UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CELSO SANTI JUNIOR

Cultivos de *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651 visando à produção de etanol
lignocelulósico

Lorena - SP

2015

CELSO SANTI JUNIOR

Cultivos de *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651 visando à produção de etanol
lignocelulósico

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia
Industrial na Área de Conversão de Biomassa

Orientador: Prof. Dr. Walter de Carvalho

Versão Original

Lorena –SP

2015

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Santi-Junior, Celso

Cultivos de *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651
visando à produção de etanol lignocelulósico / Celso
Santi-Junior; orientador Walter Carvalho - Versão
Original. - Lorena, 2015.
169 p.

Tese (Doutorado 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. 2015
Orientador: Walter Carvalho

1. Fermentação. 2. Etanol. 3. *Scheffersomyces*
stipitis. 4. Lignocelulósico. 5. Planejamento de
experimentos. I. Título. II. Carvalho, Walter, orient.

Dedico este trabalho aos meus pais Celso e Sonia, à minha irmã Adriana e à minha futura esposa Mariana, por todo o amor, apoio e compreensão ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado saúde e paz para que eu pudesse ter realizado este meu sonho.

Aos meus pais, Celso e Sonia, pelo amor incondicional, apoio e exemplo.

À Mariana, minha futura esposa, por todos estes anos de compreensão, amor e cumplicidade.

À minha irmã Adriana, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

Ao Prof. Walter de Carvalho, pelos ensinamentos, dedicação e orientação ao longo de todos estes anos de iniciação à carreira científica.

Aos meus sobrinhos, Julia e Lorenzo, pelos momentos de descontração e alegria.

À minha família paulistana, por todo amor, incentivo e suporte.

Aos meus “amigos-irmãos” por todo amor e companheirismo desde sempre.

À minha segunda família, Molina Souza, por todo amor e apoio.

Aos amigos, Victor, Paula e Germano, pela amizade sincera e por todos estes anos de companheirismo.

Aos amigos de departamento (Felipe, Omar, Flávio, Pepel, Robson, Jose, Fernanda, Maiara, Sérgio, Zé Moreira, Zé Cobrinha, André e Guedes), por todos estes anos de convivência e futebol.

À Escola de Engenharia de Lorena, pela estrutura e suporte.

Aos professores André Ferraz e Adriane Maria Ferreira Milagres, pelos ensinamentos, suporte e apoio.

Ao professor Júlio, pela importante colaboração na reta final.

Aos meus avós, Wilson e Enedina, *in memoriam*, saudades.

À CAPES, pelo auxílio financeiro.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

SANTI-JUNIOR, C. **Cultivos de *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651 visando à produção de etanol lignocelulósico.** 2015. 169 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2015.

Este estudo buscou definir as melhores condições para a fermentação alcoólica da xilose pela levedura *S. stipitis* DSM-3651, utilizando suplementação nutricional de baixo custo. Inicialmente, o melaço de cana foi escolhido, devido à sua disponibilidade e inserção no contexto do etanol de segunda geração. Sendo assim, o estudo acerca dos requerimentos nutricionais foi realizado em quatro etapas. A primeira foi avaliar a capacidade da levedura em utilizar os açúcares provenientes de materiais lignocelulósicos e do melaço: xilose, arabinose, glicose, frutose e sacarose. Observou-se que a levedura foi capaz de converter apenas glicose, xilose e frutose em etanol, e inclusive realizar a co-fermentação destes. Desta forma, a segunda etapa foi determinar a composição química do melaço e compará-la com a de um suplemento referência (extratos de levedura e malte, e peptona). Enquanto o conteúdo de minerais foi semelhante o teor de nitrogênio foi bem inferior, de modo que o enriquecimento com fosfato de amônio foi requerido. A próxima etapa confrontou a qualidade nutricional de meios suplementados com melaço e fosfato ou com a suplementação referência, utilizando xilose como fonte de carbono. Embutida nesta análise foram testadas diferentes cargas de inóculo (0,07 e 3,00 g/L) provenientes de cultivos com ou sem limitação de nutrientes. Como resposta obtivemos que, de modo geral, o desempenho fermentativo de *S. stipitis* DSM-3651 foi reduzido quando apenas melaço e fosfato foram disponibilizados como nutrientes. Desta forma a quarta e última etapa baseou-se na metodologia de planejamento experimental para definir a combinação de nutrientes ideal para cada carga de inóculo. Com base na produção de etanol, definiu-se que, para o prosseguimento do trabalho um meio à base, principalmente, de melaço seria o mais adequado, utilizando uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. O estudo dos efeitos das condições de fermentação no crescimento celular e na produção de etanol a partir de xilose, foi realizado com base no planejamento de experimentos e adequada análise estatística, utilizando 4 variáveis: aeração e concentrações de substrato, células e suplemento. Após avaliar e interpretar o impacto que cada variável exerceu no desenvolvimento da levedura, o aumento da produção de etanol foi o critério escolhido para estabelecer as condições que seriam fixadas para a continuidade do trabalho, atendendo nosso objetivo principal; redução da aeração e aumento das concentrações de substrato, células e nutrientes. Considerando que o melaço perfazia a maior porção mássica do suplemento nutricional, e que frutose, glicose e sacarose são os seus principais componentes, avaliou-se a possibilidade de inverter este dissacarídeo, utilizando invertases. O resultado foi uma eficiente hidrólise em glicose e frutose, atingindo 100% rendimento. Deste modo, o estudo de otimização da produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a partir de meio a base de xilose, procedeu-se na forma de uma nova abordagem para a integração das produções de etanol de primeira e segunda geração. Utilizando-se da capacidade intrínseca da levedura de co-fermentar xilose, glicose e frutose, um aumento da concentração de substrato foi obtido a partir do tratamento enzimático do melaço, que passou a exercer função dupla no processo fermentativo: fonte de nutriente e de açúcares fermentescíveis. Como resultado, a condição otimizada pelo presente trabalho atingiu fator de conversão e produtividade volumétrica de etanol de 0,41 g/g e 1,26 g/L.h, respectivamente, referentes à concentração final de 60,36 g/L de etanol.

Palavras-chave: Fermentação; Etanol; *Scheffersomyces stipitis*; Lignocelulósico; Planejamento de experimentos.

ABSTRACT

SANTI-JUNIOR, C. **Cultures of *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651 aiming the lignocellulosic ethanol production.** 2015. 169 p. Thesis (Doctor in Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo – Lorena, 2015.

This study seek to define the best conditions for the xylose fermentation by yeast *S. stipitis* DSM-3651, using an inexpensive nutritional supplementation. Initially, the sugarcane molasses was chosen due to its availability and integration in the second generation ethanol context. Thus, the study of the nutritional requirements was conducted in four stages. The first was to evaluate the yeast's ability to use sugars from lignocellulosic materials and sugarcane molasses: xylose, arabinose, glucose, fructose and sucrose. It was observed that the yeast was capable of converting only glucose, xylose and fructose in ethanol, and even carry out their co-fermentation. Thus, the second stage was to determine the chemical composition of sugarcane molasses and compare it with a reference supplement (malt and yeast extracts and peptone). While the mineral content was similar, the nitrogen content was much lower, so that the enrichment of ammonium phosphate was required. In the next step a comparison was established among media supplemented with sugar molasses plus phosphate or reference supplementation considering their nutritional qualities, using xylose as a carbon source. Embedded in this analysis were tested different inoculum loads (0.07 and 3.00 g/L) from cultures with or without nutrient limitation. We obtained that, in general, the fermentative performance of *S. stipitis* DSM-3651 was reduced when only sugarcane molasses and phosphate were provided as nutrients. Thus the fourth and final step was based on the experimental design methodology to define the optimum combination of nutrients for each inoculum load. Based in ethanol production, it was decided that a media composed mainly by sugarcane molasses would be more appropriate, using an initial cell concentration of 3.00 g/L. The study of the effects of fermentation conditions on cell growth and ethanol production from xylose was conducted based on the design of experiments, and appropriate statistical analysis using four variables: aeration and substrate, cells and supplement concentrations. After evaluating and interpreting the impact which each variable exercised in the yeast development, the increased ethanol production was chosen as criteria to establish the conditions that would be fixed for the research continuation, following our main aim; reducing aeration and increasing substrate, cells and nutrients concentrations. Whereas sugarcane molasses composing the greatest mass portion of the nutritional supplement, and fructose, glucose and sucrose are its main components, we evaluated the ability to invert this disaccharide using invertase. The result was an efficient hydrolysis into glucose and fructose, reaching 100% yield. Thus, the optimization studies of ethanol production by *S. stipitis* DSM-3651 from a medium composed by xylose was arranged as a novel approach for integrating the first and second generation ethanol production. Using the yeast intrinsic capacity of to perform the co-fermentation of xylose, glucose and fructose, an increase in the substrate concentration was obtained from the enzymatic treatment of the sugarcane molasses, which had a double duty in the fermentation process: nutrient and fermentable sugars source. As a result, the best condition determined by this study reached an ethanol yield and productivity of 0.41g/g and 1.26 g/L.h, respectively, for an ethanol final concentration of 60.36 g/L.

Keywords: Fermentation; Ethanol; *Scheffersomyces stipitis*; Lignocellulosic; Design of experiments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processamento da cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira.	31
Figura 2 - Metabolismo de xilose, glicose, frutose e arabinose por <i>Scheffersomyces stipitis</i>	39
Figura 3 - Efeitos das condições de fermentação na bioconversão de xilose a etanol por <i>Scheffersomyces stipitis</i>	44
Figura 4 - Parâmetros fermentativos obtidos durante cultivos de <i>Scheffersomyces stipitis</i> em diferentes concentrações iniciais de substrato.	47
Figura 5 - Fluxograma simplificado do procedimento de caracterização composicional do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência.	55
Figura 6 - Representação esquemática do fechamento dos frascos Erlenmeyer com rolha (gaze e algodão) e filme de PVC (A) ou com tampão (gaze e algodão) (B).	59
Figura 7 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando as colunas BIO RAD Aminex HPX-87H (A) e BIO RAD Aminex HPX-87P (B), para a determinação das concentrações de celobiose (1), glicose (2), xilose (3), arabinose (4), ácido acético (5), etanol (6) e frutose (7).	68
Figura 8 - Curvas de consumo de substrato (A), crescimento celular (B) e produção de etanol (C) determinadas para os cultivos com açúcares individuais. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais; as barras verticais representam os desvios-padrão determinados para as triplicatas experimentais; (x) representa os valores experimentais determinados para o cultivo em meio contendo apenas o suplemento nutricional.	76
Figura 9 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de consumo de substrato determinadas para os cultivos com açúcares individuais.....	77
Figura 10 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de crescimento determinadas para os cultivos com açúcares individuais.....	81
Figura 11 - Plote do inverso dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) em função do inverso das velocidades específicas de crescimento (μ_X) determinadas para os cultivos com açúcares individuais.	83
Figura 12 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de produção de etanol determinadas para os cultivos com açúcares individuais.....	86
Figura 13 - Plote das velocidades específicas de produção de etanol (μ_P) em função das velocidades específicas de crescimento (μ_X) determinadas para os cultivos com açúcares individuais.....	87
Figura 14 - Curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol obtidas na fermentação do meio composto por xilose, glicose e frutose. Os símbolos representam os valores experimentais, as linhas representam as curvas ajustadas utilizando	

o modelo de Boltzmann e as barras verticais representam o desvio padrão entre as triplicatas experimentais.88

Figura 15 - Velocidades específicas de consumo de substrato (A), crescimento celular (B) e produção de etanol (C) obtidas na fermentação do meio composto pela mistura de xilose, glicose e frutose.89

Figura 16 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.96

Figura 17 - Parâmetros fermentativos determinados após 48 horas de fermentação para os cultivos utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.98

Figura 18 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.....100

Figura 19 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 horas de fermentação para os cultivos utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.101

Figura 20 - Parâmetros fermentativos determinados após 48 h de fermentação para os experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação dos efeitos das concentrações das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.....105

Figura 21 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B), Q_P (C), Q_S (D) e Q_X (E) obtidos por *S. stipitis* DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.107

Figura 22 - Curvas de produção de etanol (A) e xilitol (B), obtidas nos experimentos 9 e 16 do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação do efeito das concentrações das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.....109

Figura 23 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 h de cultivo para os experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação dos efeitos

das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.	110
Figura 24 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B), Q_P (C), Q_S (D) e Q_X (E) obtidos por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.	112
Figura 25 - Curvas de produção de etanol (A) e xilitol (B) obtidas nos experimentos contendo melaço nos níveis -1 e +1 do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para a avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.	113
Figura 26 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou alternativo (ALT) a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.	116
Figura 27 - Valores de Q_P (A), Q_S (B) e Q_X (C) obtidos nos experimentos dos planejamentos fatoriais 2^{5-1} para avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651, utilizando concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L.	119
Figura 28 - Valores de $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B) e $Y_{XOH/S}$ (C) obtidos nos experimentos dos planejamentos fatoriais 2^{5-1} para avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651, utilizando concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L.	120
Figura 29 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações com (Troca +) ou sem (Troca -) troca de gases e utilizando diferentes razões entre volume de frasco e volume de meio ($v_f/v_m = 5, 2,5$ ou 2), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.	121
Figura 30 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 horas de fermentação para os cultivos com (Troca +) ou sem (Troca -) troca de gases e utilizando diferentes razões entre volume de frasco e volume de meio ($v_f/v_m = 5, 2,5$ ou 2), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.	124
Figura 31 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 h de fermentação para os experimentos do planejamento fatorial completo 2^4 utilizado para a avaliação dos efeitos das condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651.	126
Figura 32 - Gráfico de cubo mostrando os efeitos das concentrações de substrato, células e suplemento sobre o Q_S	128
Figura 33 - Gráfico do quadrado mostrando os efeitos das concentrações de substrato e suplemento sobre o Q_X	130

Figura 34 - Fator de conversão de substrato em células em função das concentrações de substrato e suplemento. Aeração e concentração celular foram fixadas no nível 0. Os círculos representam os valores experimentais.....	132
Figura 35 - Produtividade volumétrica de etanol em função das concentrações de substrato e células. Aeração e concentração de suplemento foram fixadas no nível 0. Os círculos representam os valores experimentais.....	135
Figura 36 - Fator de conversão de substrato a etanol em função da aeração e da concentração de substrato. Os círculos representam os valores experimentais.	137
Figura 37 - Curvas de produção de etanol obtidas nos experimentos contendo concentração inicial de xilose no nível +1 do planejamento fatorial completo 2^4 para a avaliação do efeito das condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651	138
Figura 38 - Cinética da hidrólise enzimática da sacarose do Condicionamento I (melaço de cana diluído em água; concentração = 45,49 g/L). As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.	140
Figura 39 - Concentração dos açúcares presentes no meio do experimento 15 (EXP 15) e no meio a base de xilose e melaço de cana condicionado com invertase (EXP 15 INV).....	140
Figura 40 - Curvas de crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol e subprodutos obtidas nas fermentações do meio do experimento 15 (A) e do meio a base de xilose e melaço de cana condicionado com invertase (B).	142
Figura 41 - Cinética da hidrólise enzimática da sacarose do Condicionamento II (solução mãe de melaço de cana; concentração = 238,4 g/L). As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.	143
Figura 42 - Concentração dos açúcares presentes no meio nos diferentes níveis de concentração de substrato/suplemento avaliados pelo DCCR – 2^2	144
Figura 43 - Concentração final de etanol em função das concentrações de substrato e células. Os círculos representam os valores experimentais.	147
Figura 44 - Curvas de produção de etanol obtida nos experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 utilizado para otimizar a produção de etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado.	148
Figura 45 - Produtividade volumétrica de etanol em função das concentrações de substrato e células. Os círculos representam os valores experimentais.....	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos referentes à produção de etanol, obtidos em cultivos de <i>S. stipitis</i>	23
Tabela 2 - Assimilação e fermentação de fontes de carbono por <i>S. stipitis</i> (PONCET, 1975)	25
Tabela 3 - Composição característica do extrato de levedura produzido por autólise e da peptona de caseína produzida por via enzimática ou ácida (SINGH; GHOSH, 2004)	27
Tabela 4 - Composição do melaço de cana-de-açúcar.....	33
Tabela 5 - Parâmetros cinéticos dos sistemas de transporte e das proteínas transportadoras de açúcar de <i>Scheffersomyces stipitis</i>	36
Tabela 6 - Matriz de experimentos dos planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} utilizados para a avaliação dos efeitos de diferentes fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651, em concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L	57
Tabela 7 - Matriz de experimentos do planejamento fatorial 2^4 utilizado para a avaliação dos efeitos de diferentes condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651	61
Tabela 8 - Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 utilizado para a otimização da produção de etanol por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 a partir de xilose melaço de cana condicionado	64
Tabela 9 - Composição das amostras analisadas pelo método de Kjeldahl.....	67
Tabela 10 - Parâmetros determinados durante os cultivos de <i>S. stipitis</i> DSM-3651 em meios com diferentes fontes de açúcar.....	80
Tabela 11 - Comparação entre a massa de nitrogênio teórica e aquela quantificada nas amostras de referência pelo método de Kjeldhal	91
Tabela 12 - Composição do melaço de cana e do suplemento nutricional referência. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas	92
Tabela 13 - Comparação entre a composição do melaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo com dados da literatura. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas	93
Tabela 14 - Estimativa dos efeitos das fontes de nutrientes avaliadas nos parâmetros fermentativos obtidos por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.....	106
Tabela 15 - Estimativa dos efeitos das fontes de nutrientes avaliadas nos parâmetros fermentativos obtidos por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.....	111

Tabela 16 - Parâmetros determinados em 24 horas nos cultivos de <i>S. stipitis</i> DSM-3651 em meio com suplemento nutricional referência (REF) ou alternativo (ALT) a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L	115
Tabela 17 - Coeficientes de regressão das variáveis independentes para a predição da velocidade média de consumo de substrato (Q_s) por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 em cultivos à base de xilose	127
Tabela 18 - Coeficientes de regressão das variáveis independentes para a predição da produtividade volumétrica de biomassa (Q_x) por <i>S. stipitis</i> DSM-3651 em cultivos à base de xilose	129
Tabela 19 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em células	131
Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em células	131
Tabela 21 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol	133
Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol	134
Tabela 23 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em etanol	135
Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em etanol	136
Tabela 25 - Parâmetros fermentativos referentes à produção de etanol obtidos nos experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 e tempo final de fermentação	145
Tabela 26 - Valor dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da concentração final de etanol	146
Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da concentração final de etanol	146
Tabela 28 - Valor dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol (Q_p)	148
Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol (Q_p)	149

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	22
2.1.1. Requerimentos nutricionais.....	24
2.2. Suplementos nutricionais alternativos.....	29
2.2.1. Produção e composição do melaço de cana-de-açúcar	30
2.3. Transporte de açúcares em <i>Scheffersomyces stipitis</i>	34
2.4. Metabolismo de açúcares em <i>Scheffersomyces stipitis</i>	38
2.4.1. Xilose	38
2.4.2. Arabinose	40
2.4.3. Glicose.....	41
2.4.4. Frutose.....	43
2.5. Bioconversão de xilose a etanol por <i>Scheffersomyces stipitis</i> em meios a base de xilose.....	44
2.5.1. Modelagem matemática e simulação	49
3. OBJETIVOS.....	52
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1. Microrganismo	53
4.2. Utilização de diferentes fontes de carbono por <i>S. stipitis</i> DSM-3651	53
4.3. Caracterização composicional do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência	54
4.4. Efeito do suplemento nutricional e da forma de pré-cultivo na bioconversão de xilose em etanol	55
4.5. Efeito das concentrações de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol	57
4.5.1. Análise estatística dos dados experimentais	58
4.6. Efeito da aeração na bioconversão de xilose em etanol	59
4.7. Efeito das condições de cultivo na bioconversão de xilose em etanol.....	60
4.7.1. Análise estatística dos dados experimentais	62
4.8. Hidrólise enzimática da sacarose do melaço de cana.....	63
4.9. Otimização da produção de etanol a partir de xilose e melaço de cana condicionado.....	63
4.9.1. Análise estatística dos dados experimentais	65
4.10. Métodos analíticos	65
4.10.1. Determinação do teor de nitrogênio	65
4.10.1.1. Validação da metodologia analítica.....	66
4.10.2. Determinação do teor de açúcares.....	67
4.10.2.1. Determinação da concentração de frutose nas presenças de xilose e etanol	67

4.10.3.	Determinação do teor de sólidos e cinzas	69
4.10.4.	Determinação da concentração celular	69
4.10.5.	Determinação do teor de etanol, xilitol e glicerol	70
4.10.6.	Determinação da atividade enzimática de invertase.....	70
4.11.	Determinação dos parâmetros fermentativos	71
4.12.	Determinação dos parâmetros cinéticos	72
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
5.1.	Utilização de diferentes fontes de carbono por <i>S. stipitis</i> DSM-3651.....	75
5.1.1.	Açúcares individuais	75
5.1.2.	Mistura xilose-glicose-frutose	87
5.2.	Validação da metodologia para a determinação do teor de nitrogênio	91
5.3.	Composição do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência.....	92
5.4.	Efeito da suplementação nutricional e da forma de pré-cultivo na bioconversão de xilose em etanol	95
5.4.1.	Concentração celular inicial de 0,07 g/L.....	95
5.4.2.	Concentração celular inicial de 3,00 g/L.....	99
5.4.3.	Análise comparativa	103
5.5.	Efeito das concentrações de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol.....	103
5.5.1.	Concentração celular inicial de 0,07 g/L.....	104
5.5.2.	Concentração celular inicial de 3,00 g/L.....	109
5.5.2.1.	Avaliação do suplemento nutricional alternativo proposto	114
5.5.3.	Análise comparativa	117
5.6.	Efeito da aeração na bioconversão de xilose em etanol	121
5.7.	Efeito das condições de cultivo na bioconversão de xilose em etanol	125
5.8.	Avaliação da produção de etanol a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado	138
5.9.	Otimização da produção de etanol a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado.....	142
6.	CONCLUSÕES	152
	REFERÊNCIAS	154
	APÊNDICES	166

1. INTRODUÇÃO

A levedura *Scheffersomyces stipitis* tem sido intensamente estudada desde a década de 80, principalmente por sua capacidade de realizar a fermentação de glicose e de xilose, os açúcares mais abundantes nos materiais lignocelulósicos, com altas eficiências de conversão em etanol. No contexto da produção comercial de etanol de segunda geração esta capacidade ganha destaque, uma vez que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada nos processos convencionais de produção de etanol, não é capaz de realizar a fermentação alcoólica desta pentose, o que afetaria substancialmente a viabilidade econômica do processo.

Considerando que a eficiência de um processo fermentativo é dependente, não só do agente de fermentação, mas também das condições de fermentação, alguns fatores devem ser ajustados para que melhores parâmetros fermentativos sejam obtidos por *S. stipitis*.

O primeiro deles está relacionado à nutrição da levedura; de modo geral os mostos obtidos a partir de materiais lignocelulósicos são deficientes do ponto de vista nutricional. Assim como os demais microrganismos, *S. stipitis* requer nutrientes para seu crescimento, e o suprimento adequado contribui para uma maior velocidade de formação de produto e menor geração de subprodutos. Embora esta suplementação seja realizada de forma eficiente em escala laboratorial, as fontes nutricionais complexas utilizadas (extrato de levedura, peptona, entre outros) apresentam custo elevado. Deste modo, tendo em vista o baixo valor agregado do etanol, a busca por suplementos alternativos é imprescindível para o aumento de escala da produção de etanol de segunda geração.

Não menos importante do que o fornecimento de nutrientes é o fornecimento adequado de oxigênio durante a fermentação. Melhores produtividades e eficiências de fermentação são obtidas quando *S. stipitis* é cultivada em semianaerobiose, onde o oxigênio é disponibilizado em concentrações limitantes; sob condições anaeróbias *S. stipitis* produz etanol em baixas quantidades com concomitante aumento da formação de subprodutos, enquanto que em condições aeróbias o metabolismo da levedura é desviado para a rota oxidativa, não havendo a produção de etanol. O ajuste da aeração em processos fermentativos utilizando *S. stipitis* tem grande importância, especialmente quando duas estratégias de otimização desta produção são empregadas: aumento da concentração inicial de substrato e aumento da concentração de células. Elevar a quantidade de substrato no mosto corresponde ao aumento da concentração de etanol ao final da fermentação, o que

contribui para a eficiência da etapa de destilação. Já o aumento da concentração de inóculo diminui o tempo de fermentação aumentando assim a produtividade. No entanto, uma maior população microbiana, oriunda do cultivo com alta concentração de substrato ou do emprego de uma alta carga de inóculo, irá consumir mais rápido o oxigênio disponível no meio, resultando em uma condição de anaerobiose caso o suprimento adequado de oxigênio não seja realizado.

Face ao exposto, o presente trabalho propôs utilizar diferentes abordagens para gerar maior conhecimento sobre o metabolismo da levedura *S. stipitis* e maximizar sua produção de etanol, por meio do ajuste das condições de fermentação supracitadas. Além disso, a utilização do melaço de cana, um subproduto da produção de açúcar de baixo valor agregado, que está inserido no contexto do etanol de segunda geração, foi investigada, tanto como um suplemento nutricional, como uma fonte de açúcares fermentescíveis para elevar a concentração inicial de substrato.

Inicialmente, avaliou-se a capacidade da levedura *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651 em utilizar os açúcares que compõe o bagaço de cana-de-açúcar (glicose, xilose e arabinose) e aqueles encontrados no melaço de cana (frutose e sacarose, além da glicose). Em seguida a substituição completa ou parcial de suplementos nutricionais tradicionais por melaço de cana enriquecido com fosfato de amônio foi investigada, devido ao seu conteúdo de nutrientes (micro e macro) e fatores de crescimento.

Posteriormente, os efeitos individuais e de interação das condições de fermentação (aeração e concentrações de substrato, células e suplemento) no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a partir de meio a base de xilose, foram determinados. Para isto, foi utilizada uma metodologia de planejamento experimental sequencial e análise estatística apropriada, a qual gerou dados que nos permitiram seguir com os estudos de otimização da produção de etanol.

Estes estudos visaram gerar uma nova vertente à proposta atual de integração dos processos de produção de etanol de primeira e de segunda geração. Enquanto que, nas configurações já avaliadas, o aumento da concentração de açúcar dos hidrolisados hemicelulósicos foi obtido pela adição de caldo de cana antes da etapa de fermentação, o presente trabalho utilizou melaço de cana tratado com invertases para este propósito, contando com a habilidade pouco explorada de *S. stipitis* em co-fermentar frutose, glicose e xilose. De acordo com esta proposta, os baixos teores de água no melaço, e de açúcares no hidrolisado, podem ser corrigidos em apenas uma etapa. Desta forma, os dados apresentados

no presente estudo referem-se à simultânea maximização da produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 e inserção de um insumo de baixo custo no processo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Scheffersomyces stipitis*

A levedura *Scheffersomyces stipitis* pertencia ao gênero *Pichia*, sendo denominada como *Pichia stipitis* Pignal (1967). Após análise filogenética, Kurtzman e Suzuki (2010) propuseram a criação do gênero *Scheffersomyces*, promovendo uma mudança na classificação taxonômica da levedura. Além da *Scheffersomyces stipitis*, espécies filogeneticamente relacionadas à *Candida shehatae* também foram incluídas no gênero *Scheffersomyces* (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

S. stipitis produz pseudohifas e pode se reproduzir sexuadamente, pela formação de ascósporos, ou assexuadamente, por brotamento multilateral (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). Isolada a partir da larva de um inseto, *S. stipitis* é estreitamente relacionada com várias leveduras que crescem em simbiose com besouros que habitam madeiras degradadas pela podridão branca. Ela contém genes que codificam celulasas, mananases, xilanases e outras enzimas de degradação que permitem a sobrevivência e o crescimento em ambientes como o supracitado (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009).

Além de possuir a maior capacidade natural de fermentar xilose dentre todos os microrganismos (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009), a levedura *S. stipitis* também é capaz de fermentar outros açúcares encontrados em diferentes materiais lignocelulósicos, como glicose, manose, galactose e celobiose, com altos fatores de conversão de açúcar em etanol (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986); sem mencionar a capacidade de utilização de xilana como fonte de carbono (JEFFRIES; KURTZMAN, 1994). Esta capacidade torna a *S. stipitis* uma levedura promissora para o uso industrial na produção de etanol lignocelulósico (AGBOGBO et al., 2006), tendo em vista que a fermentação de pentoses se faz necessária para a viabilidade econômica deste processo (HUMBIRD et al., 2011), e que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, amplamente utilizada em processos de produção de etanol, embora apresente elevada produtividade de etanol e tolerância a subprodutos de fermentação, não é capaz de fermentar xilose (ZALDIVAR et al., 2002).

Tabela 1 - Parâmetros fermentativos referentes à produção de etanol, obtidos em cultivos de *S. stipitis*

Código	Substrato	P _F (g/L) ^a	Y _{P/S} (g/g) ^b	Q _P (g/L.h) ^c	REF	
NRRL Y-7124	Xilose	20-57	0,39-0,42	0,21-0,38	1	
NRRL Y-7124	Glicose, xilose e arabinose	7-49	0,28-0,42	0,03-0,44	2	
NRRL Y-7124	Frutose	3	0,27	0,06	3	
	Xilose e frutose	3	0,25	0,07		
CBS 5773	Xilose	18	0,41	0,46	4	
CBS 5773	Xilose	11	0,28	0,07	5	
	Glicose e xilose	16	0,39	0,53		
NRRL Y-7124	Xilose	6-15	0,25-0,35	0,14-0,16	6	
NRRL Y-7124	Xilose	6-12	0,41-0,50	0,15-0,46	7	
NRRL Y-7124	Xilose	8	0,30	0,20	8	
	Xilose e arabinose	3	0,23	0,10		
	Glicose e xilose	8	0,28	0,28		
	Glicose, xilose e arabinose	6	0,21	0,21		
	Xilose	61	0,41	0,38		
NRRL Y-7124	Xilose	0-26	0,00-0,33	0,00-0,38	10	
NRRL Y-7124	Xilose	3-55	0,37-0,50	0,12-0,26	11	
	Material	Pré-tratamento				
NRRL Y-7124	Casca de semente de girassol	Ácido diluído	5-16	0,23-0,38	0,02-0,12	12
DSM-3651	Eucalipto	Auto hidrólise	1-2	0,27-0,41	0,02-0,04	13
		Ácido diluído	7-10	0,22-0,32	0,07-0,20	
DSM-3651	Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido diluído	5-8	0,20-0,30	0,04-0,16	14
NRRL Y-7124	Palha de arroz	Ácido diluído	0-16	0,00-0,47	0,00-0,34	15
DSM-3651	Palha de trigo	Explosão a vapor	9-12	0,26-0,45	0,08-0,25	16
NRRL Y-7124	Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido diluído	7-9	0,18-0,22	0,10-0,12	17
DSM-3651	Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido diluído/ Microondas	9	0,31	0,09	18
DSM-3651	Palha de trigo	Ozonólise	16-22	0,31-0,43	0,18-0,41	19
DSM-3651	Palha de trigo	Auto hidrólise	4-5	0,39-0,42	0,02-0,03	20
		Ácido diluído	2-3	0,20-0,23	0,01-0,02	
		Alcalino	2-13	0,05-0,38	0,01-0,08	
		Peróxido alcalino	14-17	0,38-0,40	0,08-0,10	

^a Concentração máxima de etanol; ^b Fator de conversão de substrato em etanol; ^c Produtividade volumétrica de etanol;

1- SLININGER et al., 1985; **2-** DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1988; **3-** BICHO; CUNNINGHAM; LEE, 1989; **4-** DELLWEG; RIZZI; KLEIN, 1989; **5-** GROOTJEN; VAN DER LANS; LUYBEN, 1991; **6-** FURLAN; BOUILLOUD; CASTRO, 1994; **7-** BOYNTON; MCMILLAN, 1994; **8-** MCMILLAN; BOYNTON, 1994; **9-** SLININGER et al., 2006; **10-** SILVA et al., 2012; **11-** FARIAS; ANDRADE; MAUGERI-FILHO, 2014; **12-** TELLI-OKUR; EKEN-SARAÇOGLU, 2008; **13-** MENDES et al., 2009; **14-** CANILHA et al., 2010; **15-** SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010; **16-** BELLIDO et al., 2011; **17-** MILESSI et al., 2012; **18-** AHI et al., 2013; **19-** BELLIDO et al., 2013; **20-** TORQUERO; BOLADO, 2014.

A *S. stipitis* DSM-3651 é uma linhagem extensamente utilizada em estudos acerca da produção de etanol a partir de meios contendo açúcares encontrados na biomassa lignocelulósica, sejam estes sintéticos ou oriundos de pré-tratamentos. A Tabela 1 compila parâmetros fermentativos relacionados à produção de etanol, obtidos por diversos estudos que utilizaram esta linhagem, a qual também se encontra depositada em outras coleções que não a DSMZ – *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, recebendo os códigos ATCC 58376, CBS 5773 ou NRRL Y-7124.

Embora tenha potencial, alguns parâmetros de referência (*benchmarks*), relacionados à conversão da xilose, precisam ser alcançados para que a *S. stipitis* seja utilizada em uma escala de produção comercial de etanol lignocelulósico: produção de pelo menos 5-6% (m/v) de etanol, com rendimento superior a 0,4 g/g, em 36 horas de fermentação (JEFFRIES, 1985).

2.1.1. Requerimentos nutricionais

No metabolismo microbiano, tanto os processos anabólicos como os catabólicos são influenciados pela composição nutricional do meio (MADIGAN et al., 2012), parâmetro importante para a otimização do crescimento celular e/ou da formação de produto em processos fermentativos (KENNEDY; KROUSE, 1999). Uma composição de meio de cultura adequada não irá apenas fornecer nutrientes e condições para o crescimento celular, mas também irá induzir a formação dos produtos desejados, suprimindo a formação de subprodutos, além de representar um componente importante do custo total do processo (LEE, 2006).

Diversos trabalhos utilizando a levedura *S. stipitis* constataram as influências exercidas pela composição do meio de cultivo, uma vez que a variação das fontes de nutrientes acarretou em alterações no crescimento celular, bem como na produção de etanol (GUEBEL et al., 1992; SLININGER et al., 2006; LI et al., 2009; FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012). Além disso, a otimização da formulação do meio foi capaz de aumentar a tolerância de *S. stipitis* a inibidores como etanol, e furfural e 5-hidroximetilfurfural, no caso de meios preparados a partir de hidrolisados lignocelulósicos (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009).

Assim como as demais leveduras, *S. stipitis* possui requerimentos nutricionais, tipo e quantidade de nutrientes, específicos. Tais requerimentos variam com a espécie e, até mesmo, a linhagem considerada (SLININGER et al., 2006). De forma geral, grande parte das leveduras apresenta bom crescimento em meios nutricionalmente simples, compostos por fontes de carbono e nitrogênio, junto com íons inorgânicos e alguns fatores de crescimento (WALKER, 2009).

Quanto à fonte de carbono, pode-se dizer que a levedura *S. stipitis* é versátil na assimilação de diferentes fontes. Ela é capaz de assimilar galactose, maltose, celobiose, trealose, ribose, ramnose, etanol, glicerol, manitol, succinato e citrato, entre outros (KURTZMAN; FELL, 1997). Dentre os açúcares, glicose, galactose, manose, celobiose, xilose (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986) e frutose (BICHO; CUNNINGHAM; LEE, 1989) podem também ser fermentados a etanol.

Poncet (1975) comprovou a versatilidade de *S. stipitis* em assimilar e fermentar diversas fontes de carbono, incluindo açúcares, álcoois e ácidos orgânicos (Tabela 2). Para esta avaliação, foram utilizados testes bioquímicos convencionais, e os resultados foram interpretados por meio da atribuição de notas de 0 a 5. Um teste negativo (por exemplo, não-assimilação ou não-fermentação de um açúcar) foi registrado como zero, e as notas 1, 2, 3, 4 e 5 foram relacionadas com a intensidade e a rapidez de utilização do substrato, ou com a intensidade e a velocidade de fermentação.

Tabela 2 - Assimilação e fermentação de fontes de carbono por *S. stipitis* (PONCET, 1975)

Assimilação				Fermentação	
Fonte de carbono	Nota	Fonte de carbono	Nota	Fonte de carbono	Nota
Galactose	5	D-arabinose	3	Glicose	4
Sacarose	5	D-ribose	5	Galactose	3
Maltose	5	L-ramnose	5	Sacarose	0
Celobiose	5	Etanol	5	Maltose	3
Trealose	5	Glicerol	5	Lactose	0
Lactose	4	Manitol	5	Rafinose	0
Rafinose	0	Lactato	2		
Xilose	5	Succinato	5		
L-arabinose	4	Citrato	5		

O nitrogênio é utilizado na síntese de constituintes celulares vitais para o crescimento de leveduras, como proteínas e ácidos nucleicos (MADIGAN et al., 2012). Em *S. stipitis*, o nitrogênio exerce influência não só no desenvolvimento celular, mas também na formação

de produto; na ausência deste nutriente, *S. stipitis* NRRL Y-7124 foi incapaz de converter xilose ou glicose em etanol (SLININGER et al., 2006).

O tipo da fonte de nitrogênio, complexa ou definida, também influencia o crescimento e a eficiência fermentativa de *S. stipitis* (GUEBEL et al. 1992). Dentre as fontes complexas mais frequentemente utilizadas em processos fermentativos, estão o extrato de levedura e a peptona. O extrato de levedura é um concentrado da fração solúvel da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtido a partir de autólise a 50–55 °C. Ele é composto basicamente por vitaminas e aminoácidos (Tabela 3). A peptona consiste de um hidrolisado de proteínas de diferentes fontes (carne, sementes, queratina, caseína, entre outros). Sua composição, tipo e quantidade de aminoácidos, é influenciada tanto pela origem como pelo método de hidrólise, enzimático ou ácido (Tabela 3) (SINGH; GHOSH, 2004). Por sua vez, nitrogênio orgânico na forma de ureia (SLININGER et al., 2006; CARNEIRO, 2011; FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012) e inorgânico, a partir de sulfato de amônio (GUEBEL et al., 1992; UNREAN; NGUYEN, 2013) ou fosfato de amônio (NIGAM, 2001; RUDOLF et al., 2008; CARNEIRO, 2011), são exemplos de fontes definidas de nitrogênio empregadas em processos fermentativos conduzidos com *S. stipitis*. Vale ressaltar que a levedura *S. stipitis* não utiliza nitrato como fonte de nitrogênio (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Por exemplo, Carneiro (2011) avaliou a utilização de fosfato de amônio, além de ureia, arginina e ácido glutâmico, como fontes de nitrogênio em cultivos de *S. stipitis* NRRL Y-7124. Os meios foram compostos por 60 g/L de xilose, 10 g/L de glicose e 10 g/L de arabinose, além de 3 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Foi observado que os meios contendo fosfato de amônio apresentaram, de modo geral, menor crescimento celular e maior produção de etanol. Na fermentação controle (extrato de levedura como única fonte de nitrogênio), apenas 78,9% do substrato foi consumido após 72 horas de fermentação, atingindo uma concentração máxima de etanol de 16,5 g/L. Com a adição de 6 g/L de fosfato de amônio, 100% do substrato foi consumido em 48 horas, e uma concentração de 25 g/L de etanol foi obtida. No ensaio cuja suplementação foi composta por todas as fontes de nitrogênio testadas, a concentração de etanol subiu para 29,3 g/L.

Quanto aos elementos inorgânicos, requeridos em menores concentrações, o enxofre está presente nos aminoácidos cisteína e metionina, e nas vitaminas tiamina e biotina; o fósforo compõe os ácidos nucleicos e os fosfolipídios; o potássio é requerido para a atividade de várias enzimas; o magnésio tem função de estabilizar ribossomos, membranas e ácidos nucleicos, além de ser capaz de diminuir a perda de viabilidade de leveduras submetidas ao

estresse por etanol (HU; BAI; AN, 2003; MADIGAN et al., 2012). Além destes, outros elementos inorgânicos atuam como cofatores em muitos processos celulares e reações enzimáticas essenciais para a célula microbiana (HOGG, 2005); o ferro, por exemplo, desempenha papel importante na respiração celular, sendo um componente chave de citocromos e proteínas utilizadas nas reações da cadeia de transporte de elétrons (MADIGAN et al., 2012).

Tabela 3 - Composição característica do extrato de levedura produzido por autólise e da peptona de caseína produzida por via enzimática ou ácida (SINGH; GHOSH, 2004)

Extrato de levedura		Peptona de caseína		
Componente	% (m/m)	Componente	Enzimático % (m/m)	Ácido % (m/m)
Nitrogênio total	8,8	Nitrogênio total	12,8	8,3
NaCl	< 1,0	NaCl	3,0	38,0
		Cinzas	5,8	39,7
<i>Aminoácidos</i>				
Alanina	3,4	Alanina	1,7	1,4
Ácido aminobutírico	0,1	Arginina	3,0	0,5
Arginina	2,1	Aspartato	0,9	3,3
Asparagina	3,8	Cistina	-	0,1
Cistina	0,3	Glutamato	3,9	8,0
Glutamato	7,2	Glicina	0,4	0,9
Glicina	1,6	Histidina	1,3	0,5
Histidina	0,9	Isoleucina	3,0	1,1
Isoleucina	2,0	Leucina	7,2	3,0
Leucina	2,9	Lisina	6,1	1,3
Lisina	3,2	Metionina	2,3	1,1
Metionina	0,5	Fenilalanina	3,3	0,1
Ornitina	0,3	Prolina	0,7	3,5
Fenilalanina	1,6	Serina	2,9	2,0
Prolina	1,6	Treonina	2,2	1,3
Serina	1,9	Triptofano	0,9	-
Treonina	1,9	Tirosina	1,4	0,5
Tirosina	0,8	Valina	3,6	1,7
Valina	2,3			
<i>Vitaminas (ppm)</i>				
Tiamina	20-30			
Riboflavina	50-70			
Piridoxina	25-35			
Nicotinamida	600			
Ácido pantotênico	200			

Os fatores de crescimento, por sua vez, são compostos orgânicos requeridos em concentrações muito baixas, para funções catalíticas ou estruturais específicas na célula. Esta classe de nutrientes é composta prioritariamente por vitaminas, as quais exercem funções vitais como componentes de coenzimas. Os requerimentos por fatores de crescimento variam entre as leveduras. A exigência de um fator de crescimento por uma espécie de levedura indica que ela não é capaz de sintetizá-lo, resultando em uma paralisação do crescimento caso este fator não seja adicionado ao meio de cultivo (WALKER, 2009).

Embora existam diferentes tipos de nutrientes, cada qual desempenhando funções específicas dentro da célula, o que pode ser observado é que, além do efeito individual, um efeito de interação tem sido reportado em cultivos utilizando *S. stipitis* (GUEBEL et al., 1992; SLININGER et al., 2006; SILVA et al., 2012).

O trabalho de Silva et al. (2012) avaliou a influência de sulfato de magnésio, ureia e extrato de levedura na fermentação de xilose (90 g/L) em meio sintético, utilizando a levedura *S. stipitis* NRRL Y-7124. Em relação às fontes de nitrogênio individuais, os melhores resultados de consumo de açúcar e de produção de etanol foram obtidos a partir de meios contendo extrato de levedura. Uma concentração máxima de 15,70 g/L de etanol foi obtida quando apenas o extrato de levedura (3 g/L) foi adicionado. No entanto, o uso combinado de extrato de levedura com 2,3 g/L de ureia aumentou este valor para 19,83 g/L. Ademais, a adição de 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ foi responsável por um aumento de 20% na concentração máxima de etanol (24,17 g/L). Esta melhora foi atribuída à interação positiva entre ureia e sulfato de magnésio, uma vez que a adição deste metal em meio contendo apenas extrato de levedura não alterou a produção de etanol.

De forma semelhante, Slininger et al. (2006) constataram que as produções de etanol e biomassa por *S. stipitis* NRRL Y-7124 são funções da interação entre ureia, minerais e aminoácidos. Uma proporção adequada entre aminoácidos e ureia suportou uma maior produção de etanol quando comparada àquelas obtidas quando ambos foram fornecidos individualmente. Em meios sintéticos contendo 150 g/L de xilose, diferentes relações aminoácidos:ureia foram testadas, fixando uma concentração final de nitrogênio de 0,15 M para todos os ensaios. Menores valores de concentração máxima e de produtividade volumétrica de etanol foram obtidos quando 100% do nitrogênio foi fornecido ou por aminoácidos (23,6 g/L e 0,08 g/L.h) ou por ureia (11,8 g/L e 0,04 g/L.h). No entanto, quando 80% do nitrogênio presente no meio foi fornecido pela ureia e 20% por aminoácidos, maiores concentração e produtividade volumétrica de etanol foram obtidas, 46,0 g/L e 0,21 g/L.h, respectivamente. Os elementos minerais também apresentaram interações com ambas as

fontes de nitrogênio (quando testadas separadamente), embora um efeito mais pronunciado tenha sido observado pelo uso combinado com aminoácidos. Dentre os vários minerais testados, magnésio, ferro, zinco, manganês e cálcio foram aqueles que resultaram em benefícios mais significantes, tendo a produção de etanol chegado a 54 g/L em condições adequadas de cultivo. Além disso, o estudo evidenciou que os minerais foram nutrientes chave para a produção de etanol por si só, e não apenas para o crescimento da levedura, por meio de experimentos com células na fase estacionária de crescimento.

Além de minerais e fontes de nitrogênio, fatores de crescimento, como vitaminas, também apresentam efeito positivo no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis*, mostrando que os bons resultados comumente obtidos pelo uso de fontes complexas de nitrogênio, mais especificamente o extrato de levedura, podem ser atribuídos, pelo menos em parte, a interações envolvendo fatores de crescimento. Guebel et al. (1992), por exemplo, substituíram o extrato de levedura por uma fonte definida de nitrogênio, o sulfato de amônio, na fermentação de um meio sintético contendo 50 g/L de xilose, utilizando *S. stipitis* NRRL Y-7124. Quando vitaminas e minerais, na mesma quantidade e composição encontradas no extrato de levedura, foram adicionados ao meio, em complementação ao sulfato de amônio, o fator de rendimento de etanol por biomassa ($Y_{P/X}$) aumentou de 0,68 para 1,45 g/g, assim como a produtividade volumétrica de etanol (Q_P) que foi de 0,14 para 0,22 g/L.h. Este resultado sugere que o fornecimento de nitrogênio pode ser feito utilizando fontes de diferentes naturezas, desde que a demanda por micronutrientes e/ou fatores de crescimento também seja suprida.

2.2. Suplementos nutricionais alternativos

Apesar da sua importância, a suplementação nutricional dos meios de fermentação é um dos principais fatores que impactam a viabilidade econômica da produção de etanol lignocelulósico, tendo em vista que o baixo valor agregado do etanol inviabiliza a utilização de nutrientes de alto custo (FERREIRA et al., 2011). Deste modo, salvo casos especiais como o apresentado por Carneiro (2011), no qual o hidrolisado de palha de arroz dispensou a suplementação com altas quantidades de nutrientes de elevado custo, devido à sua composição rica em micronutrientes e nitrogênio, há a necessidade de se elaborar formulações para suplementação nutricional a partir de subprodutos de baixo custo, porém

capazes de suprir todos os requerimentos nutricionais do agente de fermentação (AMARTEY; JEFFRIES, 1994).

Um exemplo de nutriente alternativo de baixo custo é a milhocina. Ela é um subproduto do processamento de milho por via úmida, contendo aminoácidos, oligopeptídeos, vitaminas e nucleotídeos (HERMANN, 2003). Neste processamento, o milho é embebido em água quente e posteriormente macerado, amolecendo os grãos e extraindo os compostos solúveis. Esta água de maceração é então drenada e evaporada até a formação de um licor contendo aproximadamente 50% de massa seca, a milhocina (THOMSEN, 2005).

Em estudo utilizando *S. stipitis* CBS 6054, na fermentação de meio contendo 80 g/L de xilose, foi observado que a milhocina, como única fonte de nitrogênio, vitaminas e demais requerimentos nutricionais, foi capaz de dar suporte a taxas de produção de etanol similares às obtidas em fermentações suplementadas com peptona, extrato de levedura e minerais. Em ensaio contendo 30 g/L de milhocina, valores de 0,42 g/g de rendimento e 0,93 g/L.h de produtividade de etanol foram alcançados, evidenciando o potencial deste subproduto como substituto das tradicionais fontes de nutrientes (AMARTEY; JEFFRIES, 1994). Já Kadam e Newman (1997) mostraram a possibilidade de reduzir em cerca de 50 vezes os gastos com suplementação, por meio da substituição do passo de preparo de inóculo com extrato de levedura e peptona, pela suplementação do meio de fermentação com milhocina. Utilizando *Saccharomyces cerevisiae* D₅A em processo de sacarificação e fermentação simultânea de *poplar*, os autores observaram que a suplementação com 0,3 % de milhocina e 2,5 mM de MgSO₄.7H₂O proporcionou uma eficiência de fermentação próxima de 80%, o que possibilitou reduzir os custos com suplementos nutricionais convencionais, a base de extrato de levedura e peptona, de U\$ 27,86 para U\$ 0,50/1000 L de meio.

2.2.1. Produção e composição do melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar é um subproduto da produção de açúcar, obtido após a clarificação, concentração e evaporação do caldo da cana, até a cristalização da sacarose (BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

O processamento da cana visando à produção de açúcar envolve várias etapas: limpeza da cana, extração, tratamento e evaporação do caldo, cozimento do xarope, cristalização da sacarose, centrifugação e secagem do açúcar (Figura 1) (MARQUES, 2009).

Figura 1 - Fluxograma do processamento da cana-de-açúcar na indústria sucroalcooleira.

Fonte: Baseado em Marques, 2009; Alcarde, 2013.

Quanto à limpeza, a cana inteira geralmente passa por um sistema de lavagem com água, enquanto que a cana colhida mecanicamente geralmente é conduzida para um sistema de limpeza a seco com peneiras vibratórias e ar comprimido, que minimiza a perda de açúcares em relação ao processo de lavagem (MARQUES, 2009). Em seguida ocorre a extração do caldo, que consiste no processo físico de separação da fibra (bagaço), sendo feito, fundamentalmente, por meio de dois processos: moagem ou difusão (ALCARDE, 2013). O primeiro, típico nos processos da indústria brasileira, consiste em extrair o caldo da cana desfibrada por meio da aplicação de uma pressão mecânica, utilizando um conjunto de ternos de moenda (MARQUES, 2009). Durante a passagem do bagaço de uma moenda

para outra, realiza-se a embebição, ou seja, a adição de água ou caldo diluído, com a finalidade de se aumentar a extração de sacarose, que atinge uma eficiência de 96% ao final do processo. O bagaço final sai com umidade em torno de 50% e segue para as caldeiras, onde é queimado para a geração de vapor (ALCARDE, 2013).

O tratamento do caldo é então realizado para remover resíduos sólidos e impurezas orgânicas presentes, garantindo a boa qualidade do açúcar produzido. A remoção dos sólidos em suspensão é realizada por peneiramento. Já para remover partículas menores e demais impurezas presentes, uma sequência de tratamentos físicos e químicos é adotada. Os principais são: aquecimento, sulfitação, calagem, decantação, filtração e flotagem (MARQUES, 2009; ALCARDE, 2013). O então denominado caldo clarificado é aquecido novamente e segue para a etapa de evaporação até atingir uma concentração de 65% de sólidos solúveis (xarope 65 °Brix), ideal para o início do processo de cozimento (MARQUES, 2009).

No cozimento, o xarope é concentrado, via evaporação controlada da água, até o início da formação de cristais de sacarose. Depois do primeiro cozimento, a chamada massa A é enviada para os cristalizadores, responsáveis por finalizar a formação dos cristais (MARQUES, 2009). A massa A é um produto que contém cristais de aproximadamente 0,5 mm, envolvidos numa película de mel (solução líquida rica em açúcares). Na centrifugação, ocorre a separação do mel (mel A), que irá para o segundo cozimento, e do açúcar propriamente dito, que é enviado para a etapa de secagem. Após o segundo ciclo, cozimento, cristalização e centrifugação da massa B, obtém-se o magma B (cristais de açúcar B, de aproximadamente 0,2 mm) e o mel B. O magma B é reutilizado no primeiro cozimento, enquanto o mel B é destinado ou para a produção de álcool ou para um terceiro ciclo (cozimento, cristalização e centrifugação da massa C) (SARAIVA, 2008). Nos processos mais comuns da região centro-sul do Brasil, o processo de produção de açúcar se encerra após o cozimento, cristalização e centrifugação da massa B. Já nas configurações industriais ainda típicas do nordeste brasileiro, o terceiro ciclo é utilizado (MARQUES, 2009).

Por conter ainda sacarose e um elevado teor de glicose e frutose (Tabela 4), o melaço (mel final, B ou C, dependendo da configuração do processo) é utilizado, principalmente, como matéria-prima para a produção do etanol, podendo ser aproveitado também na produção de rações, levedura prensada para panificação, antibióticos, entre outros (NOGUEIRA, 2008; ALCARDE, 2013). Na produção de etanol, ele é adicionado ao caldo clarificado, elevando a concentração de sólidos solúveis de cerca de 15 °Brix para cerca de

18 °Brix, a fim de otimizar a fermentação (MARQUES, 2009). A cada tonelada de cana processada, são produzidos de 40 a 60 kg de melaço (ALCARDE, 2013).

Tabela 4 - Composição do melaço de cana-de-açúcar

Componente (% m/m)	JONES; THOMAS; INGLEDEW, 1994	GHORBANI et al., 2011	OLBRICH, 1963	PAZOUKI et al., 2000	STUPIELLO, 1974 ¹
Sólidos totais	76,6	76,7	80,0	80,6	82,0
Sacarose	33,4	51,5	32,0	-	40,0
Frutose	13,0	4,1	14,0	-	9,0
Glicose	10,0	9,6	16,0	-	12,0
Maltose	0,1	-	-	-	-
Maltotriose	0,3	-	-	-	-
Nitrogênio	0,4	0,02	-	0,35	8,0 ⁶
Cinzas	9,9	-	8,0	-	8,5
Al	-	-	-	8,24 x 10 ⁻³	-
Cu	-	-	-	4,18 x 10 ⁻³	-
Zn	-	-	-	5,99 x 10 ⁻³	-
Mn	-	-	-	2,02 x 10 ⁻³	-
Ba	-	-	-	8,84 x 10 ⁻³	-
Ni	-	-	-	1,90 x 10 ⁻³	-
S	-	-	-	6,76 x 10 ⁻²	-
Na	-	-	-	0,16	-
K	-	-	-	3,06	3,80 ²
Fe	-	-	-	2,98 x 10 ⁻²	-
Mg	-	-	-	0,66	0,50 ³
Si	-	-	-	0,13	-
Ca	-	-	-	4,88	1,05 ⁴
P	-	-	-	0,10	0,15 ⁵
<i>Vitaminas (µg/100 g)</i>					
Tiamina	-	-	830	-	-
Riboflavina	-	-	250	-	-
Piridoxina	-	-	650	-	-
Ácido fólico	-	-	4	-	-
Biotina	-	-	120	-	-
Ácido pantotênico	-	-	2140	-	-

- não determinado; ¹citado por Santos (2008); ²K₂O; ³MgO; ⁴CaO; ⁵P₂O₅; ⁶Matéria nitrogenada.

Além de sacarose, frutose e glicose, açúcares que podem ser assimilados por *S. stipitis* como fonte de carbono (KURTZMAN; FELL, 1997), o melaço contém metais importantes para o metabolismo desta levedura, como magnésio (SLININGER et al., 2006; SILVA et al., 2012), cobre (LI et al., 2009), potássio, cálcio, fósforo e sódio, entre outros (HOGG, 2005). Adicionalmente, o melaço de cana representa uma valiosa fonte de fatores

de crescimento, presentes em quantidades suficientes para impactar os processos fermentativos principalmente em relação ao crescimento da levedura (OLBRICH, 1963).

2.3. Transporte de açúcares em *Scheffersomyces stipitis*

O transporte de açúcares em *Scheffersomyces stipitis* é realizado por proteínas transportadoras transmembrana. Conforme revisado por Leandro, Fonseca e Gonçalves (2009), muitos dos transportadores de monossacarídeos atuam por difusão facilitada, o qual é um mecanismo que não utiliza energia e catalisa o transporte de solutos a favor do gradiente de concentração.

No entanto, os primeiros estudos voltados à caracterização dos sistemas de transporte de açúcares em *S. stipitis* postularam a ocorrência de transporte ativo; tanto para glicose como para xilose, por meio de simporte com prótons. As evidências que levaram a esta conclusão foram: o comprovado uso de prótons, evidenciado pela alcalinização transitória do meio após a adição do açúcar, e a inibição da atividade de transporte, ocasionada por desacopladores da fosforilação oxidativa (KILIAN; VAN UDEN, 1988; DOES; BISSON, 1989). Os transportadores de monossacarídeos do tipo simporte próton/soluto requerem energia; a entrada do soluto na célula está acoplada a entrada de prótons, os quais devem ser novamente eliminados às custas de ATP. Eles operam quando a concentração de açúcar no meio é baixa, e são capazes de realizar o transporte contra o seu gradiente de concentração (LEANDRO; FONSECA; GONÇALVES, 2009).

No estudo de Kilian e van Uden (1988), foi observado que a glicose foi captada utilizando apenas um tipo de transporte, de baixa afinidade, o qual apresentou K_m de 0,26-0,73 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 3,53-6,22 mmol/g.h. De forma semelhante, van Urk et al. (1989) também concluíram que um único tipo de transporte foi responsável pela captação de glicose em *S. stipitis*; com K_m de 0,015 mM e $V_{m\acute{a}x}$ de 6 mmol/g.h; classificado como de alta afinidade.

Em contrapartida, para xilose, sistemas de transporte envolvendo transportadores de alta e baixa afinidade foram identificados. No trabalho de Does e Bisson (1989) o sistema de baixa afinidade apresentou K_m de cerca de 380 mM, enquanto que o valor desta constante foi de 0,9 mM para o sistema de alta afinidade. Já Kilian e van Uden (1988) obtiveram valores de K_m de 1,89-3,69 mM para o sistema de baixa afinidade, e de 0,06-0,38 mM para

o sistema de alta afinidade; os valores de $V_{\text{máx}}$ determinados para os respectivos sistemas de transporte foram de 2,34-3,51 e 0,38-0,88 mmol/g.h.

A glicose, além de possuir maior afinidade com os transportadores de *S. stipitis*, conforme mostram os valores de K_m apresentados, também exerce inibição do transporte de xilose. De acordo com Kilian e van Uden (1988) a glicose compete com a xilose no transporte pelo sistema de baixa afinidade, inibindo a captação da pentose (aumento do K_m); e inibe não competitivamente o transporte de xilose pelo sistema de alta afinidade (redução do $V_{\text{máx}}$).

Mais recentemente, os transportadores de açúcar de *S. stipitis* começaram a ser identificados e caracterizados. Embora os estudos acerca do genoma da levedura *S. stipitis* indiquem que existe um grande número de genes putativos responsáveis por codificar transportadores de açúcar (JEFFRIES et al. 2007; LIU et al., 2012; YOUNG et al., 2011), muitos destes ainda não foram completamente caracterizados.

Weierstall, Hollenberg e Boles (1999) clonaram, sequenciaram e caracterizaram três genes que codificam transportadores de glicose em *S. stipitis*, SUT1, SUT2 e SUT3; por mecanismo envolvendo difusão facilitada. Eles foram expressos em *Saccharomyces cerevisiae*, complementando uma cepa incapaz de captar monossacarídeos. Os três transportadores foram capazes de restabelecer a captação de glicose pela levedura com afinidades semelhantes às reportadas para os transportadores de *S. cerevisiae*; no entanto, com propriedades cinéticas significativamente diferentes (Tabela 5). Com afinidades inferiores às observadas para glicose, SUT1, SUT2 e SUT3 foram capazes de mediar também a captação de xilose; SUT1 e SUT3, a captação de frutose. Verificou-se que a transcrição do gene SUT1 foi fortemente induzida por glicose, independentemente do suprimento de oxigênio; tendo sido sugerido que Sut1 seja um transportador de baixa afinidade por xilose, indutível por glicose. Quanto à transcrição dos genes SUT2 e SUT3, verificou-se que estes foram expressos exclusivamente sob condições aeróbicas; tendo sido sugerido que Sut2 e Sut3 sejam transportadores de alta afinidade por xilose, induzidos pela presença de oxigênio.

No trabalho de Weierstall, Hollenberg e Boles (1999), uma linhagem de *Scheffersomyces stipitis* sem gene SUT1 funcional também foi gerada e caracterizada quanto ao transporte de açúcares. Verificou-se transporte monofásico (um componente) de glicose e xilose para células crescidas em meio à base de glicose sob aerobiose (K_{MS} iguais a 0,07 e 7,0 mM, respectivamente); em comparação a transporte bifásico (dois componentes), na linhagem selvagem (K_{MS} iguais a 0,09 e 1,9 mM, e 3,2 e 80 mM, respectivamente). Foi

sugerido que, no sistema de transporte bifásico, Sut1 constitui-se no transportador de baixa afinidade.

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos dos sistemas de transporte e das proteínas transportadoras de açúcar de *Scheffersomyces stipitis*

Sistema de transporte/ Proteína transportadora	K_m (mM)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/g.h)	Referência
Glicose (baixa afinidade)	0,26 - 0,73	3,53 - 6,22	KILIAN; VAN UDEN, 1988
Xilose (alta afinidade)	0,04 - 0,38	0,38 - 0,88	
Xilose (baixa afinidade)	1,89 - 3,69	2,34 - 3,51	
Xilose (baixa afinidade)	380	ND	DOES; BISSON, 1989
Xilose (alta afinidade)	0,9	ND	
Xilose (alta afinidade)	0,015	6	VAN URK et al., 1989
SUT1 (glicose)	1,5±0,1	2,70±0,06	WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999
SUT1 (xilose)	145,0±1,0	7,92±0,06	
SUT1 (frutose)	36,0±1,0	8,28±0,06	
SUT2 (glicose)	1,1±0,1 / 55,0±11,0	0,20±0,01 / 1,68±0,24	
SUT2 (xilose)	49,0±1,0	2,46±0,06	
SUT2 (frutose)	> 400	> 12	
SUT3 (glicose)	0,8±0,1 / 31,0±0,1	0,22±0,1 / 1,32±0,1	
SUT3 (xilose)	103,0±3,0	5,22±0,12	
SUT3 (frutose)	49,0±1,0	2,76±0,06	
Xyp29	56,0±9,4	0,042±0,002	DU; LI; ZHAO, 2010
Xut3	4,09 ± 1,08 mM	0,68±0,14	YOUNG et al., 2012

ND – Não determinado.

De acordo com Young, Lee e Alper (2010), o desenvolvimento da capacidade para cofermentação de hexoses e pentoses é considerado um dos obstáculos principais para a produção de biocombustíveis a partir de biomassas lignocelulósicas. De acordo com os autores, *Sacharomyces cerevisiae* consegue transportar pentoses através da membrana plasmática, via transportadores HXT; entretanto, como a afinidade destes carreadores por hexoses é muito maior que por pentoses, os cultivos em presença de glicose e xilose, por exemplo, são geralmente caracterizados pela ocorrência de diauxia. Foi proposto o desenvolvimento de uma abordagem denominada engenharia panmetabólica, para a otimização das etapas interdependentes de transporte e metabolismo de hexoses e pentoses em *Saccharomyces cerevisiae*. Um estudo subsequente (Young et al., 2011), entretanto, não conseguiu provar a existência de transportadores dedicados para xilose no genoma de

Scheffersomyces stipitis que se mostrassem adequados para permitir uma eficiente cofermentação de glicose e xilose por *Saccharomyces cerevisiae*.

Young et al. (2011) avaliaram o efeito da expressão heteróloga de 23 proteínas transportadoras de monossacarídeos (putativas) em uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* incapaz de captar monossacarídeos; incluindo os genes XUT1 e XUT3 de *Scheffersomyces stipitis*. Em meio a base de glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L), entretanto, verificou-se consumo incompleto dos açúcares (16 e 17%, respectivamente); a relação entre o número de moléculas de xilose e glicose transportadas por unidade de tempo foi de 0,69 na linhagem expressando o gene XUT1, e de 0,11 na linhagem expressando o gene XUT3. Para fins de comparação, a expressão dos genes responsáveis pela codificação de proteínas transportadoras de glicose e xilose de *Candida intermedia* na mesma linhagem, submetida às mesmas condições de cultivo, resultou em consumo de 78% (GXF1) e 14% (GXS1) dos açúcares disponíveis; as relações entre o número de moléculas de xilose e glicose transportadas por unidade de tempo foram, respectivamente, de 0,10 e 0,51.

Em um estudo posterior, Young et al. (2012) determinaram os parâmetros cinéticos do transporte de xilose pelo transportador codificado pelo gene XUT3, o qual apresentou K_m de $4,09 \pm 1,08$ mM e $V_{m\acute{a}x}$ de $11,31 \pm 2,31$ nmol/min/mg.

Du, Li e Zhao (2010), entretanto, reportaram a descoberta de um gene que codifica uma proteína de transporte específica para xilose, sem atividade significativa no transporte de glicose e arabinose, a partir de transcritos isolados durante cultivos de *Scheffersomyces stipitis* em meio à base de xilose. O transportador Xyp29 apresentou K_m de $56,0 \pm 9,4$ mM e $V_{m\acute{a}x}$ de $41,5 \pm 2,3$ μ mol/h.g; tendo sido proposto que seu mecanismo de transporte não é acoplado ao transporte de prótons, ou seja, Xyp29 realiza o transporte de xilose por difusão facilitada.

Dentre os diversos transportadores putativos que ainda não foram caracterizados estão o AUT1, um transportador de arabinose do tipo simporte próton/arabinose e os transportadores de hexose da família HXT (LIU et al., 2012). Estes últimos, além de estarem relacionados com o transporte de glicose, provavelmente também contribuem para o transporte de outros monossacarídeos em *S. stipitis*. Conforme revisado por Leandro, Fonseca e Gonçalves (2009), xilose e arabinose, embora não sejam metabolizadas por *S. cerevisiae*, são captadas pela levedura por meio de transportadores Hxt. Os de afinidade intermediária ou alta, Hxt4p, Hxt5p e Hxt7p, são os mais importantes para o transporte de xilose, embora apresentem afinidade cerca de 100 vezes maior para a glicose. Além disso, a

grande maioria dos transportadores de hexose pode aceitar tanto glicose como frutose como substratos.

2.4. Metabolismo de açúcares em *Scheffersomyces stipitis*

2.4.1. Xilose

De acordo com o sequenciamento do genoma de *S. stipitis*, esta levedura contém todos os genes para a assimilação de xilose, via das pentoses fosfato, glicólise, ciclo de Krebs e produção de etanol (JEFFRIES et al., 2007).

Após a captação, o metabolismo de xilose por *Scheffersomyces stipitis* (Figura 2) é iniciado por duas reações de óxido-redução. Primeiro a xilose é reduzida pela ação da enzima xilose redutase a xilitol, o qual é então oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase. Na sequência, a xilulose é fosforilada pela xilulose quinase a xilulose 5-fosfato (WEBB; LEE, 1990). Neste ponto, o metabolismo continua pela via das pentoses fosfato, onde a xilulose 5-fosfato pode ser convertida em diferentes açúcares fosforilados com diferentes números de carbonos, dentre eles a frutose 6-fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato, intermediários da glicólise. Na glicólise, os açúcares são convertidos a piruvato, e a partir dele as células podem seguir a rota fermentativa e/ou a oxidativa. Na rota fermentativa, as enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase catalisam as respectivas reações de descarboxilação e redução responsáveis pela conversão de piruvato a etanol, com a concomitante oxidação de NADH a NAD⁺. Na presença de oxigênio, o piruvato é oxidado pelo ciclo de Krebs (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Em geral, leveduras que fermentam xilose requerem oxigênio para que uma ótima eficiência de conversão e altas taxas de produção de etanol sejam alcançadas. Esta dependência é reflexo de um equilíbrio de óxido-redução desarranjado. A fermentação anaeróbica de xilose é incompatível com o metabolismo desta pentose via xilose redutase associada a NADPH e xilitol desidrogenase associada a NAD⁺. No entanto, a xilose redutase de *S. stipitis* pode usar tanto o NADH como o NADPH como doadores de elétrons para converter xilose a xilitol. Deste modo, em *S. stipitis*, o NADH produzido na conversão de xilitol a xilulose pode ser usado na primeira reação do metabolismo, eliminando o excesso

de NADH que iria ocorrer caso coenzimas diferentes fossem exigidas para redução de xilose e oxidação de xilitol sob condições anaeróbicas (BRUINENBERG et al., 1984). Dellweg, Rizzi e Klein (1989), avaliando a influência do oxigênio no metabolismo de *S. stipitis* CBS 5773, observaram que, sob completa aerobiose, a xilose é metabolizada quase que exclusivamente pela redução com NADPH como doador de elétrons, enquanto que, na ausência de oxigênio, cerca de 85% da xilose foi reduzida utilizando a coenzima NADH. Sendo assim, é possível afirmar que *S. stipitis* apresenta capacidade de realizar a fermentação alcoólica de xilose em anaerobiose, requerendo a presença de oxigênio para crescer (BRUINENBERG et al., 1984).

Figura 2 - Metabolismo de xilose, glicose, frutose e arabinose por *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Baseado em Lee; Fisher, 1990; Hahn-Hägerdal et al., 1994; Gírio et al., 2010.

2.4.2. Arabinose

A levedura *Scheffersomyces stipitis* também é capaz de metabolizar a L-arabinose (Figura 2), outra pentose encontrada em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, em adição à D-xilose (CANILHA et al., 2010). O metabolismo de ambas as pentoses é muito semelhante, considerando que as rotas catabólicas de L-arabinose e D-xilose compartilham intermediários em comum e passam pela via das pentoses fosfato. L-arabinose é primeiro reduzida para formar L-arabitol pela ação da enzima L-arabinose redutase. A L-arabitol desidrogenase oxida o L-arabitol a L-xilulose, a qual é reduzida novamente, desta vez pela L-xilulose redutase, para formar xilitol (GÍRIO et al., 2010). O xilitol é um álcool aquiral de cinco carbonos que seguirá para a via das pentoses fosfato de forma semelhante à descrita para o metabolismo de xilose (MCMILLAN; BOYNTON, 1994). Embora seja capaz de assimilar, a *S. stipitis* não apresenta capacidade de fermentar L-arabinose. Diversos estudos têm evidenciado tanto o crescimento celular de *S. stipitis* a partir de L-arabinose, como a ausência de produção de etanol a partir deste açúcar (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SHI et al., 2000; DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1989).

O trabalho de Du Preez, Bosch e Prior (1986) avaliou a utilização de L-arabinose por *S. stipitis* CSIR-Y633 em meio sintético. Eles observaram que os 20 g/L do açúcar foram completamente consumidos após 121 horas de fermentação, resultando em um rendimento de células de 0,32 g/g, embora nenhum etanol tenha sido formado. Delgenes, Moletta e Navarro (1989), utilizando *S. stipitis* NRRL Y7124, avaliaram a fermentação de L-arabinose na presença de uma mistura de açúcares e em condições variadas de oxigenação. Em meio composto por 75% de xilose, 20% de glicose e 5% de arabinose, perfazendo um total de 20 g/L, foi constatado a utilização sequencial dos açúcares. Em todas as taxas de transferência de oxigênio estudadas, a L-arabinose foi consumida apenas após o esgotamento de glicose e xilose, com exceção da fermentação sob condição anaeróbia, na qual ela não foi assimilada.

Visando obter maior conhecimento acerca do metabolismo de L-arabinose, Shi et al. (2000) avaliaram a atividade enzimática expressa por duas cepas de *S. stipitis* cultivadas em meios contendo esta pentose; uma parental (CBS 6054, controle) e uma mutante (FPL-MY30), o qual é incapaz de crescer em D-xilose ou L-arabinose. Enquanto que, para o controle, foram determinadas as atividades de todas as enzimas-chave necessárias para o metabolismo de pentoses, para o mutante algumas enzimas não foram encontradas, dentre elas a xilitol desidrogenase. Mais adiante, quando o gene *XYL2*, que codifica a xilitol

desidrogenase, foi inserido neste mutante, a capacidade de FPL-MY30 crescer em L-arabinose foi recuperada, confirmando que as rotas metabólicas de xilose e arabinose, de fato, apresentam um intermediário em comum, o xilitol. Ainda neste estudo, as baixas concentrações de L-arabitol desidrogenase e xilitol desidrogenase mostraram que estes dois passos intermediários são limitantes para o metabolismo de L-arabinose.

O fato de L-arabinose ser assimilada por *S. stipitis*, mas não ser convertida a etanol, como é observado para xilose, pode ser explicado pela hipótese de McMillan e Boynton (1994). Segundo os autores, a incapacidade das leveduras fermentadoras de xilose em produzir etanol a partir de L-arabinose está relacionada ao número de reações de óxido-redução requeridas para metabolizar este açúcar. Quatro reações são requeridas para a conversão de L-arabinose a D-xilulose, enquanto que para xilose há o requerimento de apenas duas reações. A manutenção da atividade enzimática e dos níveis de cofatores exigidos para esta rota pode demandar uma quantidade de energia metabólica superior àquela que pode ser obtida pela fosforilação ao nível do substrato decorrente da fermentação. Ademais, a possibilidade de ocorrência de desequilíbrio redox sob condições de limitação de oxigênio aumenta com o aumento do número de reações de óxido-redução envolvidas na transformação. Sendo assim, uma maior concentração de oxigênio no meio é requerida para que a via possa funcionar; a fosforilação oxidativa gera mais energia e permite o reciclo de cofatores. Isso explicaria também a razão pela qual a produção de biomassa é favorecida em relação à formação de produtos, como o arabitol, durante cultivos aeróbios em L-arabinose.

2.4.3. Glicose

S. stipitis é capaz de crescer, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, utilizando glicose como fonte de carbono (SKOOG; JEPPSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1992). Para metabolizar a glicose, a levedura utiliza a via glicolítica e o ciclo de Krebs, sendo capaz de produzir etanol pela rota fermentativa e/ou dióxido de carbono pela rota respiratória (Figura 2).

Em comparação com *Saccharomyces cerevisiae*, levedura tradicionalmente utilizada na produção de álcool a partir de hexoses, a regulação da fermentação por *S. stipitis* apresenta comportamento muito diferente. Enquanto a atividade fermentativa de *S. stipitis* depende do nível de oxigênio do meio, para *Saccharomyces cerevisiae* a quantidade de glicose,

independentemente da disponibilidade de oxigênio, é que determina seu estado metabólico, respiratório ou fermentativo (PAPINI et al., 2012). Em microrganismos como a *S. cerevisiae*, a fermentação alcoólica é desencadeada quando culturas com concentrações limitantes de glicose são expostas a um excesso de açúcar. Esta resposta instantânea é conhecida como efeito Crabtree de curto prazo, e é seguida de uma adaptação a longo prazo envolvendo a repressão de enzimas do metabolismo respiratório. As leveduras Crabtree-negativas, por exemplo a *S. stipitis*, não exibem esta resposta, e realizam metabolismo respiratório quando sob aerobiose (VAN URK et al., 1989).

Em seu estudo comparativo, Papini et al. (2012) mostraram que *S. stipitis* apresentou maior crescimento específico e rendimento de células ($0,47 \text{ h}^{-1}$ e $0,55 \text{ g/g}$, respectivamente) do que a levedura *S. cerevisiae* ($0,40 \text{ h}^{-1}$ e $0,17 \text{ g/g}$), quando ambas foram crescidas em condições aeróbias, em meio contendo 20 g/L de glicose. Os resultados obtidos com *S. stipitis* podem ser explicados considerando que esta levedura apresentou metabolismo completamente respiratório, sem qualquer produção de metabólito extracelular. Ao contrário, *S. cerevisiae* exibiu metabolismo respiro-fermentativo, produzindo, além de biomassa e CO_2 , subprodutos como etanol e glicerol.

Jeffries et al. (2007) observaram que o gene KGD2, responsável por codificar um componente do complexo α -cetoglutarato desidrogenase, o qual forma NADH no ciclo de Krebs, foi expresso três vezes mais quando as células de *S. stipitis* foram crescidas em meio contendo glicose como única fonte de carbono em relação àquelas crescidas em xilose, confirmando a maior atividade desta via no catabolismo de glicose.

Ademais, em meios contendo misturas de glicose e xilose, *S. stipitis* consome glicose preferencialmente, em detrimento à xilose (AGBOGBO et al., 2006). Este efeito de diauxia é ocasionado tanto pela maior afinidade dos transportadores por glicose (KILIAN; VAN UDEN, 1988; WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999) quanto pela repressão dos genes XYL1 e XIL2, que codificam as enzimas necessárias para a assimilação de xilose, os quais não são expressos na presença de glicose (JEFFRIES et al., 2007).

No estudo de Agbogbo et al. (2006), a levedura *S. stipitis* CBS 6054 alcançou maiores taxas de crescimento celular e consumo de açúcar a partir de glicose, em comparação com cultivos em meio à base de xilose. Além de consumir completamente a glicose em menor tempo (96 h para glicose e 120 h para xilose) nos ensaios utilizando fontes únicas de carbono, a levedura consumiu glicose primeiro nas fermentações contendo diferentes misturas de ambos os açúcares. Com relação à produção de etanol, Du Preez, Bosch e Prior (1986) mostraram que *S. stipitis* CSIR-Y633 apresentou uma produtividade volumétrica 30% maior

utilizando glicose ao invés de xilose; e, de forma semelhante ao estudo de Agbogbo et al. (2006), quando ambos os açúcares foram disponibilizados juntos no meio, a diauxia foi evidente, e a xilose só foi consumida após o esgotamento de glicose.

2.4.4. Frutose

A levedura *S. stipitis* é capaz de assimilar frutose produzindo etanol e biomassa (BICHO; CUNNINGHAM; LEE, 1989; LEE; FISHER, 1990). O metabolismo intracelular de frutose ocorre pela sua fosforilação à frutose 6-fosfato, intermediário da via glicolítica, pela enzima hexoquinase (Figura 2) (LEE; FISHER, 1990).

Bicho, Cunningham e Lee (1989) avaliaram a fermentação de frutose por duas estirpes de *S. stipitis*, NRRL Y-7124 e CBS 5773. Nos ensaios contendo 2% (m/v) de frutose e xilose, ambas as estirpes utilizaram xilose preferencialmente em detrimento à frutose. Os autores atribuíram esta lenta utilização de frutose a uma possível atividade de repressão pela xilose. Este comportamento se opôs ao efeito de repressão que outras hexoses (glicose, manose e galactose) exerceram no consumo de xilose por esta levedura. Além disso, a presença de frutose não afetou o padrão de consumo de xilose, o qual se manteve igual quando a pentose foi disponibilizada como única fonte de carbono. Nos cultivos contendo frutose como única fonte de carbono, *S. stipitis* foi capaz de consumir e fermentar o açúcar a etanol; no entanto, o consumo foi incompleto e procedeu em taxas mais lentas quando comparadas àquelas obtidas para glicose, manose e galactose. Em testes avaliando o crescimento das estirpes em glicose ou frutose ou xilose, observou-se que as taxas de crescimento específico para as hexoses foram de cerca de $0,35 \text{ h}^{-1}$, enquanto que para xilose este valor foi de $0,30 \text{ h}^{-1}$.

Na sequência, o trabalho de Lee e Fisher (1990) utilizou 17 espécies de *Pichia*, antigo gênero *Scheffersomyces*, para avaliar se a utilização deficitária de frutose é um comportamento comum nestas leveduras. Nos ensaios de fermentação contendo 2% (m/v) de xilose e frutose, apenas *Pichia abadieae* NCR 2644 seguiu o observado para *S. stipitis* CBS 5773 e NRRL Y7124, indicando que a utilização preferencial de xilose em relação à frutose não segue a tendência observada para as espécies deste gênero. Em ensaios contendo glicose ao invés de xilose, foi observado que ambas as estirpes CBS 5773 e NRRL Y7124 não utilizaram frutose mesmo após 90 horas de fermentação, enquanto que a glicose foi

completamente consumida em apenas 50 horas. Embora uma baixa atividade de quinase, responsável por fosforilar frutose a frutose 6-fosfato, tenha sido mensurada nos cultivos contendo xilose e glicose, os autores sugeriram que a completa inibição da utilização de frutose na presença de glicose deveria estar associada ao transporte e não ao metabolismo intracelular.

2.5. Bioconversão de xilose a etanol por *Scheffersomyces stipitis* em meios a base de xilose

Algumas condições de cultivo, como as concentrações de substrato, células e oxigênio, devem ser consideradas em conjunto para aumentar a produção de etanol pela levedura *S. stipitis* (Figura 3) (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1985).

Figura 3 - Efeitos das condições de fermentação na bioconversão de xilose a etanol por *Scheffersomyces stipitis*.

Fonte: Arquivo pessoal.

O aumento da concentração inicial de substrato no meio de fermentação é importante para atingir uma elevada formação de produto (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010). A importância desta variável é ainda maior nos processos de produção de etanol, tendo em vista que a concentração final de etanol no meio, após o término da fermentação, deve estar entre 4 e 5% (m/m) para que o processo de destilação seja economicamente viável

(WALTON; HEININGEN; WALSUM, 2010). Portanto, devido à estequiometria da fermentação alcoólica, as concentrações iniciais de substrato no meio deveriam ser de, no mínimo, 80-100 g/L.

No entanto, concentrações excessivas de substrato podem: (i) aumentar o estresse osmótico nos microrganismos (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008), (ii) causar um efeito de inibição pelo substrato (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1988), (iii) gerar altas concentrações de produto, o que pode ocasionar na inibição de *S. stipitis* pelo etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994), e (iv) gerar uma alta densidade celular no meio de fermentação, o que altera os requerimentos por oxigênio e nutrientes (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1985; FERREIRA et al., 2011).

A Figura 4 compila resultados obtidos por três estudos, realizados em meios sintéticos, acerca do efeito da concentração inicial de xilose no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis*.

No trabalho de Slininger et al. (1985) (Figura 4 - Referência 1), três linhagens de *S. stipitis* (NRRL Y-7124, 11544 e 11545) foram avaliadas na fermentação de meios contendo concentrações iniciais crescentes de xilose, 50, 100, 150 e 200 g/L. Nenhuma linhagem foi capaz de consumir completamente a xilose nos cultivos com concentrações iguais ou superiores a 150 g/L, e apenas a NRRL Y-11545 consumiu completamente 100 g/L de xilose. O aumento da concentração inicial, de 50 para 200 g/L, reduziu a produtividade volumétrica de etanol (Q_P) para todas as linhagens (Y-7124: de 0,28 para 0,21 g/L.h; Y-11544: de 0,22 para 0,04 g/L.h; Y-11545: de 0,24 para 0,14 g/L.h); entretanto, pouco influenciou nos fatores de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$).

Du Preez, Bosch e Prior (1986) (Figura 4 - Referência 2) avaliaram o crescimento e a produção de etanol por *S. stipitis* CSIR-Y633 a partir de meios contendo seis concentrações iniciais diferentes de xilose: 10, 20, 50, 70, 90 e 100 g/L. Foi observado que, apenas no cultivo contendo a maior concentração avaliada, a levedura não foi capaz de esgotar a xilose do meio. Quanto à formação de biomassa, embora o incremento inicial, de 10 para 20 g/L, tenha contribuído para o aumento da taxa específica de crescimento ($\mu_{\max}$), concentrações maiores ocasionaram a redução gradual deste parâmetro. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) mostrou relação inversa com a concentração inicial de xilose. O valor máximo de Q_P foi obtido na fermentação iniciada com 50 g/L de xilose, 0,85 g/L.h, o qual foi reduzido em resposta ao aumento desta concentração; os valores de $Y_{P/S}$ se mantiveram estáveis, em torno de 0,40 g/g, até a concentração inicial de xilose exceder 70 g/L, atingindo o seu menor valor (0,32 g/g) na maior concentração avaliada.

No estudo de Farias, Andrade e Maugeri-Filho (2014) (Figura 4 - Referência 3), a bioconversão de xilose a etanol por *S. stipitis* NRRL Y-7124 foi avaliada a partir de meios compostos por 7,2 a 145,6 g/L de xilose. Em relação ao consumo de substrato, o esgotamento de xilose no meio não foi observado apenas nas fermentações contendo concentrações iniciais iguais ou superiores a 125,2 g/L. O aumento da concentração de xilose também ocasionou a redução da $\mu_{\max}$ (de 0,189 para 0,074 h⁻¹) e do $Y_{X/S}$ (de 0,215 para 0,047 g/g). Quanto à produção de etanol, tanto os valores de $Y_{P/S}$ quanto de Q_P mostraram pequena variabilidade ao longo das diferentes concentrações iniciais de xilose; entretanto, aparentemente, com tendência de declínio quando esta excedeu 125,2 g/L.

Em síntese, observa-se que, em concentrações superiores a ~100 g/L, há uma tendência para que o consumo de xilose por *S. stipitis* seja incompleto, considerando fermentações conduzidas em batelada e com baixas concentrações celulares iniciais. Em relação ao crescimento, incrementos na concentração inicial de substrato até valores próximos a 20 g/L contribuem para o aumento da taxa específica de crescimento máxima ($\mu_{\max}$); no entanto, valores maiores causam uma queda nesta taxa, assim como no fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), o qual mostra relação inversamente proporcional à concentração inicial de substrato. Os parâmetros fermentativos relativos à produção de etanol apresentam respostas diferentes ao aumento da concentração inicial de substrato; a produtividade volumétrica de etanol (Q_P) é mais suscetível à variação da concentração inicial de substrato que o fator de conversão de substrato a etanol ($Y_{P/S}$). O aumento da concentração de substrato promove uma maior formação de etanol, aumentando o Q_P ; no entanto, a partir de certo ponto, o aumento na concentração de substrato implica em aumento no tempo de fermentação, promovendo uma queda nos valores de Q_P , relacionada tanto à inibição pelo substrato quanto pelo produto formado. Em contrapartida, o aumento da concentração de substrato afeta em menor extensão a especificidade da levedura *S. stipitis* em convertê-lo a etanol; de modo geral, os valores de $Y_{P/S}$ foram mais estáveis que os de Q_P nos três estudos avaliados. As concentrações máximas de etanol, por sua vez, são obtidas a partir das maiores concentrações iniciais de substrato que não afetam o $Y_{P/S}$; na Figura 4, as linhas verticais tracejadas estão sempre posicionadas no ponto anterior à queda do valor de $Y_{P/S}$.

Em comparação a *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, outras leveduras capazes de realizar naturalmente a fermentação alcoólica de xilose, *S. stipitis* apresenta maior resistência à inibição pelo substrato, tendo em vista os maiores valores de $Y_{P/S}$ obtidos em altas concentrações de xilose (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SLININGER et al., 1985). Uma alternativa para que este tipo de inibição seja superado é conduzir os processos

fermentativos com baixas concentrações de substrato, por meio de processo contínuo ou em batelada alimentada (FARIAS; ANDRADE; MAUGERI-FILHO, 2014); ou então, aumentar a aeração nas fermentações conduzidas em batelada (consequentemente, diminuindo a produção de etanol), uma vez que a tolerância de *S. stipitis* é quantitativa e qualitativamente dependente da disponibilidade de oxigênio no cultivo (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1988).

Figura 4 - Parâmetros fermentativos obtidos durante cultivos de *Scheffersomyces stipitis* em diferentes concentrações iniciais de substrato.

Fonte: Adaptado de Slininger et al. (1985) (Referência 1); Du Preez, Bosch e Prior (1986) (Referência 2); Farias, Andrade e Maugeri-Filho (2014) (Referência 3).

Já o aumento da concentração inicial de células tem sido reportado como uma alternativa para aumentar a produtividade de etanol. Como uma quantidade maior de células é disponibilizada para a conversão, o esperado é que uma concentração mais elevada de produto seja alcançada em um tempo mais curto de fermentação (FERREIRA et al., 2011).

A levedura *S. stipitis*, embora seja capaz de converter xilose em etanol com altos fatores de rendimento, realiza esta conversão com tempos elevados de fermentação, de modo que as produtividades volumétricas (Q_P) geralmente obtidas são baixas; impactando a viabilidade econômica do processo (NUÑEZ et al., 1991). Sendo assim, o aumento da densidade celular na fermentação, visando o aumento do Q_P , aparece como uma alternativa, a qual deve ser empregada em conjunto com o ajuste de outras condições de fermentação, uma vez que o aumento da concentração de células usualmente diminui a produtividade específica de etanol (quantidade de etanol produzida por cada célula) (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Agbogbo et al. (2007) avaliaram o efeito da concentração celular inicial de *S. stipitis* CBS6054 (1,8, 4,3 e 6,5 g/L) na fermentação de xilose (120 g/L). Eles observaram que as taxas específicas de crescimento celular diminuíram e as concentrações finais de xilitol aumentaram quando a concentração inicial de células foi aumentada de 1,8 para 6,5 g/L. Por outro lado, quantidades maiores de xilose foram consumidas nas fermentações iniciadas com maior densidade celular; como consequência, a produção de etanol foi diretamente relacionada com a concentração inicial de células: 20,9, 34,3 e 41,1 g/L de etanol foram obtidos após 192 h de cultivo, equivalendo a valores de Q_P de 0,11, 0,18 e 0,21 g/L.h, respectivamente. Os valores de $Y_{P/S}$ foram de 0,36, 0,38 e 0,38 g/g, respectivamente.

Sarks et al. (2014) apresentaram recentemente um processo denominado RaBIT (Tecnologia de bioconversão rápida com reciclo integrado), o qual utiliza alta densidade celular (cerca de 10 g/L), mantida por meio de reciclo, para superar a lenta utilização de xilose, os longos tempos de fermentação e as baixas produtividades de etanol. Segundo os autores, fermentações que normalmente duravam entre 96 e 168 h, passaram a se encerrar em apenas 24 h.

Uma maior concentração celular, inicial ou proveniente de excesso de substrato, irá reduzir a concentração de oxigênio disponível no meio, podendo promover a formação de subprodutos (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). Ademais, quando submetida a condições aeróbicas, *S. stipitis* produz principalmente biomassa, enquanto que, sob condições semi-aeróbicas, maiores rendimentos de etanol são obtidos (GROOTJEN; VAN DER LANS; LUYBEN, 1991). Em outras palavras, oxigênio não limitante é necessário para sustentar uma alta taxa de crescimento celular; oxigênio em quantidade mínima, por outro lado, é requerido para uma adequada regeneração de coenzimas durante a produção de etanol (SLININGER et al., 1990).

Boynton e McMillan (1994) avaliaram a influência da aeração no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de xilose (30 g/L). As fermentações,

em frascos de 250 mL, foram realizadas utilizando volumes crescentes de meio (de 100 a 225 mL em incrementos de 25 mL), gerando assim condições progressivamente mais próximas da anaerobiose, devido à diminuição da área superficial para trocas gasosas. Foi observado que esta redução na disponibilidade de oxigênio exerceu um forte efeito nos fatores de conversão de substrato; o $Y_{X/S}$ foi reduzido de 0,10 para 0,05 g/g, enquanto que o $Y_{P/S}$ aumentou de 0,41 para 0,50 g/g.

Dellweg, Rizzi e Klein (1989) mostraram que, embora *S. stipitis* seja capaz, a produção de etanol na ausência de oxigênio é prejudicada. Em condições de limitação de oxigênio (coeficiente de transferência de oxigênio igual a 15 h^{-1}), valores máximos de rendimento (0,39 g/g) e taxa específica de produção de etanol (0,12 g/g.h) foram obtidos. Os valores destes parâmetros caíram proporcionalmente à diminuição da concentração de oxigênio no meio, até valores mínimos, obtidos em condição de anaerobiose (0,33 g/g e 0,05 g/g.h). Em contrapartida, com o aumento da taxa de transferência de oxigênio para o meio de fermentação (coeficiente de transferência de oxigênio igual a 60 h^{-1}), valores máximos de rendimento celular (0,49 g/g) e taxa específica de crescimento (0,16 g/g.h) foram obtidos, sem formação de etanol.

Skoog e Hahn-Hägerdal (1990), conduzindo a fermentação de xilose por *S. stipitis* CBS 6054 em cultura contínua, obtiveram valores máximos de produtividade específica (0,20 g/g.h) e rendimento de etanol (0,48 g/g) sob a condição de menor oxigenação do meio, inferior a 1 mmol de oxigênio/L.h. Já em condições de anaerobiose, embora a levedura não tenha apresentado crescimento, foi capaz de converter xilose a etanol; no entanto, de forma menos eficiente (produtividade específica de 0,02 g/g.h e rendimento de 0,25 g/g).

2.5.1. Modelagem matemática e simulação

A modelagem de processos fermentativos reduz o trabalho experimental, pois permite o estudo de uma variedade de condições de fermentação, relacionando parâmetros cinéticos e fatores de conversão, por meio de equações que podem ser utilizadas em simulações (FARIAS; ANDRADE; MAUGERI-FILHO, 2014). No contexto da fermentação alcoólica de xilose por *S. stipitis*, os benefícios provenientes do uso desta ferramenta matemática são notáveis, uma vez que os parâmetros cinéticos e fatores de conversão são altamente sensíveis às mudanças das condições de fermentação.

Recentemente, modelos matemáticos não estruturados foram propostos para descrever a influência das condições de fermentação no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis*: um deles, não segregado (FARIAS; ANDRADE; MAUGERI-FILHO, 2014); o outro, segregado (SLININGER et al., 2014).

Farias, Andrade e Maugeri-Filho (2014) propuseram um modelo capaz de descrever as concentrações de células, substrato e produto durante o processo fermentativo de produção de etanol a partir de xilose por *S. stipitis* NRRL Y-7124, sob condição de microaerobiose; consistindo em um conjunto de três equações, descritas a seguir:

$$r_X = \frac{\mu_{\max} \times S}{S + K_S + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)} \times \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \times X \quad (1)$$

$$r_S = \frac{r_X}{Y_X} + m_S \times X \quad (2)$$

$$r_P = \alpha \times r_X + \beta \times X \quad (3)$$

Para a estimação dos parâmetros relacionados ao crescimento celular ($\mu_{\max}$, K_S , K_I , $P_{\max}$ e n), ao consumo de substrato (Y_X e m_S) e à síntese de produto (α e β), a concentração inicial de xilose foi variada entre 7,2 e 145,6 g/L.

Como já mencionado, não foi observado consumo completo de substrato nas fermentações iniciadas com 125,2 e 145,6 g/L; e houve uma tendência de aumento da produção de xilitol com o aumento da concentração inicial de xilose. A máxima produção de etanol (54,9 g/L) foi observada quando a concentração inicial de xilose foi igual a 120,0 g/L.

Verificou-se que a concentração inicial de substrato influenciou alguns parâmetros fermentativos, exercendo efeito mais pronunciado sobre a taxa específica de crescimento celular máxima e sobre o fator de conversão de substrato em células. O coeficiente de manutenção não foi alterado pelo aumento da concentração inicial de substrato; entretanto, houve um aumento linear no valor de $Y_{P/X}$, o que significa que, em maiores concentrações de substrato, as células são mais eficientes na produção de etanol. A constante de inibição pelo substrato, determinada de acordo com o modelo de Andrews, foi de 24,4 g/L; a concentração máxima de etanol, determinada de acordo com o modelo de Levenspiel, de 56,0 g/L. As

equações que relacionam as velocidades instantâneas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto com as variáveis que as influenciam (Equações 1-3), já com os parâmetros (constantes ou variáveis, em função da concentração inicial de substrato) ajustados, são representadas a seguir:

$$r_X = \frac{0,232 \times S}{S + 1,670 + \left(\frac{S^2}{24,4}\right)} \times \left(1 - \frac{P}{56,0}\right)^{(2,5-4,5)} \times X \quad (4)$$

$$r_S = \frac{r_X}{(0,04 - 0,14)} + 0,027 \times X \quad (5)$$

$$r_P = (3,00 - 10,83) \times r_X + 0,003 \times X \quad (6)$$

O trabalho de Slininger et al. (2014), por outro lado, reuniu, em um único sistema, cinco equações diferenciais, provenientes de estudos prévios (SLININGER et al., 1989; SLININGER et al., 1990; SLININGER et al., 1991), que, quando resolvidas simultaneamente, permitem estimar as concentrações de etanol, biomassa total, biomassa viável, xilose e oxigênio, como função do tempo.

O modelo proposto foi utilizado para prever o curso de fermentações em batelada contendo diferentes concentrações iniciais de xilose, diferentes coeficientes de transferência de oxigênio (K_{La}) e alta densidade celular, além de fermentações em batelada alimentada e extrativa. A remoção de etanol aumentou o Q_P de 0,3 para 0,4 g/L h (produção de 50 g/L de etanol), permitindo uma economia de 40-50 h na fermentação contendo concentração inicial de xilose igual a 140 g/L; entretanto, uma melhora relativamente pequena foi obtida quando a fermentação foi conduzida no modo de batelada alimentada. Já o aumento da taxa de transferência de oxigênio para o meio (K_{La} de 2,4 para 6,0 h⁻¹) foi responsável por reduzir de 210 para 125 h o tempo requerido para o completo consumo de 150 g/L de xilose, sem que qualquer redução no valor de $Y_{P/S}$ (0,34 g/g) tenha sido observada.

3. OBJETIVOS

O objetivo principal do estudo foi definir as melhores condições de fermentação para a bioconversão de xilose a etanol por *S. stipitis* DSM-3651 utilizando suplementação nutricional de baixo custo.

Para isso as seguintes metas foram propostas:

- (i) Avaliar a utilização dos açúcares presentes nos materiais lignocelulósicos e no melaço de cana-de-açúcar por *S. stipitis* DSM-3651, definindo aqueles que podem ser utilizados como substrato para a produção de etanol;
- (ii) Avaliar a substituição de um suplemento nutricional de referência para meios microbiológicos por um suplemento alternativo a base de melaço de cana enriquecido com fosfato de amônio;
- (iii) Definir a composição ideal de um suplemento nutricional alternativo;
- (iv) Avaliar a influência da concentração celular inicial nos requerimentos nutricionais da levedura, baseando-se no crescimento celular e na produção de etanol;
- (v) Avaliar o efeito individual da aeração na produção de etanol e no crescimento da levedura;
- (vi) Avaliar o efeito individual e de interação da aeração e das concentrações de xilose, células e suplemento nutricional na produção de etanol e no crescimento da levedura;
- (vii) Avaliar a utilização de invertases para a conversão da sacarose contida no melaço em glicose e frutose, visando aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis no meio;
- (viii) Otimizar a produção de etanol utilizando uma estratégia que contemple o emprego das condições de fermentação ideais e a co-fermentação da xilose e das hexoses provenientes do tratamento enzimático do melaço.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A levedura *Scheffersomyces stipitis* DSM-3651, proveniente da Coleção de Culturas Tropical - Fundação André Tosello, foi o microrganismo utilizado no estudo. A cultura foi mantida repicada em tubos contendo ágar extrato de malte (Merck, Lote: V142498/807 – 30 g/L de extrato de malte, 3,0 g/L de peptona de soja e 15 g/L de ágar-ágar) a 4 °C.

4.2. Utilização de diferentes fontes de carbono por *S. stipitis* DSM-3651

A levedura foi ativada em tubos contendo ágar extrato de malte inclinado a 30 °C por 3 dias. Após este período, as células foram suspensas em água destilada estéril e quantificadas; sendo adicionado ao meio de cultivo, como inóculo, um volume adequado para prover concentração inicial de células igual a 0,07 g/L.

Os meios de cultivo foram compostos por glicose (30 g/L), xilose (30 g/L), arabinose (30 g/L), frutose (30 g/L) ou sacarose (30 g/L), ou por uma mistura de glicose (10 g/L), xilose (10 g/L) e frutose (10 g/L); suplementados com 3 g/L de extrato de levedura (Oxoid, Lote: B.:813002), 3 g/L de extrato de malte (Biobrás, Lote: 1801871A) e 5 g/L de peptona de caseína (Merck, Lote: 408073). As soluções dos açúcares e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 min; e então adicionadas assepticamente aos frascos contendo água destilada estéril, de modo a obter a concentração desejada de cada componente no meio.

Os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 mL de meio inoculado, incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 120 h. Em intervalos apropriados, alíquotas de 1 mL foram retiradas assepticamente e utilizadas para determinação das concentrações de açúcares, etanol e células.

Os fatores de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$), as produtividades volumétricas de etanol (Q_P) e biomassa (Q_X) e a velocidade média de

consumo de substrato (Q_S) foram determinados ao final das fermentações, definido pela concentração máxima de etanol.

Para a determinação das velocidades instantâneas e específicas de crescimento (r_X e μ_X), formação de produto (r_P e μ_P) e consumo de substrato (r_S e μ_S), curvas sigmoidais foram ajustadas aos dados experimentais de concentrações de células, etanol e açúcares utilizando o modelo de Boltzmann (Equação 7).

$$y = a + \frac{(b - a)}{a + \exp\left(\frac{c - x}{d}\right)} \quad (7)$$

onde a , b , c e d são os parâmetros do modelo, y é o valor de concentração calculado a partir do modelo, e x é o tempo de fermentação.

O coeficiente de manutenção celular (m_X) e o fator de conversão de substrato em células verdadeiro (Y_G) foram determinados de acordo com Pirt (1965); a velocidade específica de formação de etanol relativa ao metabolismo de manutenção (m_P) e o coeficiente de formação de produto por biomassa ($Y_{P/X}$) foram determinados de acordo com Luedeking e Piret (1959).

4.3. Caracterização composicional do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência

O melaço de cana-de-açúcar foi fornecido pela Usina São Luiz (Abengoa Bioenergia – Pirassununga – SP). Denominado *blackstrap molasses* ou Mel C, o melaço utilizado foi retirado na centrifugação da massa C, a terceira massa do processo de cozimento do açúcar. Já o suplemento nutricional utilizado como referência foi aquele reportado por Canilha et al. (2010), sendo composto por: 3 g/L de extrato de levedura (Oxoid, Lote: B.:813002), 3 g/L de extrato de malte (Biobrás, Lote: 1801871A) e 5 g/L de peptona de caseína (Merck, Lote: 408073).

Ambos os materiais foram caracterizados quanto aos seus teores de nitrogênio, açúcares, sólidos e cinzas (Figura 5). O melaço, embora apresente certo conteúdo de água, foi analisado considerando sua massa e não seu volume, devido sua alta viscosidade. O

suplemento referência, também caracterizado em base mássica, foi composto por extrato de levedura, extrato de malte e peptona de caseína, na proporção 3:3:5.

Figura 5 - Fluxograma simplificado do procedimento de caracterização composicional do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência.

Fonte: Arquivo pessoal.

O melaço, embora apresente certo conteúdo de água, foi analisado considerando sua massa e não seu volume, devido sua alta viscosidade. O suplemento referência, também caracterizado em base mássica, foi composto por extrato de levedura, extrato de malte e peptona de caseína, na proporção 3:3:5.

De acordo com as metodologias empregadas, os teores de todos os componentes foram determinados diretamente em percentual massa/massa, com exceção do teor de açúcares. Neste caso, soluções em água de ambos os materiais, com altos fatores de diluição, foram preparadas. Os valores de concentração, obtidos em gramas/litro, foram então convertidos em percentual massa/massa, considerando a densidade como 1000 g/L.

4.4. Efeito do suplemento nutricional e da forma de pré-cultivo na bioconversão de xilose em etanol

Os efeitos de duas formas de pré-cultivo e dois suplementos nutricionais foram avaliados no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir de um meio a base de xilose (30 g/L), em duas concentrações celulares diferentes.

Em relação às formas de pré-cultivo, os inóculos utilizados nas fermentações foram provenientes de pré-cultivo em: (i) tubos contendo ágar extrato de malte inclinado a 30 °C por 3 dias, ou (ii) frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio sintético composto por 30 g/L de xilose, 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona de caseína, incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 24 h.

Quanto à suplementação nutricional, o efeito de um suplemento composto por melaço de cana-de-açúcar enriquecido com fosfato de amônio dibásico foi avaliado comparativamente em relação ao suplemento referência. As concentrações de melaço de cana e fosfato de amônio dibásico representaram a quantidade necessária de cada nutriente para que as concentrações de cinzas e nitrogênio, respectivamente, fossem iguais às aquelas encontradas no suplemento referência (Apêndice A).

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio sintético, composto por: (i) 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona de caseína e 30 g/L de xilose, ou (ii) 9,54 g/L de melaço e 4,83 g/L de fosfato de amônio dibásico, e 30 g/L de xilose.

As soluções de xilose e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 min, e então adicionadas assepticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio.

Duas concentrações celulares iniciais foram avaliadas, 0,07 e 3,00 g/L. A inoculação foi realizada transferindo um volume adequado de uma suspensão de células (preparada em água esterilizada), proveniente dos cultivos avaliados.

Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 72 ou 96 h. Amostragens foram realizadas a cada 12 ou 24 h, para a determinação das concentrações de xilose, células, etanol, xilitol e glicerol.

Os resultados obtidos em cada ensaio de fermentação foram analisados a partir dos seguintes parâmetros fermentativos: concentração máxima de etanol, fator de conversão de açúcares em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de etanol (Q_P), velocidade média de consumo de substrato (Q_S), produtividade volumétrica de biomassa (Q_X).

4.5. Efeito das concentrações de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol

A partir de um meio contendo 30 g/L de xilose, o efeito de cinco fontes nutricionais - extrato de levedura, extrato de malte, peptona, melão de cana-de-açúcar e fosfato de amônio dibásico – no crescimento e produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, em duas concentrações celulares iniciais (0,07 e 3,00 g/L), foi avaliado por meio de planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} , a partir do gerador ($5 = -1234$), com 4 experimentos replicados no ponto central (Tabela 6).

Tabela 6 - Matriz de experimentos dos planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} utilizados para a avaliação dos efeitos de diferentes fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, em concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L

Exp	Variáveis									
	Valores codificados					Valores reais				
	EL	EM	PE	ME	FA	EL (g/L)	EM (g/L)	PE (g/L)	ME (g/L)	FA (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	-1	0,87	0,87	1,45	2,76	1,40
2	1	-1	-1	-1	1	2,13	0,87	1,45	2,76	3,43
3	-1	1	-1	-1	1	0,87	2,13	1,45	2,76	3,43
4	1	1	-1	-1	-1	2,13	2,13	1,45	2,76	1,40
5	-1	-1	1	-1	1	0,87	0,87	3,55	2,76	3,43
6	1	-1	1	-1	-1	2,13	0,87	3,55	2,76	1,40
7	-1	1	1	-1	-1	0,87	2,13	3,55	2,76	1,40
8	1	1	1	-1	1	2,13	2,13	3,55	2,76	3,43
9	-1	-1	-1	1	1	0,87	0,87	1,45	6,77	3,43
10	1	-1	-1	1	-1	2,13	0,87	1,45	6,77	1,40
11	-1	1	-1	1	-1	0,87	2,13	1,45	6,77	1,40
12	1	1	-1	1	1	2,13	2,13	1,45	6,77	3,43
13	-1	-1	1	1	-1	0,87	0,87	3,55	6,77	1,40
14	1	-1	1	1	1	2,13	0,87	3,55	6,77	3,43
15	-1	1	1	1	1	0,87	2,13	3,55	6,77	3,43
16	1	1	1	1	-1	2,13	2,13	3,55	6,77	1,40
17	0	0	0	0	0	1,50	1,50	2,50	4,77	2,42
18	0	0	0	0	0	1,50	1,50	2,50	4,77	2,42
19	0	0	0	0	0	1,50	1,50	2,50	4,77	2,42
20	0	0	0	0	0	1,50	1,50	2,50	4,77	2,42

EL: extrato de levedura; EM: extrato de malte; PE: peptona; ME: melão de cana-de-açúcar; FA: fosfato de amônio dibásico.

As concentrações de extrato de levedura e extrato de malte variaram de 0,87 a 2,13 g/L, enquanto a concentração de peptona variou de 1,45 a 3,55 g/L. A concentração de

melaço de cana variou de 2,76 a 6,77 g/L, enquanto a de fosfato de amônio dibásico variou de 1,40 a 3,43 g/L. A determinação dos níveis dos nutrientes foi baseada na possibilidade de se completar o planejamento e adicionar pontos axiais para gerar um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), de modo que as concentrações dos nutrientes fossem mínimas (0 g/L) quando $\alpha = -2,83$ e máximas (item 4.3) quando $\alpha = +2,83$.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio. As soluções de xilose e dos cinco nutrientes testados, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos, e então adicionadas assepticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio. As células de *S. stipitis*, provenientes do pré-cultivo, em meio YMP (item 4.4), foram adicionadas ao meio de fermentação, provendo concentração inicial de células de 0,07 g/L ou 3,00 g/L. Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 96 h. Amostragens foram realizadas a cada 24 h, para a determinação das concentrações de xilose, células, etanol, xilitol e glicerol.

Os resultados obtidos em cada ensaio de fermentação foram analisados utilizando os seguintes parâmetros fermentativos: concentração máxima de etanol, fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de etanol (Q_P), velocidade média de consumo de substrato (Q_S), produtividade volumétrica de biomassa (Q_X).

4.5.1. Análise estatística dos dados experimentais

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o programa Statistica 10.

Os dados experimentais obtidos nos planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} foram analisados com base na determinação dos efeitos exercidos pelos nutrientes (extrato de levedura, extrato de malte, peptona, melaço de cana e fosfato de amônio) no valor médio dos parâmetros fermentativos ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, Q_P , Q_S e Q_X). Os valores dos efeitos principais dos fatores foram determinados, avaliados em relação à significância estatística (ao nível de confiança de 90%) e apresentados em diagramas de Pareto.

4.6. Efeito da aeração na bioconversão de xilose em etanol

O efeito da aeração no crescimento e produção de etanol a partir de xilose por *S. stipitis* DSM-3651 foi avaliado variando a forma de fechamento dos frascos Erlenmeyer e a razão entre o volume de frasco e o volume de meio (v_f/v_m).

Duas formas de fechamento dos frascos foram avaliadas (Figura 6), as quais impediam ou não as trocas gasosas entre o interior do frasco e o meio externo. Conforme ilustrado na Figura 6A, o fechamento utilizando rolha de algodão e gaze com selagem por filme de PVC impediu a troca de gases; em contrapartida, a Figura 6B ilustra o fechamento dos frascos utilizando um tampão composto por uma camada de algodão envolvido por gaze, o qual permitiu a troca de gases.

Figura 6 - Representação esquemática do fechamento dos frascos Erlenmeyer com rolha (gaze e algodão) e filme de PVC (A) ou com tampão (gaze e algodão) (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

A variação da área superficial para troca de gases foi realizada utilizando diferentes razões v_f/v_m . Para isso, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo volumes de meio de 50 mL ($v_f/v_m = 5$), 100 mL ($v_f/v_m = 2,5$) e 125 mL ($v_f/v_m = 2$).

Os ensaios foram realizados utilizando meio composto por 0,87 g/L de extrato de levedura, 0,87 g/L de extrato de malte, 1,45 g/L de peptona de caseína, 6,77 g/L de melaço de cana, 1,40 g/L de fosfato de amônio e 30 g/L de xilose; conforme definido previamente. As soluções de xilose e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos, e então adicionadas

aspticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio.

As células de *S. stipitis* DSM-3651 adicionadas ao meio de cultivo foram provenientes de pré-cultivo em meio YMP (item 4.4). Os frascos foram incubados em shaker; a 30 °C e 200 rpm, por 72 h. Amostragens foram realizadas a cada 12 h, para a determinação das concentrações de xilose, células, etanol, xilitol e glicerol.

Os resultados obtidos em cada ensaio de fermentação foram analisados utilizando os seguintes parâmetros fermentativos: concentração máxima de etanol, fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica de etanol (Q_P), velocidade média de consumo de substrato (Q_S), produtividade volumétrica de biomassa (Q_X).

4.7. Efeito das condições de cultivo na bioconversão de xilose em etanol

Os efeitos da aeração e das concentrações de substrato, células e suplemento nutricional - extrato de levedura, extrato de malte, peptona de caseína, melaço de cana e fosfato de amônio; nas concentrações de 0,87, 0,87, 1,45, 6,77 e 1,40 g/L, para o meio com 30 g/L de xilose; de 1,74, 1,74, 2,90, 13,54 e 2,80 g/L, para o meio com 60 g/L de xilose; e de 2,61, 2,61, 4,35, 20,31 e 4,20 g/L, para o meio com 90 g/L de xilose; respectivamente – no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir de xilose foram avaliados por meio de planejamento fatorial completo 2^4 com 4 experimentos replicados no ponto central (Tabela 7).

A aeração foi variada pela razão entre o volume de frasco e o volume de meio (V_f/V_m), de 2 a 5; a concentração inicial de substrato, de 30 a 90 g/L; a concentração inicial de células, de 3,0 a 9,0 g/L; e a concentração de suplemento nutricional, de 11,36 a 34,08 g/L.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL fechados com tampão (gaze e algodão) (Figura 6B). As soluções de xilose e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos, e então adicionadas aspticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio.

Tabela 7 - Matriz de experimentos do planejamento fatorial 2^4 utilizado para a avaliação dos efeitos de diferentes condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651

Exp	Variáveis							
	Valores codificados				Valores reais			
	Aeração	Substrato	Células	Suplemento	Aeração (v/v _m)	Substrato (g/L)	Células (g/L)	Suplemento (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	2,00	30,00	3,00	11,36
2	1	-1	-1	-1	5,00	30,00	3,00	11,36
3	-1	1	-1	-1	2,00	90,00	3,00	11,36
4	1	1	-1	-1	5,00	90,00	3,00	11,36
5	-1	-1	1	-1	2,00	30,00	9,00	11,36
6	1	-1	1	-1	5,00	30,00	9,00	11,36
7	-1	1	1	-1	2,00	90,00	9,00	11,36
8	1	1	1	-1	5,00	90,00	9,00	11,36
9	-1	-1	-1	1	2,00	30,00	3,00	34,08
10	1	-1	-1	1	5,00	30,00	3,00	34,08
11	-1	1	-1	1	2,00	90,00	3,00	34,08
12	1	1	-1	1	5,00	90,00	3,00	34,08
13	-1	-1	1	1	2,00	30,00	9,00	34,08
14	1	-1	1	1	5,00	30,00	9,00	34,08
15	-1	1	1	1	2,00	90,00	9,00	34,08
16	1	1	1	1	5,00	90,00	9,00	34,08
17	0	0	0	0	3,50	60,00	6,00	22,72
18	0	0	0	0	3,50	60,00	6,00	22,72
19	0	0	0	0	3,50	60,00	6,00	22,72
20	0	0	0	0	3,50	60,00	6,00	22,72

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL fechados com tampão (gaze e algodão) (Figura 6B). As soluções de xilose e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos, e então adicionadas assepticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio.

As células de *S. stipitis* DSM-3651 adicionadas ao meio de fermentação foram provenientes de pré-cultivo em meio YMP (item 4.4).

Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 120 h. Amostragens foram realizadas a cada 12 h, para a determinação das concentrações de xilose, células, etanol, xilitol e glicerol.

Os resultados obtidos em cada ensaio de fermentação foram analisados utilizando os seguintes parâmetros fermentativos: concentração máxima de etanol, fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), produtividade

volumétrica de etanol (Q_P), velocidade média de consumo de substrato (Q_S), produtividade volumétrica de biomassa (Q_X).

4.7.1. Análise estatística dos dados experimentais

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se os programas Statistica 10 e Protimiza Experimental Design.

Os dados experimentais obtidos no planejamento fatorial foram analisados com base na estatística paramétrica, ou seja, utilizando métodos derivados dos parâmetros média e variância (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os coeficientes de regressão das variáveis independentes para cada parâmetro fermentativo ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, Q_P , Q_S e Q_X) foram calculados. Após reparametrização, considerando a significância estatística de cada variável ao nível de confiança de 95%, modelos empíricos foram elaborados por meio do ajuste de modelos lineares (Equação 8) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados, incluindo efeitos principais e de interação:

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j \quad (8)$$

onde y_i é a variável dependente, b_0 , b_i e b_{ij} representam os coeficientes de regressão do modelo, e x_i e x_j representam as variáveis independentes.

Para a realização das análises supracitadas, os valores reais das variáveis independentes foram convertidos em valores codificados, de acordo com a Equação 9.

$$V_C = \frac{(V_R - V_0)}{\left(\frac{\Delta V_R}{2}\right)} \quad (9)$$

onde V_C é o valor codificado da variável independente, V_R é o valor real da variável independente, V_0 é o valor real da variável independente no nível central e ΔV_R é a diferença entre o valor real máximo e o valor real mínimo da variável independente.

4.8. Hidrólise enzimática da sacarose do melaço de cana

As reações de hidrólise enzimática da sacarose do melaço de cana de açúcar foram realizadas utilizando a enzima invertase de *Saccharomyces cerevisiae* (I4504 - grau VII, ≥ 300 U/mg de sólido) fornecida pela Sigma-Aldrich. Dois procedimentos diferentes foram realizados; Condicionamento I e Condicionamento II.

O Condicionamento I foi realizado em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 10,65 mL da solução mãe de melaço de cana de açúcar (238,4 g/L) e 45,16 mL de extrato enzimático diluído em água destilada para uma carga enzimática final de 0,5 U/mL ($U_{\text{total}} = 27,90$), equivalente à 21,6 U/g de sacarose. A reação foi incubada em banho termostático por 10 horas a 55 °C e agitação de 100 rpm. O pH inicial de 5,75, proveniente da mistura melaço e água, não foi ajustado.

O Condicionamento II foi realizado em frascos Erlenmeyer de 500 mL, contendo 47,68 g de melaço de cana (cerca de 33 mL) e 167 mL de extrato enzimático diluído em água destilada para uma carga final de 2,62 U/mL ($U_{\text{total}} = 524,03$), equivalente aos mesmos 21,6 U/g de sacarose utilizados no Condicionamento I. A reação foi incubada em banho por 8 horas a 55 °C e agitação de 100 rpm. O pH inicial de 5,75 não foi ajustado.

Após 1, 2, 4, 6, 8 e 10 horas de reação, amostras retiradas, fervidas por 5 minutos em banho e centrifugadas a 4500 g por 15 minutos. A partir do sobrenadante as concentrações de glicose frutose e sacarose foram determinadas. A conversão de sacarose foi calculada pela Equação 10.

$$\text{Conversão de sacarose (\%)} = \left(\frac{sac_i - sac_t}{sac_i} \right) \times 100 \quad (10)$$

onde sac_i é a concentração de sacarose inicial e sac_t é a concentração de sacarose no tempo t da amostragem.

4.9. Otimização da produção de etanol a partir de xilose e melaço de cana condicionado

A otimização da produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a partir de meio contendo xilose e melaço de cana hidrolisado com invertase, foi realizada por meio de

Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 (DCCR – 2^2) com 3 experimentos replicados no ponto central (Tabela 8). As variáveis independentes avaliadas foram a concentração de substrato (xilose) e concentração de células. A concentração de suplemento nutricional foi associada à concentração de substrato, tendo em vista a manutenção da razão entre fonte de carbono e fonte de nutrientes. A condição de menor aeração foi utilizada; razão entre o volume de frasco e o volume de meio (v_f/v_m) de 2.

Tabela 8 - Matriz de experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 utilizado para a otimização da produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir de xilose melaço de cana condicionado

Exp	Variáveis			
	Valores codificados		Valores reais	
	Substrato	Células	Substrato (g/L)	Células (g/L)
1	-1	-1	98,79	9,88
2	1	-1	141,21	9,88
3	-1	1	98,79	14,12
4	1	1	141,21	14,12
5	-1,41	0	90,00	12,00
6	1,41	0	150,00	12,00
7	0	-1,41	120,00	9,00
8	0	1,41	120,00	15,00
9	0	0	120,00	12,00
10	0	0	120,00	12,00
11	0	0	120,00	12,00

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL fechados com tampão (gaze e algodão) (Figura 6B). As soluções de xilose e dos nutrientes, com concentrações mais elevadas, foram preparadas e, juntamente com a solução de melaço de cana hidrolisado, autoclavadas separadamente a 111 °C (0,5 atm) por 15 minutos, e então adicionadas assepticamente aos frascos, de modo a se obter a concentração desejada de cada componente no meio.

As células de *S. stipitis* DSM-3651 adicionadas ao meio de fermentação foram provenientes de pré-cultivo em meio YMP (item 4.4).

Os frascos foram incubados em shaker a 30 °C e 200 rpm por 72 h. Amostragens foram realizadas a cada 6 h, para a determinação das concentrações de xilose, glicose, frutose, células, etanol, xilitol e glicerol.

Os resultados obtidos em cada ensaio de fermentação foram analisados utilizando os seguintes parâmetros fermentativos: concentração máxima de etanol (P_f), fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P).

4.9.1. Análise estatística dos dados experimentais

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o programa Protimiza Experimental Design.

Os dados experimentais obtidos no Delineamento Composto Central Rotacional foram analisados com base na estatística paramétrica, ou seja, utilizando métodos derivados dos parâmetros média e variância (RODRIGUES; IEMMA, 2009). Os coeficientes de regressão foram calculados, e modelos empíricos para a predição da concentração final (P_f) e produtividade volumétrica de etanol (Q_P) foram elaborados a partir dos fatores que apresentaram efeito estatisticamente significativo (ao nível de confiança de 95%). Estes modelos foram elaborados por meio do ajuste de modelos quadráticos (Equação 11) aos dados experimentais, pelo método dos mínimos quadrados.

$$y_i = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n b_{ij} x_i x_j \quad (11)$$

onde y_i é a variável dependente, b_0 , b_i , b_{ii} e b_{ij} representam os coeficientes de regressão do modelo, e x_i e x_j representam as variáveis independentes.

Para a realização das análises supracitadas, os valores reais das variáveis independentes foram convertidos em valores codificados, de acordo com a Equação 9 (item 4.7.1).

4.10. Métodos analíticos

4.10.1. Determinação do teor de nitrogênio

A determinação dos teores de nitrogênio do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento referência foi realizada pelo método de Kjeldahl. Este método quantifica o chamado “nitrogênio total de Kjeldahl” (TKN), o qual inclui apenas o nitrogênio orgânico e

o nitrogênio amoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$). As formas oxidadas de nitrogênio, nitrato ($\text{NO}_3\text{-N}$) e nitrito ($\text{NO}_2\text{-N}$), não são quantificadas pelo método sem uma redução prévia (KIRK, 1950). No presente trabalho o TKN mensurado será referido apenas como nitrogênio.

4.10.1.1. Validação da metodologia analítica

Para a etapa de digestão, cerca de 0,1 g de amostra, 0,05 g de catalisador (sulfato de potássio : sulfato de cobre 2:1) e 2 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados a tubos de ensaio de 25 mL. Para o branco, apenas o ácido e o catalisador foram adicionados. Os tubos foram mantidos a 350 °C até a completa digestão da matéria orgânica presente nas amostras (~ 4 horas), evidenciada pela transparência/limpidez da solução.

Após a digestão, os tubos foram conectados ao sistema de destilação por arraste de vapor, e então 20 mL de hidróxido de sódio 30% (m/v) foram adicionados. A etapa de destilação decorreu até 4 min após a primeira gota de água ter sido recuperada no frasco receptor, garantindo assim a destilação da amônia total presente nas amostras. O frasco receptor continha 50 mL de ácido clorídrico 0,01 M e 4 gotas de vermelho de metila 0,2 % (m/v). A titulação foi então realizada utilizando hidróxido de sódio 0,01 M.

O cálculo do teor de nitrogênio por grama de amostra foi realizado considerando que 0,01 N de nitrogênio equivale a uma massa de 0,14 mg (Equação 12):

$$N = \frac{(V_b - V_a) \times f_{\text{NaOH}} \times 0,14}{m} \quad (12)$$

onde N é a massa de nitrogênio, em miligramas, por grama de amostra, V_b é o volume de NaOH 0,01 M gasto para neutralizar o branco, V_a é o volume de NaOH 0,01 M gasto para neutralizar a amostra, f_{NaOH} é o fator da solução de NaOH 0,01 M e m é a massa de amostra, em gramas.

A validação da metodologia foi realizada pela determinação do teor de nitrogênio de amostras referência compostas por albumina (fonte de nitrogênio orgânico), fosfato de amônio monobásico (fonte de nitrogênio inorgânico) e glicose, na proporção 1:1:2 (Tabela 9). A massa teórica de nitrogênio presente nestas amostras é apresentada no Apêndice B.

Tabela 9 - Composição das amostras analisadas pelo método de Kjeldahl

Amostra		Composição
Melaço	A	0,1160 g de melaço de cana-de-açúcar
	B	0,1038 g de melaço de cana-de-açúcar
Suplemento referência	A	0,0481 g de peptona, 0,0252 g de ext de levedura e 0,0275 g de ext de malte
	B	0,0445 g de peptona, 0,0267 g de ext de levedura e 0,0276 g de ext de malte
Amostra referência	A	0,0252 g de albumina, 0,0279 g de fosfato de amônio e 0,0505 de glicose
	B	0,0253 g de albumina, 0,0254 g de fosfato de amônio e 0,0527 de glicose

4.10.2. Determinação do teor de açúcares

As amostras de melaço de cana-de-açúcar e do suplemento referência foram caracterizadas quanto à concentração de açúcares totais utilizando a técnica fenol-ácido sulfúrico (DUBOIS et al., 1956). Já a posterior identificação dos açúcares monoméricos e da sacarose foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando a coluna BIO RAD Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) a 85 °C, água deionizada como fase móvel, fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 20 µL e detector de índice de refração.

As concentrações de açúcares das amostras retiradas durante os experimentos de fermentação foram determinadas por meio de CLAE. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min. A partir do sobrenadante foram determinadas as concentrações de xilose, glicose, frutose e arabinose utilizando a coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) a 45 °C e solução de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvel. Já para determinar a concentração de sacarose, utilizou-se a coluna BIO RAD Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) nas condições supracitadas.

4.10.2.1. Determinação da concentração de frutose nas presenças de xilose e etanol

A determinação da concentração de frutose na fermentação da mistura glicose-xilose-frutose foi realizada seguindo método desenvolvido no decorrer do estudo. Esta determinação não pôde ser realizada diretamente por CLAE, tendo em vista que a frutose

apresenta tempos de retenção semelhantes ao do etanol, para a coluna BIO RAD Aminex HPX-87P, e ao da xilose, para a coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (Figura 7).

Figura 7 - Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando as colunas BIO RAD Aminex HPX-87H (A) e BIO RAD Aminex HPX-87P (B), para a determinação das concentrações de celobiose (1), glicose (2), xilose (3), arabinose (4), ácido acético (5), etanol (6) e frutose (7).

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com o método, primeiro a concentração de xilose (XIL) foi determinada utilizando a coluna BIO RAD Aminex HPX-87P. Este valor de concentração foi então convertido no valor de área do pico cromatográfico (A_x), utilizando a curva de calibração de xilose obtida para a coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (Equação 13).

$$A_x = 1875435,836.XIL + 19305,663 \quad (13)$$

Na sequência, a área do pico cromatográfico referente à xilose + frutose (A_{x+f}) foi obtida utilizando a coluna BIO RAD Aminex HPX-87H. Este valor de área foi subtraído da área referente à xilose (A_x), e então convertido para concentração de frutose (FRU) utilizando a curva de calibração deste açúcar (Equação 14).

$$FRU = \frac{[(A_{x+f} - A_x) - 4786,571]}{1804826,809} \quad (14)$$

4.10.3. Determinação do teor de sólidos e cinzas

Para determinar o teor de sólidos totais do melaço de cana, uma alíquota de cerca de 2 g foi transferida para um cadinho de porcelana, de massa conhecida, e seca em estufa a 105 °C, até massa constante. Posteriormente, o mesmo cadinho contendo a amostra seca foi utilizado para a determinação de cinzas.

O teor de cinzas foi determinado via oxidação a seco. Tanto a amostra de melaço quanto uma amostra de cerca de 2 g de suplemento referência foram calcinadas a 575 °C por 3 h em mufla. Após resfriamento, o material residual (cinzas) foi quantificado gravimetricamente.

Para a determinação do teor de sólidos insolúveis em água, via filtração, cerca de 2 g de melaço ou suplemento referência foram transferidos para um cadinho de Gooch com filtro de vidro poroso nº 3 (abertura de 16-40 µm), de massa conhecida. Um volume de 500 mL de água destilada foi adicionado, garantindo que a massa retida representasse apenas compostos insolúveis em água. Os cadinhos foram secos em estufa a 105 °C, até massa constante.

4.10.4. Determinação da concentração celular

As concentrações celulares das amostras retiradas durante os experimentos de fermentação foram determinadas via turbidimetria. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min. Após a lavagem do precipitado, por meio de ressuspensão em água destilada e posterior centrifugação a 12000 g por 15 min, a suspensão celular foi diluída e os valores de absorbância a 600 nm (y) foram correlacionados à concentração celular em massa seca (x) por meio da Equação 15:

$$y = 4,603x + 0,037 \quad (15)$$

4.10.5. Determinação do teor de etanol, xilitol e glicerol

As concentrações de etanol, xilitol e glicerol das amostras retiradas durante os experimentos de fermentação foram determinadas por meio de CLAE. As amostras foram centrifugadas a 12000 g por 15 min. A partir do sobrenadante foram determinadas as concentrações utilizando a coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) a 45 °C e solução de ácido sulfúrico 0,01N como fase móvel.

4.10.6. Determinação da atividade enzimática de invertase

A determinação da atividade de invertase dos extratos enzimáticos preparados no estudo foi realizada de acordo com o procedimento estabelecido pelo fornecedor (Sigma-Aldrich).

Simultaneamente ao ensaio enzimático, uma curva de calibração para a determinação da concentração de glicose, em μmol , foi realizada. Em seis tubos de ensaio de 4 mL, previamente identificados, foram adicionados os seguintes volumes de água destilada: 0,95, 0,90, 0,80, 0,70, 0,60 e 0,50. Completou-se então o volume de cada tubo para 1,0 mL com uma solução padrão de glicose 5,56 mM. Para o branco do padrão, água substituiu a solução padrão de glicose. Para a determinação da atividade enzimática do extrato, adicionou-se 0,90 mL de água destilada em um tubo de ensaio de 4 mL. Após o equilíbrio a 55 °C em banho, 0,10 mL de extrato enzimático com atividade entre 0,3-0,4 U/mL, preparado em água, foi adicionado. Para o branco do teste, água destilada substituiu o extrato enzimático.

Os tubos, da reação enzimática e da curva de calibração, foram incubados a 55 °C por 20 minutos. Após homogeneização, uma alíquota de 0,10 mL de cada mistura reacional foi transferida para outro tubo de ensaio de 4 mL, o qual continha 2,90 mL de p-hidroxibenzidrazida 0,5% (m/v). Os tubos foram homogeneizados e colocados em banho com água fervendo por 5 minutos. Após este período e o resfriamento à temperatura ambiente, a absorbância a 410 nm foi mensurada em espectrofotômetro. A atividade enzimática de invertase, em U/mL, foi calculada utilizando a Equação 16.

$$U/mL = \frac{gli \times fd}{20 \times 0,1 \times 2} \quad (16)$$

onde *gli* é a concentração de glicose (em µmol) liberada na reação enzimática, *fd* é o fator de diluição do extrato enzimático, 20 é o tempo da reação enzimática (em minutos), 0,1 é o volume de extrato enzimático (em mililitros) e 2 é o fator de conversão para 1 µmol de sacarose sendo hidrolisado em glicose e frutose.

Por definição 1 U de invertase hidrolisa 1,0 µmol de sacarose em glicose e frutose por minuto, em pH 4,5 e temperatura de 55 °C

4.11. Determinação dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) representa a massa de células produzida por massa de substrato consumido, e foi calculado utilizando as concentrações iniciais e finais de substrato (S_i e S_f) e de células (X_i e X_f), de acordo com a Equação 17:

$$Y_{X/S} (g/g) = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad (17)$$

O fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) representa a massa de etanol produzida por massa de substrato consumido, e foi calculado utilizando as concentrações iniciais e finais de substrato (S_i e S_f) e de etanol (P_i e P_f), de acordo com a Equação 18:

$$Y_{P/S} (g/g) = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (18)$$

A eficiência da conversão de substrato em etanol (η) representa a razão entre o fator de conversão de substrato em etanol obtido experimentalmente ($Y_{P/S}$) e o fator de conversão de substrato em etanol máximo teórico, considerado como 0,51 g/g, e foi calculada utilizando a Equação 19:

$$\eta (\%) = \frac{Y_{P/S}}{0,51} \times 100 \quad (19)$$

A produtividade volumétrica de etanol (Q_P) representa a quantidade de etanol produzida por hora de fermentação, e foi calculada utilizando as concentrações inicial e final de etanol (P_i e P_f) e os tempos inicial e final da fermentação (t_i e t_f), de acordo com a Equação 20:

$$Q_P \text{ (g/L.h)} = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (20)$$

A velocidade média de consumo de substrato (Q_S) representa a quantidade de substrato consumido por hora de fermentação, e foi calculada utilizando as concentrações inicial e final de substrato (S_i e S_f) e os tempos inicial e final da fermentação (t_i e t_f), de acordo com a Equação 21:

$$Q_S \text{ (g/L.h)} = - \frac{\Delta S}{\Delta t} = - \frac{S_f - S_i}{t_f - t_i} \quad (21)$$

A produtividade volumétrica de biomassa (Q_X) representa a quantidade de células produzidas por hora de fermentação, e foi calculada utilizando as concentrações inicial e final de células (X_i e X_f) e os tempos inicial e final da fermentação (t_i e t_f), de acordo com a Equação 22:

$$Q_X \text{ (g/L.h)} = \frac{\Delta X}{\Delta t} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i} \quad (22)$$

4.12. Determinação dos parâmetros cinéticos

As velocidades instantâneas e específicas de crescimento (r_X e μ_X), formação de produto (r_P e μ_P) e consumo de substrato (r_S e μ_S) foram calculadas de acordo com as equações do método geométrico de cálculo de derivadas proposto por Le Duy e Zajic (1973). As velocidades instantâneas são representadas pelos valores das inclinações das tangentes às respectivas curvas em um tempo t , e são representadas pelas Equações 23-25 (SCHMIDELL et al., 2001):

$$r_X = \frac{dX}{dt} \quad (23)$$

$$r_P = \frac{dP}{dt} \quad (24)$$

$$r_S = \frac{dS}{dt} \quad (25)$$

As velocidades específicas representam as velocidades instantâneas com relação à respectiva concentração celular, ou seja, são obtidas pela razão entre velocidade instantânea e a concentração de celular (X) em um tempo t . Elas foram calculadas a partir foram calculadas a partir das Equações 26-28:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \times \frac{dX}{dt} \quad (26)$$

$$\mu_P = \frac{1}{X} \times \frac{dP}{dt} \quad (27)$$

$$\mu_S = \frac{1}{X} \times \frac{dS}{dt} \quad (28)$$

O coeficiente de manutenção celular (m_X) e o fator de conversão de substrato em células verdadeiro (Y_G) foram determinados por meio da regressão linear do plote dos valores de $1/Y_{X/S}$ em função dos valores de $1/\mu_X$ determinados ao longo das fermentações; m_X corresponde ao coeficiente angular e Y_G ao inverso do coeficiente linear. Enquanto que m_X equivale à velocidade específica de consumo de substrato utilizado para manutenção celular, Y_G representa o $Y_{X/S}$ corrigido pelo requerimento de substrato para manutenção. Ambos são determinados pela Equação 29 (PIRT, 1965):

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = m_X \times \frac{1}{\mu_X} + \frac{1}{Y_G} \quad (29)$$

A velocidade específica de formação de etanol relativa ao metabolismo de manutenção (m_P) e o coeficiente de formação de produto por biomassa ($Y_{P/X}$) foram determinados a partir da regressão linear do plote dos valores de μ_P em função dos valores de μ_X ; m_P corresponde ao coeficiente linear α , e $Y_{P/X}$ ao coeficiente angular β . Enquanto que m_P representa a velocidade específica de produção de etanol não associada ao crescimento celular, a eficiência de fermentação das células é representada pelo $Y_{P/X}$. Estes parâmetros são determinados pela Equação 30 (LUEDEKING; PIRET, 1959):

$$\mu_P = \mu_X \times \alpha + \beta \quad (30)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Utilização de diferentes fontes de carbono por *S. stipitis* DSM-3651

5.1.1. Açúcares individuais

A Figura 8 apresenta as curvas de concentração de açúcar, células e etanol determinadas nos cultivos de xilose, glicose, frutose, sacarose e arabinose. Conforme pode ser observado, as curvas sigmoidais ajustadas aos dados experimentais, utilizando o modelo de Boltzmann, apresentaram boa capacidade para descrever os perfis de consumo, crescimento e produção ao longo das fermentações realizadas; exceção feita aos dados de crescimento celular a partir de sacarose e arabinose, os quais serão discutidos mais adiante. Desta forma, os valores de concentração e parâmetros fermentativos apresentados referem-se aos dados extraídos das curvas ajustadas aos dados experimentais.

De acordo com a Figura 8, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 foi capaz de consumir substrato e crescer em todas as fermentações realizadas. Concentrações significantes de etanol (11,0-11,9 g/L), no entanto, só foram produzidas a partir de xilose, glicose e frutose, atingindo valores máximos entre 46 e 54 h de cultivo.

Sacarose e arabinose não foram consumidas significativamente; 87 e 77% destes açúcares permaneceram não utilizados no meio após 120 h de cultivo, equivalendo a velocidades médias de consumo de substrato (Q_s) de 0,03 e 0,06 g/L.h, respectivamente (Tabela 10). Por outro lado, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 esgotou os demais açúcares em aproximadamente 48 h; os valores de Q_s , determinados ao final das fermentações, foram de 0,50 g/L.h para xilose, 0,66 g/L.h para glicose e 0,63 g/L.h para frutose.

Uma maior velocidade de consumo de glicose, em relação à xilose, constitui-se em comportamento relatado para *S. stipitis*. No trabalho de Agbogbo et al., 2006, a levedura consumiu glicose e xilose com valores de Q_s de 0,58 e 0,46 g/L.h, respectivamente. Utilizando meios compostos por 20 g/L de substrato, Du Preez, Bosch e Prior (1986a) observaram que o consumo completo de glicose ocorreu em apenas 17 h de fermentação ($Q_s = 1,18$ g/L.h); o de xilose, em 24 h ($Q_s = 0,83$ g/L.h); o de arabinose, em 120 h ($Q_s = 0,17$ g/L.h).

No que se refere à frutose, consumo completo e relativamente rápido (semelhante ao da glicose) foi observado, pela primeira vez (no nosso conhecimento), no presente estudo. Bicho, Cunningham e Lee (1989), por outro lado, relataram consumo de apenas 67% deste açúcar pela linhagem NRRL Y-7124 (concentração inicial de 15 g/L), além de velocidade média de consumo muito menor (0,21 g/L.h).

Figura 8 - Curvas de consumo de substrato (A), crescimento celular (B) e produção de etanol (C) determinadas para os cultivos com açúcares individuais. Os símbolos representam os valores experimentais; as linhas representam as curvas ajustadas aos dados experimentais; as barras verticais representam os desvios-padrão determinados para as triplicatas experimentais; (x) representa os valores experimentais determinados para o cultivo em meio contendo apenas o suplemento nutricional.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir das curvas de concentração dos açúcares, as velocidades instantâneas de consumo de substrato (r_s) foram calculadas. De acordo com a Figura 9A, a glicose foi o açúcar consumido em maiores velocidades por *S. stipitis* DSM-3651, alcançando $r_{s\text{máx}}$ de 1,59 g/L.h; em sequência foram obtidos $r_{s\text{máx}}$ de 1,18 g/L.h para frutose e 0,86 g/L.h para

xilose. Não só os valores das velocidades instantâneas máximas, mas também os tempos nas quais elas são obtidas, juntamente com as respectivas concentrações celulares, explicam o porquê de as hexoses serem os primeiros açúcares a serem esgotados no meio; os picos de consumo de substrato ocorreram em 14 e 16 h nas fermentações de glicose e frutose, respectivamente, enquanto que para xilose, a $r_{S\text{máx}}$ foi obtida em 20 h. Quanto à arabinose e sacarose, os próprios perfis de picos com baixa amplitude e ampla distribuição, em conjunto com as menores concentrações celulares durante o início dos cultivos, justificam o lento consumo pela levedura; valores máximos de r_s de apenas 0,09 e 0,04 g/L.h, determinados após 78 e 54 h de fermentação, respectivamente, foram obtidos.

Figura 9 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de consumo de substrato determinadas para os cultivos com açúcares individuais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Considerando que a concentração celular, e, portanto, a concentração do *pool* enzimático responsável pelo metabolismo do substrato, aumenta com o decorrer da fermentação, as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_s) foram então calculadas, permitindo comparação entre as velocidades de consumo dos diferentes açúcares

pela levedura *S. stipitis* DSM-3651 em base mássica (Figura 9B). A levedura alcançou valores máximos de μ_s de 5,31 h⁻¹ para glicose, 5,44 h⁻¹ para frutose e 4,11 h⁻¹ para xilose, logo no início dos cultivos, evidenciando sua maior capacidade em captar hexoses em relação às pentoses. Nos meios compostos por sacarose ou arabinose, estes valores foram, respectivamente, iguais a 0,08 e 0,16 h⁻¹.

Skoog e Hahn-Hägerdal (1990), utilizando *S. stipitis* na fermentação contínua de xilose sob diferentes níveis de aeração, obtiveram valores de μ_s entre 0,4 e 0,8 h⁻¹. Grootjen et al. (1991), utilizando *S. stipitis* para a fermentação de meios a base de glicose ou xilose, sob aerobiose ou anaerobiose, definiram valores máximos de μ_s iguais a 1,10 e 0,50 h⁻¹, respectivamente. No trabalho de Demeke et al. (2013), por outro lado, uma cepa recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* (GS1.11-26) foi capaz de esgotar 35 g/L de xilose em 17 h, com μ_s máxima de 1,10 h⁻¹; em meio contendo 36 g/L de glicose + 37 g/L de xilose, entretanto, os açúcares foram consumidos em 13 h de cultivo, com μ_s máximas de 2,71 e 1,10 h⁻¹, respectivamente. Esta redução do tempo de fermentação foi atribuída ao maior crescimento a partir de glicose, demonstrando o efeito da concentração celular, em adição à velocidade específica de consumo do substrato, no tempo de cultivo.

A diferença na velocidade de consumo das hexoses (glicose e frutose) e da pentose (xilose) pode ser atribuída tanto às atividades dos transportadores de açúcares transmembrana quanto às vias metabólicas utilizadas. Em *S. stipitis*, o transporte de monossacarídeos é realizado por meio de sistemas de transporte bifásicos, compostos por componentes de alta (simporte de prótons) e de baixa (difusão facilitada) afinidade, os quais apresentam maior afinidade por glicose e realizam seu transporte para o interior da célula com maior velocidade em comparação à xilose (KILIAN; VAN UDEN, 1988; WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999). Transportadores já caracterizados bioquimicamente como aqueles sintetizados pelos genes SUT1, SUT2, SUT3 (WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999) e XUT3 (YOUNG et al., 2012) além de realizarem o transporte de glicose, transportam xilose e frutose, no entanto em velocidades bem inferiores. Mais adiante, a utilização de xilose também pode ser limitada por baixos níveis de xiluloquinase e das vias das pentoses fosfato (VANKUYK et al., 2012), além do desequilíbrio redox nas duas etapas iniciais do catabolismo da xilose.

O consumo da arabinose, substancialmente mais lento e limitado que o da xilose, pode ser atribuído aos ineficientes sistemas de transporte e metabolismo deste açúcar por *S. stipitis* (KNOSHAUG et al., 2009). E deve-se tanto à falta de transportadores específicos quanto à baixa capacidade de metabolismo (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986;

MCMILLAN; BOYNTON, 1994). Abordagem semelhante pode ser utilizada para interpretar os dados de consumo de sacarose. Não tendo sido identificados genes que codifiquem invertase ou mesmo transportadores específicos (JEFFRIES et al., 2007), evidencia-se que *S. stipitis* não é capaz de metabolizar de forma eficiente o único dissacarídeo avaliado pelo estudo, o que explica os valores mais baixos de Q_s , r_s e μ_s obtidos.

Seguindo os perfis de consumo de substrato, o crescimento de *S. stipitis* DSM-3651 ocorreu em maiores velocidades nas fermentações utilizando meios à base de xilose, glicose e frutose. As concentrações celulares obtidas ao final das fermentações foram de 3,8 g/L para xilose, 4,1 g/L para glicose e 4,3 g/L para frutose, resultando em valores de Q_x entre 0,07 e 0,09 g/L.h (Tabela 10).

Embora as fermentações utilizando arabinose ou sacarose como fonte de açúcar tenham apresentado crescimento celular mais lento, concentrações próximas às obtidas com os demais açúcares foram alcançadas ao final dos cultivos (120 h). Conforme já relatado, as curvas sigmoidais ajustadas aos dados de concentração de células das fermentações destes dois açúcares não descreveram perfeitamente o comportamento experimental observado; o crescimento celular ocorreu, aparentemente, em duas etapas. Como pode ser observado na Figura 8B, até 48 h de cultivo, as concentrações celulares obtidas a partir de arabinose e sacarose foram próximas daquela determinada na fermentação controle ($2,33 \pm 0,12$ g/L), contendo apenas o suplemento nutricional como fonte de carbono ($1,88 \pm 0,02$ g/L de maltose, $0,32 \pm 0,01$ g/L de glicose e $0,09 \pm 0,02$ g/L de frutose). Portanto, considerando o comportamento evidenciado pelos dados experimentais, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 apresentou crescimento diáuxico em ambas as fermentações; um crescimento inicial a partir dos açúcares do suplemento nutricional, os quais são mais facilmente assimilados pela levedura, seguido pelo crescimento promovido pela utilização de arabinose ou sacarose, o qual é confirmado pelos valores máximos de r_s obtidos após 48 h de fermentação.

Verificou-se também que os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) determinados para os cultivos em meios a base de sacarose (0,78 g/g) e arabinose (0,59 g/g) foram cerca de até 5 vezes maiores do que aqueles determinados para os cultivos em meios a base de xilose (0,13 g/g), glicose (0,13 g/g) e frutose (0,14 g/g) (Tabela 10). Esta diferença substancial se deve ao fato que, embora tenham sido pouco assimiladas pela levedura, sacarose e arabinose foram preferencialmente direcionadas para a síntese de biomassa, possibilitando a obtenção de concentrações celulares, ao final dos cultivos, semelhantes às aquelas obtidas a partir de xilose, glicose e frutose.

Maiores velocidades de crescimento de *S. stipitis* a partir de glicose (AGBOGBO et al., 2006) e frutose (BICHO; CUNNINGHAM; LEE, 1989), em relação à xilose, também se constituem em comportamentos reportados para a levedura *S. stipitis*. Quanto ao consumo de arabinose, Du Preez, Bosch e Prior (1986a) também relataram que, embora lento, resultou em fator de conversão em células maior (0,32 g/g) que aqueles observados em meios a base de glicose (0,18 g/g) e xilose (0,16 g/g).

Tabela 10 - Parâmetros determinados durante os cultivos de *S. stipitis* DSM-3651 em meios com diferentes fontes de açúcar

Parâmetros	Açúcar				
	Glicose	Frutose	Xilose	Sacarose	Arabinose
S_0 (g/L)	30,3	30,4	28,1	31,5	31,7
$S\%$ (%)	100	100	100	13	23
t_f (h)	46	48	56	120	120
X_f (g/L)	4,1	4,3	3,8	3,3	4,5
X_f/X_0 (x)	51,6	59,7	50,2	21,6	34,6
P_f (g/L)	11,9	11,7	11,0	-	-
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13	0,14	0,13	0,78	0,59
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,39	0,39	0,39	-	-
Q_s (g/L h)	0,66	0,63	0,50	0,03	0,06
Q_x (g/L h)	0,09	0,09	0,07	0,03	0,04
Q_P (g/L h)	0,26	0,24	0,20	-	-

S_0 – concentração inicial de substrato; $S\%$ - percentual de substrato consumido; t_f – tempo final de fermentação; X_f – concentração final de células; X_f/X_0 – razão entre as concentrações final e inicial de células; P_f – concentração final de etanol.

Os perfis das curvas de velocidade instantânea de crescimento (r_x) para xilose, glicose e frutose (Figura 10A) apresentaram similaridades com as cinéticas de consumo de substrato, mostrando que a captação de açúcar foi um dos fatores que influenciaram diretamente a velocidade de crescimento de *S. stipitis* DSM-3651. A levedura alcançou maiores valores de $r_{x\text{máx}}$ a partir das hexoses, 0,32 g/L.h para glicose e 0,30 g/L.h para frutose, em relação à xilose, 0,23 g/L.h. Embora os dados de $r_{x\text{máx}}$ para arabinose e sacarose não reflitam adequadamente o crescimento diáuxico observado, conforme discutido acima, o valor de apenas 0,11 g/L.h, determinado em ambas as fermentações, evidencia o lento crescimento da levedura a partir destes açúcares.

Figura 10 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de crescimento determinadas para os cultivos com açúcares individuais.

Fonte: Arquivo pessoal.

A levedura alcançou maiores velocidades específicas de crescimento (μ_x) nas fermentações de glicose ($0,28 \text{ h}^{-1}$), frutose ($0,24 \text{ h}^{-1}$) e xilose ($0,21 \text{ h}^{-1}$) (Figura 10B). Estes valores máximos foram obtidos nos períodos iniciais (8-10h), tornando-se nulos a partir de cerca de 36 horas. A partir de sacarose e arabinose, $\mu_{x\text{máx}}$ de $0,11$ e $0,08 \text{ h}^{-1}$ foram determinadas, respectivamente, se estendendo por períodos mais longos. Estes resultados corroboram com os dados de μ_s , ou seja, a levedura cresceu mais rápido nas fermentações onde captou substrato com maior velocidade. Valores semelhantes de μ_x a partir de glicose ($0,34$ e $0,35 \text{ h}^{-1}$), frutose ($0,36$ e $0,34 \text{ h}^{-1}$) e xilose ($0,30 \text{ h}^{-1}$) foram reportados para outras duas estipes de *S. stipitis*, NRRL Y-7124 e CBS 5773 (BICHO; CUNNINGHAM; LEE., 1989). No trabalho de Delgenes, Moleta e Navarro (1988), *S. stipitis* NRRL Y-7124 alcançou $\mu_{x\text{máx}}$ de $0,08 \text{ h}^{-1}$ em meio contendo 20 g/L da mistura xilose (75%), glicose (20%) e arabinose (5%).

Considerando que o substrato consumido pode ser direcionado em diferentes vias metabólicas, seja para a biossíntese e crescimento celular ou para a geração de energia para

manter atividades vitais da célula, o coeficiente de manutenção (m_X) de *S. stipitis* DSM-3651 a partir de cada fonte de açúcar foi determinado. Este parâmetro equivale à velocidade específica de consumo de substrato utilizado exclusivamente para atividades de manutenção (gradiente de íons, prótons, entre outras), ou seja, sua determinação permite quantificar o substrato que não contribui para o crescimento celular (DORAN, 1995). Os valores de m_X foram determinados a partir do plote $1/Y_{X/S} \times 1/\mu_X$, correspondendo ao valor do coeficiente angular das regressões lineares (Figura 11).

Analisando de forma integrada os coeficientes de manutenção e as curvas de crescimento celular obtidos a partir de xilose, glicose e frutose, pode-se constatar que *S. stipitis* DSM-3651 seguiu um comportamento já observado, no qual quando a quantidade de energia requerida para manutenção celular aumenta, as células reduzem a taxa de biossíntese, disponibilizando uma porção maior de energia para suprir esta demanda (WANG; HATZIMANIKATIS, 2006). Em meio à base de xilose, o coeficiente de manutenção foi maior ($0,020 \text{ h}^{-1}$) e o crescimento celular mais lento, em comparação com as fermentações de glicose ($m_X = 0,003 \text{ h}^{-1}$) e frutose ($m_X = 0,013 \text{ h}^{-1}$). Quanto à sacarose e arabinose, os respectivos coeficientes de manutenção, $0,011$ e $0,014 \text{ h}^{-1}$, representam, proporcionalmente, uma demanda de energia para manutenção muito maior do que a observada para os demais açúcares, tendo em vista que as velocidades específicas de consumo de substrato alcançadas pela levedura foram relativamente muito baixas em ambos os cultivos.

Visando complementar a discussão acerca do metabolismo de manutenção celular, o fator de conversão de substrato em células verdadeiro (Y_G) foi determinado. Este parâmetro se refere ao $Y_{X/S}$ corrigido pelo requerimento de substrato para manutenção (PIRT, 1965) e foi calculado a partir do plote da Figura 11 (é o inverso do coeficiente linear). Enquanto que no cultivo a base de xilose obteve-se Y_G de $0,02 \text{ g/g}$, a partir de glicose e frutose, valores de $0,04$ e $0,05 \text{ g/g}$ foram determinados, respectivamente. Portanto, fica evidenciado que, de fato, *S. stipitis* DSM-3651 necessita direcionar uma maior porção de substrato para o metabolismo de manutenção quando cultivada em xilose, ocasionando em um menor crescimento celular. Estes requerimentos de substrato para a manutenção variam consideravelmente dependendo do organismo e das condições de cultura (DORAN, 1995); entretanto, uma vez que o mesmo microrganismo e as mesmas condições (aeração, temperatura, agitação, suplementação, entre outros) foram utilizadas em todas as fermentações, as variações dos valores de m_X e Y_G podem ser atribuídas exclusivamente aos

requerimentos energéticos da célula para captar e metabolizar os diferentes açúcares avaliados.

Nas fermentações de glicose e frutose, o menor direcionamento de substrato para o metabolismo de manutenção pode ser atribuído ao menor requerimento de energia para a síntese enzimática, uma vez que as enzimas da via glicolítica são constitutivas, ou seja, estão presentes nas células de levedura independentemente das condições de fermentação (MAITRA; LOBO, 1971). Em contrapartida, para xilose, tanto os transportadores (BOLES; HOLLENBERG, 1997) como as enzimas presentes nas vias de catabolismo (WEBB; LEE, 1990) são indutíveis, o que explica o maior valor de m_x e a menor velocidade de crescimento de *S. stipitis* DSM-3651 em comparação com as hexoses. No caso da arabinose, os requerimentos energéticos referentes à síntese enzimática são ainda maiores; quatro enzimas são requeridas nas primeiras etapas de óxido-redução do catabolismo de arabinose, duas a mais que para xilose, o que ocasiona, proporcionalmente, um requerimento ainda maior de energia para a manutenção da atividade enzimática e dos níveis de cofatores exigidos (MCMILLAN; BOYNTON, 1994).

Figura 11 - Plote do inverso dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) em função do inverso das velocidades específicas de crescimento (μ_x) determinadas para os cultivos com açúcares individuais.

Fonte: Arquivo pessoal.

A levedura *S. stipitis* DSM-3651 foi capaz de produzir etanol, em concentrações significativas, somente a partir de xilose, glicose e frutose. De acordo com os perfis das curvas de concentração (Figura 8C), esta produção ocorreu mais rapidamente a partir das

hexoses nas primeiras 24 horas. As concentrações máximas de etanol obtidas foram de 11,0 g/L para xilose, 11,9 g/L para glicose e 11,7 g/L para frutose, correspondendo a produtividades volumétricas de etanol (Q_P) de 0,20, 0,26 e 0,24 g/L.h, respectivamente (Tabela 10). A produção de etanol por *S. stipitis* em maiores velocidades a partir de glicose, em relação à xilose, tem sido amplamente relatada na literatura. No estudo de Agbogbo et al. (2006), foram obtidas produtividades de 0,24 g/L.h para glicose e 0,20 g/L.h para xilose. Já Du Preez, Bosch e Prior (1986a) obtiveram Q_P de 0,70 g/L.h na fermentação de glicose e 0,53 g/L.h na fermentação de xilose por *S. stipitis* CSIR-Y633.

Assim como o rápido consumo, a elevada capacidade de produção de etanol a partir de frutose apresentada por *S. stipitis* DSM-3651 ainda não tinha sido reportada na literatura (no nosso conhecimento), sendo observada pela primeira vez no presente estudo. No estudo de Bicho, Cunningham e Lee (1989), *S. stipitis* NRRL Y-7124 produziu etanol de forma lenta e gradual até a concentração máxima de cerca de 3 g/L, após 48 horas de fermentação, equivalente a um Q_P de 0,06 g/L.h.

De acordo com a Figura 8C, as baixas concentrações de etanol produzidas nas fermentações de sacarose e arabinose, inferiores a 1 g/L, foram provenientes da conversão dos açúcares presentes no suplemento nutricional utilizado; $1,88 \pm 0,02$ g/L de maltose, $0,32 \pm 0,01$ g/L de glicose e $0,09 \pm 0,02$ g/L de frutose. *S. stipitis* não produz etanol a partir de arabinose (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1989; DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986a; SHI et al., 2000;) e não contém gene que codifique invertase (JEFFRIES et al., 2007), apenas assimilando estes açúcares (PONCET, 1975). No caso da arabinose, o fato do açúcar ser assimilado, mas não convertido em etanol deve-se ao já discutido alto requerimento energético para o metabolismo deste açúcar. De acordo com McMillan e Boynton (1994), esta demanda de energia é superior àquela que pode ser obtida pela fosforilação ao nível do substrato decorrente da fermentação. Sendo assim, seria necessária uma alta concentração de oxigênio no meio, maior do que a disponibilizada pelas condições de limitação de oxigenação utilizadas no presente estudo, permitindo a produção de energia suficiente para a via funcionar, por meio de fosforilação oxidativa (MCMILLAN; BOYNTON, 1994).

A produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 se deu a fatores de conversão ($Y_{P/S}$) de 0,39 g/g para os três açúcares (Tabela 10), equivalendo a uma eficiência de conversão em torno de 80%. Estes altos valores de eficiência evidenciam a capacidade de *S. stipitis* DSM-3651 produzir etanol a partir destes três diferentes açúcares, a qual pode ser aumentada por meio da otimização das condições de cultivo, dentre elas a oxigenação, visando direcionar uma maior quantidade de substrato para a formação de etanol (aumento de $Y_{P/S}$) em

detrimento da biossíntese (redução de $Y_{X/S}$). Os valores de $Y_{P/S}$ obtidos para glicose e xilose corroboram com os dados reportados na literatura; no trabalho de Agbogbo et al. (2006), a levedura *S. stipitis* CBS 6054 converteu glicose ou xilose a etanol com fatores de 0,42 e 0,44 g/g, respectivamente. Já no estudo de Du Preez, Bosch e Prior (1986a), os valores deste parâmetro foram de 0,40 g/g para glicose e 0,39 g/g para xilose. Em relação à frutose, no presente estudo, sua conversão a etanol se deu com uma eficiência aproximadamente 20% maior do que a reportada por Bicho, Cunningham e Lee (1989).

A partir dos dados de concentração, as velocidades instantâneas de produção de etanol (r_P) foram calculadas. Como pode ser observado na Figura 12A, a produção de etanol ocorreu de forma mais rápida nas fermentações onde o consumo de substrato e o crescimento celular se deram em maiores velocidades. A partir de meios a base de glicose e frutose, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 alcançou valores máximos de r_P de 0,80 e 0,78 g/L.h, respectivamente; utilizando xilose, o $r_{Pmáx}$ foi de 0,62 g/L.h. Além dos maiores valores de r_P , os picos de produtividade de etanol para as hexoses se deram em tempos mais curtos de fermentação, 16 h para glicose e 18 h para frutose, em relação à pentose, 22 h.

Os dados de velocidade específica de produção de etanol (μ_P) (Figura 12B), provenientes da normatização das velocidades instantâneas pelas concentrações celulares, mostram que uma célula de *S. stipitis* DSM-3651 produz etanol mais rápido a partir de glicose e frutose em relação à xilose; a partir da pentose, o valor máximo de μ_P obtido foi de $0,47 \text{ h}^{-1}$, já a partir das hexoses obteve-se $0,53 \text{ h}^{-1}$ a partir de frutose e $0,62 \text{ h}^{-1}$ a partir de glicose. Estes resultados corroboram com valores já determinados para *S. stipitis* em cultivos a base de glicose ou xilose. Avaliando a influência de condições de cultivo (pH, temperatura e concentração inicial de substrato) na fermentação de xilose por *S. stipitis* CSIR-Y633, Du Preez, Bosch e Prior (1986b) determinaram valores máximos de μ_P entre 0,30 e $0,35 \text{ h}^{-1}$, os quais também são próximos daquele obtido por *Saccharomyces cerevisiae* no estudo de Demeke et al. (2013), $0,48 \text{ h}^{-1}$. Em relação à glicose, Du Preez, Bosch e Prior (1986a) utilizando *S. stipitis* CSIR-Y633 na fermentação de um meio contendo 20 g/L do açúcar, determinaram um μ_P de $0,39 \text{ h}^{-1}$; valor semelhante ao alcançado no trabalho de Skoog, Jeppsson e Hahn-Hägerdal (1992) pela estirpe CBS 6054 sob condições de limitação de oxigênio, $0,38 \text{ h}^{-1}$.

Figura 12 - Velocidades instantâneas (A) e específicas (B) de produção de etanol determinadas para os cultivos com açúcares individuais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar da levedura *S. stipitis* DSM-3651 ter apresentado, no cultivo em meio à base de xilose, metabolismo de manutenção mais ativo, crescendo menos e de forma mais lenta em relação às hexoses, uma concentração de etanol apenas um pouco inferior às demais foi obtida (0,7 e 0,9 g/L menor que frutose e glicose, respectivamente). Isto pode ser explicado pelo fato de que o etanol é um produto formado em vias de geração de energia, ou seja, a sua síntese é uma consequência inevitável do desenvolvimento celular; ele é formado a partir do substrato captado para suportar tanto o crescimento quanto a manutenção celular (DORAN, 1995). A determinação da velocidade específica de formação de etanol relativa ao metabolismo de manutenção (m_P), por meio do plote $\mu_P \times \mu_X$ (Figura 13) (coeficiente linear das regressões lineares), possibilita avaliar a velocidade específica de produção de etanol não associada ao crescimento celular, e consequentemente, entender como a levedura alcançou relativa boa produção de etanol a partir de xilose. Como pode ser observado, o valor de m_P de 0,023 h⁻¹ obtido no cultivo em meio a base de xilose foi inferior apenas ao obtido no cultivo em meio a base de glicose, 0,028 h⁻¹; para frutose, entretanto, o valor deste

parâmetro foi de apenas $0,015 \text{ h}^{-1}$. Esta considerável capacidade de *S. stipitis* DSM-3651 em realizar a fermentação alcoólica de xilose também é suportada pelo coeficiente de formação de produto por biomassa ($Y_{P/X}$), determinado pelo mesmo plote supramencionado (coeficiente angular das regressões lineares). Valores semelhantes de $Y_{P/X}$ foram obtidos nas três fermentações: $2,20 \text{ g/g}$ para xilose, $2,23$ para glicose e $2,24 \text{ g/g}$ para frutose (Figura 13); ou seja, embora uma célula de *S. stipitis* DSM-3651 produza etanol mais rápido a partir de glicose do que a partir de frutose, e a partir de frutose mais rápido do que a partir de xilose, ao longo da fermentação esta mesma célula é capaz de produzir quantidades semelhantes de etanol independentemente do açúcar. No trabalho de Agbogbo et al. (2006), *S. stipitis* CBS 6054 alcançou valores de $Y_{P/X}$ de $3,01$ e $4,18 \text{ g/g}$ a partir de glicose e xilose, respectivamente; no entanto, a concentração inicial de substrato no estudo foi de 60 g/L .

Figura 13 - Plote das velocidades específicas de produção de etanol (μ_P) em função das velocidades específicas de crescimento (μ_X) determinadas para os cultivos com açúcares individuais.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.1.2. Mistura xilose-glicose-frutose

De modo geral, os perfis de consumo de substrato (total), crescimento celular e produção de etanol obtidos na fermentação da mistura xilose, glicose e frutose (XGF) (Figura 14) foram semelhantes aos obtidos nos cultivos nos quais estes açúcares foram disponibilizados como fontes únicas de carbono.

Figura 14 - Curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol obtidas na fermentação do meio composto por xilose, glicose e frutose. Os símbolos representam os valores experimentais, as linhas representam as curvas ajustadas utilizando o modelo de Boltzmann e as barras verticais representam o desvio padrão entre as triplicatas experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os substratos foram consumidos quase que completamente ($98,16 \pm 0,49\%$) nas primeiras 48 horas de fermentação, seguindo o observado nos cultivos individuais contendo glicose, xilose ou frutose como fontes únicas de carbono. No entanto, houve um consumo preferencial de substrato, evidenciado pela utilização sequencial dos açúcares (Figura 14). A glicose foi o primeiro substrato a ser consumido, seguido por frutose e xilose. Em 12 h de fermentação, cerca de 75% da glicose tinha sido consumida; enquanto que os consumos de frutose e xilose foram de apenas 14 e 10%, respectivamente. Já em 18 h, com a glicose esgotada no meio, cerca de 70% da frutose e 27% da xilose tinham sido consumidas.

Este consumo preferencial, de glicose em relação à frutose e xilose, e de frutose em relação à xilose, pode ser avaliado em termos quantitativos, considerando as velocidades específicas de consumo de cada açúcar ao longo da fermentação. O consumo de glicose foi realizado a uma μ_s máxima de $2,10 \text{ h}^{-1}$, a qual ocasionou seu esgotamento no meio em apenas 20 horas de fermentação. Em contrapartida, frutose e xilose foram captadas do meio de forma mais lenta e gradual, evidenciada pelo formato espaçado e de menor amplitude das curvas de μ_s em função do tempo (Figura 15A). O consumo de frutose atingiu μ_s máxima de $0,63 \text{ h}^{-1}$, se estendendo até ao final da fermentação, 72 h, tempo no qual seu esgotamento foi

observado. Já o consumo de xilose procedeu de forma ainda mais lenta e gradual, atingindo aparentemente dois picos de μ_s ; o primeiro no início da fermentação ($0,36 \text{ h}^{-1}$) e o segundo em 24 horas ($0,11 \text{ h}^{-1}$), tempo no qual a glicose já tinha sido esgotada e apenas cerca de 2 g/L de frutose permaneciam inutilizados.

Figura 15 - Velocidades específicas de consumo de substrato (A), crescimento celular (B) e produção de etanol (C) obtidas na fermentação do meio composto pela mistura de xilose, glicose e frutose.

Fonte: Arquivo pessoal.

O consumo preferencial de glicose em detrimento à xilose tem sido amplamente descrito pela literatura (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; AGBOGBO et al., 2006). Este efeito de diauxia observado em *S. stipitis* é ocasionado tanto pela maior afinidade dos transportadores de açúcar de *S. stipitis* por glicose (KILIAN; VAN UDEN, 1988; WEIERSTALL; HOLLENBERG; BOLES, 1999) quanto pelo efeito de repressão que a glicose exerce sobre os genes *XYL1* e *XIL2*, responsáveis pela assimilação de xilose (JEFFRIES et al., 2007). Bicho et al. (1988), por exemplo, mostraram que a glicose foi capaz de reduzir em cerca de 80% as atividades de xilose redutase e xilitol desidrogenase via repressão da indução, em *S. stipitis* NRRL Y-7124.

No entanto, de acordo com a Figura 14 e os dados de μ_s , a frutose não exerceu o mesmo efeito que a glicose no consumo de xilose. Embora um consumo mais pronunciado de xilose tenha sido observado somente após a redução da concentração de frutose no meio, ambos os açúcares foram consumidos simultaneamente a partir de 12 horas de cultivo. Em estudo preliminar (dados não apresentados), no qual o meio foi composto apenas por xilose (15 g/L) e frutose (15 g/L), foi constatado que, de fato, frutose e xilose são consumidas simultaneamente por *S. stipitis* DSM-3651. Contrariamente ao observado no presente estudo Bicho, Cunningham e Lee (1989) relataram que *S. stipitis* consumiu xilose preferencialmente em relação à frutose, devido a um efeito de repressão catabólica; também constataram que a presença de frutose não alterou o padrão de consumo de xilose, em comparação com a fermentação do meio contendo xilose como fonte única de carbono.

A concentração máxima de células, cerca de 4,50 g/L (Figura 14), foi atingida em 48 horas de cultivo, o que representa um Q_x de $0,09 \pm 0,01$ g/L.h. Analisando a cinética de crescimento de *S. stipitis* DSM-3651 (Figura 15B), pode-se observar que, no meio contendo a mistura de açúcares, a levedura alcançou velocidade específica de crescimento (μ_x) máxima de $0,30 \text{ h}^{-1}$, ainda maior do que aquelas obtidas a partir de glicose, $0,28 \text{ h}^{-1}$. Em relação ao direcionamento de substrato para a síntese de biomassa, nenhuma diferença foi observada em comparação com os cultivos utilizando os açúcares individuais como fontes únicas de carbono, uma vez que o valor de $Y_{x/s}$ foi de $0,14 \pm 0,01$ g/g. Em contrapartida, o direcionamento de substrato para o metabolismo de manutenção apresentou uma pequena variação. Enquanto o m_x foi de $0,012 \text{ h}^{-1}$ para xilose, e de $0,002\text{-}0,004 \text{ h}^{-1}$ para as hexoses, no cultivo contendo a mistura destes açúcares, o coeficiente de manutenção apresentou um valor intermediário, $0,008 \text{ h}^{-1}$. Este resultado corrobora com a tendência sugerida, a qual estabelece que o metabolismo de pentoses exige uma maior demanda de energia para a síntese de transportadores e enzimas induzidas. Tendo em vista que uma concentração menor

de xilose estava presente nesta fermentação, menor foi o requerimento energético de *S. stipitis* DSM-3651 para manutenção.

A produção de etanol a partir da mistura xilose, glicose e frutose também foi semelhante aos cultivos utilizando apenas um açúcar. Após 48 horas de fermentação, a concentração máxima de $13,08 \pm 0,58$ g/L de etanol foi obtida (Figura 14), equivalendo a um Q_P de $0,27 \pm 0,01$ g/L.h. Esta produção se deu a um fator de conversão de $0,42 \pm 0,03$ g/g, correspondendo aos mesmos 80% de eficiência obtidos a partir dos açúcares individuais. De acordo com a Figura 15C, observa-se que a cinética de produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir da mistura de açúcares foi semelhante àquela obtida na fermentação da glicose, alcançando μ_P máxima de $0,59 \text{ h}^{-1}$; ou seja, a substituição de 1/3 das hexoses pela pentose não impactou a formação de produto.

Em síntese, todos os parâmetros fermentativos, que consideram o tempo de fermentação, velocidade média de consumo de substrato (Q_S) e produtividades volumétricas de biomassa (Q_X) e etanol (Q_P), foram semelhantes àqueles obtidos nos cultivos a base de glicose e frutose, e maiores em relação ao cultivo em xilose (Tabela 10).

Com base no exposto, acredita-se que a fermentação de xilose em meios contendo glicose e frutose seja uma alternativa à sua utilização como fonte única de carbono, embora mais estudos ainda sejam necessários para otimizar a proporção entre pentoses e hexoses, e também as demais condições de cultivo.

5.2. Validação da metodologia para a determinação do teor de nitrogênio

A metodologia de determinação do teor de nitrogênio pela metodologia de Kjeldhal, utilizada no presente estudo, mostrou-se adequada, levando em conta que todo o nitrogênio presente nas amostras de referência, compostas por albumina, fosfato de amônio e glicose, foi corretamente quantificado (Tabela 11).

Tabela 11 - Comparação entre a massa de nitrogênio teórica e aquela quantificada nas amostras de referência pelo método de Kjeldhal

Amostra	Massa de nitrogênio (g)	
	Teórica	Quantificada
A	0,0074	0,0077
B	0,0071	0,0074

5.3. Composição do melaço de cana-de-açúcar e do suplemento nutricional referência

As composições do suplemento nutricional referência e do melaço de cana-de-açúcar estão dispostas na Tabela 12.

Tabela 12 - Composição do melaço de cana e do suplemento nutricional referência. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas

Componente (% m/m)	Suplemento referência	Melaço
Nitrogênio¹	9,31 (0,40)	0,41 (0,02)
Açúcares totais	28,98 (1,74)	83,08 (7,44)
Glicose	3,00 (0,06)	6,43 (0,08)
Frutose	ND	6,20 (0,05)
Sacarose	ND	50,89 (0,79)
Sólidos totais	100.00	81,32 (0,01)
Sólidos insolúveis	ND	0.03 (0,01)
Cinzas	6,48 (0,24)	7,47 (0,21)

¹ A determinação do teor de nitrogênio foi realizada em duplicata;

ND: Não detectado.

Em relação ao suplemento referência, o teor de nitrogênio de $9,31 \pm 0,40\%$ (m/m) é compatível com os teores de nitrogênio na peptona de caseína e nos extratos de malte e levedura reportados por Lee (2006): 13, 5 e 9% (m/m), respectivamente. O teor de açúcares totais, $28,98 \pm 1,74\%$ (m/m), é compatível com a proporção de extrato de malte no suplemento, o qual é composto em 92% (m/m) por açúcares (maltose, glicose e dextrinas, entre outros) (LEE, 2006).

Quanto à composição do melaço de cana-de-açúcar, uma comparação entre aquela determinada no presente estudo e dados da literatura está disposta na Tabela 13. As divergências encontradas nesta comparação devem-se ao fato de que não há uma composição definida para o melaço de cana, tendo em vista que o teor dos seus componentes varia de acordo com as peculiaridades da matéria-prima e do processo de fabricação do açúcar (OLBRICH, 1963).

Considerando as cinzas e o nitrogênio, nutrientes essenciais para o crescimento e atividade fermentativa de *S. stipitis* (SLININGER et al., 2006), o melaço apresenta teor de cinzas semelhante em ambos os materiais, $7,47 \pm 0,21\%$ (m/m) no melaço e $6,48 \pm 0,24\%$ (m/m) no suplemento referência. Em contrapartida, é composto por uma quantidade

deficitária de nitrogênio; $0,41 \pm 0,02\%$ (m/m) no melaço, e $9,31 \pm 0,40\%$ (m/m) no suplemento referência. Desta forma, para que o melaço seja proposto como uma fonte suplementar de nutrientes para *S. stipitis* DSM-3651, há a necessidade de associá-lo a uma fonte de nitrogênio, uma vez que apenas as cinzas seriam fornecidas em quantidades teoricamente suficientes para a levedura.

Tabela 13 - Comparação entre a composição do melaço de cana-de-açúcar utilizado no presente estudo com dados da literatura. Os valores entre parênteses representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas

Componente (% m/m)	Presente estudo	REF 1	REF 2 ^a	REF 3	REF 4	REF 5
Nitrogênio	0,41 (0,02) ^b	0,40	8,0 ^c	-	0,35	0,02
Açúcares totais	83,08 (7,44)	-	65,0	-	-	-
Glicose	6,43 (0,08)	10,0	12,0	16,0	-	9,6
Frutose	6,20 (0,05)	13,0	9,0	14,0	-	4,1
Sacarose	50,89 (0,79)	33,4	40,0	32,0	-	51,5
Sólidos totais	81,32 (0,01)	76,6	82,0	80,0	80,6	76,7
Sólidos insolúveis	0,03 (0,01)	-	-	-	-	-
Cinzas	7,47 (0,21)	9,9	8,5	8,0	-	-

REF: 1- JONES; THOMAS; INGLEDEW, 1994; **2-** STUPIELLO, 1974; **3-** OLBRICH, 1963; **4-** PAZOUKI et al., 2000; **5-** GHORBANI et al., 2011;

^a Citado por Santos (2008);

^b A determinação do teor de nitrogênio foi realizada em duplicatas;

^c Matéria nitrogenada;

- Não determinado.

O termo “cinzas” define o resíduo inorgânico obtido após oxidação a seco, a 575 °C, ou seja, não fornece informações qualitativas ou quantitativas da composição mineral dos materiais, no que se refere às concentrações dos elementos individuais. Desta forma, a utilização do melaço como fonte alternativa de cinzas, baseada exclusivamente no teor bruto de minerais totais, semelhante ao do suplemento referência, pode não contemplar as necessidades nutricionais da levedura *S. stipitis* DSM-3651.

Adicionalmente, o melaço de cana pode até exercer efeito inibitório para a levedura. Sabe-se que, em certas concentrações, alguns compostos orgânicos e elementos inorgânicos presentes no melaço inibem o crescimento microbiano (KASENO; KOKUGAN, 1997; KUNDU et al., 1984; SINGH; VADEHRA; GUPTA, 1981). Os trabalhos de Kundu et al. (1984) e de Singh, Vadehra e Gupta (1981) mostraram que diferentes compostos orgânicos inibiram a produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. Enquanto, no primeiro, estes compostos apresentavam massa molar superior à da sacarose, no segundo, a massa molar foi

equivalente à das hexoses e seu efeito inibitório foi aumentado em três vezes após o melaço ter sido submetido ao processo de sulfitação.

Com relação aos minerais, de modo geral, dependendo do microrganismo e do teor de melaço no meio de cultivo, os íons metálicos Ca^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} , conhecidos micronutrientes essenciais, podem passar a exercer efeito inibitório para o processo fermentativo, devido às suas concentrações excessivas (DOELLE; DOELLE, 1990; LIU et al., 2008; SINGH; VADEHRA; GUPTA, 1981). Neste contexto, deve-se mencionar a possibilidade de alteração da composição do melaço, em termos de minerais, por meio de condicionamento prévio (VALDUGA et al. 2007).

Em estudo conduzido pelo Instituto Nacional de Tecnologia (1970), compostos nitrogenados e fosforados foram avaliados individualmente e em conjunto na suplementação nutricional de mostos a base de melaço de cana. Os resultados mostraram que tanto a adição de 0,5 g/L de sulfato de amônio (fonte de nitrogênio) como a adição de 0,5 g/L de fosfato de amônio (fonte de nitrogênio e fósforo) incrementaram a produção de etanol e o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*; com destaque para a suplementação mista inorgânica (adição de fosfato de amônio), que se mostrou particularmente benéfica na fermentação de melaços que apresentaram fermentabilidade ruim.

A utilização do fosfato de amônio dibásico como fonte única de nitrogênio corresponde a um fornecimento de nitrogênio estritamente inorgânico. Em comparação às fontes orgânicas complexas, presentes no suplemento referência, o sulfato de amônio é capaz de suprir apenas a demanda de nitrogênio necessária para a síntese de moléculas nitrogenadas, enquanto que os aminoácidos presentes no extrato de levedura e na peptona, além de suprirem esta demanda, estimulam o metabolismo celular. Além disso, o extrato de levedura também é composto por vitaminas, que são fatores de crescimento comumente requeridos por microrganismos (MADIGAN et al., 2012).

Guebel et al. (1992), por meio de cultivos de *S. stipitis* NRRL Y-7124 em meio sintético contendo 50 g/L de xilose, mostraram que o extrato de levedura pode ser substituído por uma fonte definida de nitrogênio, o sulfato de amônio, desde que os requerimentos por vitaminas e minerais sejam supridos. Por outro lado, trabalhos como o de Silva et al. (2012) e Slininger et al. (2006) mostraram que o fornecimento de nitrogênio por meio de uma suplementação mista, extrato de levedura (complexo) e ureia (definido), ocasionou em melhor desenvolvimento e atividade fermentativa de *S. stipitis*.

Villavicencio, Sant'Anna e Tôrres (1999) avaliaram o uso de três meios de cultura à base de melaço de cana, em comparação a um meio comercial (MRS - Man-Rogosa-Sharpe),

para o crescimento de *Pediococcus pentosaceus*. O meio 1 foi composto por apenas 5% (v/v) de melaço, o meio 2 por 5% (v/v) de melaço suplementado com 0,5% (m/v) de extrato de levedura, e o meio 3 por 5% (v/v) de melaço suplementado com 0,5% (m/v) de extrato de carne. O enriquecimento nutricional do melaço foi realizado devido ao baixo teor de nitrogênio, além das deficiências em fósforo e potássio. Após 28 h de cultivo, concentrações muito próximas de células viáveis foram obtidas nos cultivos em meio comercial e no meio 2 (melhor entre os meios à base de melaço suplementado), mostrando o potencial da utilização do melaço como substrato para o crescimento de *P. pentosaceus*. Considerando os gastos para a formulação de ambos os meios de cultivo, a utilização do meio 2, ao invés do meio comercial (MRS), respondeu por uma redução de 78% nos custos.

5.4. Efeito da suplementação nutricional e da forma de pré-cultivo na bioconversão de xilose em etanol

5.4.1. Concentração celular inicial de 0,07 g/L

Analizando as curvas de crescimento celular de *S. stipitis* DSM-3651 (Figura 16A), pode-se observar que a “fase lag” foi mais extensa nos cultivos realizados em meio contendo melaço de cana-de-açúcar enriquecido com fosfato de amônio dibásico (MF) como suplemento nutricional. Nestas fermentações, as concentrações celulares aumentaram gradualmente ao longo das 96 horas de cultivo, atingindo um valor de cerca de 4 g/L. Em contrapartida, nos cultivos utilizando o suplemento referência (REF), um forte crescimento celular ocorreu durante as primeiras 24 horas de fermentação, alcançando aproximadamente a mesma concentração de células em apenas 48 horas. O crescimento celular não foi influenciado significativamente pela forma na qual as células de *S. stipitis* DSM-3651 foram pré-cultivadas; em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP).

O reflexo da extensão do período de adaptação na velocidade média de crescimento celular pode ser observado a partir dos valores de produtividade volumétrica de biomassa (Q_X) (Figura 17A). Nas primeiras 48 horas de cultivo, a levedura *S. stipitis* DSM-3651

cresceu com valores médios de Q_x de 0,08 g/L.h quando a suplementação REF foi empregada; em meios suplementados por MF, este valor foi de 0,06 g/L.h.

Figura 16 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melão e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

O consumo de xilose seguiu a tendência observada para o crescimento celular, ou seja, quanto menor o crescimento, menor o consumo de substrato. De acordo com a Figura 16B, pode-se observar que a xilose não foi completamente consumida nos cultivos realizados em meio contendo MF como suplemento nutricional. Após 96 horas de fermentação, cerca de 6 g/L de xilose permaneceram inutilizados no meio, em ambos os pré-cultivos (EM e YMP). Em contrapartida, nos cultivos utilizando o suplemento REF, a xilose foi completamente consumida em 48 horas. Além da quantidade, a velocidade média de

consumo de xilose por *S. stipitis* DSM-3651 também variou neste período de 48 horas; valores médios de velocidade média de consumo de substrato (Q_s) de 0,26 e 0,58 g/L.h foram obtidos nas fermentações utilizando suplemento MF e REF, respectivamente (Figura 17A).

Quanto à produção de etanol, os cultivos em meio contendo suplemento REF alcançaram maiores concentrações em menor tempo. De acordo com a Figura 16C, concentrações máximas de etanol entre 11 e 12 g/L foram obtidas em 48 horas. Nas fermentações suplementadas por MF, cerca de 6 g/L de etanol foram produzidas após 96 horas. Em termos de velocidade média de produção, os cultivos contendo suplementação REF apresentaram valores médios de produtividade volumétrica de etanol (Q_P) de 0,24 g/L.h em 48 horas de fermentação; mais do que o triplo do obtido nos cultivos utilizando suplemento MF, 0,07 g/L.h (Figura 17A). De forma semelhante à observada para o crescimento celular e para o consumo de substrato, a produção de etanol foi independente da forma de pré-cultivo das células (EM ou YMP).

O xilitol foi o principal subproduto da bioconversão de xilose a etanol (Figura 16D). Nas fermentações com suplemento REF, concentrações máximas entre 0,7 e 1,0 g/L foram quantificadas, não diferindo significativamente entre as diferentes formas de pré-cultivo avaliadas. Por outro lado, nas fermentações com suplemento MF, além de maior, a produção de xilitol foi aparentemente influenciada pela forma de pré-cultivo; $1,50 \pm 0,26$ g/L foram produzidos nas fermentações utilizando células provenientes do pré-cultivo em meio YMP, e $2,41 \pm 0,15$ g/L em meio EM.

O glicerol foi produzido em todos os cultivos; porém, em quantidades relativamente pequenas (de 0,15 a 0,20 g/L), e mais tardiamente nas fermentações com suplemento MF (dados não apresentados).

Para avaliar as alterações no metabolismo da levedura *S. stipitis* DSM-3651, promovidas pelas diferentes condições de cultivo e pré-cultivo, uma análise baseada nos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), etanol ($Y_{P/S}$), xilitol ($Y_{XOH/S}$) e dióxido de carbono ($Y_{CO_2/S}$) foi realizada, de forma a obter uma visão aproximada do direcionamento do substrato consumido (Figura 17B). Esta análise partiu de três pressupostos: (i) o valor de $Y_{CO_2/S}$ refere-se exclusivamente ao dióxido de carbono formado pela descarboxilação do piruvato, o qual pode ser estimado a partir da concentração de etanol formado, (ii) o substrato considerado refere-se apenas às fontes de carbono quantificadas (xilose do meio + glicose e frutose do melaço de cana), e (iii) a diferença entre os somatórios dos respectivos fatores de conversão e 1 foi considerada como a quantidade de CO_2 resultante de respiração celular.

Figura 17 - Parâmetros fermentativos determinados após 48 horas de fermentação para os cultivos utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com as Figuras 16B, C e 17B, as maiores concentrações de etanol produzidas pela levedura *S. stipitis* DSM-3651 nos cultivos utilizando o suplemento REF devem-se, não só ao maior consumo de substrato, mas também ao fato de que, nestes cultivos, a quantidade de substrato direcionada para a produção de etanol ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g) foi maior do que nos cultivos utilizando o suplemento MF ($Y_{P/S} = 0,27$ - $0,28$ g/g). Este direcionamento ocorreu em detrimento da utilização do substrato para o crescimento celular e para a formação de xilitol. De fato, xilitol e biomassa, foram produzidos com fatores de conversão ($Y_{XOH/S}$ e $Y_{X/S}$) de 0,08-0,10 g/g e 0,22-0,24 g/g, respectivamente, nos cultivos

com suplemento MF; já quando a suplementação REF foi avaliada, o $Y_{\text{XOH/S}}$ variou de 0,03 a 0,04 g/g, e o $Y_{\text{X/S}}$, de 0,13 a 0,14 g/g.

Com base nos dados supramencionados, e considerando as maiores velocidades médias de consumo de substrato e formação de produto (Figura 17A), pode-se inferir que os melhores resultados obtidos nas fermentações utilizando suplemento REF estão relacionados às condições nutricionais mais favoráveis ao consumo de substrato e à formação de produto pela levedura nestes cultivos.

Conforme exposto, a forma de pré-cultivo da levedura *S. stipitis* DSM-3651 não influenciou a fermentação quando a concentração celular inicial foi de 0,07 g/L. Por outro lado, nesta condição de baixa concentração celular, a suplementação nutricional do meio de fermentação mostrou-se crucial para a atividade fermentativa da levedura. Embora apresente composição química bruta (teor de nitrogênio e de minerais) semelhante à do suplemento nutricional referência, o suplemento formulado a partir de melaço de cana-de-açúcar enriquecido com fosfato de amônio dibásico não foi capaz de fornecer condições adequadas para uma eficiente e rápida bioconversão de xilose em etanol.

5.4.2. Concentração celular inicial de 3,00 g/L

De acordo com as curvas de crescimento celular de *S. stipitis* DSM-3651 (Figura 18A), pode-se observar que a produção de biomassa foi mais lenta nos cultivos com suplemento MF: utilizando células provenientes do pré-cultivo em meio YMP, a concentração celular máxima ($5,07 \pm 0,28$ g/L) foi obtida em 24 horas de cultivo, o que equivale a um Q_X de $0,09 \pm 0,01$ g/L.h (Figura 19A); no caso da fermentação com células pré-cultivadas em meio EM, embora um valor semelhante de Q_X tenha sido obtido neste mesmo período (0,08 g/L.h), o crescimento celular se manteve gradual e constante até 48 horas de cultivo, atingindo uma concentração de 6,35 g/L. Em contrapartida, nos cultivos utilizando o suplemento REF, uma fase de maior crescimento celular se estendeu pelas primeiras 12 horas de fermentação, alcançando a concentração máxima (5,5 g/L) em 24 horas. Esta rápida adaptação ao meio de fermentação ocasionou uma maior velocidade média de crescimento celular, correspondendo a valores de Q_X superiores a 0,12 g/L.h.

O consumo de xilose foi influenciado tanto pela suplementação do meio de fermentação quanto pelas condições utilizadas durante o pré-cultivo (Figura 18B). Dentre as

fermentações utilizando a mesma suplementação nutricional, a xilose foi consumida mais rapidamente quando células pré-cultivadas em meio YMP foram utilizadas. Já dentre as fermentações utilizando a mesma forma de pré-cultivo, o consumo de xilose foi mais rápido quando o suplemento REF foi utilizado. Sendo assim, apenas no cultivo MF/EM a xilose foi completamente consumida em 48 horas; nos demais, o esgotamento da xilose ocorreu em 24-36 horas. Considerando os valores de Q_s medidos em 24 horas de fermentação (Figura 19A), os cultivos dispõem-se na seguinte ordem crescente de velocidade média de consumo de substrato: MF/EM (0,69 g/L.h) < REF/EM (0,96 g/L.h) < MF/YMP (1,06 g/L.h) < REF/YMP (1,09 g/L.h).

Figura 18 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A produção de etanol foi influenciada de forma semelhante à observada para o consumo de xilose, sofrendo efeito da suplementação (REF melhor que MF) e da forma de pré-cultivo das células (YMP melhor que EM) (Figura 18C). Exceto pelo cultivo MF/EM, no qual a concentração máxima de etanol (10,94 g/L) foi obtida após 48 horas, nos demais cultivos a concentração máxima (13-14 g/L) foi alcançada em apenas 24-36 horas de fermentação. Em termos de velocidade média de produção de etanol em 24 horas, os cultivos se dispõem, em ordem crescente para Q_P , da seguinte forma: MF/EM (0,23 g/L.h) < REF/EM (0,39 g/L.h) < MF/YMP (0,46 g/L.h) < REF/YMP (0,50 g/L.h) (Figura 19A).

Figura 19 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 horas de fermentação para os cultivos utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou à base de melaço e fosfato de amônio (MF) e células provenientes de cultivo em meio ágar extrato de malte (EM) ou em meio composto por extrato de levedura, extrato de malte, peptona e xilose (YMP), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

O xilitol foi o principal subproduto da bioconversão de xilose a etanol por *S. stipitis* DSM-3651 (Figura 18D). Ele foi produzido em maiores quantidades nas fermentações utilizando células provenientes do pré-cultivo em meio EM; concentrações máximas de 1,67 e 2,03 g/L nas fermentações utilizando suplemento REF e MF, respectivamente. Quando células pré-cultivadas em meio YMP foram utilizadas, a concentração máxima de xilitol permaneceu em torno de 1,20 g/L.

O glicerol foi produzido em todos os cultivos; porém, em quantidades relativamente menores, de cerca de 0,20 g/L (dados não apresentados).

A avaliação das alterações no metabolismo da levedura *S. stipitis* DSM-3651, promovidas pelas diferentes condições de pré-cultivo e composições dos meios avaliados, foi realizada de forma semelhante àquela descrita no item 5.4.1. (Figura 19B).

De acordo com as Figuras 18C e 19B, os cultivos nos quais os maiores valores de $Y_{P/S}$ foram obtidos correspondem exatamente com os cultivos onde as maiores concentrações de etanol foram produzidas. Após 24 horas de fermentação, os seguintes valores de concentração de etanol e $Y_{P/S}$ foram determinados: 5,43 g/L e 0,33 g/g (MF/EM), 9,45 g/L e 0,41 g/g (REF/EM), 10,99 g/L e 0,43 g/g (MF/YMP), e 11,93 g/L e 0,46 g/g (REF/YMP).

Analisando comparativamente os cultivos nos quais o etanol foi produzido com o menor (MF/EM) e o maior (REF/YMP) fator de conversão, pode-se observar que o direcionamento do substrato para a fermentação alcoólica ocorreu em detrimento da utilização de substrato para a formação de xilitol e para a respiração celular. O $Y_{XOH/S}$ no cultivo MF/EM foi de 0,08 g/g; no cultivo REF/YMP, de 0,05 g/g. Por outro lado, o “balanço de massa” para o cultivo REF/YMP, determinado a partir dos fatores de conversão considerados, foi maior que o esperado (1,08 g/g), sugerindo a utilização de substratos não quantificados (provenientes do suplemento nutricional ou do próprio inóculo).

Conforme exposto, tanto a forma de pré-cultivo quanto a composição do suplemento nutricional exerceram efeito na fermentação quando a concentração inicial de células foi 3,00 g/L. No entanto, diferenças mais substanciais nos parâmetros de fermentação só puderam ser observadas quando, tanto o pré-cultivo quanto a fermentação, foram realizados em meios mais simples. Ou seja, nas condições de cultivo em que um meio nutricionalmente mais completo foi utilizado em pelo menos uma das etapas, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 mostrou produções semelhantes de etanol.

5.4.3. Análise comparativa

Os efeitos exercidos pela suplementação nutricional e pela forma de pré-cultivo sobre a atividade metabólica e fermentativa de *S. stipitis* DSM-3651 variaram com a concentração celular inicial. Baseado na discussão apresentada no item 5.3, duas hipóteses podem justificar o comportamento observado nas fermentações iniciadas com concentração celular de 0,07 g/L (influência da suplementação nutricional; apenas): (i) a levedura *S. stipitis* DSM-3651 requer fontes complexas de nitrogênio e outros nutrientes para produzir etanol a partir de xilose, e/ou (ii) um ou mais componentes do melaço de cana-de-açúcar apresentaram atividade inibitória no desenvolvimento da levedura e na fermentação alcoólica.

Em contrapartida, quando a maior concentração celular foi utilizada, a suplementação nutricional apresentou efeito dependente da forma de pré-cultivo; quando o preparo de inóculo ou a fermentação foram conduzidos em meio à base de extrato de levedura, extrato de malte e peptona, as limitações na produção de etanol foram amenizadas. Ademais, o aumento da concentração celular foi responsável por um maior direcionamento do substrato para a formação de etanol, em detrimento à formação de biomassa. Isto pode ser explicado, em parte, pela interpretação de Slininger et al. (2014) do modelo cinético proposto por Luedeking e Piret (1959), a qual estabelece que a fermentação alcoólica rende energia para dar suporte tanto ao crescimento celular como à manutenção de células que não estão crescendo. Considerando então que, mesmo células que não estão crescendo produzem etanol, a limitação do crescimento significa reduzir a quantidade de carbono destinada à biossíntese ($Y_{X/S}$), sem alterar, necessariamente, a produção de etanol. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que a limitação do crescimento celular foi alcançada pelo aumento da concentração inicial de células; deste modo, diminuiu-se o crescimento celular e aumentou-se a produção de etanol (aumento do $Y_{P/S}$ atrelado à diminuição do $Y_{X/S}$). Ou seja, a formação de produto foi desassociada ao crescimento.

5.5. Efeito das concentrações de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol

Considerando que a substituição total do suplemento referência pelo suplemento composto por melaço de cana-de-açúcar enriquecido com fosfato de amônio dibásico não

contemplou completamente as exigências nutricionais da levedura *S. stipitis* DSM-3651 para a bioconversão otimizada de xilose em etanol, a elaboração de um suplemento alternativo, visando substituir parcialmente os componentes do suplemento referência por melaço de cana e fosfato de amônio, foi realizada com o auxílio de planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} . Dois planejamentos iguais foram conduzidos com diferentes concentrações celulares iniciais, 0,07 e 3,00 g/L, visando analisar as diferenças nos requerimentos nutricionais.

5.5.1. Concentração celular inicial de 0,07 g/L

Os parâmetros fermentativos obtidos nos experimentos do planejamento estão dispostos na Figura 20. Estes parâmetros foram calculados após 48 horas de cultivo, já que este foi o tempo no qual o etanol atingiu sua concentração máxima (de 9,78 a 13,02 g/L) em 16 dos 20 ensaios realizados. Neste período, o consumo de substrato (xilose do meio sintético + glicose e frutose do melaço de cana) variou de 84,07 a 100,00%, não sendo completo em apenas 6 dos 20 experimentos realizados (nos quais o substrato foi esgotado em 72 h). Em todos os experimentos, a concentração máxima de células foi atingida em 36-48 h, variando de 3,68 a 5,20 g/L.

De modo geral, os parâmetros obtidos nos vinte ensaios de fermentação apresentaram baixa variabilidade entre si e ficaram próximos daqueles obtidos nas fermentações utilizando a suplementação REF (item 5.4.1), resultado que indica que existe a possibilidade de se realizar a substituição parcial dos nutrientes microbiológicos convencionais (extrato de levedura, extrato de malte e peptona) por melaço de cana e fosfato de amônio.

Com base na análise estatística dos resultados, os efeitos exercidos por cada nutriente nos parâmetros fermentativos obtidos foram determinados, compilados na Tabela 14 e descritos nos diagramas de Pareto mostrados na Figura 21. Os valores absolutos de t_{Calc} , também denominados “Efeitos padronizados”, estão representados pelas barras horizontais, já a linha pontilhada vertical representa o valor de t_{Tab} (1,76, referente ao erro padrão com 14 graus de liberdade), que fornece o valor a partir do qual os efeitos são considerados significativos ao nível de confiança de 90%.

Figura 20 - Parâmetros fermentativos determinados após 48 h de fermentação para os experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação dos efeitos das concentrações das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

As duas principais fontes de nitrogênio orgânico avaliadas, extrato de levedura e peptona, foram os nutrientes que exerceram efeito positivo significativo sobre a taxa de consumo de substrato (Q_s), 0,0361 e 0,0324, respectivamente; o extrato de malte exerceu efeito negativo (-0,0273).

Tabela 14 - Estimativa dos efeitos das fontes de nutrientes avaliadas nos parâmetros fermentativos obtidos por *S. stipitis* DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L

Variável dependente	Fator	Efeito	Erro padrão	t (14)	p-valor
$Y_{X/S}$	Média*	0,1496	0,0027	54,49	<0,0001
	Extrato de levedura	-0,0006	0,0061	-0,09	0,9271
	Extrato de malte	0,0101	0,0061	1,64	0,1234
	Peptona	-0,0003	0,0061	-0,05	0,9579
	Melaço de cana*	0,0122	0,0061	1,99	0,0665
	Fosfato de amônio	0,0081	0,0061	1,32	0,2084
$Y_{P/S}$	Média*	0,3870	0,0024	159,69	<0,0001
	Extrato de levedura	0,0058	0,0054	1,06	0,3055
	Extrato de malte*	0,0127	0,0054	2,34	0,0345
	Peptona*	0,0214	0,0054	3,96	0,0014
	Melaço de cana	0,0001	0,0054	0,02	0,9838
	Fosfato de amônio*	-0,0193	0,0054	-3,56	0,0031
Q_P	Média*	0,2431	0,0028	88,30	<0,0001
	Extrato de levedura*	0,0172	0,0062	2,80	0,0141
	Extrato de malte	-0,0027	0,0062	-0,43	0,6717
	Peptona*	0,0260	0,0062	4,22	0,0008
	Melaço de cana	0,0052	0,0062	0,84	0,4151
	Fosfato de amônio	-0,0056	0,0062	-0,90	0,3823
Q_S	Média*	0,6280	0,0066	94,69	<0,0001
	Extrato de levedura*	0,0361	0,0148	2,43	0,0290
	Extrato de malte*	-0,0273	0,0148	-1,84	0,0869
	Peptona*	0,0324	0,0148	2,18	0,0465
	Melaço de cana	0,0126	0,0148	0,85	0,4082
	Fosfato de amônio	0,0179	0,0148	1,21	0,2463
Q_X	Média*	0,0938	0,0013	72,67	<0,0001
	Extrato de levedura*	0,0053	0,0029	1,85	0,0852
	Extrato de malte	0,0022	0,0029	0,75	0,4667
	Peptona	0,0047	0,0029	1,64	0,1225
	Melaço de cana*	0,0094	0,0029	3,27	0,0056
	Fosfato de amônio*	0,0076	0,0029	2,64	0,0195

*Significativo ao nível de confiança de 90%.

O melaço foi o único nutriente que apresentou efeito significativo e positivo no $Y_{X/S}$ (0,0122). Além de contribuir para a conversão de substrato em células ele também apresentou o maior efeito na velocidade de produção de biomassa. Além do melaço (0,0094), o fosfato de amônio (0,0076) e o extrato de levedura (0,0053) apresentaram efeitos significantes e positivos sobre o Q_X . Estes efeitos observados podem ser associados tanto ao

fornecimento de fatores de crescimento provido pelo melaço de cana e extrato de levedura, quanto pela disponibilização de nitrogênio de inorgânico (fosfato de amônio), o qual é mais facilmente disponibilizado para as vias de biossíntese.

Figura 21 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B), Q_P (C), Q_S (D) e Q_X (E) obtidos por *S. stipitis* DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

Em relação à produção de etanol, a peptona foi o nutriente que apresentou maior efeito positivo; 0,0214 e 0,0260 para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente. Mais adiante, considerando que o extrato de levedura também foi benéfico (0,0172) para o aumento da produtividade, e o fosfato de amônio apresentou efeito negativo (-0,0193) ao fator de conversão, sugere-se que a suplementação do meio utilizando fontes de nitrogênio orgânico, ao invés de inorgânico, apresenta vantagens para a produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651. Além

disso, uma relação direta pôde ser estabelecida entre a produtividade volumétrica de etanol e velocidade de consumo de substrato, uma vez que os mesmos nutrientes (peptona e extrato de levedura) exerceram efeito positivo para ambos. Com relativa menor influência (0,0127), o extrato de malte contribuiu significativamente para o aumento de $Y_{P/S}$, efeito que pode ser relacionado à presença de açúcares fermentescíveis em sua composição.

Considerando que o objetivo principal do presente estudo foi maximizar a produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a definição do suplemento ideal, para uma concentração celular inicial de 0,07 g/L, foi baseada nos efeitos dos nutrientes sobre a produtividade e o fator de conversão de substrato a etanol. Sendo assim, este suplemento seria composto por extrato de levedura (efeito positivo sobre o Q_P), extrato de malte (efeito positivo sobre o $Y_{P/S}$) e peptona (efeitos positivos sobre o $Y_{P/S}$ e o Q_P) nas concentrações máximas avaliadas, e fosfato de amônio (efeito negativo no $Y_{P/S}$) e melaço (não exerceu efeito significativo para ambos) nas concentrações mínimas. Alternativamente, a expansão dos níveis determinados no presente planejamento, para concentrações superiores e inferiores, respectivamente, poderia ser avaliada.

A Figura 22 compila as curvas de produção de etanol e xilitol determinadas nos experimentos realizados utilizando extrato de levedura, extrato de malte, peptona e fosfato de amônio nos níveis que maximizam (+1, +1, +1 e -1, respectivamente – Experimento 16) e minimizam (-1, -1, -1 e +1, respectivamente – Experimento 9) o fator de conversão de substrato a etanol, permitindo a visualização dos efeitos destes nutrientes na produção de etanol, conforme avaliado pela análise estatística. Além de mais rápida, a produção de etanol após 48 horas de fermentação também se deu em maior quantidade no experimento 16 (12,67 g/L) do que no experimento 9 (10,29 g/L) (Figura 22A); equivalendo a valores de Q_P de 0,26 g/L.h e 0,21 g/L.h, respectivamente (Figura 20A). O xilitol foi produzido em maior quantidade (1,56 g/L) no experimento 9 em comparação ao experimento 16 (0,93 g/L) (Figura 22B).

De acordo com a Figura 20B, na qual uma visão aproximada do fluxo de substrato nas células é obtida a partir dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), etanol ($Y_{P/S}$), xilitol ($Y_{XOH/S}$) e dióxido de carbono ($Y_{CO_2/S}$), pode-se dizer que a maior produção de etanol no experimento 16 está relacionada ao fato de que, neste cultivo, o fluxo de substrato direcionado para a produção de etanol ($Y_{P/S} = 0,41$ g/g) foi maior do que no experimento 9 ($Y_{P/S} = 0,35$ g/g). Este direcionamento para a produção de etanol ocorreu em detrimento da produção de xilitol ($Y_{XOH/S} = 0,05$ g/g no experimento 9; $Y_{XOH/S} = 0,03$ g/g no experimento

16) e da suposta utilização de substrato na respiração celular (o experimento 9 apresentou menor somatório de fatores de conversão, o qual explica a utilização de 91% do substrato).

Figura 22 - Curvas de produção de etanol (A) e xilitol (B), obtidas nos experimentos 9 e 16 do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação do efeito das concentrações das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 0,07 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.5.2. Concentração celular inicial de 3,00 g/L

A Figura 23 compila os parâmetros fermentativos obtidos nos experimentos do planejamento. Estes parâmetros foram calculados após 24 horas de cultivo, período no qual as concentrações máximas de etanol (de 10,58 a 15,12 g/L), e de células (de 4,84 a 6,32 g/L), foram obtidas, com exceção do experimento 1, no qual ambas as concentrações máximas foram atingidas em 48 h. O consumo de substrato (xilose do meio sintético + glicose e frutose do melaço de cana) variou de 84,23 a 100,00% nas primeiras 24 horas, não sendo completo em 2 dos 20 experimentos realizados, em que o substrato foi esgotado em 48 h.

De modo geral, os ensaios de fermentação contendo o melaço no nível +1 alcançaram parâmetros referentes à produção de etanol, $Y_{P/S}$ e Q_P , com valores mais elevados. Além disso, estes parâmetros obtidos nos experimentos do planejamento foram ligeiramente maiores do que aqueles obtidos quando o meio de fermentação foi composto por suplemento

REF ou MF (item 5.4.2), resultado que indica que a substituição parcial dos nutrientes do suplemento REF, por melaço de cana, pode acarretar em ganhos na produção de etanol.

Figura 23 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 h de cultivo para os experimentos do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} utilizado para a avaliação dos efeitos das fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

Os efeitos exercidos por cada nutriente sobre os parâmetros fermentativos $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, Q_P , Q_S e Q_X foram determinados com base na análise estatística dos resultados, de forma semelhante à realizada para os dados obtidos com uma concentração celular inicial de 0,07

g/L. Eles foram compilados na Tabela 15 e descritos nos diagramas de Pareto mostrados na Figura 24. Os valores absolutos de t_{Calc} , também denominados “Efeitos padronizados”, estão representados pelas barras horizontais, já a linha pontilhada vertical representa o valor de t_{Tab} (1,76, referente ao erro padrão com 14 graus de liberdade), que fornece o valor a partir do qual os efeitos são considerados significativos ao nível de confiança de 90%.

Tabela 15 - Estimativa dos efeitos das fontes de nutrientes avaliadas nos parâmetros fermentativos obtidos por *S. stipitis* DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L

Variável dependente	Fator	Efeito	Erro padrão	t (14)	p-valor
$Y_{X/S}$	Média*	0,0904	0,0021	43,24	<0,0001
	Extrato de levedura*	0,0090	0,0047	1,93	0,0744
	Extrato de malte	0,0067	0,0047	1,44	0,1715
	Peptona*	0,0108	0,0047	2,32	0,0361
	Melaço de cana	-0,0034	0,0047	-0,72	0,4838
	Fosfato de amônio	-0,0053	0,0047	-1,13	0,2792
$Y_{P/S}$	Média*	0,4443	0,0032	138,24	<0,0001
	Extrato de levedura	0,0075	0,0072	1,05	0,3120
	Extrato de malte	0,0017	0,0072	0,23	0,8204
	Peptona	0,0078	0,0072	1,08	0,2983
	Melaço de cana*	0,0413	0,0072	5,75	0,0001
	Fosfato de amônio	0,0046	0,0072	0,64	0,5314
Q_P	Média*	0,5723	0,0056	101,92	<0,0001
	Extrato de levedura	0,0135	0,0126	1,07	0,3018
	Extrato de malte	0,0117	0,0126	0,93	0,3657
	Peptona	0,0217	0,0126	1,73	0,1057
	Melaço de cana*	0,0787	0,0126	6,27	<0,0001
	Fosfato de amônio	0,0138	0,0126	1,10	0,2915
Q_S	Média*	1,2876	0,0145	88,59	<0,0001
	Extrato de levedura	0,0110	0,0325	0,34	0,7412
	Extrato de malte	0,0234	0,0325	0,72	0,4834
	Peptona	0,0272	0,0325	0,84	0,4167
	Melaço de cana	0,0588	0,0325	1,81	0,0919
	Fosfato de amônio	0,0210	0,0325	0,64	0,5296
Q_X	Média*	0,1165	0,0030	38,37	<0,0001
	Extrato de levedura*	0,0122	0,0068	1,80	0,0930
	Extrato de malte	0,0106	0,0068	1,56	0,1411
	Peptona*	0,0163	0,0068	2,40	0,0309
	Melaço de cana	0,0006	0,0068	0,09	0,9294
	Fosfato de amônio	-0,0051	0,0068	-0,75	0,4681

*Significativo ao nível de confiança de 90%.

Peptona e extrato de levedura apresentaram efeitos significantes e positivos para os parâmetros fermentativos referentes ao crescimento celular. Para o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) os efeitos foram de 0,0108 e 0,0090; para a produtividade volumétrica de biomassa (Q_X), estes valores foram de 0,0163 e 0,0122, respectivamente.

Em contrapartida, a produção de etanol foi influenciada apenas pela concentração de melaço no meio de cultivo, único nutriente que apresentou efeito significativo e positivo tanto sobre o $Y_{P/S}$ (0,0413) quanto sobre o Q_P (0,0787). Em relação ao consumo de substrato todos os nutrientes apresentaram pouco efeito no Q_S , sendo o efeito do melaço o único estatisticamente significativo (0,0588).

Figura 24 - Diagramas de Pareto dos efeitos padronizados dos fatores sobre os parâmetros fermentativos $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B), Q_P (C), Q_S (D) e Q_X (E) obtidos por *S. stipitis* DSM-3651 a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 25 compila as curvas de produção de etanol e xilitol dos experimentos realizados utilizando o melaço nos níveis -1 (do 1 ao 8) e +1 (do 9 ao 16), permitindo a visualização do seu efeito positivo na produção de etanol, conforme evidenciado pela análise estatística. De forma geral, pode ser observado que as fermentações contendo maior concentração de melaço produziram maiores quantidades de etanol (Figura 25A) e menores quantidades de xilitol (Figura 25B). Em relação ao etanol, a utilização do melaço no nível +1 correspondeu a um aumento em concentração de 10,58-13,60 g/L para 14,23-15,12 g/L (primeiras 24 horas de fermentação); equivalendo à um aumento em Q_P de 0,44-0,57 g/L.h para 0,59-0,63 g/L.h (Figura 23A). Nestas condições, as concentrações de xilitol foram de 0,71-1,05 para 0,15-1,15 g/L.

Figura 25 - Curvas de produção de etanol (A) e xilitol (B) obtidas nos experimentos contendo melaço nos níveis -1 e +1 do planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} para a avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Figura 23B, uma visão aproximada do fluxo de substrato nas células é obtida a partir dos fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), etanol ($Y_{P/S}$), xilitol ($Y_{XOH/S}$) e dióxido de carbono ($Y_{CO_2/S}$). Pode-se dizer que este efeito positivo do melaço na produção de etanol está relacionado ao direcionamento do substrato; nos experimentos contendo melaço no nível +1, o fluxo de substrato para a produção de etanol ($Y_{P/S} = 0,45$ - $0,49$ g/g) foi maior do que nos experimentos contendo melaço no nível -1 ($Y_{P/S} = 0,40$ - $0,45$ g/g). Este direcionamento para a formação de etanol ocorreu em detrimento da produção de xilitol ($Y_{XOH/S} = 0,02$ - $0,04$ g/g, melaço no nível -1; $Y_{XOH/S} = 0,00$ - $0,03$ g/g, melaço no nível

+1) e da suposta utilização de substrato na respiração celular. Os experimentos contendo melaço no nível -1 apresentaram menores somatórios de fatores de conversão, explicando a utilização de 89-98% do substrato. Por outro lado, os “balanços de massa” para os experimentos contendo melaço no nível +1 tenderam a ser maiores que o valor esperado (1,00 g/g), sugerindo a utilização de substratos não quantificados (provenientes do suplemento nutricional ou do próprio inóculo).

Com base na análise estatística proposta, o melaço foi o único nutriente que apresentou efeito significativo, e positivo, sobre ambos os parâmetros relacionados à produção de etanol, $Y_{P/S}$ e Q_P . Sendo assim, visando a maximização desta produção o melaço deve ser mantido na concentração máxima avaliada, ou então ser testado em concentrações mais elevadas. Em contrapartida, os demais nutrientes, extrato de levedura, extrato de malte, peptona e fosfato de amônio, podem ser mantidos nas menores concentrações avaliadas, ou então testados em concentrações inferiores, uma vez que não apresentaram efeito significativo sobre ambos os parâmetros da conversão, nos cultivos de *S. stipitis* DSM-3651 com concentração celular inicial de 3,00 g/L.

5.5.2.1. Avaliação do suplemento nutricional alternativo proposto

Visando confirmar a análise realizada no item 5.5.2, a qual indicou que, em relação à produção de etanol, todos os nutrientes presentes no suplemento referência (REF) podem ser reduzidos à menor concentração avaliada, uma vez que o melaço de cana seja adicionado no nível mais elevado (6,77 g/L), um experimento adicional foi realizado. Neste experimento o desempenho fermentativo da levedura *S. stipitis* DSM-3651 (proveniente de meio YMP) cultivada em meio com este suplemento nutricional alternativo, denominado ALT, foi avaliado comparativamente com àquele obtido a partir do suplemento REF. A Tabela 16 apresenta a compilação dos parâmetros fermentativos determinados após 24 horas de cultivo.

Como pode ser observado na Figura 26, as curvas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol e xilitol, apresentaram pequenas variações entre os cultivos; aparentemente, a partir do suplemento ALT, a levedura *S. stipitis* DSM-3651 apresentou eficiência sutilmente maior para realizar a conversão de xilose em etanol. Nas primeiras 24 horas de fermentação o consumo de xilose foi levemente superior no cultivo utilizando o suplemento ALT (98,3 contra 90,8%) o que refletiu na formação de produto;

neste período as concentrações de etanol foram de $13,58 \pm 0,37$ e $11,93 \pm 0,18$ g/L a partir de ALT e REF, respectivamente. Entretanto, em 36 horas, estas concentrações se equipararam. Já em relação ao crescimento celular e produção de xilitol, nenhuma diferença significativa foi observada.

Tabela 16 - Parâmetros determinados em 24 horas nos cultivos de *S. stipitis* DSM-3651 em meio com suplemento nutricional referência (REF) ou alternativo (ALT) a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L

Parâmetros	REF/YMP	ALT/YMP
S_0 (g/L)	28,77 (0,70)	29,90 (0,54)
S% (%)	90,8	98,3
X_{24h} (g/L)	6,19 (0,43)	6,10 (0,33)
X_{24h}/X_0 (x)	2,19	2,14
P_f (g/L)	13,35 (0,10)	13,58 (0,37)
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13 (0,02)	0,11 (0,01)
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,46 (0,01)	0,46 (<0,01)
Q_s (g/L.h)	1,09 (0,03)	1,24 (0,03)
Q_x (g/L.h)	0,14 (0,02)	0,14 (0,01)
Q_p (g/L.h)	0,50 (0,01)	0,57 (0,02)

S_0 – concentração inicial de substrato; S% - percentual de substrato consumido; X_{24h} – concentração de células em 24 h; X_{24h}/X_0 – razão entre as concentrações de células em 24 h e inicial; P_f – concentração final de etanol.

Considerando esta similaridade dos dados obtidos em ambos os cultivos, fica evidenciado que, para uma concentração celular inicial de 3,00 g/L, o suplemento alternativo, composto principalmente por melaço e cana, foi capaz de suprir a demanda de *S. stipitis* DSM-3651 por nutrientes de forma semelhante ao suplemento referência, cuja composição apresenta maiores quantidades de nutrientes complexos de custo elevado (extratos de malte e levedura, e peptona).

A possibilidade de utilizar melaço de cana-de-açúcar como suplemento nutricional para a fermentação de xilose por *S. stipitis* DSM-3651, em alternativa aos nutrientes microbiológicos convencionais, contempla uma das principais carências do processo de produção industrial; a formulação de meios de baixo custo. De acordo com a revisão realizada por Hahn-Hägerdal et al. (2005), a produção em larga escala de produtos de baixo valor agregado, como, por exemplo, combustíveis, é dependente da utilização de fontes baratas de carbono e nitrogênio (melaço de cana e milhocina, entre outros). Conforme revisado, a composição do meio de cultivo tem um impacto muito forte na economia dos processos industriais, podendo perfazer até 30% do custo total da produção. Além dos

benefícios relacionados à economia do processo, de forma geral, os microrganismos apresentam maior crescimento em meios complexos do que em meios definidos, uma vez que certos precursores encontrados nesses meios podem ser canalizados diretamente para as vias metabólicas, representando uma economia de energia para o microrganismo com efeito significativo nos perfis de crescimento e formação de produto. Dentre as fontes de nitrogênio alternativas, a levedura gerada como subproduto em bioprocessos, após processamento, e a milhocina proveniente do processamento do milho por via úmida, podem ser citadas.

Figura 26 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações utilizando suplemento nutricional referência (REF) ou alternativo (ALT) a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Amartey e Jeffries (1994), por exemplo, avaliaram a fermentação de xilose (80 g/L) por *S. stipitis* CBS 6054 em cinco meios diferentes: A, contendo YNB (base de nitrogênio para leveduras), casaminoácidos e ureia; B, contendo extrato de malte, extrato de levedura e

sulfato de amônio; C, contendo peptona, extrato de levedura, fosfato de potássio, sulfato de magnésio e sulfato de amônio; D, contendo apenas milhocina; E, contendo milhocina, sulfato de magnésio e fosfato de potássio. Foi observado que as taxas de crescimento e consumo de xilose foram maiores nos meios contendo milhocina, as quais não variaram com a adição de sulfato de magnésio e fosfato de potássio. Em relação à produção de etanol, o cultivo em meio contendo apenas milhocina (D) alcançou os maiores valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , 0,42 g/g e 0,93 g/L.h, respectivamente. Estes melhores resultados formam atribuídos aos efeitos dos nutrientes encontrados na milhocina; nitrogênio, vitaminas, aminoácidos e minerais.

5.5.3. Análise comparativa

O aumento da concentração celular inicial acarretou na alteração dos requerimentos nutricionais da levedura *S. stipitis* DSM-3651, conforme evidenciado pelos diferentes efeitos que os nutrientes avaliados exerceram sobre o crescimento celular e a produção de etanol em cada um dos planejamentos fatoriais realizados.

Em relação ao crescimento celular, para a menor carga de inóculo (0,07 g/L) o melaço foi o único nutriente que exerceu influência positiva tanto para o fator de conversão quanto para produtividade volumétrica de biomassa. Em contrapartida, peptona e extrato de levedura foram os componentes que beneficiaram de forma significativa o crescimento de *S. stipitis* DSM-3651 quando esta iniciou as fermentações a uma concentração de 3,00 g/L. Estes resultados sugerem que as fontes complexas de nitrogênio (peptona e extrato de levedura), mesmo nas menores concentrações avaliadas, supriram a demanda por este nutriente quando a menor carga de inóculo foi utilizada, de modo que seus efeitos para o crescimento celular não puderam ser determinados. Seguindo a hipótese sugerida, o aumento da concentração celular inicial para 3,00 g/L promoveu um incremento da demanda por estas fontes de nitrogênio, o que acarretou na determinação de efeitos significativos sobre os parâmetros fermentativos relacionados ao crescimento.

Quanto à produção de etanol, o efeito dos nutrientes foi o inverso daquele observado para o crescimento celular. Enquanto que, para uma concentração celular inicial de 0,07 g/L, a peptona foi o principal nutriente a exercer contribuição significativa, para as fermentações iniciadas com 3,00 g/L de células, o melaço foi o componente a exercer este papel. Sendo assim, pode-se constatar que as moléculas orgânicas e/ou os íons metálicos que compõe o

melaço exerceram efeito positivo sobre o metabolismo fermentativo de *S. stipitis* DSM-3651, o qual não foi observado para os cultivos com carga de inóculo inicial de 0,07 g/L, provavelmente, pela faixa de concentração avaliada estar acima da demanda.

Além de alterar os requerimentos nutricionais da levedura, o aumento da concentração celular inicial, de 0,07 para 3,00 g/L, também influenciou quantitativamente a bioconversão de xilose em etanol. Por meio da análise comparativa dos parâmetros fermentativos obtidos nos planejamentos fatoriais fracionados 2^{5-1} (Figuras 27 e 28), este efeito pode ser avaliado em termos quantitativos.

Em uma primeira análise, observa-se que, em termos gerais, o aumento da concentração celular inicial reduziu o tempo de fermentação, de 48 para 24 h. Ou seja, a concentração máxima de etanol e o consumo completo do substrato foram alcançados na metade do tempo. Consequentemente, a velocidade média de produção de etanol (Q_P) aumentou de $0,24 \pm 0,02$ para $0,57 \pm 0,04$ g/L.h; a velocidade média de consumo de substrato (Q_S), de $0,63 \pm 0,04$ para $1,29 \pm 0,07$ g/L.h (Figura 27A e B). Em contrapartida, a velocidade média de crescimento celular (Q_X) não foi alterada na mesma extensão, apesar da concentração celular máxima também ter sido obtida 24 h mais cedo nos cultivos com concentração celular inicial de 3,00 g/L (Figura 27C).

A melhoria dos parâmetros fermentativos calculados com base no tempo de fermentação é um comportamento esperado quando a concentração celular inicial é aumentada. Isto porque, quanto maior o número de agentes de fermentação, menor será o tempo necessário para que o substrato seja convertido em produto (FERREIRA et al., 2011). Já o aumento sutil do Q_X médio, de $0,09 \pm 0,01$ para $0,12 \pm 0,02$ g/L.h, promovido pelo aumento da concentração celular inicial, pode ser explicado pelas diferenças na produção de biomassa e no tempo de fermentação, ou seja, a concentração de células aumentou muito nos cultivos com concentração celular inicial de 0,07 g/L, mas o tempo de cultivo foi reduzido pela metade quando a concentração celular inicial foi aumentada para 3,00 g/L.

O efeito positivo do aumento da concentração celular inicial sobre a bioconversão de xilose em etanol também se refletiu nos fatores de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), células ($Y_{X/S}$) e xilitol ($Y_{XOH/S}$). Os dados mostram que o fluxo de substrato para a produção de etanol foi maior nos cultivos utilizando maior concentração celular inicial; o $Y_{P/S}$ médio nestes cultivos foi de $0,44 \pm 0,02$ g/g, enquanto que, para os cultivos iniciados com apenas 0,07 g/L de células, este valor foi de $0,39 \pm 0,02$ g/g (Figura 28B). Em presença de baixa concentração celular inicial, a utilização de substrato para a produção de biomassa e xilitol foi maior; os valores médios de $Y_{X/S}$ e $Y_{XOH/S}$ obtidos para 0,07 g/L de células foram de 0,15

$\pm 0,01$ e $0,05 \pm 0,01$ g/g, respectivamente. Já nos cultivos iniciados com 3,00 g/L de células, valores de $Y_{X/S}$ de $0,09 \pm 0,01$ g/g, e de $Y_{XOH/S}$ de $0,02 \pm 0,01$ g/g, foram obtidos. Ou seja, além de aumentar a produtividade, o aumento da concentração celular inicial aumentou a especificidade da produção de etanol.

Figura 27 - Valores de Q_P (A), Q_S (B) e Q_X (C) obtidos nos experimentos dos planejamentos fatoriais 2^{5-1} para avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, utilizando concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 28 - Valores de $Y_{X/S}$ (A), $Y_{P/S}$ (B) e $Y_{XOH/S}$ (C) obtidos nos experimentos dos planejamentos fatoriais 2^{5-1} para avaliação do efeito de fontes de nutrientes na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651, utilizando concentrações celulares iniciais de 0,07 ou 3,00 g/L.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.6. Efeito da aeração na bioconversão de xilose em etanol

É preciso enfatizar que, até esta parte do estudo, os experimentos foram realizados utilizando frascos de 125 mL com 50 mL de meio ($v_f/v_m = 2,5$). A partir deste ponto, no entanto, foi realizada a substituição dos frascos de 125 mL por frascos de 250 mL; visando o aumento do volume de meio, o que permitiu que um número igual de amostragens fosse realizado nos ensaios com maior e menor valor de v_f/v_m .

De acordo com a Figura 29, pode-se observar que, tanto a forma de fechamento dos frascos quanto a razão entre o volume de frasco e o volume de meio (v_f/v_m), influenciaram a bioconversão de xilose por *S. stipitis* DSM-3651.

Figura 29 - Curvas de crescimento celular (A), consumo de substrato (B) e produção de etanol (C) e xilitol (D), obtidas nas fermentações com (Troca +) ou sem (Troca -) troca de gases e utilizando diferentes razões entre volume de frasco e volume de meio ($v_f/v_m = 5, 2,5$ ou 2), a uma concentração celular inicial de 3,00 g/L. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A restrição de trocas gasosas e a diminuição da área superficial disponível para que estas ocorram exerceram efeito negativo no crescimento celular (Figura 29A). A concentração celular máxima ($7,39 \pm 0,58$ g/L) foi obtida na fermentação realizada sob a condição de maior aeração: frascos não selados e razão v_f/v_m de 5. Em contrapartida, a menor concentração celular foi obtida quando condições opostas foram empregadas (frascos selados e razão v_f/v_m de 2), $5,59 \pm 0,05$ g/L.h. Em termos de velocidade média de crescimento após 24 horas de cultivo, valores de produtividade volumétrica de biomassa (Q_x) de $0,16 \pm 0,02$ e $0,11 \pm 0,00$ g/L.h foram alcançados nos cultivos com maior e menor nível de aeração, respectivamente (Figura 30A). De modo geral, houve uma tendência de aumento do crescimento celular em função da maximização da aeração, seja via aumento da razão v_f/v_m (aumento da área superficial) ou pela otimização de trocas gasosas (utilização de camada de algodão envolvido por gaze, sem selagem com filme de PVC).

Em relação ao consumo de xilose, velocidades médias relativamente maiores foram obtidas nos cultivos realizados sem restrição de trocas gasosas, independentemente da razão v_f/v_m ; nestes cultivos, a xilose foi completamente consumida em 24 horas (Figura 29B), correspondendo a valores de Q_s de $1,26 \pm 0,01$ a $1,27 \pm 0,04$ g/L.h (Figura 30A). Conforme mostra a Figura 29B, nos cultivos realizados em frascos selados, a variação da razão v_f/v_m exerceu um leve efeito no consumo de xilose (quanto maior a razão, maior a velocidade de consumo - valores de Q_s iguais a $1,12 \pm 0,03$, $1,19 \pm 0,02$ e $1,24 \pm 0,01$ g/L.h, respectivamente); ademais, no cultivo com maior área superficial ($v_f/v_m = 5$), a xilose foi completamente consumida em 24 horas, enquanto concentrações de $1,04 \pm 0,49$ g/L.h e $2,44 \pm 0,44$ g/L ainda permaneciam inutilizadas nos cultivos com razões v_f/v_m de 2,5 e 2, respectivamente.

A produção de etanol apresentou maior sensibilidade às condições de cultivo, em comparação ao crescimento celular e ao consumo de substrato; quanto maior o nível de trocas gasosas, menor a quantidade de etanol produzido (Figura 29C). Em média, maiores concentrações máximas de etanol foram obtidas nos cultivos com restrição de trocas gasosas; em torno de 13 g/L após 24 horas, correspondendo a valores de produtividade volumétrica de etanol (Q_p) de $0,52 \pm 0,02$ a $0,55 \pm 0,01$ g/L.h (Figura 30A). Nestes cultivos, a variação da razão v_f/v_m não acarretou em mudanças significativas nestas concentrações. Já nos cultivos em que as trocas gasosas entre o interior dos frascos e o meio externo puderam ser estabelecidas, um efeito pronunciado da razão v_f/v_m foi observado na produção de etanol; enquanto concentrações de $12,19 \pm 0,37$ e $11,85 \pm 0,47$ g/L foram obtidas em 24 horas nas fermentações com razões v_f/v_m de 2 e 2,5, respectivamente, apenas $9,12 \pm 0,01$ g/L de etanol

foram produzidos na fermentação com maior área superficial disponível para troca de gases ($v_f/v_m = 5$). Esta redução na produção de etanol refletiu nos valores de Q_P , os quais caíram de $0,51 \pm 0,02$ ($v_f/v_m = 2$) e $0,49 \pm 0,02$ ($v_f/v_m = 2,5$) para $0,38 \pm 0,00$ g/L.h ($v_f/v_m = 5$).

O xilitol foi o principal subproduto formado nas fermentações, independentemente do nível de aeração avaliado. Conforme pode ser observado na Figura 29D, entretanto, a variabilidade dos dados impede que uma discussão precisa seja estabelecida. Já o glicerol foi produzido apenas nos cultivos em frascos selados; no entanto, em concentrações relativamente baixas, de cerca de 0,20 g/L.

A avaliação das alterações no metabolismo da levedura *S. stipitis* DSM-3651, promovidas pelas diferentes formas de fechamento dos frascos e razões entre o volume de frasco e o volume de meio (v_f/v_m), foi realizada de forma semelhante àquelas descritas previamente. A diminuição do nível de aeração promoveu o aumento do fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) (Figura 30B), o qual foi responsável por elevar a concentração de etanol produzido (Figura 29C). Tanto o impedimento de trocas gasosas entre o interior do frasco e o ambiente externo quanto a diminuição da razão v_f/v_m foram capazes de favorecer a fermentação alcoólica. Além do efeito individual, um efeito aditivo pôde ser observado, uma vez que o maior e o menor valores de $Y_{P/S}$ foram obtidos em condições opostas de aeração; $0,47 \pm 0,01$ g/g sob a condição de menor aeração (frascos selados e razão v_f/v_m de 2), e $0,30 \pm 0,00$ g/g sob a condição de maior aeração (frascos não selados e razão v_f/v_m de 5). Considerando que um comportamento oposto foi observado para o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) (Figura 30B), fica evidenciado que o direcionamento do substrato para a produção de etanol ocorreu em detrimento da síntese de biomassa. Adicionalmente, observa-se que a diferença entre os somatórios dos fatores de conversão, determinados para as fermentações conduzidas com ou sem restrição de trocas gasosas, pode ser atribuída a uma maior utilização de substrato para a respiração celular nas fermentações com maior nível de aeração.

De acordo com a Figura 30B, os fatores de conversão de substrato em xilitol ($Y_{XOH/S}$) permaneceram praticamente inalterados ao longo das diferentes condições de aeração, ou seja, mesmo nas condições de menor aeração, o oxigênio estava presente em concentrações suficientes para evitar o desequilíbrio redox. De acordo com Dellweg, Rizzi e Klein (1989), quando as condições de limitação de oxigênio, que maximizam a produção de etanol se aproximam de condições de anaerobiose, os valores de $Y_{P/S}$ sofrem uma redução provocada pelo direcionamento do substrato para a formação de xilitol.

Figura 30 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 horas de fermentação para os cultivos com (Troca +) ou sem (Troca -) troca de gases e utilizando diferentes razões entre volume de frasco e volume de meio ($v_f/v_m = 5, 2,5$ ou 2), a uma concentração celular inicial de $3,00 \text{ g/L}$. As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de duplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Boynton e McMillan (1994) avaliaram a influência de diferentes razões entre volume de frasco e volume de meio (1,11, 1,25, 1,43, 1,67, 2,00 e 2,50) na fermentação de meio a base de xilose (30 g/L) por *S. stipitis* NRRL Y-7124. Em termos de direcionamento do substrato, comportamento semelhante ao observado no presente estudo foi evidenciado; a redução da aeração (v_f/v_m) causou o aumento do $Y_{P/S}$ (de $0,41$ para $0,50 \text{ g/g}$) e a diminuição do $Y_{X/S}$ (de $0,10$ para $0,05 \text{ g/g}$); em contrapartida, a velocidade média de consumo de xilose (Q_s) foi reduzida substancialmente (de $1,1$ para $0,3 \text{ g/L.h}$), de modo que 19 g/L permaneceram inutilizados no meio após 46 horas de fermentação na condição menos areada, enquanto que na mais aerada a xilose foi esgotada em 30 horas. Desta forma, com quantidades menores de substrato convertidas, as condições de menor aeração levaram a

produções de etanol menores e mais lentas; a fermentação menos aerada alcançou uma concentração máxima de etanol de 6,2 g/L a um Q_P de 0,15 g/L.h, já a mais aerada, 12,2 g/L e 0,46 g/L.h, respectivamente.

No trabalho de Furlan, Bouilloud e Castro (1994), o efeito da aeração na fermentação de xilose (50 g/L) por *S. stipitis* NRRL Y-7124 foi avaliado por meio de fermentações em biorreator, no qual o fornecimento de ar e a agitação determinaram a capacidade de transferência de oxigênio para o meio de cultivo (valor de K_{La}). Foi observado que a condição de microaerobiose ($K_{La} = 4,8 \text{ h}^{-1}$) levou a uma melhor produção de etanol do que a de aerobiose ($K_{La} = 35,4 \text{ h}^{-1}$). Os valores de $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ obtidos foram, respectivamente, 0,35 e 0,09 g/g na condição microaeróbia e 0,25 e 0,14 g/g na condição aeróbia, evidenciando o direcionamento do substrato para a produção de etanol em detrimento da produção de biomassa. Em termos de velocidade de produção de etanol, ambas as condições apresentaram valores próximos Q_P , 0,14 g/L.h sob microaerobiose e 0,16 g/L.h sob aerobiose, no entanto, 14,56 g/L de etanol foram produzidos na condição menos aerada, contra apenas 6,08 g/L na condição de maior aeração.

Em síntese, os trabalhos de Boynton e McMillan (1994) e de Furlan, Bouilloud e Castro (1994) corroboram com o presente estudo quanto ao efeito da aeração no metabolismo de xilose pela levedura *S. stipitis*. Adicionalmente, esta mesma tendência pode ser observada em estudos acerca da produção de etanol por *S. stipitis* a partir de meios contendo outros açúcares (DELGENES; MOLLETA; NAVARRO, 1988; GROOTJEN; VAN DER LANS; LUYBEN, 1991; UNREAN; NGUYEN, 2012).

5.7. Efeito das condições de cultivo na bioconversão de xilose em etanol

Os parâmetros fermentativos obtidos nos experimentos do planejamento estão dispostos na Figura 31. Estes parâmetros foram calculados após 24 horas de fermentação, uma vez que, (i) este foi o tempo necessário para que a concentração máxima de etanol fosse alcançada pela maioria dos ensaios realizados, determinando assim o fim da fermentação, e (ii) para que uma comparação direta, em relação aos parâmetros calculados em função do tempo, possa ser traçada com o experimento anterior. Neste período somente os ensaios contendo concentração inicial de 90 g/L de xilose não alcançaram o consumo completo de substrato (xilose do meio sintético + glicose e frutose do melaço de cana); dentre estes,

metade alcançou o consumo completo em 36-48 horas, nos demais, concentrações de xilose variando entre 2,58 e 20,68 g/L permaneceram inutilizadas pela levedura, mesmo após 120 horas de fermentação. Quanto à formação de biomassa, o período de 24 horas foi tempo necessário para que as curvas de crescimento celular de 18 dos 20 experimentos atingissem o plateau.

Figura 31 - Parâmetros fermentativos determinados após 24 h de fermentação para os experimentos do planejamento fatorial completo 2^4 utilizado para a avaliação dos efeitos das condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651.

Fonte: Arquivo pessoal.

Como pode ser observado na Figura 31, diferentes ensaios alcançaram parâmetros fermentativos relativos à produção de etanol próximos ou superiores àqueles obtidos pela condição otimizada no item 5.4.2 ($Y_{P/S} = 0,46$ g/g e $Q_P = 0,59$ g/L.h), até então a mais adequada para a bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651. Alguns resultados foram inclusive superiores aos *benchmarks* propostos por Jeffries (1985) para a produção de etanol a partir de xilose: $Y_{P/S}$ superior a 0,40 g/g e Q_P de 1,30-1,67 g/L.h (equivalente à produção de 5-6% m/v de etanol em 36 horas).

De forma geral, os parâmetros fermentativos obtidos nos vinte ensaios apresentaram variabilidade substancial entre si, de modo que a análise dos resultados foi realizada com base em análise estatística apropriada, contemplando a forma planejada de realização dos experimentos. Modelos empíricos para a predição dos parâmetros fermentativos ($Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$, Q_P , Q_S e Q_X) foram avaliados em função das diferentes condições de fermentação (aeração e concentrações de substrato, células e suplemento) adotando um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Esta estratégia teve por objetivo avaliar com mais detalhes a influência qualitativa e quantitativa de cada fator no crescimento e na produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir de xilose.

Tabela 17 - Coeficientes de regressão das variáveis independentes para a predição da velocidade média de consumo de substrato (Q_S) por *S. stipitis* DSM-3651 em cultivos à base de xilose

Fator	Coeficiente	Erro padrão	t (8)	p-valor
Média*	2,1069	0,0210	100,21	<0,0001
Curvatura*	0,3281	0,0470	6,98	0,0001
A	0,0206	0,0210	0,98	0,3553
B*	0,8906	0,0210	42,36	<0,0001
C*	0,1894	0,0210	9,01	<0,0001
D*	0,2206	0,0210	10,49	<0,0001
AB	0,0294	0,0210	1,40	0,1999
AC	-0,0219	0,0210	-1,04	0,3286
AD	0,0419	0,0210	1,99	0,0816
BC*	0,1831	0,0210	8,71	<0,0001
BD*	0,1869	0,0210	8,89	<0,0001
CD*	-0,0594	0,0210	-2,82	0,0224

A: aeração; B: concentração de substrato; C: concentração celular; D: concentração de suplemento;

*Significativo ao nível de confiança de 95%.

Como pode ser observado na Tabela 17, a velocidade média de consumo de substrato (Q_S) foi influenciada pelas concentrações de substrato, células e suplemento, e inclusive pela

interação destas variáveis. No entanto, conforme evidenciado pelo alto valor do coeficiente determinado para a concentração de substrato (0,8906), em relação à média, pode-se notar que este foi o fator que exerceu maior influência positiva para o aumento da velocidade de consumo.

De acordo com a Figura 32, o aumento da concentração inicial de substrato (S_0) de 30 para 90 g/L correspondeu a um aumento médio de Q_s de 1,242-1,322 para 2,283-3,843 g/L.h; o maior valor de Q_s foi determinado quando xilose, suplemento e células estavam nas concentrações máximas, e o menor valor, na condição oposta.

Figura 32 - Gráfico de cubo mostrando os efeitos das concentrações de substrato, células e suplemento sobre o Q_s .

Fonte: Arquivo pessoal.

Esta forte dependência da velocidade média de consumo de substrato pela S_0 refletiu a capacidade dos transportadores de açúcar transmembrana de *S. stipitis*; a concentração de xilose captada por hora aumentou de acordo com o aumento da quantidade de xilose disponibilizada para a célula. Este comportamento evidencia a tendência de aumento da velocidade de transporte, a qual atinge valores próximos do máximo ($V_{máx}$) em concentrações saturantes de substrato.

O efeito positivo da concentração celular é explicado pelo simples fato que, quanto maior a quantidade de células consumindo substrato, mais rápido ele será consumido. Enquanto que este resultado nos permite avaliar o impacto que a quantidade de células tem sobre o tempo de fermentação, o efeito exercido pela concentração de suplemento nos permite fazer inferências acerca da qualidade destas células. O efeito significativo e positivo desta variável mostra que tão importante quanto o aumento do número de agentes de fermentação é a disponibilização adequada de nutrientes, a qual fornece boas condições para o crescimento e o desenvolvimento da levedura.

O modelo linear determinado para Q_s , definido após reparametrização (triagem com relação à significância estatística dos coeficientes de regressão), apresentou curvatura significativa na região de estudo (Tabela 18). Isto porque os valores de Q_s obtidos nos experimentos do ponto central foram próximos àqueles obtidos sob maiores concentrações de substrato (Figura 31A). Ou seja, observou-se que, a partir de um dado valor, o aumento da S_0 tende a não contribuir mais com o Q_s , o que do ponto de vista biológico significa que a capacidade máxima ($V_{\text{máx}}$) de transporte de açúcar teria sido alcançada, de modo que aumentos adicionais na S_0 exerceria efeito de inibição à levedura. Sendo assim, apenas um modelo quadrático poderia se ajustar adequadamente aos dados experimentais de Q_s .

Quanto ao crescimento celular, as condições de fermentação exerceram efeitos diferentes na produtividade volumétrica de biomassa (Q_x) e no fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), ou seja, o aumento da velocidade de crescimento celular não foi associado a um maior direcionamento de substrato para a biossíntese.

A produtividade volumétrica de biomassa sofreu influência significativa e positiva das concentrações de substrato e de suplemento; os valores dos coeficientes destas variáveis foram de 0,0369 e 0,0431, respectivamente (Tabela 18). Em cultivos nos quais ambas as variáveis estavam no nível -1, um valor médio de 0,157 g/L.h de Q_x foi obtido, já quando ambas estavam no nível +1 este valor foi de 0,318 g/L.h (Figura 33).

Tabela 18 - Coeficientes de regressão das variáveis independentes para a predição da produtividade volumétrica de biomassa (Q_x) por *S. stipitis* DSM-3651 em cultivos à base de xilose

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t (8)	p-valor
Média*	0,2169	0,0092	23,58	0,0000
Curvatura*	0,0781	0,0206	3,80	0,0053
A	0,0106	0,0092	1,16	0,2814
B*	0,0369	0,0092	4,01	0,0039
C	-0,0044	0,0092	-0,48	0,6471
D*	0,0431	0,0092	4,69	0,0016
AB	-0,0094	0,0092	-1,02	0,3380
AC	-0,0156	0,0092	-1,70	0,1278
AD	0,0169	0,0092	1,83	0,1039
BC	-0,0019	0,0092	-0,20	0,8436
BD	0,0206	0,0092	2,24	0,0552
CD	-0,0081	0,0092	-0,88	0,4029

A: aeração; B: concentração de substrato; C: concentração celular; D: concentração de suplemento.

*Significativo ao nível de confiança de 95%.

Portanto, observa-se que o desenvolvimento de *S. stipitis* DSM-3651 está condicionado não apenas à disponibilidade da fonte de carbono, como também dos demais nutrientes (nitrogênio, minerais e fatores de crescimento). Estes resultados ressaltam a importância de se fixar uma proporcionalidade entre as concentrações de substrato e suplemento visando ao aumento do crescimento celular, de modo que, o suprimento de fontes de carbono e nutrientes seja mantido em uma relação ótima para a levedura.

O modelo linear determinado para Q_X não se ajustou aos dados experimentais. Além da alta variabilidade experimental, os elevados valores obtidos a partir dos pontos centrais apontaram uma curvatura significativa na região de estudo (Tabela 18), a qual poderia ser descrita somente pelo ajuste de um modelo quadrático.

Figura 33 - Gráfico do quadrado mostrando os efeitos das concentrações de substrato e suplemento sobre o Q_X .

Fonte: Arquivo pessoal.

O fator de conversão de substrato em células foi influenciado significativamente por todas as condições de fermentação avaliadas e pela interação entre a aeração e a concentração de inicial de substrato. De acordo com a Tabela 19, a qual compila apenas os coeficientes mantidos no modelo após reparametrização, a S_0 exerceu a maior influência neste parâmetro, juntando-se a sua interação com a aeração e a concentração celular como os fatores que exerceram efeito negativo no $Y_{X/S}$. A relação entre o fator de conversão de substrato em células e os fatores relacionados é descrita pela Equação 31.

$$Y_{X/S} = 0,119 + 0,008A - 0,031B - 0,008C + 0,012D - 0,011AB \quad (31)$$

onde A é o valor codificado para a aeração, B é o valor codificado para a concentração de substrato, C é o valor codificado para a concentração de células e D é o valor codificado para a concentração de suplemento.

Tabela 19 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em células

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,119	0,003	41,58	<0,0001
A	0,008	0,003	2,55	0,0231
B	-0,031	0,003	-9,61	<0,0001
C	-0,008	0,003	-2,55	0,0231
D	0,012	0,003	3,73	0,0023
AB	-0,011	0,003	-3,33	0,0049

A: aeração; B: concentração de substrato; C: concentração celular; D: concentração de suplemento.

A análise de variância (ANOVA) do modelo elaborado está apresentada na Tabela 20. O modelo apresentou significância estatística, cujo p -valor foi <0,0001. O valor de F_{calc} , ao nível de confiança de 95%, foi de 26,08, muito maior que o de F_{tab} (2,96); ou seja, existiram diferenças significativas entre os tratamentos. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais, uma vez que o p -valor obtido no teste de falta de ajuste foi 0,2125. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,90.

Tabela 20 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em células

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F_{calc}	p-valor
Regressão	5	0,0212	0,0042	26,08	<0,0001
Resíduos	14	0,0023	0,0002		
Falta de Ajuste	11	0,0021	0,0002	2,83	0,2125
Erro Puro	3	0,0002	0,0001		
Total	19	0,0235			

A partir do modelo proposto, um gráfico de superfície de resposta foi elaborado (Figura 34), mostrando os efeitos exercidos pelas concentrações de substrato e de suplemento no $Y_{X/S}$ (os demais fatores foram fixados no nível 0). Como pode ser observado, o referido gráfico descreve a forte influência da concentração inicial de substrato sobre o $Y_{X/S}$, e mostra que a limitação do direcionamento de substrato para a biossíntese e crescimento celular pode ser alcançada por meio do aumento da concentração inicial de xilose combinado com a restrição da disponibilidade de nutrientes. Este comportamento, já

observado em *S. stipitis* (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; FARIAS; ANDRADE; MAUGERI-FILHO, 2014), é atribuído ao efeito inibitório que altas concentrações de substrato exercem sobre a levedura.

Figura 34 - Fator de conversão de substrato em células em função das concentrações de substrato e suplemento. Aeração e concentração celular foram fixadas no nível 0. Os círculos representam os valores experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

O efeito negativo da concentração celular no $Y_{X/S}$ deve-se ao fato que, o aumento da densidade celular inicial acarreta no direcionamento do substrato para a produção de etanol ao invés da produção de biomassa (AGBOGBO et al., 2007). Já a aeração e a concentração de suplemento foram os dois fatores que exerceram efeito positivo significantes no $Y_{X/S}$. O aumento da disponibilidade de oxigênio é responsável por desviar o catabolismo de xilose para a via oxidativa, na qual a fosforilação oxidativa gera energia metabólica suficiente para promover a biossíntese e o crescimento celular (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Já o efeito da suplementação nutricional deve-se ao suprimento adequado de nutrientes à levedura, os quais são essenciais para a síntese celular.

Com relação à produção de etanol, os efeitos exercidos pelas condições de fermentação foram diferentes para produtividade volumétrica (Q_P) e fator de conversão ($Y_{P/S}$), resultado semelhante ao determinado para o crescimento celular.

As condições de fermentação que exerceram efeito sobre a produtividade volumétrica de etanol (Q_P) (Tabela 21), com exceção da aeração, foram as mesmas que

influenciaram a velocidade média de consumo de açúcar (Q_S). Esta relação bem definida entre ambos os parâmetros sugere que a velocidade de produção foi limitada pela velocidade na qual o substrato foi disponibilizado no interior da célula, evidenciando a capacidade de *S. stipitis* DSM-3651 em converter xilose a etanol. A concentração inicial de substrato exerceu efeito preponderante no Q_P . As concentrações de células e suplemento, além das suas interações com a concentração de substrato foram os demais fatores que influenciaram de forma significativa e positiva a produtividade volumétrica de etanol; a aeração exerceu efeito negativo. A Equação 32 descreve a relação entre o Q_P e os fatores citados.

$$Q_P = 0,856 - 0,049A + 0,368B + 0,088C + 0,088D + 0,082BC + 0,074BD \quad (32)$$

onde A é o valor codificado para a aeração, B é o valor codificado para a concentração de substrato, C é o valor codificado para a concentração de células e D é o valor codificado para a concentração de suplemento.

Tabela 21 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol

Fator	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,856	0,019	45,54	<0,0001
A	-0,049	0,021	-2,35	0,0352
B	0,368	0,021	17,53	<0,0001
C	0,088	0,021	4,20	0,0010
D	0,088	0,021	4,20	0,0010
BC	0,082	0,021	3,90	0,0018
BD	0,074	0,021	3,54	0,0036

A:aeração; B: concentração de substrato; C: concentração celular; D: concentração de suplemento.

A análise de variância (ANOVA) do modelo proposto está apresentada na Tabela 22. Como pode ser observado o modelo apresentou significância estatística, considerando o p -valor <0,0001. A existência de diferenças significativas entre os tratamentos foi confirmada pela determinação do valor de F_{cal} a 95% de nível de confiança, 62,61; para regressão com 6 graus de liberdade e resíduos com 13, o F_{tab} é de 2,92. De acordo com o p -valor da Falta de ajuste, maior que o valor de alfa 0,05, o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,97.

Tabela 22 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F _{calc}	p-valor
Regressão	6	2,6515	0,4419	62,61	<0,0001
Resíduos	13	0,0918	0,0071		
Falta de Ajuste	10	0,0872	0,0087	5,68	0,0897
Erro Puro	3	0,0046	0,0015		
Total	19	2,7433			

O gráfico de superfície de resposta originado a partir do modelo elaborado está disposto na Figura 35, e mostra a importância que a concentração de substrato tem sobre o Q_P . Em contrapartida, a concentração celular apresentou efeito progressivamente maior, seguindo o aumento de S_0 . Nesta representação gráfica, a aeração e a concentração de suplemento foram fixadas no nível 0.

O aumento da velocidade de produção de etanol por meio do aumento de S_0 , também foi observado no estudo de Du Preez, Bosch e Prior (1986), no qual o Q_P obtido por *S. stipitis* CSIR-Y633 passou de 0,30 para 0,85 g/L.h com o aumento da concentração inicial de xilose de 10 para 50 g/L. Já o aumento da concentração celular tem sido reportado como uma alternativa interessante para aumentar a produtividade de etanol (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996), uma vez que com mais células disponíveis para a formação de produto, uma maior concentração deste deve ser alcançado em um menor tempo de fermentação (FERREIRA et al., 2011). O efeito positivo da concentração de suplemento mostra que os nutrientes não exercem efeito apenas no desenvolvimento celular, mas também na produção de etanol por si só. Slininger et al. (2006), utilizando células de *S. stipitis* em fase estacionária, observaram que a produção de etanol não associada ao crescimento foi fortemente influenciada pela concentração de nitrogênio no meio; além de não produzir etanol na ausência de fontes de nitrogênio, a quantidade mínima de nitrogênio requerida para uma produção satisfatória de etanol aumentou com o aumento da concentração de xilose, tendo em vista a manutenção da razão C:N em uma faixa ótima.

Figura 35 - Produtividade volumétrica de etanol em função das concentrações de substrato e células. Aeração e concentração de suplemento foram fixadas no nível 0. Os círculos representam os valores experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com a Tabela 23, o fator de conversão de substrato em etanol foi influenciado de forma significativa pela aeração, pela concentração de substrato e pela interação entre ambas as variáveis. Nota-se que o aumento da concentração de oxigênio no meio de fermentação apresentou grande influência no direcionamento de substrato para a produção de etanol, em comparação com as demais variáveis. O modelo que relaciona o $Y_{P/S}$ com os fatores relacionados é descrito pela Equação 33.

$$Y_{P/S} = 0,390 - 0,033A + 0,011B + 0,017AB \quad (33)$$

onde A é o valor codificado para a aeração e B é o valor codificado para a concentração de substrato.

Tabela 23 - Valores dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em etanol

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Média	0,390	0,003	118,24	<0,0001
A	-0,033	0,004	-8,98	<0,0001
B	0,011	0,004	2,88	0,0109
AB	0,017	0,004	4,58	0,0003

A:aeração; B: concentração de substrato.

A Tabela 24 apresenta a análise de variância (ANOVA) do modelo de predição proposto. Considerando que o p -valor foi inferior a 0,0500, constatou-se que o modelo apresentou significância estatística. O fato do valor de F_{cal} (36,64) ter sido superior à 3,24 (referente à 3 graus de liberdade para a regressão e 16 para os resíduos) a 95% de nível de confiança evidencia que, de fato, os tratamentos apresentaram de diferenças significativas entre si. Além disso, o modelo apresentou bom ajuste aos dados experimentais (p -valor da Falta de ajuste, superior à 0,0500) e coeficiente de determinação (R^2) de 0,87.

Tabela 24 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição do fator de conversão de substrato em etanol

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F_{calc}	p -valor
Regressão	3	0,0239	0,0080	36,64	<0,0001
Resíduos	16	0,0035	0,0002		
Falta de Ajuste	13	0,0028	0,0002	0,96	0,5934
Erro Puro	3	0,0007	0,0002		
Total	19	0,0274			

De acordo com a superfície de resposta elaborada a partir do modelo (Figura 36), a variação da aeração do nível -1 ao nível +1 foi responsável por uma queda considerável dos valores médios de $Y_{P/S}$. Este comportamento está de acordo com o esperado para o metabolismo de *S. stipitis*. Conforme discutido no item 5.6 o aumento da aeração faz com que a levedura *S. stipitis* direcione o substrato consumido para o metabolismo oxidativo ao invés do fermentativo, o que acarreta no aumento do $Y_{X/S}$ em detrimento do $Y_{P/S}$. Este desvio metabólico foi evidenciado pelo trabalho de Skoog e Hahn-Hägerdal (1990), no qual se observou que a diminuição da concentração de oxigênio disponível no meio ocasionou o aumento da atividade da enzima piruvato descarboxilase e a diminuição da atividade da enzima malato desidrogenase, além do acúmulo de intermediários da via das pentoses fosfato e do ciclo do Krebs.

De forma menos determinante, a concentração de substrato e sua interação com aeração exerceram efeito positivo sobre o $Y_{P/S}$. Como pode ser observado, o efeito da aeração foi mais acentuado em baixa concentração de substrato. O efeito positivo desta interação pode ser observado nos cultivos onde ambos os fatores estavam no nível +1; este aumento de $Y_{P/S}$ promovido pelo aumento de S_0 sob condições de maior aeração deve-se ao fato que a partir de uma maior quantidade de substrato, maior é o crescimento celular, de modo que

ao decorrer do cultivo a disponibilidade de oxigênio por unidade de biomassa diminui, o que contribui para que o substrato seja direcionado para o metabolismo fermentativo.

Figura 36 - Fator de conversão de substrato a etanol em função da aeração e da concentração de substrato. Os círculos representam os valores experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Além de permitir a avaliação dos efeitos da aeração e das concentrações de substrato, células e suplemento no metabolismo de xilose por *S. stipitis* DSM-3651, a análise dos experimentos do planejamento fatorial forneceu importantes informações para a maximização da produção de etanol pela levedura. Considerando que a aeração exerceu efeito negativo sobre o fator de conversão de substrato a etanol, e as demais condições de fermentação efeito positivo ou nulo tanto para $Y_{P/S}$ quanto para Q_P , pode-se estabelecer que uma condição otimizada para a obtenção de maiores concentrações de etanol deveria ser compreendida pela restrição de oxigênio e pelo aumento das concentrações de células e suplemento, além da evidente necessidade de fornecer maiores concentrações iniciais de xilose.

A Figura 37 compila as curvas de produção de etanol obtidas nos experimentos contendo S_0 igual a 90 g/L (nível 1), nos quais as maiores produções foram determinadas. Como pode ser observado, o experimento 15, o qual foi realizado exatamente sob a condição supramencionada, alcançou a maior concentração de etanol, 37,01 g/L; valor substancialmente maior do que aqueles obtidos até então.

Figura 37 - Curvas de produção de etanol obtidas nos experimentos contendo concentração inicial de xilose no nível +1 do planejamento fatorial completo 2^4 para a avaliação do efeito das condições de fermentação na bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis* DSM-3651

Fonte: Arquivo pessoal.

Portanto, a partir das análises realizadas, foi possível determinar um conjunto de experimentos complementar, direcionado para a maximização da produção de etanol, visando atingir o *benchmark* sugerido por Jeffries (1985), o qual determina que a concentração de etanol mínima a ser produzida pela conversão da xilose deve estar entre 50 e 60 g/L. Este estudo complementar foi realizado utilizando um Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 , que visou a otimização da produção de etanol, avaliando o aumento da concentração inicial de xilose além de 90 g/L e o aumento da concentração celular além de 9 g/L (tendo em vista a manutenção dos valores de produtividade); de acordo com os efeitos exercidos sobre o metabolismo de *S. stipitis* DSM-3651 discutidos previamente, a aeração foi fixada no nível -1 e a concentração de suplemento variou de forma proporcional à concentração de xilose.

5.8. Avaliação da produção de etanol a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado

Conforme avaliado no item 5.7, a concentração de suplemento nutricional foi um dos fatores que apresentou efeito positivo significativo estatisticamente na produtividade de

etanol, ou seja, visando maiores incrementos de Q_P , maiores concentrações iniciais de suplemento podem ser avaliadas. No entanto, considerando que o melaço de cana é o componente presente em maior quantidade no suplemento nutricional (59,6% da massa total de nutrientes) e que a sacarose, que perfaz $50,89 \pm 0,79\%$ (m/m) da sua composição não é convertida em etanol pela levedura *S. stipitis* DSM-3651, observa-se que o aumento da concentração de suplemento para níveis acima dos já avaliados implica na obtenção de concentrações significantes de açúcares não utilizados pela levedura ao final das fermentações. Tomando como base o ensaio do planejamento fatorial (item 5.7) que alcançou a maior concentração de etanol (experimento 15), 10,67 g/L de sacarose permaneceram inutilizadas no meio após 48 horas de fermentação, provenientes do melaço contido nos 34,08 g/L de suplemento nutricional.

Portanto, tendo em vista que a hidrólise de 1 mol de sacarose gera 1 mol de glicose e 1 mol de frutose, açúcares fermentescíveis para *S. stipitis* DSM-3651, o condicionamento do melaço de cana diluído com a enzima hidrolítica invertase foi avaliado. A faixa de pH ótimo da enzima, previamente determinada (resultados não mostrados), se estendeu de 4,2 a 5,2, o que possibilitou sua adição à solução de melaço de cana (pH = 5,75) dispensando a correção de pH.

A Figura 38 apresenta a cinética de hidrólise de sacarose no Condicionamento I, no qual o substrato foi composto por melaço diluído em água. A concentração de 45,59 g/L de melaço foi empregada, de modo a se obter a concentração definida para o experimento 15 do planejamento fatorial (item 5.7) por meio da adição dos demais nutrientes, da xilose e do inóculo, após a reação enzimática. Como pode ser observado, $92,79 \pm 0,03\%$ da sacarose foi convertida em 4 horas de reação; 100% em 10 horas. Desta forma, o meio antes composto por $2,84 \pm 0,04$ g/L de glicose, $2,99 \pm 0,05$ g/L de frutose e $20,83 \pm 20$ g/L de sacarose, após o condicionamento com invertase apresentou $14,80 \pm 0,10$ g/L de glicose e $14,88 \pm 0,07$ g/L de frutose em sua composição.

Tendo em vista a produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651, a hidrólise completa da sacarose presente no melaço, utilizando o tratamento com invertase, aumentou a quantidade de açúcares fermentescíveis, logo a concentração teórica máxima de etanol. Sendo assim, uma vez hidrolisado, o meio foi complementado com a adição dos demais componentes (para a concentração final de: 2,61 g/L de extrato de levedura, 2,61 g/L de extrato de malte, 4,35 g/L de peptona e 4,20 g/L de fosfato de amônio, 90 g/L de xilose e 9,00 g/L de células) e a fermentação foi realizada. A Figura 39 apresenta as diferenças de

composição do meio do experimento 15 (EXP 15) e do meio a base de xilose e melaço de cana condicionado com invertase (EXP 15 INV).

Figura 38 - Cinética da hidrólise enzimática da sacarose do Condicionamento I (melaço de cana diluído em água; concentração = 45,49 g/L). As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 39 - Concentração dos açúcares presentes no meio do experimento 15 (EXP 15) e no meio a base de xilose e melaço de cana condicionado com invertase (EXP 15 INV).

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 40 apresenta as curvas de consumo de açúcar, crescimento celular e produção de etanol e subprodutos, obtidas nas fermentações dos meios contendo melaço de

cana condicionado ou não com invertase. Como pode ser observado, uma maior concentração de etanol foi alcançada a partir do meio contendo frutose e glicose proveniente da hidrólise enzimática da sacarose, $40,91 \pm 0,85$ g/L; sem o condicionamento prévio do melaço (experimento 15) esta concentração foi de 37,01 g/L. No entanto, além deste aumento de produção, o aumento da concentração inicial de açúcares fermentescíveis ocasionou um aumento de 6 horas no tempo de fermentação. As concentrações máximas de etanol foram obtidas em 30 e em 24 horas, a partir dos meios contendo melaço condicionado e não condicionado, respectivamente, o que representou uma queda na produtividade volumétrica de etanol (Q_P), de 1,54 para $1,36 \pm 0,03$ g/L.

O aumento do tempo de fermentação e a concomitante redução do Q_P podem estar relacionados à menor velocidade de consumo de xilose. Na fermentação do meio contendo melaço não condicionado a concentração de xilose em 24 horas era de 4,84 g/L; neste mesmo período, 9,28 g/L de xilose permaneciam inutilizadas no meio contendo melaço condicionado. Esta diminuição da taxa de consumo de xilose deveu-se ao consumo sequencial dos açúcares, ocasionado pelo efeito de diauxia exercido tanto pela glicose como pela frutose; de acordo com a discussão do item 5.1.2 embora de forma menos pronunciada, a frutose também influencia no consumo de xilose por *S. stipitis* DSM-3651.

Assim como a produtividade, o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) também diminuiu com o condicionamento enzimático do melaço de cana, de 0,43 g/g para 0,40 g/g. Isto implica em dizer que a disponibilização de hexoses no meio ocasionou uma sutil diminuição do direcionamento de substrato para a produção de etanol, embora nenhuma diferença significativa entre as fermentações tenha sido observada em relação às produções de células e subprodutos (xilitol e glicerol).

De modo geral, o condicionamento enzimático do melaço de cana com invertase, promovendo a hidrólise da sacarose previamente à fermentação, acarretou em um aumento satisfatório da concentração final de etanol. Portanto, com base no fato que o aumento e diversificação de açúcares fermentescíveis também foi responsável por uma queda nos parâmetros fermentativos relacionados à produção de etanol ($Y_{P/S}$ e Q_P), e que esta estratégia, juntamente com o ajuste de condições de fermentação (aeração e concentrações de células, substrato e suplemento) podem promover maiores ganhos de produtividade, um conjunto de experimentos para a otimização da produção etanol foi proposto, visando a obtenção de concentrações superiores à 50 g/L, conforme proposto por Jeffries (1985), as quais viabilizam economicamente o processo de destilação (WALTON; HEININGEN; WALSUM, 2010).

Figura 40 - Curvas de crescimento celular, consumo de açúcar e produção de etanol e subprodutos obtidas nas fermentações do meio do experimento 15 (A) e do meio a base de xilose e melaço de cana condicionado com invertase (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

5.9. Otimização da produção de etanol a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado

Para a realização dos experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 (DCCR – 2^2), proposto para a otimização da produção de etanol, uma estratégia diferente

de hidrólise enzimática do melaço de cana com invertase foi utilizada. Devido a variabilidade dos volumes das soluções de substrato, suplemento nutricional e células nos experimentos do planejamento, a hidrólise de uma determinada diluição do melaço se tornou inviável. Desta forma, realizou-se o condicionamento da solução-mãe (Condicionamento II), mantendo a razão U de invertase/g de sacarose utilizada no Condicionamento I (item 5.8), 21,6 U/g.

De acordo com a Figura 41, a cinética de hidrólise de sacarose no Condicionamento II apresentou resultados semelhantes aos observados para o Condicionamento I (melaço diluído em água); 89,71% da sacarose foi convertida em 4 horas de reação e 100% em 8 horas. Sendo assim, a solução-mãe de melaço antes composta por 19,34 g/L de glicose, 18,56 g/L de frutose e 113,52 g/L de sacarose, após o condicionamento com invertase apresentou 74,80 g/L de glicose e 73,90 g/L de frutose em sua composição.

Figura 41 - Cinética da hidrólise enzimática da sacarose do Condicionamento II (solução mãe de melaço de cana; concentração = 238,4 g/L). As barras verticais representam o desvio padrão, calculado a partir de triplicatas.

Fonte: Arquivo pessoal.

A Figura 42 apresenta as concentrações de glicose e frutose nos 5 níveis de concentração de substrato/suplemento avaliados pelo DCCR – 2², no qual utilizou-se o melaço condicionado (inv+); apenas como base de comparação, a Figura 42 também apresenta as concentrações teóricas de glicose, frutose e sacarose, caso o melaço não condicionado com invertase (inv-) fosse utilizado. De modo geral, o condicionamento

enzimático aumentou cerca de 4 vezes a concentração destas hexoses fornecidas pelo melaço de cana, o que representou 12% do total dos açúcares fermentescíveis nas fermentações realizadas.

Figura 42 - Concentração dos açúcares presentes no meio nos diferentes níveis de concentração de substrato/suplemento avaliados pelo DCCR – 2².

Fonte: Arquivo pessoal.

Após o prévio condicionamento do melaço de cana os ensaios do DCCR – 2² foram realizados. Este conjunto de experimentos veio a dar continuidade ao estudo das condições de fermentação, porém com foco direcionado exclusivamente para a otimização da produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651. Tanto as variáveis quanto os níveis empregados foram determinados a partir dos resultados obtidos no item 5.7; a aeração foi fixada no menor nível avaliado, e as concentrações de substrato como de células foram avaliadas em níveis superiores aos testados.

A Tabela 25 apresenta os parâmetros referentes à produção de etanol - concentração final (P_f), fator de conversão de substrato ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) - e o tempo de fermentação (T_f) no qual estes foram obtidos. Como pode ser observado, a proposta de aumento da concentração inicial de substrato para se obter concentrações de etanol entre 4 e 5% (m/m), tendo em vista a viabilidade econômica do processo de destilação (WALTON; HEININGEN; WALSUM, 2010), obteve êxito. O aumento proporcional da concentração celular permitiu que as concentrações máximas de etanol fossem obtidas em até 72 horas, mesmo em fermentações iniciadas com altas concentrações de substrato. Além disso, em sua

maioria, as fermentações realizadas nas condições avaliadas apresentam fatores de conversão de substrato em etanol superiores à 0,40 g/g.

Tabela 25 - Parâmetros fermentativos referentes à produção de etanol obtidos nos experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2² e tempo final de fermentação

Exp	P_f (g/L)	Y_{P/S} (g/g)	Q_P (g/L.h)	T_f (h)
1	44,42	0,40	1,23	36
2	55,81	0,37	0,78	72
3	47,50	0,43	1,98	24
4	60,36	0,41	1,26	48
5	42,66	0,41	1,78	24
6	58,90	0,39	0,82	72
7	52,09	0,42	1,09	48
8	55,19	0,36	1,31	42
9	53,61	0,41	1,12	48
10	54,13	0,41	1,13	48
11	53,84	0,41	1,12	48

De forma geral, as concentrações de etanol obtidas ao final das fermentações apresentaram certa variabilidade entre si, de modo que a análise destes dados foi realizada com base em análise estatística apropriada, contemplando a forma planejada de realização dos experimentos. Deste modo, um modelo quadrático empírico para a predição da concentração final de etanol (P_f), em função das concentrações de substrato e células, foi determinado a partir dos parâmetros de regressão obtidos, adotando um nível de confiança de 95% (p<0,05) para definir aqueles que exerceram efeito significativo.

De acordo com a Tabela 26 a concentração de substrato (Fator A), seu coeficiente quadrático (A²) e a concentração de células (Fator B) foram os parâmetros que apresentaram significância estatística, *p*-valor de <0,0001, 0,0003 e 0,0002, respectivamente, logo, sendo mantidos no modelo. A relação entre o P_f e os fatores relacionados é descrita pela Equação 34.

$$P_f = 53,71 + 5,90A - 1,54A^2 + 1,50B \quad (34)$$

onde A é o valor codificado para a concentração de substrato, B é o valor codificado para a concentração de células.

Tabela 26 - Valor dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da concentração final de etanol

Fator	Coeficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Constante	53,71	0,25	218,03	<0,0001
A	5,90	0,21	28,47	<0,0001
A ²	-1,54	0,24	-6,54	0,0003
B	1,50	0,21	7,24	0,0002

A análise de variância (ANOVA) do modelo elaborado está apresentada na Tabela 27. O modelo apresentou significância estatística, cujo *p*-valor foi <0,0001. O valor de F_{calc} , ao nível de confiança de 95%, foi de 301,9, muito maior que o de F_{tab} (4,35); ou seja, existiram diferenças significativas entre os tratamentos. O modelo se ajustou bem aos dados experimentais, uma vez que o *p*-valor obtido no teste de falta de ajuste foi 0,1369. O coeficiente de determinação (R^2) do modelo foi de 0,99.

Tabela 27 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da concentração final de etanol

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F_{calc}	p-valor
Modelo	3	311,5	103,8	301,9	<0,0001
Resíduos	7	2,4	0,3		
Falta de Ajuste	5	2,3	0,5	6,6	0,1369
Erro Puro	2	0,1	0,1		
Total	10	313,9			

A partir do modelo de predição proposto um gráfico de superfície de resposta foi elaborado (Figura 43), ilustrando os efeitos exercidos pelas concentrações de substrato e de células na concentração final de etanol. Como pode ser observado pela análise do gráfico, e também pelos valores dos coeficientes, a concentração de substrato exerceu efeito substancialmente maior do que a concentração de células na produção de etanol. Como o efeito de interação entre as variáveis não apresentou significância estatística, observa-se que o leve incremento na concentração final de etanol, promovido pelo aumento da concentração de células de 9 para 15 g/L, é semelhante tanto para a maior quanto para a menor concentração de xilose utilizada. Esta menor contribuição está associada ao fato que, de modo geral, o principal efeito do aumento da carga de inóculo é a diminuição do tempo de fermentação, logo, o aumento da produtividade volumétrica (Q_P), e não o aumento da concentração de etanol final.

O efeito positivo da concentração de substrato na concentração final de etanol tem explicação lógica: quanto maior a quantidade de açúcar no meio de fermentação, maior é a produção de etanol. No entanto, como pode-se observar na superfície de resposta, o aumento de P_f em fermentações contendo concentração de substrato acima de ~ 120 g/L tem inclinação progressivamente menor. A diminuição deste efeito positivo a partir de altas concentrações de substrato está associada à inibição. Concentrações muito altas de substrato aumentam a pressão osmótica nos microrganismos o que ocasiona em redução das taxas de crescimento e de fermentação (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Além de inibição pelo substrato, as altas concentrações de etanol, acima de 50 g/L, obtidas nestas condições, indicam inibição de *S. stipitis* DSM-3651 pelo produto. Este comportamento se refere ao termo quadrático (A^2) do modelo elaborado, o qual apresentou alta significância estatística (p -valor de 0,0003) e sinal negativo, indicando que maiores concentrações de substrato podem ocasionar queda na produção de etanol.

Figura 43 - Concentração final de etanol em função das concentrações de substrato e células. Os círculos representam os valores experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Perante à uma abordagem comercial da produção de etanol, o tempo de fermentação passa a ser um parâmetro de grande importância. Sendo assim, os efeitos das concentrações de substrato e células na produtividade volumétrica de etanol (Q_P), determinado em 30 horas, foram analisados. A definição do tempo de fermentação foi baseada na análise das curvas de produção obtidas nos experimentos do DCCR – 2² (Figura 44). Em 30 horas, na maioria dos

ensaios as concentrações de etanol encontravam-se próximas do valor máximo, ao mesmo tempo que em nenhum deles foi observado redução da concentração, devido a reassimilação pela levedura.

Figura 44 - Curvas de produção de etanol obtida nos experimentos do Delineamento Composto Central Rotacional 2^2 utilizado para otimizar a produção de etanol por *S. stipitis* DSM-3651 a partir de meio a base de xilose e melaço de cana condicionado.

Fonte: Arquivo pessoal.

A análise dos dados de Q_p obtidos foi baseada na elaboração de um modelo quadrático empírico de predição, tendo como variáveis independentes as concentrações de substrato e células. A definição da significância estatística dos parâmetros de regressão calculados foi realizada adotando um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Conforme pode ser observado na Tabela 28, os parâmetros estatisticamente significantes, os quais foram mantidos no modelo, foram a concentração de células (Fator B), a sua interação com a concentração de substrato (Fator AB) e o coeficiente quadrático da concentração de substrato (A^2). Desta forma o modelo que relaciona o Q_p com os fatores relacionados é descrito pela Equação 35.

Tabela 28 - Valor dos coeficientes de regressão do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol (Q_p)

Fator	Coefficiente	Erro padrão	t calculado	p-valor
Constante	1,61	0,0073	220,76	<0,0001
A^2	-0,09	0,0070	-12,33	<0,0001
B	0,09	0,0061	14,28	<0,0001
AB	0,04	0,0087	4,45	0,0030

$$Q_P = 1,61 - 0,09A^2 + 0,09B + 0,04AB \quad (35)$$

onde A é o valor codificado para a concentração de substrato, B é o valor codificado para a concentração de células.

A análise de variância (ANOVA) do modelo proposto está apresentada na Tabela 29. Como pode ser observado o modelo apresentou significância estatística, considerando o p -valor $<0,0001$. A existência de diferenças significativas entre os tratamentos foi confirmada pela determinação do valor de F_{cal} a 95% de nível de confiança, 125,24; para modelo com 3 graus de liberdade e resíduos com 7, o F_{tab} é de 4,35. De acordo com o p -valor da Falta de ajuste, maior que o valor de alfa 0,05, o modelo se ajustou bem aos dados experimentais. O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,98.

Tabela 29 - Análise de variância (ANOVA) do modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica de etanol (Q_P)

Causa de variação	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F_{calc}	p -valor
Modelo	3	0,11	0,038	125,24	$<0,0001$
Resíduos	7	0,0021	0,0003		
Falta de Ajuste	5	0,0018	0,0004	2,74	0,2887
Erro Puro	2	0,0003	0,0001		
Total	10	0,12			

Os efeitos exercidos pelas concentrações de substrato e células na produtividade volumétrica de etanol podem ser melhor analisados por meio do gráfico de superfície de resposta elaborado a partir do modelo proposto (Figura 45). Observa-se que o efeito da concentração de células no Q_P aumentou de acordo com o aumento da concentração de substrato. Em meio contendo menores concentrações de xilose e hexoses (provenientes do melaço condicionado) o aumento da carga de inóculo não apresentou um ganho substancial na produtividade. Este resultado sugere que para estas condições, o Q_P foi pouco influenciado pela concentração celular, sendo a menor concentração testada, 9 g/L, suficiente para realizar a produção de etanol em tempo semelhante a maior concentração (15 g/L).

Entretanto, esta influência aumentou gradualmente, seguindo o aumento da concentração de substrato; a uma concentração de 150 g/L de xilose, 10,62 g/L de glicose e 10,49 g/L de frutose, a concentração celular inicial exerceu efeito pronunciado no Q_P . Este comportamento mostra que as células apresentam uma certa capacidade de converter

substrato em etanol, de modo que, progressivos aumentos na concentração de substrato ocasionam no seu acúmulo, e conseqüentemente, no aumento do tempo necessário para sua conversão. De acordo com a superfície de resposta, nesta maior concentração de substrato avaliada, o aumento da concentração celular de 9 para 15 g/L ocasionaria um aumento de produtividade de 1,22 para 1,64 g/L. Aumentar a concentração celular tem se mostrado uma forma adequada para diminuir o tempo de fermentação, logo, aumentar a produtividade (OLSSON; HÄRGERDAL, 1996). No trabalho de Agbogbo et al. (2007) o aumento da concentração celular inicial de *S. stipitis* CBS6054 de 1,8 para 6,5 g/L foi responsável pelo aumento do Q_P de 0,11 para 0,21 g/L.h, na fermentação de meio contendo 120 g/L de xilose. Por meio de planejamento fatorial, assim como o presente estudo, Ferreira et al. (2011) observaram que a concentração celular inicial de *S. Stipitis* UFMG-IMH 43.2 apresentou efeito positivo estatisticamente significativo na produtividade volumétrica de etanol.

Figura 45 - Produtividade volumétrica de etanol em função das concentrações de substrato e células. Os círculos representam os valores experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

Com relação à concentração do substrato, como determinado pelo modelo de predição, seu efeito no Q_P não foi linear; nos níveis extremos, maior e menor concentração de substrato, menores valores de produtividade foram obtidos.

As maiores produtividades foram atingidas a partir de concentrações iniciais de substrato em torno de 120 g/L. A redução do valor deste parâmetro sob menores valores de concentração deve-se ao fato que menos etanol é formado quando menos substrato é

disponibilizado. Por outro lado, quando a concentração de substrato inicial excede um determinado valor, o qual pode variar de acordo com as condições de cultivo, ela se torna inibitória para o desenvolvimento do microrganismo. Para *S. stipitis*, reduções no Q_P têm sido comumente reportadas para concentrações superiores a 50 g/L de xilose (PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; SLININGER et al., 1985). Entretanto, Farias, Andrade e Maugeri-Filho (2014), em acordo com o obtido neste estudo, observaram queda no Q_P apenas em concentrações de xilose superiores à 125,2 g/L.

Quanto ao fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), nenhum coeficiente de regressão apresentou significância estatística. Isto mostra que, nem a concentração de substrato nem a concentração de células exerceram efeito significativo no $Y_{P/S}$, indicando que este parâmetro foi robusto dentro das condições avaliadas, o que de modo geral, é um resultado satisfatório, tendo em vista que ele se manteve em valores relativamente adequados para o processo (cerca de 0,40 g/g).

Estes resultados obtidos dão suporte a uma nova abordagem de integração dos processos de produção de etanol de primeira e de segunda geração. Em configurações já avaliadas, a concentração de açúcares dos hidrolisados hemicelulósicos foi corrigida pela adição de caldo de cana antes da etapa de fermentação (ANDRADE et al., 2013; CASTRO et al., 2003). Aqui utilizou-se melaço de cana tratado com invertases para este propósito; contando com a habilidade pouco explorada de *S. stipitis* em co-fermentar frutose, glicose e xilose para que uma produção satisfatória de etanol fosse alcançada. Nesta nova abordagem, os baixos teores de água no melaço, e de açúcares no hidrolisado, podem ser corrigidos em apenas uma etapa.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

(i) A levedura *S. stipitis* DSM-3651 foi capaz de produzir etanol, com uma eficiência de aproximadamente 80%, apenas a partir de glicose, xilose e frutose, tanto individualmente, quanto de forma simultânea (co-fermentação). Nos cultivos a base de arabinose ou sacarose, a levedura apresentou baixo consumo de substrato destinando-o para manutenção e crescimento celular;

(ii) Embora contenha teores equivalentes de cinzas e nitrogênio, o melaço de cana enriquecido com fosfato de amônio não pôde substituir totalmente o suplemento referência em cultivos de *S. stipitis* DSM-3651. Sua menor qualidade nutricional, foi associada às diferenças nas composições das cinzas e no tipo de fonte de nitrogênio (definido x complexo);

(iii) Para uma concentração celular inicial de 0,07 g/L, o suplemento alternativo definido para maximizar a produção de etanol foi composto por extrato de levedura, extrato de malte e peptona nos níveis máximos (2,13, 2,13 e 3,55 g/L, respectivamente) e fosfato de amônio e melaço nos níveis mínimos (1,40 e 2,76 g/L); para 3,00 g/L de células, o suplemento definido para maximizar tanto o $Y_{P/S}$ como o Q_P foi composto por melaço no nível máximo (6,77 g/L), e os demais nutrientes nos níveis mínimos;

(iv) Os requerimentos nutricionais de *S. stipitis* DSM-3651 variaram de acordo com a carga de inóculo. Quanto maior a concentração celular inicial, maiores foram as exigências por fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura e peptona) para o crescimento e por melaço de cana para a produção de etanol;

(v) O aumento da aeração resultou em maior crescimento celular e menor produção de etanol, ou seja, maiores concentrações de oxigênio dissolvidas no meio de fermentação ocasionaram um maior direcionamento de substrato para a produção de biomassa em relação à produção de etanol. A partir da condição de menor aeração ($v_f/v_m = 2$, sem troca de gases) obteve-se $Y_{P/S}$ igual a $0,47 \pm 0,01$ g/g e Q_P igual a $0,52 \pm 0,02$ g/L.h; para a condição de maior aeração ($v_f/v_m = 5$, com troca de gases) os valores destes parâmetros foram 0,30 g/g e 0,38 g/L.h, respectivamente;

(vi) As condições de fermentação que exerceram efeito sobre o consumo de substrato por *S. stipitis* DSM-3651 foram as concentrações de substrato, células e suplemento (todas positivas). Em relação ao crescimento, Q_x foi influenciado de forma

positiva pelas concentrações de substrato e suplemento; $Y_{X/S}$ sofreu influência positiva da aeração e da concentração de suplemento, enquanto que, as concentrações de células, substrato e a interação entre este último e a aeração exerceram efeito negativo. Quanto à produção de etanol, o Q_P sofreu efeito negativo da aeração e positivo das concentrações de substrato, células e suplemento, e das interações entre o primeiro e os dois últimos. Para o $Y_{P/S}$ a aeração exerceu efeito negativo e a concentração de substrato e a interação entre ambos, efeito positivo. Pela análise global, as condições mais favoráveis para a produção de etanol a partir de xilose por *S. stipitis* DSM-3651 foram: menor nível aeração e maiores concentrações de substrato, células e suplemento nutricional. Sob estas condições a levedura foi capaz de produzir 37,01 g/L em 24 horas a partir de 90 g/L de xilose, equivalente a um $Y_{P/S}$ de 0,43 g/g e um Q_P de 1,54 g/L.h;

(vii) O tratamento enzimático empregando invertases apresentou-se com um método eficiente para a conversão da sacarose contida no melaço de cana. Em ambas as estratégias de condicionamento (melaço concentrado ou diluído), rendimentos de conversão de sacarose em glicose e frutose de cerca de 100% foram obtidos em apenas 6 horas de reação, utilizando 21,6 U de atividade de invertase por grama de sacarose. Para o estudo de otimização (condicionamento do melaço concentrado), esta conversão foi responsável por aumentar em cerca de 4 vezes as concentrações de hexoses fornecidas pelo melaço, representando 12% do total dos açúcares fermentescíveis contidos nos meios;

(viii) O emprego de condições ideais de fermentação para *S. stipitis* DSM-3651, associado à utilização de meio composto por concentrações adicionais de glicose e frutose, oriundas do tratamento enzimático do melaço, promoveu a otimização da produção de etanol. A concentração final de etanol sofreu forte influência positiva da concentração de substrato/suplemento; em menores extensões seu coeficiente quadrático e a concentração celular também exerceram efeitos significativos no P_f , negativo e positivo, respectivamente. Em relação ao Q_P , a concentração celular e a sua interação com a concentração de substrato exerceram efeitos positivos; já o coeficiente quadrático da concentração de substrato, efeito negativo, assim como observado para P_f , o que evidenciou a presença de inibição pelo substrato. No experimento que empregou o nível +1 para ambas as variáveis, uma concentração final de etanol de 60,36 g/L foi obtida em 48 h. O fator de conversão e a produtividade volumétrica foram 0,41 g/g e 1,26 g/L.h, respectivamente.

REFERÊNCIAS

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, 2008.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K. S. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 2333-2336, 2006.

AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G.; TORRY-SMITH, M.; WENGER, K.; JEFFRIES, T. W. The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 653-662, 2007.

AHI, M.; AZIN, M.; SHOJAOSADATI, S. A.; FARAHANI, E. V.; NOSRATI, M. Optimization of sugarcane bagasse hydrolysis by microwave-assisted pretreatment for bioethanol production. **Chemical Engineering Technology**, v. 36, p. 1997-2005, 2013.

ALCARDE, A. R. **Árvore de conhecimento, cana de açúcar**. Agência Embrapa de Informação Tecnológica. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/cana_de_acucar.html> Acesso em: 10 de setembro de 2013.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xilose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, p. 211-214, 1994.

ANDRADE, R. R.; MAUGERI-FILHO, F.; MACIEL-FILHO, R.; COSTA, A. C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 351-359, 2013;

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol production in Brazil: The industrial process and its impact on yeast fermentation. In: BERNARDES, M. A. S. **Biofuel production** - recent developments and prospects. Rijeka: InTech, 2011, cap. 5, p. 85-100.

BELLIDO, C.; BOLADO, S.; COCA, M.; LUCAS, S.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10868-10874, 2011.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, p. 51-58, 2013.

BICHO, P. A.; CUNNINGHAM, J. D.; LEE, H. Differential fructose effect in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis*. **Microbiology Letters**, p. 323-328, 1989.

BICHO, P. A.; RUNNALS, P. L.; CUNNINGHAM, J. D.; LEE, H. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 50-54, 1988.

BOYNTON, B. L.; MCMILLAN, J. D. High-yield shake-flask fermentation of xylose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45/46, p. 509-514, 1994.

BRUINENBERG, P. M.; BOT, P. H. M.; VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, W. A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 256-260, 1984.

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

CARNEIRO, L. M. 2011. **Avaliação de estratégias de adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol**. 2011. 175 p. Tese (Doutorado) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, S. C.; FURLAN, S. A. Alternative approach for utilization of pentose stream from sugarcane bagasse by an induced flocculent *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 547-555, 2003.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Fermentation of D-xylose, D-glucose and L-arabinose mixture by *Pichia stipitis* Y7124: sugar tolerance. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, p. 155-161, 1988.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*: effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 398-402, 1989.

DELLWEG, H.; RIZZI, M.; KLEIN, C. Controlled limited aeration and metabolic regulation during the production of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 12, p. 111-122, 1989.

DEMEKE, M. M.; DIETZ, H.; LI, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; MUTTURI S.; DEPREZ, S.; ABT, T. D; BONINI, B. M.; LIDEN, G.; DUMORTIER, F.; VERPLAETSE, A.; BOLES, E.; THEVELEIN, J. M. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnol Biofuels**, v. 6, p. 89, 2013.

DOELLE, M. B.; DOELLE, H. W. Sugar-cane molasses fermentation by *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 31-35, 1990.

DOES, A. L.; BISSON, L. F. Characterization of xylose uptake in the yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 159-164, 1989.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press Limited, 1995.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M., PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 360-364, 1986b.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 228-233, 1986a.

DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel D-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Molecular BioSystems**, v. 6, p. 2081-2340, 2010.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.

FARIAS, D.; ANDRADE, R. R.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic modeling of ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* from xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, p. 361-379, 2014.

FERREIRA, A. D.; MUSSATTO, S. I.; CADETE, R. M.; ROSA, C. A.; SILVA, S. S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, p. 547-554, 2011.

FURLAN, S. A.; BOUILLAUD, P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 657-662, 1994).

GHORBANI, F.; YOUNESI, H.; SARI, A. E.; NAJAFPOUR, G. Cane molasses fermentation for continuous ethanol production in an immobilized cells reactor by *Saccharomyces cerevisiae*. **Renewable Energy**, v. 36, p. 503-509, 2011.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LULASIK. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GROOTJEN, D. R. J.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipites* under oxygen-limited conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, p. 648-654, 1991.

GUEBEL, D. V.; CORDENONS, A.; CASCONI, O.; GIULIETTI, A. M.; NUDEL, C. Influence of the nitrogen source on growth and ethanol production by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 1193-1198, 1992.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, p. 933-942, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C. U.; GORWA-GRAUSLUND, M.; GÖRGENS, J.; VAN ZYL, W. H. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factories**, v. 4, p. 31, 2005.

HERMANN, T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 104, p. 155-172, 2003.

HOGG, S. **Essential microbiology**. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, 2005. 468p.
HU, C-H.; BAI, F-W.; AN, L-J. Enhancing ethanol tolerance of a self-flocculating fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* by Mg^{2+} via reduction in plasma membrane permeability. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1191-1194, 2003.

HUMBIRD D.; DAVIS, R.; TAO, L.; KINCHIN, C.; HSU, D.; ADEN, A.; SCHOEN, P.; LUKAS, J.; OLTHOF, B.; WORLEY, M.; SEXTON, D.; DUDGEON, D. **Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover**. Colorado: NREL, 2011. 136 p. Technical Report, NREL/TP-5100-47764.

JEFFRIES, T. W. Emerging technology for fermenting D-xylose. **Trends in Biotechnology**, v. 3, p. 208-212, 1985.

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y. S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v. 25, p. 319-326, 2007.

JEFFRIES, T. W.; KURTZMAN, C. P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 922-932, 1994.

JEFFRIES, T. W.; VAN VLEET, J. R. H. *Pichia stipitis* genomics, transcriptomics, and gene clusters. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 793-807, 2009.

JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanolic fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1242-1246, 1994.

KADAM, K. L.; NEWMAN, M. M. Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 47, p. 625-629, 1997.

KASENO; KOKUGAN, T. The effect of molasses pretreatment by ceramic microfiltration membrane on ethanol fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 577-582, 1997.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 456-475, 1999.

KILIAN, S. G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 545-548, 1988.

KIRK, P. L. Kjeldahl method for total nitrogen. **Analytical chemistry**, v. 22, p. 354-358, 1950.

KNOSHAUG, E. P.; FRANDEN, M. A.; STAMBUK, B. U.; ZHANG, M.; SINGH, A. Utilization and transport of L-arabinose by non-*Saccharomyces cerevisiae*. **Cellulose**, v. 16, p. 729-741, 2009.

KUNDU, S.; PANDA, T.; MAJUMDAR, S. K.; GUHA, B.; BANDYOPADHYAY, K. K. Pretreatment of indian cane molasses for increased production of citric acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1114-1121, 1984.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. New York: Elsevier, 1997. 1055p.

KURTZMAN, C. P.; SUZUKI, M. Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*. **Mycoscience**, v. 51, p. 2-14, 2010.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. Sampling procedures for non-newtonian fermentation broths. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, p. 579-581, 1973

LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS yeast research**, v. 9, p. 511-525, 2009.

LEE, H.; FISHER, B. G. Unusual fructose utilization by *Pichia stipitis* and its potential application. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, p. 79-82, 1990.

LEE, Y. K. **Microbial biotechnology: principles and applications**. Toh Tuck Link: World Scientific Publishing Co, 2006. 808p.

LI, Y.; ZHANG., Z.; LEI, Z.; YANG, Y.; UTSUMI, M.; SUGIURA, N. Influence of metal addition on ethanol production with *Pichia stipitis* ATCC 58784. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 491-497, 2009.

LIU, H-S.; CHOU, C-M.; LEE, Y-C. The effect of K_{La} on the ethanol yield for xylose fermentation. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 33, p. 161-166, 2002.

LIU, T.; ZOU, W.; LIU, L.; CHEN, J. A constraint-based model of *Scheffersomyces stipitis* for improved ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 72-83, 2012.

LIU, Y-P.; ZHENG, P.; SUN, Z-H.; NI, Y.; DONG, J-J.; ZHU, L-L. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1736-1742, 2008.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1, p. 393-412, 1959.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A.; CLARK, D. P. **Brock: biology of microorganisms**. San Francisco: Pearson, 2012. 1043p.

MAITRA, P. K.; LOBO, Z. A kinetic study of glycolytic enzyme synthesis in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 475-488, 1971.

MARQUES, P.V. (Coord.) **Custos de produção agrícola e industrial de açúcar e álcool no Brasil na safra 2007/2008**. Piracicaba: Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Programa de Educação Continuada em Economia e Gestão de Empresas/Departamento de Economia, Administração e Sociologia. 2009. 194 p. Relatório apresentado a Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil – CNA.

MCMILLAN, J. D.; BOYNTON, B. L. Arabinose utilization by xylose-fermenting yeasts and fungi. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 45-46, p. 569-584, 1994.

MENDES, C. V. T.; CARVALHO, M. G. V. S.; BAPTISTA, C. M. S. G.; ROCHA, J. M. S.; SOARES, B. I. G.; SOUSA, G. D. A. Valorization of hardwood hemicelluloses in the kraft pulping process by using an integrated biorefinery concept. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 197-207, 2009.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech**, v.3, p. 373-379, 2013.

NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17–27, 2001.

NOGUEIRA, L. A, H. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES and CGEE Organização, 2008. 316p.

NUÑEZ, M. J.; CHAMY, R.; DOMINGUEZ, H.; SANROMAN, A.; LEMA, J. M. Continuous fermentation of D-xylose by immobilized *Pichia stipitis*. Comparison between CSTR and CPFR. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28/29, p. 731-739, 1991.

OLBRICH, H. **The molasses book**. Berlin: Fermentation Technologist, Institute für Zuckerindustrie, 1963.

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

PAPINI, M.; NOOKAEW, I.; UHLÉN, M.; NIELSEN, J. Scheffersomyces stipitis: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 136-152, 2012.

PAZOUKI, M.; FELSE, P. A.; SINHA, J.; PANDA, T. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 353-361, 2000.

PIRT, S. J. The maintenance energy of bacteria in growing cultures. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 163, p. 224-231, 1965.

PONCET, S. Analyse numérique des 50 espèces classées dans le genre *Pichia* (Ascomycetes). Seconde application d'une méthode d'analyse factorielle. **Mycopathologia**, v. 57, p. 99-108, 1975.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas – SP: Casa do Espírito Amigo Fraternidade, Fé e Amor, 2009, 358p.

RUDOLF, A.; BAUDEL, H.; ZACCHI, G.; HAHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. **Biotechnology and bioengineering**, v. 99, p. 783-790, 2008.

SANTOS, A. M. 2008. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada**. 2008. 77p. Dissertação (Mestrado) Unidade Acadêmica Centro de Tecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.

SARAIVA, R. Q. **Avaliação do histórico de auditorias da qualidade de uma empresa do setor sucroalcooleiro**. 2008. 61p. Monografia (Pós-Graduação em Gestão da Qualidade e da Produtividade) - Escola Politécnica, Universidade de Pernambuco, Recife, 2008.

SARKS, C.; JIN, M.; SATO, T. K.; BALAN, V.; DALE, B. E. Studying the rapid bioconversion of lignocellulosic sugars into ethanol using high cell density fermentations with cell recycle. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, p. 73, 2014.

SCHMIDELL W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**: engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541p.

SHI, N-Q.; PRAHL, K.; HENDRICK, J.; CRUZ, J.; LU, P.; CHO, J-Y.; JONES, S.; JEFFRIES, T. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 201-216, 2000.

SILVA, J. P. A.; MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C.; TEIXEIRA, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1306-1315, 2010.

SINGH, R.; GHOSH, S. K. **Industrial biotechnology**. Delhi: Global Vision Publishing House, 2004. 340p.

SINGH, V. K.; VADEHRA, D. V.; GUPTA, J. K. Occurrence of an organic inhibitor in cane molasses affecting citric acid production by *Aspergillus niger*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 341-343, 1981.

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

SKOOG, K.; JEPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 34-35, p. 369-375, 1992.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; OKOS, M. R.; LADISCH, M. R. Comparative evaluation of ethanol production by xylose-fermenting yeasts presented high xylose concentrations. **Biotechnology Letters**, v. 7, p. 431-436, 1985.

SLININGER, P. J.; BRANSTRATOR, J. E.; LOMONT, J. M.; DIEN, B. S.; OKOS, M. R.; LADISCH, M. R.; BOTHAST, R. J. Stoichiometry and kinetics of xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 589, p. 25-40, 1990.

SLININGER, P. J.; BRANSTRATOR, L. E.; BOTHAST, R. J.; OKOS, M. R.; LADISCH, M. R. Growth, death, and oxygen uptake kinetics of *Pichia stipitis* on xylose. **Biotechnology and bioengineering**, v. 37, p. 973-980, 1991.

SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 1285-1296, 2006.

SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; LOMONT, J. M.; BOTHAST, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R. Evaluation of a kinetic model for computer simulation of growth and fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* fed D-xylose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, p. 1532-1540, 2014.

SLININGER, P. J.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Culture nutrition and physiology impact the inhibitor tolerance of the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p. 778-790, 2009.

SLININGER, P. J.; PETROSKI, R. J.; LADISCH, M. R.; OKOS, M. R.; BOTHAST, R. 1989. Measurement of oxygen solubility in fermentation media: A colorimetric method. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 33, p. 578-583, 1989

STUPIELLO, S. P.; MARINO, E. A.; CELINSKI, R. **Fermentação**. Piracicaba: COPERUCAR, 1973. 79p.

TELLI-OKUR, M.; EKEN-SARAÇOĞLU, N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 99, p.2162-2169, 2008.

THOMSEN, M. H. Complex media from processing of agricultural crops for microbial fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 598-606, 2005.

TORQUERO, C.; BOLADO, S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 68-76, 2014.

UNREAN, P.; NGUYEN, N. H. A. Optimized fed-batch fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for efficient production of ethanol from hexoses and pentoses. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 169, p. 1895-1909, 2013.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; JACQUES, R. A.; JÚNIOR, A. F. Pré-tratamentos de melaço de cana-de-açúcar e água de maceração de milho para a bioprodução de carotenoides. **Química Nova**, v. 30, p. 1860-1866, 2007

VAN URK, H.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P. Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 135, p. 2399-2406, 1989.

VANKUYK, P. A.; VRIES, R. P.; VISSER, J.; RAM, A. F. J.; HONDEL, C. A. M. J. J.; BATTAGLIA, E.; DUARTE, D. A. V. **Pentose transporters and uses thereof**. U.S. Patent Application 13/509,299, 12 nov. 2010.

VILLAVICENCIO, A. R. N.; SANT'ANNA, E. S.; TÔRRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, 1999.

WALKER, G.M. Yeasts. In: SCHAECHTER, M. **Desk encyclopedia of microbiology**. London: Elsevier/Academic Press, 2009, p. 1174-1187.

WALTON, S.; HEININGEN, A. V.; WALSUM, P. V. Inhibition effects on fermentation of hardwood extracted hemicelluloses by acetic acid and sodium. **Bioresource Technology**, v. 101, 1935–1940, 2010.

WANG, L.; HATZIMANIKATIS, V. Metabolic engineering under uncertainty-II: analysis of yeast metabolism. **Metabolic Engineering**, v.8, p. 142-159, 2006.

WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685-697, 1990.

WEIERSTALL, T.; HOLLENBERG, C. P.; BOLES, E. Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. **Molecular Microbiology**, v. 31, p. 871-883, 1999.

YOUNG, E. M.; COMER, A. D.; HUANG, H.; ALPER, H. S. A molecular transporter engineering approach to improving the xylose catabolism in *Sccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 401-411, 2012.

YOUNG, E.; LEE, S-M.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for biofuels**, v. 3, p. 24-24, 2010.

YOUNG, E.; POUCHER, A.; COMER, A.; BAILEY, A.; ALPER, H. Functional survey for heterologous sugar transport proteins, using *Saccharomyces cerevisiae* as a host. **Applied and environmental microbiology**, v. 77, p. 3311-3319, 2011.

ZALDIVAR, J.; BORGES, A.; JOHANSSON, B.; SMITS, H. P.; VILLAS-BÔAS, S. G.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fermentation performance and intracellular metabolite patterns in laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 436-442, 2002.

ZHOU, H-L.; SHI, W-J. Construction of bovine serum albumin nanostructure by scanning probe nanolithography. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, p. 884-887, 2009.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Cálculo do nível máximo de melaço de cana-de-açúcar e fosfato de amônio dibásico

1. Cálculo do nível máximo de melaço

- Suplemento referência (Extrato de levedura, extrato de malte e peptona; 3:3:5) $\rightarrow$ 6,4774% (m/m) de cinzas.
- Melaço de cana-de-açúcar $\rightarrow$ 7,4723% (m/m) de cinzas.

Em solução:

- Suplemento referência (3 g/L de extrato de levedura + 3 g/L de extrato de malte + 5 g/L de peptona = 11 g/L) $\rightarrow$ 0,7125 g/L de cinzas.

100,0000 g de melaço $\rightarrow$ 7,4723 g de cinzas
 $x \rightarrow$ 0,7125 g de cinzas

x = 9,5352 g de melaço

2. Cálculo do nível máximo de fosfato de amônio dibásico

- Suplemento referência (Extrato de levedura, extrato de malte e peptona; 3:3:5) $\rightarrow$ 9,3143% (m/m) de nitrogênio.

Tabela A1. Teor de nitrogênio do fosfato de amônio dibásico ((NH₄)₂HPO₄)

Átomo	Massa	Quantidade de átomos	Massa total	Massa percentual
N	14	2	28	21,2121
H	1	9	9	6,8282
P	31	1	31	23,4848
O	16	4	64	48,4848
			132	100.00

Fosfato de amônio dibásico $\rightarrow$ 21,2121% (m/m) de nitrogênio

Em solução:

- Suplemento referência (3 g/L de extrato de levedura + 3 g/L de extrato de malte + 5 g/L de peptona = 11 g/L) $\rightarrow$ 1,025 g/L de nitrogênio.

100,000 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4 \rightarrow 21,2121$ g de nitrogênio

x $\rightarrow$ 1,0245 g de nitrogênio

x = 4,8298 g de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

APÊNDICE B - Validação da metodologia para determinação do teor de nitrogênio

Tabela B1. Composição das amostras referência utilizadas na validação da metodologia para determinação do teor de nitrogênio

Amostra	Massa (g)	
	Albumina	(NH ₄)H ₂ PO ₄
A	0,0252	0,0279
B	0,0253	0,0254

Tabela B2. Teor de nitrogênio do fosfato de amônio monobásico ((NH₄)H₂PO₄)

Átomo	Massa	Quantidade de átomos	Massa total	Massa percentual
N	14	1	14	12,1739
H	1	6	6	5,2174
P	31	1	31	26,9565
O	16	4	64	55,6522
			115	100.00

Na amostra A:

100,0000 g de (NH₄)H₂PO₄ → 12,1739 g de nitrogênio

0,0279 → x

x = 0,0034 g de nitrogênio

Na amostra B:

100,0000 g de (NH₄)H₂PO₄ → 12,1739 g de nitrogênio

0,0254 → y

y = 0,0031 g de nitrogênio

- Teor de nitrogênio da albumina bovina = 16% (ZHOU; SHI, 2009).

Na amostra A:

100,0000 g de albumina → 16,0000 g de nitrogênio

0,0252 → x

x = 0,0040 g de nitrogênio

Na amostra B:

100,0000 g de albumina → 16,0000 g de nitrogênio

0,0253 → y

y = 0,0040 g de nitrogênio

Tabela B3. Teor de nitrogênio das amostras referência utilizadas na validação da metodologia para determinação do teor de nitrogênio

Amostra	Massa de nitrogênio teórica		
	Albumina	NH ₄ H ₂ PO ₄	Total
A	0,0040	0,0034	0,0074
B	0,0040	0,0031	0,0071