel foi obtida de acordo com o método Klason modificado por Rocha (2000). A relação entre o peso do resíduo e o peso inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina insolúvel presente no bagaço de maçã (Equação 3).

$$\%lignina\text{insolúvel} = \frac{mk - mc}{ma} * 100 \quad (3)$$

onde:

mk =massa de lignina insolúvel seca;

mc =massa de resíduo mineral (cinzas);

ma =massa da amostra seca.

A lignina solúvel foi determinada diluindo-se 5 mL da fração líquida do material em balão volumétrico, (100 mL) posteriormente alcalinizada com 40 gotas de solução de NaOH 6,5N e analisada em espectroscopia de UV (espectrofotômetro Beckman DU 840) a um comprimento de onda de 280 nm. Finalmente calculou-se de acordo com as Equações 4 e 5.

$$[Conc.ligninasolúvel] = \frac{A_{280T} - A_{pd280}}{\varepsilon_{lignina}} \quad (4)$$

$$A_{pd280} = (C_{furf} * \varepsilon_{furf}) + (C_{HMF} * \varepsilon_{HMF}) \quad (5)$$

onde:

A_t - absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação, em 280 nm;

A_{pd280} – absorbância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), cujas concentrações C_{Furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por HPLC e ε_{Furf} , ε_{HMF} e $\varepsilon_{lignina}$ são as absortividades e valem, respectivamente, 146,85, 114,00 e 18,69 L/g.cm.

O teor de resíduo mineral (cinzas) foi determinado pesando-se cerca de 1 grama de bagaço seco em cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em mufla elétrica a 800°C por 2h, posteriormente os cadinhos foram transferidos para dessecador durante 50 minutos. A porcentagem de cinzas presente no bagaço foi determinada correlacionando a diferença de peso da amostra, antes e após a incineração, de acordo com a Equação 6.

$$\%Cinzas = \frac{mc * 100}{ma} \quad (6)$$

onde:

mc =massa de resíduo mineral (cinzas) (g);

ma =massa da amostra seca (g).

4.3. Hidrólise do Bagaço de Maçã

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã foi obtido baseando-se na metodologia estabelecida por Pessoa Júnior et al. (1997) para bagaço de cana,

com temperatura modificada. A hidrólise ocorreu em reator de aço inoxidável com capacidade total de 40L localizado no Departamento de Biotecnologia (DEBIQ), empregando-se 100 mg de H_2SO_4 por grama de matéria seca (relação sólido-líquido de 1:10), temperatura de 121°C, durante 20 minutos. Calculou-se a eficiência de hidrólise correlacionando as concentrações de xilose e arabinose obtidos durante a caracterização da biomassa com as concentrações obtidas pela hidrólise aqui empregada. Posteriormente o hidrolisado foi filtrado, concentrado a vácuo 4 vezes (FC=4) a fim de aumentar as concentrações dos açúcares presentes, e armazenado em câmara fria a 4°C.(RODRIGUES et al., 2003).

4.4. Destoxificação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

A destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã concentrado foi realizada anteriormente a cada processo fermentativo, ajustando-se o pH inicial do hidrolisado para 7,0 com CaO, seguido de sua redução para 2,5 com H_3PO_4 e submetendo o hidrolisado à adsorção de carvão vegetal ativo (1% p/v) em frascos Erlenmeyer agitados a 100 rpm, 60°C, por 30 minutos de acordo com metodologia estabelecida por Marton et al., (2006) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Após cada etapa, o hidrolisado foi filtrado a vácuo com papel filtro e ao final do processo seu pH foi ajustado para 5,5 com NaOH micropérolas.

4.5. Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

Ensaio fermentativos foram realizados empregando-se as leveduras *Candida guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al (1988) para bioconversão de xilose a xilitol, e *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 cedida pelo Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE - Cascavel/PR). Ambas as leveduras são mantidas em ultrafreezer (-80°C) no Departamento de Biotecnologia (DEBIQ).

4.5.1. Preparo do Inóculo

Cada inóculo foi obtido por cultivo das leveduras em meio semissintético contendo (g.L^{-1}): xilose (30,0); sulfato de amônio (2,0), cloreto de cálcio (0,1) e extrato de farelo de arroz (20,0), em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio, com agitação de 200rpm, a 30°C, pH 5,5 por 24 horas.

As soluções estoques de sulfato de amônio e cloreto de cálcio foram preparadas separadamente nas concentrações de 250 e 50 g.L^{-1} , respectivamente, e esterilizadas a 1 atm por 20 minutos. A solução de extrato de farelo de arroz foi obtida empregando-se 200 g de farelo para um volume de 1 L de água destilada, autoclavado por 15 minutos a 0,5 atm e centrifugado por 30 minutos em condições assépticas a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division), assim utilizando apenas o sobrenadante (solução de extrato de farelo de arroz).

4.5.2. Meio e Condições de Fermentação

A fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã foi avaliada a partir de ensaios empregando-se hidrolisado destoxificado (item 4.4) e suplementado com sulfato de amônio (2 g.L^{-1}), cloreto de cálcio (0,1 g.L^{-1}) e solução de extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}) empregando-se uma concentração celular inicial de aproximadamente 1,0 g.L^{-1} em frascos Erlenmeyer (125 mL) com 50 mL de meio, pH inicial 5,5 em shaker rotatório com agitação de 200rpm a 30°C (FELIPE et al., 1997a). Foram coletadas amostras regularmente durante o processo, sendo em intervalos de 6 horas nas primeiras 12 horas de cultivo e intervalos de 24 horas (a contar do tempo inicial) finalizando o processo em 96 horas.

Essas amostras foram analisadas quanto a concentração celular, pH, concentração e consumo de açúcares, produção de etanol e xilitol. As células foram armazenadas a -4°C em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,2 para posterior análise da atividade das enzimas XR e XDH.

4.5.3. Métodos Analíticos

4.5.3.1. Determinação da Concentração de Açúcares Metabolitos e Compostos Tóxicos

As concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e bioproductos (etanol e xilitol) assim como ácido acético, foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em aparelho Shimadzu LC - 10AD (Kyoto, Japão) em coluna Aminex HPX87H e detector RID segundo condições estabelecidas por Rodrigues et al. (2003). Estas amostras foram previamente filtradas em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak (C18 - Waters).

Quanto à determinação da concentração dos compostos tóxicos (furfural e 5-HMF) as amostras foram filtradas em membrana milipore (0,45µm) e posteriormente analisadas por cromatografia líquida (HPLC) empregando-se coluna C18 com detector UV (RODRIGUES et al., 2001).

4.5.3.2. Viabilidade das Culturas e Morfologia Celular

A viabilidade das culturas e morfologia celular foi verificada por microscopia óptica em microscópio óptico digital binocular (LABO), equipado com câmera digital, em lâminas preparadas a fresco, onde as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO et al., 1992). A concentração celular (g.L^{-1}) foi determinada por turbidimetria a 600 nm e calculada utilizando-se uma curva padrão pré definida, correlacionando a absorbância a 600 nm e a massa seca das células obtidas de um cultivo em meio semi-sintético contendo xilose como fonte de carbono por 24h.

4.6. Determinação das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH)

A determinação das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) foi realizada segundo Gurpilhares et al. (2009), como será descrito a seguir.

4.6.1. Rompimento Celular

As amostras estocadas a -4°C foram descongeladas lentamente a temperatura ambiente. Posteriormente ajustou-se a concentração celular inicial destas amostras em 12g.L^{-1} com tampão fosfato de potássio (0,1M) pH 7,2. Rompeu-se as células agitando-as em vortex com micropérolas de vidro (uma parte de micropérolas para uma parte de solução celular) durante 1 minuto, transferindo imediatamente ao gelo durante 30 segundos, repetindo o processo por 5 vezes. Estas foram centrifugadas em centrífuga refrigerada a 10.000 rpm, 4°C por 10 minutos, recolhendo-se o sobrenadante para determinação de XR, XDH e proteína solúvel..

4.6.2. Determinação das Atividades Enzimáticas

Para determinação da atividade específica de XR foi preparado um meio padrão de reação, contendo tampão fosfato de potássio 1M pH 8,0 (80 μL), β -mercaptoetanol 0,1M (150 μL), xilose 0,5M (200 μL), NADPH 1,2mM (100 μL), água destilada (570 μL) e extrato enzimático (200 μL). No caso da XDH, o meio padrão de reação continha água destilada (550 μL), tampão Tris-HCL 0,5M (200 μL), β -mercaptoetanol 0,1M (150 μL), NAD^{+} 1,26mM (150 μL), xilitol 0,5M (150 μL) e extrato enzimático (100 μL).

A atividade de XR foi determinada medindo-se o decréscimo da absorbância a 340 nm decorrente da oxidação do NADPH, empregando-se xilose

como substrato. A atividade de XDH foi determinada acompanhando-se o aumento da absorbância a 340nm decorrente da redução do NAD^+ utilizando-se xilitol como substrato

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução/oxidação de 1 μmol de cofator por minuto a temperatura ambiente, utilizando-se o coeficiente de extinção molar para cofatores NADPH e NAD^+ de $6220\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. As atividades específicas foram expressas em $\text{U}/\text{mg}_{\text{prot}}$.

4.6.3. Determinação de Proteína Solúvel

A determinação da concentração de proteína no extrato livre de células foi realizada conforme o método de Bradford (1976), empregando-se albumina bovina cristalizada (BSA) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Comassie G-250) como corante. A atividade específica das enzimas, medida em $\text{U}/\text{mg}_{\text{prot}}$ foi calculada dividindo-se o valor encontrado para as velocidades (ou atividades em U/ml) pelo valor de proteínas totais (Bradford – $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Este valor foi determinado adicionando-se 100 μL do extrato enzimático a 5 mL do reagente de Bradford, fazendo a leitura em espectrofotômetro a 595nm.

4.7. Determinação dos Parâmetros Fermentativos

4.7.1. Fator de Conversão de Substrato em Produto ($Y_{(P/S)}$)

O fator de conversão foi calculado correlacionando a massa (g) de xilitol produzida e a massa (g) de xilose consumido conforme Equação 10:

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (10)$$

onde:

Si e Sf correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g.L^{-1});

Pi e Pf correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g.L^{-1}).

4.7.2. Produtividade Volumétrica de Produto (QP)

A produtividade volumétrica foi calculada correlacionando a concentração de produto produzido (g.L^{-1}) por tempo (h), conforme a Equação 11.

$$Q_P = \frac{\Delta_P}{\Delta_t} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i} \quad (11)$$

onde:

Pi e Pf correspondem às concentrações inicial e final do produto (g.L^{-1});

Ti e Tf correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

4.7.3 Eficiência da Fermentação (η)

A eficiência da fermentação em porcentagem foi calculada correlacionando o rendimento de xilitol durante a fermentação com o rendimento teórico ($0,917\text{g.g}^{-1}$) (BARBOSA et al.,1988) de acordo com a Equação 12.

$$\eta = \frac{Yp/s_{exp}}{Yp/s_{teo}} \times 100 \quad (12)$$

onde:

Yp/s_{exp} e Yp/s_{teo} correspondem aos rendimentos experimental e teórico ($g.g^{-1}$), respectivamente.

4.7.4. Velocidade Volumétrica de Crescimento (r_x)

A velocidade volumétrica de crescimento expressa a taxa de formação de biomassa celular em função do tempo, é expressa em $gL^{-1}h^{-1}$ e calculada de acordo com a Equação 13.

$$r_X = \frac{\Delta X}{\Delta T} = \frac{X_F - X_I}{T_F - T_I} \quad (13)$$

onde:

X_F e X_I correspondem às concentrações final e inicial de biomassa celular (gL^{-1}), respectivamente.

T_F e T_I correspondem ao tempo final e inicial (h), respectivamente.

4.7.5. Velocidade Volumétrica de Consumo de Açúcares (r_s)

A velocidade volumétrica de consumo de açúcares baseia-se no consumo de açúcar em função do tempo e é expressa em $gL^{-1}h^{-1}$ e calculada de acordo com a Equação 14.

$$r_S = \frac{\Delta S}{\Delta T} = \frac{S_I - S_F}{T_F - T_I} \quad (14)$$

onde:

S_I e S_F correspondem às concentrações inicial e final de açúcar (gL^{-1}), respectivamente.

T_F e T_I correspondem ao tempo final e inicial (h), respectivamente.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do Bagaço de Maçã

O bagaço de maçã *in natura* foi caracterizado quanto à sua composição química, encontrando-se valores de 32,62; 23,60; 25,38; 0,14 e 17,67% para celulose, hemicelulose, lignina, resíduo mineral (cinzas) e extrativos respectivamente, conforme mostrados na Tabela 2. Considerando os valores encontrados neste trabalho em relação a outras biomassas (Tabela 2) tem-se que os percentuais das frações de celulose e hemicelulose, correspondentes aos carboidratos constituintes do bagaço de maçã, são comparáveis a outros no que se refere a maior quantidade de celulose em relação à hemicelulose a exemplo do bagaço de cana-de-açúcar (GOUVEIA et al., 2009), biomassa de sorgo (VARIZ, 2011) e palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002). No caso do bagaço de maçã não foram encontrados valores referentes na literatura pesquisada.

Tabela 2 - Composição química do bagaço de maçã e de diferentes biomassas.

Matéria-Prima	(%)			Resíduo mineral (cinzas)	Referência
	Celulose	Hemicelulose	Lignina		
Bagaço de Maçã	32,62	23,60	25,38	0,14	Presente trabalho
Bagaço de Cana	42,8	25,8	22,1	1,4	Gouveia et al., 2009
Bagaço de Malte	16,8	28,4	27,8	4,6	Dragone, 2007
Biomassa de Sorgo	39,5	27,9	23,1	5,5	Variz, 2011
Casca de Aveia	29,3	28,4	22,2	17,2	Tamanini et al., 2004
Palha de Arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussato; Roberto, 2002
Palha de Cevada	38,6	21,4	19,9	9,5	Moraes, 2008
Palha de Trigo	33,8	31,8	20,1	7,0	Canilha et al., 2006

Nota-se na Tabela 2, que o bagaço de maçã apresenta maior teor de lignina em relação à hemicelulose, diferente das demais biomassas aqui apresentadas. No caso das outras biomassas presentes na Tabela 2, a literatura apresenta valores que variam entre 30 e 45% de celulose, 20 e 30% de hemicelulose, 15 e 25% de lignina e menos que 10% de constituintes menores ou Resíduo mineral (cinzas) (FENGEL, WEGENER 1989). Nota-se ainda, que no bagaço de maçã o teor de Resíduo mineral (cinzas) é inferior às demais biomassas, o que provavelmente está relacionado ao processo de extração do suco de maçã, uma vez que o Resíduo mineral (cinzas) representa os constituintes minerais e vitamínicos da planta (BRITO, BARRICHELLO, 1982). Este processo é otimizado de modo a extrair maior quantidade de vitaminas e minerais presentes no fruto, enriquecendo assim o suco e diminuindo a concentração destes no bagaço¹ (informação verbal).

5.2. Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã com Relação aos Teores de Açúcares e Compostos Tóxicos

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã resultante da hidrólise ácida, cuja eficiência de hidrólise obtida foi de 84,92%, foi caracterizado quanto aos teores de seus principais constituintes, açúcares (hexose e pentoses) e compostos inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural) (Tabela 3). É importante ressaltar que a eficiência de hidrólise apresentada pela metodologia utilizada neste trabalho pode ser considerada satisfatória, uma vez que as condições de hidrólise empregadas foram estabelecidas para o bagaço de cana-de-açúcar (PESSOA JUNIOR et al., 1997) e palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Com relação aos teores de carboidratos, verifica-se na Tabela 3 que a xilose representa 42,73% da concentração dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), enquanto para arabinose e glicose estes valores foram 30,60% 26,67% respectivamente.

¹ Informação fornecida por Hudson Couto do Amparo, responsável químico pela empresa de sucos Fischer Juice Fraiburgo em visita à empresa, 02/2013.

Tabela 3: Principais açúcares e compostos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas.

Matéria-Prima	(g.L⁻¹)					Ácido Acético	Referência
	Xilose	Glicose	Arabinose	Furfural	5-HMF		
Bagaço de maçã	11,10	6,93	7,85	0,30	0,15	1,36	Presente Trabalho
Bagaço de Cana	15,73	1,82	1,45	0,19	0,02	2,31	Arruda et al., 2011
Palha de Sorgo	17,69	2,1	1,81	0,04	1,56	1,87	Sene et al., 2011
Biomassa de Sorgo	17,22	6,26	3,48	0,13	0,56	2,23	Variz, 2011
Palha de Trigo	15,4	4,4	2,2	0,53	0,09	1,20	Canilha et al., 2006
Palha de Arroz	18,33	3,29	3,40	0,10	0,17	1,05	Mussato; Roberto, 2002

É importante ressaltar que hidrolisados hemicelulósicos de biomassas diversas, obtidos por hidrólise ácida, apresentam maiores concentrações de xilose em relação aos demais açúcares. No hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã, esta pentose representa 42,73%, enquanto no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana representa 82,72% dos açúcares presentes e 73,26% no hidrolisado de palha de arroz (Tabela 3) (ARRUDA, 2011; MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Quanto à outra pentose, arabinose, verifica-se na Tabela 3 que o seu teor (30,60%) em relação à concentração total de açúcares encontrado no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã foi superior ao encontrado em outros hidrolisados hemicelulósicos, como de bagaço de cana e palha de arroz (7,63 e 13,58% respectivamente). Semelhante a arabinose, a glicose também se encontra em concentrações superiores no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã quando comparado aos demais hidrolisados apresentados na Tabela 3, sendo esta 26,67% da concentração total de açúcares, enquanto para cana-de-

açúcar e palha de arroz são 9,58 e 13,14%, respectivamente (ARRUDA, 2011 e MUSSATO; ROBERTO, 2002). Esta diferença provavelmente ocorre devido à diferença da formação da cadeia principal da fração hemicelulósica, uma vez que a alta concentração de arabinose presente nesse hidrolisado sugere uma cadeia formada tanto por xilose quanto por arabinose, enquanto nas biomassas com menores teores de arabinose, esta é composta principalmente por xilose com ramificações de arabinose (FENGEL, WEGENER, 1989).

Com relação às concentrações dos compostos tóxicos oriundos do processo avaliados (furfural e hidroximetilfurfural – 5-HMF e ácido acético), apresentados ainda na Tabela 3, nota-se a presença de maior concentração de ácido acético ($1,36\text{g.L}^{-1}$), seguido de furfural ($0,30\text{g.L}^{-1}$) e hidroximetilfurfural ($0,15\text{g.L}^{-1}$). Estes tóxicos também foram encontrados nos demais hidrolisados hemicelulósicos apresentados na Tabela 3, obtidos por hidrólise ácida, sendo que a concentração de furfural presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã é inferior ao apresentado por Canilha et al. (2006) em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, porém superior ao encontrado na demais biomassas apresentadas. No caso do hidroximetilfurfural ($0,15\text{g.L}^{-1}$), este se encontra em menor concentração quando comparado aos hidrolisados hemicelulósicos das demais biomassas apresentadas na Tabela 3, exceto bagaço de cana (ARRUDA et al., 2011) e palha de trigo (CANILHA et al., 2006), enquanto para o ácido acético sua concentração é superior apenas à presente nos hidrolisados hemicelulósicos de palhas de trigo (CANILHA et al., 2006) e arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002). Com relação aos fenóis totais, estes não foram quantificados em função da ausência de reprodutibilidade dos resultados obtidos nas metodologias empregadas.

Considerando a utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã (Figura 4a) em processo de bioconversão em função da sua quantidade de açúcares e a presença de compostos inibidores à atividade microbiana, este foi submetido à concentração a vácuo (Figura 4b) para aumentar o teor dos açúcares e destoxificação (Figura 4c) por ajuste de pH e adsorção em carvão ativo para a redução do teor de tóxicos, cujos dados se encontram na Tabela 4.

Figura 4 - Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã original (a), concentrado (b) e concentrado destoxificado (c).

Fonte: Arquivo pessoal

Nota-se nesta Tabela o aumento do teor de açúcares em torno de 3,6 vezes durante o processo de concentração, diferente ao fator de concentração empregado ($FC=4$), enquanto para os compostos tóxicos, ácido acético e hidroximetilfurfural, houve aumento da concentração durante este processo, sendo 56,20% para acético e 38,46% para hidroximetilfurfural. No caso do furfural, este teve sua concentração diminuída em 36,67%. O aumento destes tóxicos foi relatado anteriormente durante concentração em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (ARRUDA et al., 2011) e palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002). Nota-se ainda que o aumento destes compostos não foi proporcional ao fator de concentração, o que alguns autores atribuem ao fato de estes serem altamente voláteis (CHAUD, 2010; ARRUDA, 2011).

Tabela 4 - Concentração de açúcares, ácido acético e inibidores (g.L⁻¹) no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã original (HHBM), concentrado (HHBMC) e destoxificado 1 (HHBMD1) e 2 (HHBMD2).

	HHBM	HHBMC	HHBMD1*	HHBMD2**
Celobiose	1,62	6,556	6,762	6,69
Glicose	6,93	25,18	20,02	20,96
Xilose	11,10	39,28	27,37	31,54
Arabinose	7,95	29,84	17,23	22,60
Ácido Acético	1.36	2.42	1.72	2.42
Furfural	0,30	0,11	0,02	0,03
5-HMF	0,15	0,39	0,08	0,11

*HHBM utilizado em processo fermentativo com *C. guilliermondii*

**HHBM utilizado em processo fermentativo com *K. marxianus*

Quanto à etapa de destoxificação (Tabela 4), verifica-se que este procedimento resultou em perda média de 72,98% dos tóxicos presentes, porém também proporcionou perda de açúcares, sendo em média 18,63% de glicose, 25,01% de xilose e 33,36% de arabinose, respectivamente. Esta perda de açúcares pode ocorrer devido à baixa especificidade do carvão ativo empregado neste procedimento em função da precipitação dos compostos tóxicos, parte do açúcar presente é também precipitado e assim, retido durante a filtração em papel de filtro (CHAUD, 2010). Uma vez que esta perda está relacionada ao método de destoxificação escolhido, e que diferentes métodos já foram pesquisados e utilizados, demonstra-se uma necessidade em testar diferentes métodos ou adequar o já utilizado a essa biomassa.

A redução de quantidades de açúcares após o processo de destoxificação em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas foi relatada em pesquisas anteriores. Arruda et al. (2008) utilizando processo de destoxificação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana também por adsorção em carvão ativo relatou perda de 67,2% da glicose e aproximadamente 9% da xilose presente no meio. Embora estas perdas tenham sido relatadas também em diferentes biomassas como sorgo (Variz 2011) e palha de trigo (CANILHA et al., 2006), Mussato e Roberto (2004) utilizaram processo semelhante e não relataram

perda significativa na concentração de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sendo esta considerada menor que 5%.

O procedimento de concentração e destoxificação foi então empregado no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã anterior a utilização deste na formulação dos meios de cultivo e uma vez que foram realizados anteriormente a cada experimento nota-se, na Tabela 4, valores diferentes em relação aos teores de seus compostos, como açúcares e tóxicos. Alguns autores já haviam reportado tal fato, e o atribuíram à baixa especificidade de adsorção do carvão vegetal ativo (MUSSATTO; ROBERTO, 1988; CHAUD, 2010 e VARIZ, 2011).

Embora as concentrações dos compostos tóxicos tenham sido diferentes entre os hidrolisados hemicelulósicos utilizados como meios de cultivo para as diferentes leveduras, os valores encontrados mostram-se inferiores aos reportados em trabalhos anteriores como tóxicos para a levedura *C. guilliermondii*. Converte et al. (2000) determinaram como inibitório valores de furfural acima de $0,62\text{g.L}^{-1}$ em meio semissintético, enquanto Mussato et al. (2005) reportaram esses valores sendo 0,66 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. Já para a levedura *K. marxianus*, Oliva et al (2003) reportaram valores de furfural acima de 2g.L^{-1} como sendo tóxico a esta levedura.

Quanto às concentrações inibitórias de hidroximetilfurfural, Sanchez e Bautista (1988) determinaram esta como sendo superior a $2,0\text{g.L}^{-1}$ para *C. guilliermondii* em meio sintético. Não foram encontrados valores referentes a concentrações deste inibidor em hidrolisados hemicelulósicos, uma vez que este é proveniente da degradação de hexoses e estes açúcares estão presentes em baixas quantidades nos hidrolisados desta natureza encontrados na literatura.

5.3. Avaliação da Fermentabilidade do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã por *Candida guilliermondii* e *Kluymeromyces marxianus*

O desempenho fermentativo de *C. guilliermondii* e *K. marxianus* cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã concentrado e destoxificado foi avaliado em função do consumo de açúcares, formação de biomassa celular e

dos bioprodutos xilitol e etanol. Também foram determinadas as atividades das principais enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), a serem apresentadas nesta seção.

5.3.1. Consumo de Açúcares por *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

O consumo de açúcares por *C. guilliermondii* e *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã é apresentado na Figura 5 a e b, respectivamente. Verifica-se nesta Figura que ambas as leveduras consumiram totalmente a glicose nas primeiras 12 horas de cultivo, enquanto que para as pentoses, xilose e arabinose, este consumo foi parcial, encontrando-se maior consumo de xilose em relação à arabinose. Nota-se ainda que no caso da xilose o consumo foi favorecido com a utilização de *C. guilliermondii* em relação *K. marxianus*, cujos valores foram de 88,44 e 75,92%, respectivamente.

Figura 5: Consumo de glicose (■), xilose (◆) e arabinose (▲) durante o cultivo de *C. guilliermondii* (a) e *K. marxianus* (b) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã

Fonte:Arquivo pessoal

No caso da arabinose, ainda na Figura 5, verifica-se que para *C. guilliermondii*, seu consumo foi constante e lento, durante toda a fermentação, (Figura 5a), enquanto para *K. marxianus* (Figura 5b) este ocorreu somente após 72 horas de cultivo, juntamente com o decréscimo de xilose. Por outro lado, ao final do cultivo o consumo de arabinose por estas leveduras não foi muito diferente, já que este foi de 33,74 e 35,38% para *C. guilliermondii* e *K. marxianus* respectivamente.

Trabalhos anteriores utilizando diferentes hidrolisados hemicelulósicos como meio de cultivo para *C. guilliermondii*, demonstraram além do consumo concomitante entre glicose e xilose, o consumo parcial e lento de arabinose por este micro-organismo (ROBERTO et al., 1995; FELIPE et al., 1997a; TAMANINI et al., 2004). Silva et al. (2014) observaram o mesmo comportamento para *K. marxianus* ATCC36907 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, afirmando a capacidade desta levedura em consumir concomitantemente glicose e xilose, no entanto estes autores não observaram assimilação de arabinose.

Nota-se ainda na Figura 5, um decréscimo no consumo da xilose a partir de 48 horas de processo por parte da levedura *C. guilliermondii*, ponto coincidente ao consumo lento, indicando uma provável supressão de nutrientes no meio, fato este que também pode ser observado para a *K. marxianus* porém a partir de 24 horas de processo.

Quando observada a velocidade volumétrica de consumo de xilose nas primeiras 6 horas de processo, a levedura *C. guilliermondii* apresenta velocidade de $0,70\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, valor este superior ao encontrado para *K. marxianus* ($0,35\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Neste mesmo período também ocorreu consumo de glicose sendo que a velocidade volumétrica de consumo para esta hexose foi de $2,16\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para *C. guilliermondii* esta superior a encontrada para *K. marxianus* ($1,00\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). o que poderia indicar uma maior capacidade de adaptação da primeira levedura em relação a segunda no meio hidrolisado. Além disso, Fonseca et al (2013) ao estudarem o comportamento de *K. marxianus* em meios sintéticos com diferentes fontes de carbono, isoladas e em conjunto, dentre elas a glicose, sugeriram que os mecanismos de transporte conhecidos para esta levedura tendem a transportar prioritariamente a glicose.

5.3.2. Crescimento Celular de *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* cultivadas em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

O perfil de crescimento de *C. guilliermondii* e *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã encontra-se na Figura 6, onde pode ser observado um maior crescimento celular nas primeiras 24 horas quando há maior concentração de açúcares no meio, sugerindo que a glicose totalmente metabolizada nas primeiras 12 horas tenha contribuído para este crescimento, porém não sendo a única fonte de carbono utilizada.

Figura 6: Biomassa celular das leveduras *Candida guilliermondii* (♦) e *Kluyveromyces marxianus* (▲) durante o cultivo em Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

Ao avaliar o crescimento de *C. guilliermondii* e *K. marxianus* (Figura 6) nota-se máxima concentração celular para *K. marxianus* às 48 horas de cultivo ($29,52\text{g.L}^{-1}$), sendo este 65,03% maior em relação a máxima concentração celular encontrada para *C. guilliermondii* ao final do processo (96 horas). Por outro lado nota-se nesta Figura um decréscimo do crescimento de *K. marxianus* no período de 48 a 72 horas, mantendo-se constante até o final do processo. Tal comportamento não foi observado para *C. guilliermondii*.

A concentração celular (g.L^{-1}) obtida para *C. guilliermondii* já foi encontrada anteriormente por outros autores em fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (ARRUDA et al., 2011) biomassa de sorgo (VARIZ, 2011), palha de trigo (CANILHA et al., 2006) e palha de arroz (MUSSATO e ROBERTO, 2002). No entanto, no caso do cultivo desta levedura em hidrolisados hemicelulósicos de outras biomassas como casca de aveia (TAMANINI et al., 2004) e palha de sorgo (SENE et al., 2011) os valores obtidos foram inferiores, sendo estes 3,8 e 7,5 g.L^{-1} respectivamente. Já a concentração celular de *K. marxianus* observada nesse estudo chega a ser 72,30% maior que a encontrada por Silva et al. (2014) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, acredita-se que tal diferença ocorra devido ao fato de que a concentração de glicose é 64,22% maior no presente trabalho em relação à presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana utilizado por Silva et al. (2014) É importante ressaltar que estes hidrolisados também apresentam concentração de açúcares diferentes às apresentadas no presente trabalho, embora deva ser destacada a complexidade dos hidrolisados hemicelulósicos pela presença nestes, não somente de carboidratos mas de outros compostos como os tóxicos.

É importante destacar ainda na Figura 6 que tanto para *C. guilliermondii* quanto para *K. marxianus* ocorreu uma maior velocidade de crescimento celular nas primeiras 24 horas, sendo esta 0,32 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e 0,95 $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para *C. guilliermondii* e *K. marxianus* respectivamente, coincidente ao tempo em que se observou também maior consumo de açúcares (Figura 5).

Outro ponto importante a ser observado a respeito do comportamento de *C. guilliermondii* e *K. marxianus* durante fermentação em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã é quanto a morfologia de células, com gêmulas típicas, apresentadas por estas duas leveduras (Figuras 7 e 8). Quando coradas com azul de metileno, as células de *C. guilliermondii* apresentam-se incolores (vivas) durante o cultivo (Figura 7) enquanto para *K. marxianus* encontram-se células escuras (mortas) (Figura 8c) no período de 48 horas, coincidente ao período de decréscimo do crescimento celular (Figura 6).

Figura 7 - Microscopia óptica de células de *Candida guilliermondii* coradas com azul de metileno. Magnificação 400x. (A) inóculo. (B), 96 horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

Figura 8 - Microscopia óptica de células de *kluveromyces marxianus* coradas com azul de metileno. Magnificação 400x. (A) inóculo. (B), 96 horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. (C) Morte celular observada após 48 horas de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

5.3.3. Produção de Xilitol e Etanol por *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

O cultivo das leveduras *C. guilliermondii* e *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã resultou na formação de xilitol e etanol entretanto, enquanto para *C. guilliermondii* foi detectada apenas a presença de xilitol, para *K. marxianus* encontrou-se também a formação de etanol (Figura 9 a e b). Verifica-se nesta Figura que a produção de xilitol por *C. guilliermondii* ocorreu ao longo do cultivo, atingindo uma concentração máxima de $9,36 \text{ g.L}^{-1}$ em 96 horas. Esta concentração se mostra inferior às encontradas na literatura quando utilizado outros hidrolisados hemicelulósicos, como de biomassa de sorgo ($12,0 \text{ g.L}^{-1}$) (SENE et al., 2011), casca de aveia ($15,0 \text{ g.L}^{-1}$) (TAMANINI et al., 2004) e bagaço de cana-de-açúcar ($34,0 \text{ g.L}^{-1}$) (FELIPE et al., 1997a).

Figura 9 - Produção de xilitol (▲) e etanol (●) durante cultivo de *C. guilliermondii* (a) e *K. marxianus* (b) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

Nota-se nesta Figura 9a uma máxima taxa de produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* nas primeiras 6 horas, correspondente a um valor de produtividade volumétrica (Q_p) de $0,52 \text{ g.L.h}^{-1}$, momento este coincidente com maior velocidade de consumo de xilose ($0,70 \text{ g.L.h}^{-1}$), o que se refletiu no máximo fator de conversão ($Y_{(p/s)} 0,73 \text{ g.g}^{-1}$) atingido neste processo. Observa-se ainda

uma queda gradativa da taxa de produção de xilitol, evidente em uma diminuição do Q_p para $0,10\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e do $Y_{(p/s)}$ para $0,38\text{g.g}^{-1}$ às 96 horas.

Mussato e Roberto (2002) mesmo tendo encontrado concentração de xilitol acima de $50,0\text{g.L}^{-1}$, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtiveram rendimento ($Y_{(p/s)}$) comparável ao deste estudo, sendo este $0,72\text{g.g}^{-1}$, desta maneira pode-se associar o baixo desempenho de *C. guilliermondii* quanto à produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã ao final do processo fermentativo a dois fatores principais. O primeiro seria a concentração de xilose inferior a relatada como ótima por Felipe et al (1997a) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, uma vez que estes autores afirmaram melhor desempenho da levedura quando utilizada concentração de xilose acima de 50g.L^{-1} , e a concentração no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã foi 49,78% menor. O segundo está relacionado à proporção glicose:xilose presente no hidrolisado utilizado como meio de cultivo, esta proporção é tida como ideal quando 1:5 (Silva et al, 2006) e no presente hidrolisado esta foi inferior a 1:2.

Quanto à levedura *K. marxianus* (Figura 9b), esta produziu xilitol apenas nas últimas 24 horas de cultivo, sendo esta concentração máxima de $9,10\text{g.L}^{-1}$ às 96 horas correspondendo a um máximo rendimento ($Y_{(p/s)}$) de $0,37\text{g.g}^{-1}$, não correspondendo com máxima velocidade de consumo de xilose que ocorreu no tempo 12 horas ($1,44\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$). Coincidentemente ao tempo correspondente à máxima formação de xilitol, verifica-se o maior consumo de arabinose no momento em que o consumo de xilose foi estacionado.

Quanto à produção de etanol, apenas a levedura *K. marxianus* (Figura 9b) foi capaz de produzi-lo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. A máxima produção de etanol observada ocorreu às 24 horas de processo obtendo-se uma concentração de $10,47\text{g.L}^{-1}$ como pode ser observado na Figura 9b. Esta concentração máxima ocorreu 12 horas após a glicose ter sido totalmente consumida sugerindo que embora este açúcar tenha sido em parte utilizado para a produção de etanol, este não foi a única fonte de carbono a contribuir para isto. Sabe-se que a levedura utiliza os carboidratos presentes no hidrolisado para o crescimento e manutenção celular, gerando assim não só bioprodutos, mas também biomassa celular, desta maneira o cálculo dos parâmetros fermentativos

para este bioproduto considerando um ou ambos os açúcares seria errôneo, para tanto, preferindo-se não expressar tais valores.

Silva et al. (2014) também relataram a produção de xilitol juntamente com etanol quando utilizado hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como meio de cultivo para *K. marxianus*, no entanto tendo xilitol como produto principal e considerando etanol como subproduto, obtendo concentrações de 9,35 e 1,31g.L⁻¹ para xilitol e etanol, respectivamente. Acredita-se que a maior produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã encontra-se no alto teor de glicose encontrado neste, quando comparado ao bagaço de cana, uma vez que estes mesmos autores encontraram maior produção de etanol por esta levedura em hidrolisado celulósico de bagaço de cana, o qual possui elevado teor de glicose, quando comparado ao hidrolisado hemicelulósico desta biomassa.

Nota-se ainda na Figura 9b um decréscimo na concentração de etanol a partir das 24 horas de processo, possivelmente pela capacidade desta levedura em metabolizá-lo. De acordo com Flores, et al (2000) leveduras como *S. cerevisae*, em determinadas situações, como repressão enzimática, são capazes de utilizar etanol como fonte de carbono. Este comportamento já foi relatado anteriormente por Rouhollah et al (2007) para esta *K. marxianus*, no entanto apenas em situação de ausência de açúcares e em concentrações de etanol acima de 30 g.L⁻¹.

Por outro lado, quanto a ausência de produção de etanol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã, a literatura pesquisada apresenta relatos desta produção por esta levedura em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas como bagaço de cana (ARRUDA et al., 2011), palha de sorgo (SENE et al. 2011) e casca de aveia (CANILHA et al. 2006). Nestes trabalhos a produção foi baixa, sendo este considerado um subproduto.

5.3.4. Concentração de Ácido Acético, Furfural, Hidroximetilfurfural, e Variação de pH Durante Cultivo de *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

A Figura 10 apresenta as variações nas concentrações de ácido acético e nos valores de pH ocorridas durante o processo fermentativo utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã como meio de cultivo para *C. guilliermondii* (a) e *K. marxianus* (b).

Figura 10 - Concentração de ácido acético (■) e variação de pH (▲) durante o cultivo de *C. guilliermondii* (a) e *K. marxianus* (b) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

Nota-se na Figura 10a que durante o processo fermentativo utilizando a levedura *C. guilliermondii* a concentração de ácido acético diminuiu 35,46% havendo manutenção do pH inicial de 5,50. Por outro lado, tal comportamento não foi observado quando fermentações com esta mesma levedura foram realizadas em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (ARRUDA, et al, 2011), palha de trigo (CANILHA et al., 2006) e casca de aveia (TAMANINI et al., 2004), nos quais se constatou aumento do pH juntamente com a assimilação do ácido acético. É importante ressaltar que existem outros ácidos presentes em hidrolisados hemicelulósicos, a citar ácidos fórmicos e furfurilico, os quais não

foram analisados no presente trabalho e podem ter contribuído para a manutenção do pH.

Diferentemente do comportamento observado para a levedura *C. guilliermondii*, observa-se na Figura 10b o comportamento de *K. marxianus* onde há o aumento da concentração de ácido acético (63,39%) juntamente com a diminuição do pH inicial (5,50) para 4,64 ao final do cultivo. Este aumento na concentração de ácido acético demonstra a capacidade deste micro-organismo em produzir este ácido em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. Silva et al. (2014) também relataram o decréscimo do pH juntamente com aumento da concentração de ácido acético..

Tabela 5 - Concentração (mg.L⁻¹).de furfural e 5 - hidroximetilfurfural durante o cultivo de *C. guilliermondii* e *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã

Inibidor (mg.L ⁻¹).	<i>C. guilliermondii</i>		<i>K. marxianus</i>	
	0h	96h	0h	96h
Furfural	20,64	13,02	36,54	34,23
5-HMF	79,96	79,06	160,93	107,60

Quanto às concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (Tabela 5) nota-se o decréscimo do primeiro composto, ao final do processo, para ambas as leveduras encontrando-se redução de 36,91 e 6,32% para *C. guilliermondii* e *K. marxianus*, respectivamente. Já para hidroximetilfurfural, este também teve sua concentração reduzida, porém apenas para *K. marxianus*, ao final obtendo-se redução de 33,14% deste composto. No presente trabalho não há dados para evidenciar que o consumo destes tóxicos tenha sido direcionado à produção de diferentes compostos como encontrado por Oliva et al (2003). Estes autores encontraram a produção de álcool furfurílico oriundo do metabolismo de furfural por *K. marxianus* e afirmaram também a capacidade existente de *K. marxianus* em assimilar compostos tóxicos como os acima citados, no entanto não foram encontrados relatos para assimilação destes por *C. guilliermondii*.

5.3.5. Atividade Enzimática de Xilose Redutase (XR) e Xilitol Desidrogenase (XDH) de *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Maçã

Considerando-se que as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) são enzimas fundamentais no metabolismo da xilose e que estas também podem auxiliar no entendimento da formação de bioprodutos pelos diferentes micro-organismos, análises destas atividades em ambas as leveduras foram feitas ao longo do cultivo (Figura 11). Nota-se, independente da levedura, que há um decréscimo na atividade enzimática tanto de XR quanto XDH nas primeiras 6 horas de processo. Este decréscimo já foi relatado em trabalhos anteriores em processos fermentativos utilizando hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas como meio de cultivo para *C. guilliermondii* (SENE et al., 2000; SILVA et al., 2006; CHAUD, 2010; VARIZ, 2011) e está atribuído ao fato de que estas enzimas são induzidas pela presença de xilose e/ou xilitol no meio. No caso do presente trabalho o inóculo foi obtido em meio semissintético contendo como açúcar apenas xilose enquanto o hidrolisado continha além desta pentose também glicose, hexose considerada como fonte de carbono preferencial (NELSON, MICHAEL, 2008). Deve-se também levar em consideração a presença de compostos tóxicos no hidrolisado, tais como fenóis, oriundos do processo de hidrólise, e íons metálicos, oriundos do reator de hidrolise, remanescentes do processo de destoxificação, os quais podem interferir no desempenho enzimático, o que poderia levar a um período inicial de adaptação celular (CORTEZ; ROBERTO, 2014).

Figura 11 - Atividade enzimática específica de XR (♦) e XDH (■) durante o cultivo de *C. guilliermondii* (a) e *K. marxianus* (b) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Fonte:Arquivo pessoal

Ainda na Figura 11, nota-se um aumento da atividade de XR entre 6 e 24 horas, para ambas as leveduras, no entanto após esse tempo, a atividade desta enzima em *C. guilliermondii* (Figura 11a) diminui, enquanto esta se mantém estável para *K. marxianus* (Figura 11b). Já para XDH nota-se um decréscimo até 6 horas, seguido de um aumento entre 6 e 24 horas para *C. guilliermondii*, enquanto para *K. marxianus* há um decréscimo até 12 horas. Após este período não houve variação significativa da atividade enzimática desta levedura

Ao avaliar a Figura 11, nota-se, tanto para XR quanto para XDH, que a maior atividade enzimática observada durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã ocorreu às 24 horas com emprego de *C. guilliermondii* sendo estas de 0,23 e 0,53 U/mg_{prot} respectivamente. Este tempo corresponde à maior assimilação de xilose (Figura 5) e produção de 44,9% do total de xilitol obtido ao final do cultivo por esta levedura (Figura 9). Ao se comparar estes resultados com outros obtidos em fermentação com *C. guilliermondii* encontrados na literatura, a máxima atividade de XR se mostra superior à obtida em hidrolisado hemicelulósico de biomassa de sorgo (0,17U/mg_{prot}) (VARIZ, 2011), porém inferior à encontrada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (0,58U/mg_{prot}) (SILVA, FELIPE, 2006).

No caso da XDH, a maior atividade encontrada para *C. guilliermondii* (0,59 U/mg_{prot}) é superior às relatadas tanto na fermentação em hidrolisado

hemicelulósico de biomassa de sorgo ($0,25\text{U/mg}_{\text{prot}}$) (VARIZ, 2011) quanto em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar ($0,36\text{U/mg}_{\text{prot}}$) (SILVA, FELIPE, 2006). Arruda et al (2011) encontraram valores superiores de XDH em relação ao presente trabalho, sendo este $0,78\text{U/mg}_{\text{prot}}$ para esta levedura, porém em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, o inóculo foi obtido do cultivo em meio semissintético contendo uma mistura de xilose e glicose, enquanto neste e nos demais trabalhos citados, o inóculo é oriundo de meio contendo apenas xilose. As diferenças encontradas podem estar relacionadas ao fato de que apesar de serem todos hidrolisados hemicelulósicos, nos quais se tem a xilose como principal carboidrato, há uma variação quanto às proporções entre xilose e outros açúcares, como glicose e arabinose, bem como nos tipos e teores dos compostos tóxicos presentes.

Enquanto para *K. marxianus* a maior atividade de XR ($0,08\text{ U/mg}_{\text{prot}}$) manteve-se constante entre 24 e 72 horas, já a maior atividade de XDH ocorreu às 6 horas ($0,20\text{ U/mg}_{\text{prot}}$). Verifica-se ainda na Figura 11b valores semelhantes das atividades de XR e XDH após 24 horas de cultivo. Ainda é importante destacar que a levedura *K. marxianus* teve maior crescimento e formação tanto de etanol quanto de xilitol, enquanto *C. guilliermondii* teve seu metabolismo favorecido para a produção apenas de xilitol (Figura 9).

6. CONCLUSÕES

Analisando os dados obtidos com a caracterização química do bagaço de maçã observou-se que seu teor de lignina (25,38%) apresentou-se superior ao de hemicelulose (23,60%), enquanto o teor de celulose (32,62%) encontrado foi o maior entre as fações aqui caracterizadas. Ainda observou-se baixo teor de resíduos minerais (cinzas) (0,14%) e alto teor de extrativos (17,67%).

Quanto ao hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida, verificou-se que a xilose ($11,10\text{g.L}^{-1}$) foi seu maior constituinte, seguido de arabinose ($7,85\text{g.L}^{-1}$), glicose ($6,93\text{g.L}^{-1}$), ácido acético ($1,36\text{g.L}^{-1}$), furfural ($0,30\text{g.L}^{-1}$) e 5-HMF (g.L^{-1}). Pode-se observar ainda que a concentração de arabinose encontrada foi maior que a concentração de glicose.

As leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus*, quando cultivadas em meio formulado com hidrolisado concentrado e destoxificado ($29,45\text{g.L}^{-1}$ de xilose, $20,49\text{g.L}^{-1}$ de glicose e $19,91\text{g.L}^{-1}$ de arabinose) suplementado com nutrientes, foram capazes de assimilar tanto hexose quanto pentose. Embora as proporções de consumo tenham sido diferentes, observou-se que ambas as leveduras consumiram totalmente a glicose e parcialmente as pentoses xilose e arabinose.

Foi constatado que a levedura *C. guilliermondii* foi capaz de produzir xilitol como resultado do metabolismo da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã. Já a levedura *K. marxianus* foi capaz de produzir tanto etanol quanto xilitol, este último produzido apenas nas últimas 24 horas.

A máxima atividade de XR ($0,23\text{U/mg}_{\text{prot}}$) para a levedura *C. guilliermondii* foi verificada às 24 horas de cultivo, juntamente com a máxima atividade de XDH ($0,53\text{U/mg}_{\text{prot}}$), diferentemente do tempo em que encontrou-se maior produtividade de xilitol (6h). Já para *K.marxianus*, a máxima atividade ($0,08\text{U/mg}_{\text{prot}}$) ocorreu às 24 horas para XR e às 12 horas para XDH diferenciando o tempo de produção de xilitol a qual ocorreu apenas nas últimas 24 horas.

Baseando-se na produção de xilitol por ambas as leveduras e etanol por *K. marxianus* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã, pode-se afirmar que esta é uma biomassa promissora a ser aproveitada como matéria-prima em bioprocessos.

REFERÊNCIAS

ARRUDA, P.V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xylose em xylitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 166-182, 2008.

ARRUDA, P. V., RODRIGUES, R. D. C. L. B., SILVA, D. D. V., & FELIPE, M. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, 22(4), 815–22. 2011.

ARRUDA, P.V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 165f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

ASHISH G. WAGHMARE and SHALINI S. A. Use of fruit by-products in the preparation of hypoglycemic thepla: indian unleavened vegetable flat bread. **Journal of Food Processing and Preservation**. ISSN 1745-4549. p. 1-9, 2013.

ABPM - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES DE MAÇÃ. **Levantamento da Safra 2010/2011**. Fraiburgo. 2012.

BAI, X. ZHANG, H. REN, S. Antioxidant activity and HPLC analysis of polyphenol-enriched extracts from industrial apple pomace. **Journal of Food Science**, v.93, p.2502–2506, 2013.

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 259–263, 1992.

BARBOSA, M.F.S. et al. Screening of yeast for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988

BRITO, J.O.; BARRICHELO, L.E.G. Aspectos técnicos da utilização da madeira e carvão vegetal como combustíveis. In: SEMINÁRIO DE ABASTECIMENTO ENERGÉTICO INDUSTRIAL COM RECURSOS FLORESTAIS, 2., 1982, São Paulo. **Resumos...** São Paulo, p. 101-137, 1982.

CANILHA, L. ; ALMEIDA e SILVA, J.B. ; CARVALHO, W. . Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, Inglaterra, v. 25, p. 1811-1814, 2003.

CANILHA, L., CARVALHO, W. ; ALMEIDA e SILVA, J.B. . Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Inglaterra, v. 86, p. 1371-1376, 2006

CANILHA, L. et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: Hydrolysed detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology** v. 39, p 333-336,. 2008

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; GIULIETTI, M.. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *pichia stipitis*. **Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 84-92, 2010.

CARDONA, C. et al. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p 4754 – 4766, 2010.

CARVALHO, J. R. et al. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**,. n. 18, p. 48-55, 2005

CASTRO, R.C.A. **Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* produtora de etanol e sua aplicação no processo de sacarificação e fermentação simultânea da celulignina de palha de arroz.** 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CENBIO - CENTRO NACIONAL DE REFERÊNCIA EM BIOMASSA. **Fontes de Biomassa.** São Paulo, SP, 2009

CHAND, P. PAKADE, Y.B. Removal of Pb from Water by Adsorption on Apple Pomace: Equilibrium, Kinetics, and Thermodynamics Studies. **Journal os Chemistry**. Hindawi Publishing Corporation. 2013

CHAUD, L.C.S.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, p. 33-46, 2009.

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol.** 2010. 92f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

CICHACZEWSKI,A. **Desenvolvimento de uma barra de cereal rica em fibras, a partir do subproduto de extração do suco de maçã.** 2012. 55f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Química). Universidade Tecnológica do Paraná (UTFPR), campus Pato Branco. Pato Branco. 2012.

CONVERTI, A. et al. Mixed inhibitions by methanol, furfural and acetic acid in xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**. v.22,p. 1861–1865 2000.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Optimization of D-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton X-100. **Biocatalysis and Biotransformation**. v.32, n.1, p. 34 – 38. 2014.

COUTO, L. et al. Produção e alocação de biomassa em um sistema agrossilvipastoril com eucalipto na região do cerrado de Minas Gerais. **Biomassa & Energia, Viçosa**, v. 1, n. 4, p. 321-334, out./dez. 2004.

DHILLON, G.S. et al Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. **J Sci Food Agric.**, v. 93, p. 1560-1 567, 2012.

DHILLON, G.S. et al. Bioproduction and extraction optimization of citric acid from *Aspergillus niger* by rotating drum type solid-state bioreactor. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p 78-84, 2013

DRAGONE, S.I.M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007. 173f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2007.

FELIPE, M.G.A. et al Effect of Acetic Acid in Xylose Fermentation do Xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, p. 171 – 177, 1995.

FELIPE, M.G.A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.18, p. 251-254, 1997a.

FELIPE, M.G.A. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for xylitol production: effect of PH. **Biomass and Bioenergy**, V.. 3, n. ½, p. 11-14, 1997b.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultraestrutura Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FLORES, C. et al. Carbohydrate and energy-yielding in non-conventional yeast. **FEMS Microbiology Reviews**. v.24, p. 507 – 529. 2000.

FONSECA, B.G.; MOUTTA, R.O.; FERRAZ, F.O.; VIEIRA, E.R.; NOGUEIRA, A.S.; BARATELLA, B.F.; RODRIGUES, L.C.; HOU-RUI, Z.; SILVA, S.S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. v. 38, p. 199-207, 2011.

FONSECA, B.G. et al. Detoxification of rice straw and olive tree pruning hemicellulosic hydrolysates employing *Saccharomyces cerevisiae* and its effect on the ethanol production by *Pichia stipitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9658-9665, 2013.

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008.

FONSECA, G.G.; CARVALHO, N.M.B.; GOMBERT, A.K.; Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbial and Cell Physiology**.DOI 10.1007/s00253-013-4748-6. 2013

FONSECA, C. et al. L-Arabinose transport and catabolism in yeast. **The Febs Journal**, v.274, p. 3589 - 3600, 2007.

FURLAN F.F. et al. Assessing the production of first and second generation bioethanol from sugarcane through the integration of global optimization and process detailed modeling. **Computers and Chemical Engineering**, v. 43, p. 1-9, 2012.

GNEPE, J.R. et al. Enzymatic activity of *Cydia pomonella* larvae reared on diets produced with agro-industrial hydrolyzed wastes. **Journal Chemistry Technology and Biotechnology**. 2013

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M.; Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500 – 1503, 2009.

GURPILHARES, D. B. et al. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v.36, p. 87 - 93. 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microb. Technol.** v.16, p.933 - 943. 1994

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER, I.; GORWA, M. Towards industrial pentose- fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 74: 937-953. 2007.

JACKSON, S.; NICOLSON, S. W., Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. Comparative biochemistry and physiology. Part B, **Biochemistry & molecular biology**, v. 131, n. 4, p. 61 3–20, 2002

KANG, H., KIM, Y., CHOI, G., Cellulosic Ethanol Production on Temperature-shift Simultaneous Saccharification and Fermentation using the Thermostable Yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612. **Bioprocess Biosyst Eng.** V. 35, p. 115 – 122, 2012

LIMA, L. H., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., TORRES, F. A. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 734-738, 2004.

LORENTE, B.; MALPERTUY, A.; BLANDIN, G.; ARTIGUENAVE, F.; WINCKER, P.; DUJON, B. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 12. *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus*. **FEBS Letters**, v. 487, p. 71–75, 2000.

MADRERA, R.R et al. Production of spirits from dry apple pomace and selected yeasts. **Food Brioprod Process**. Elsevier Science Limited. 2013

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; PESSOA JUNIOR, A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.9-21, 2006.

MATSUZAK, C., et al. *Kluyveromyces marxianus* – based platform for direct ethanol fermentation and recovery from cellulosic materials under air-ventilated conditions. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 5, 604 – 607, 2012

MOLWITZ, M. et al. Aspects of the cell growth of *Candida guilliermondii* in sugar bagasse hydrolysate. **Zeitschrift fur Naturforschung**. Alemanha, v. 51, p. 404 – 408. 1996

MORAES, E.J.C. **Estudo da viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. 2008. 157f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2008.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose – to – xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**. v. 40, p. 3801 - 3806. 2005.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate Destoxificatio with Activated charcoal for Xylitol Production by carboydrate components of steam – Treated wood. Scientific Note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 137-149, 1988.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 28. p. 34-39. 2002.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C., Avaliação de Diferentes tipos de Carvão Ativo na Destoxificação de Hidrolisado de Palha de Arroz para Produção de Xilitol. **Cienc. Tecnol. Aliment**. 24(1), p. 94 – 100, 2004

MUSSATTO, S.I.; SILVA C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. Fermentation Performance of *Candida guilliermondii* for Xylitol Production on Single and Mexed Substrate Media. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 72, p. 681 – 686, 2006.

NELSON, D. L. ; MICHAEL, M. Cox: Lehninger **Principles of Biochemistry**. 5th ed. New York : W. H. Freeman and Company, cop. 2008

ODUMERO, J. A., D'AMORE, T., RUSSELL, I., STEWART, G. Effect of heat and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, p. 111-116, 1992.

OLIVA, J.M; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 141-153, 2003.

PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74, p.17-24, 2000.

PAPON, N. et al, *Candida guilliermondii*: biotechnological applications perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Springer**. 2013.

PARMAR, H.P.I. RUPASUNGHE, V. Bio-conversion of apple pomace into ethanol and acetic acid: Enzymatic hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v.130, p. 613–620, 2013.

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

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

PING, Y. et al., Xylitol Production from Non-detoxified Corn cob Hemicellulose acid Hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, China v. 75, p. 86 – 91, 2013.

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

ROBERTO, I.C., et al., Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**. V. 16. n. 11. p. 1211 – 1216, 1994.

ROBERTO I. C. et al., Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agroindustrial residues. **Bioresource Technology**, v.51, p. 255-257, 1995.

ROCHA, G. F. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAUJO, G. T.; In BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, 5., 1997. Paraná, Brasil. **Resumos**.

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136f. Tese (Doutorado em físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA E SILVA, J. B., VITOLO, M., GÓMEZ, P. V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non-volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 03, p. 299-311, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry** v. 38, p. 1231-1237, 2003.

ROUHOLLAH, H. et al. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**. v. 6. n. 9. p. 1110 – 1114. 2007.

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

SENE, L. et al. Effects of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84 – 86. p. 371 – 380. 2000.

SENE, L.; ARRUDA, P.V.; OLIVEIRA, S.M.M.; FELIPE, M.G.A., Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 42. p. 1141 – 1146. 2011.

SEYE, O.; CORTEZ, L. A. B. C.; GOMEZ, E. O. **Estudo cinético da biomassa a partir de resultados termogravimétricos**. An. 3. Encontro anual de Energia no meio Rural. 2013.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I.M.; LUCHESE, R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248-254, 2004

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal Of Chemical Technology And Biotechnology**, n. 81, p.1294-1300, 2006.

SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in Hydrolysates Obtained from Fractions C5 and C6 of the Sugarcane

Bagasse. In: **2nd CONGRESO IBEROAMERICANO SOBRE BIORREFINERIAS**, 2-CIAB, Jaen, Espanha. Memorias 2-CIAB, 10-12/Abr.13, 2013.

SILVA, D.D.V. et al. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, 2014.

SILVA, S.S.; VITOLO, M.; PESSOA JUNIOR, A.; FELIPE, M.G.A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**. v. 36, n 3, p. 187 – 191, 1996.

SILVA, S. S., FELIPE, M. G., & MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. A review. **Applied biochemistry and biotechnology**, 70-72, 331–9, 1998.

TAMANINI, C. et al. Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum**. v. 26, p. 117-125, 2004.

VARIZ, D.I.L.S. **Avaliação da Biomassa de Sorgo Forrageiro para Produção Biotecnológica de Xilitol**. 2011. 78f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

VENDRUSCOLO F. et al. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dietas para alevinos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 4, p. 487-493, 2009.

VICENTE, F. M. C. F.; SILVA, D. D. V.; ARRUDA, P. V.; LOPES, P. P.; FELIPE, M. G. A. Influência de Etapas de Destoxificação do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para a Produção de Etanol por *Pichia stipitis*. In: **XXI CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA**, Santos/SP, 28/Out – 01/Nov.12, 2012.

VILLAS BOAS, S. G. ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de Maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. **Biotechnologia Ciência & Desenvolvimento**. p. 38-42, 2000.

WALIA A. et al Production of Alkalophilic Xylanases by *Paenibacillus polymyxa* CKWX1 Isolated from Decomposing Wood. **Proc. Natl. Acad. Sci. India. Sect. B Biol. Sci**, v. 83, n. 2, p. 215–223, 2013a.

WALIA A. et al. Optimization of cellulase-free xylanase production by alkalophilic *Cellulosimicrobium* sp. CKMX1 in solid-state fermentation of apple pomace using central composite design and response surface methodology. **Ann Microbiol.**, v. 63, p. 187-198, 2013b.

WEBB, S.R.; LEE, H. Characterization of xylose reductase from yeast *Pichia stipitis*: evidence for functional thiol and histidyl groups. **Journal Genes Microbiology**. p. 1857 – 1863. 1992.

WEREKO-BROBBY; HAGEN, **Wood Energy Technologies**, 1996.

WILKINS, M.R., MULLER, M., EICHLING, R., BANAT, I.M., Fermentation of Xylose by the Thermotolerant Yeast Strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 Under anaerobic Conditions, **Process Biochemistry**. v. 43 p. 346 – 350, 2008

YABLOCHKOVA, E. et al. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**. v. 72. n.4 p. 414 – 417. 2003.

YABLOCHKOVA, E. et al. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. **Microbiology**. v.73, n.2, p.129 – 133. 2004.

YIN, J.S. et al. Optimization of production conditions for β -mannanase using apple pomace as raw material in solid-state fermentation. **Ann Microbiol**, v. 63, p. 101-108, 2013.

ZHANG, Y.H.P.; HIMMEL, M.E.; MIELENZ, J.R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 452–481, 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Concentração (g.L^{-1}) de açúcares, bioprodutos e ácido acético e variação de pH observados durante cultivo de *C. guilliermondii* em Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã

Tempo (h)	Glicose	Xilose	Arabinose	Xilitol	Ácido acético	Etanol	pH	Concentração celular
0	20.04	27.37	17.23	n. d	1.72	n.d	5.59	1.03
6	7.08	23.16	15.08	3.09	1.29	n.d	5.55	3.69
12	n.d	20.33	15.68	3.56	1.45	n.d	5.61	5.41
24	n.d	13.12	15.34	4.20	1.27	n.d	5.58	8.81
48	n.d	7.13	14.25	5.82	1.10	n.d	5.58	10.33
72	n.d	4.70	13.06	7.21	0.99	n.d	5.57	11.46
96	n.d	3.16	11.42	9.36	1.11	n.d	5.55	11.48

*n.d=Não detectado

Apêndice 2 – Concentração (g.L^{-1}) de açúcares, bioprodutos e ácido acético e variação de pH observados durante cultivo de *K. marxianus* em Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Tempo (h)	Glicose	Xilose	Arabinose	Xilitol	Ácido acético	Etanol	pH	Concentração Celular
0	20.96	31.54	22.60	n.d	2.43	0.00	5.45	1.07
6	14.97	29.43	21.19	n.d	2.16	0.04	5.34	7.49
12	n.d	20.82	20.97	n.d	2.00	5.90	5.30	11.94
24	n.d	13.16	22.87	n.d	2.80	11.00	5.19	23.80
48	n.d	10.25	21.49	n.d	4.25	5.97	4.91	29.44
72	n.d	8.29	21.50	n.d	5.62	6.22	4.73	25.88
96	n.d	7.60	14.60	9.10	7.23	5.29	4.64	27.22

*n.d=Não detectado

Apêndice 3 – Atividade enzimática específica (U/mg_{prot}) de XR e XDH das leveduras *C. guilliermondii* e *K. marxianus* cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã.

Tempo (h)	<i>C.guilliermondii</i>		<i>K.marxianus</i>	
	XR	XDH	XR	XDH
t0	0,28	0,59	0,34	0,45
t6	0,05	0,18	n.d*	0,20
t12	0,10	0,20	0,04	0,08
t24	0,23	0,53	0,08	0,06
t48	0,19	0,31	0,08	0,07
t72	0,07	0,30	0,08	0,08
t96	0,07	0,26	0,07	0,08

*n.d=não detectado