UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ADRIANA DILON FERREIRA

**Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de
etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**

**Lorena – SP
2010**

ADRIANA DILON FERREIRA

Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

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

Orientador: Dr. Silvio Silvério da Silva

Lorena – SP

2010

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Ferreira, Adriana Dilon

Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar / Adriana Dilon Ferreira ; orientador Sílvio Silvério da Silva. – Lorena: 2010. 119 pág. : fig.

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

1. Bagaço de cana-de-açúcar 2. Hidrolisado hemicelulósico 3. Fermentação 4. *Pichia stipitis* 5. Etanol. I. Título

664.113 - CDU

A meu querido filho Felipe, meus pais, Marly e José Maria (in memorian) em algum lugar está olhando por mim, a minhas irmãs, Andréia e Lílian, sobrinhos Aron e Alec, ao Paulo, a todos com amor, compreensão e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, e a Nossa Senhora por interceder sempre por mim quando necessito.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela oportunidade, orientação, amizade, contribuição para meu crescimento científico, intelectual e, sobretudo, pessoal.

À Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

Aos Professores do Debiq, especialmente, Arnaldo Márcio, George, Inês e Graça pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Professor Dr. Carlos Augusto Rosa pela doação da cepa da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

A Dra. Rita pela atenção, carinho, paciência e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos Nicanor, Sr. Ângelo, Djalma, Jussara, José Moreira, Cibele, Paulinho, pelo auxílio técnico no laboratório. Sem deixar de agradecer a: Zé Cobrinha, André, Ismael, Lílian, Valquíria e colegas da Biblioteca, pela atenção e boa vontade de sempre. Aos alunos de iniciação científica pela ajuda.

As sempre prestativas e atenciosas Sandra, Cida e Bia.

Aos funcionários carinhosamente chamados de azulinhos, Zé Arthur, José Maria pela ajuda.

A todos os colegas e amigos Rondinele, Juan, Adriana M., Cláudia, Boutros, Pche, Bruno, Flávio, Ricardo, Guilherme, Germano, Gina, Giovani, Josi, Carol, Juliana, Michel, Paula, Robson, Sérgio, Wagner, Priscila Vaz, Luciana, Luanda, João Paulo, Lívia, Dani Cortez, Dani Garcia, Fernanda, Vinícius, Fernando, Patrícia, Rafael, Priscila, Raquel pela colaboração e convivência.

A amiga Tais obrigada por tudo pelo apoio, amizade e carinho.

A Luiza pela amizade, convivência e pelas palavras amigas.

A Kelly obrigada pela amizade sincera, companhia, a ajuda despretensiosa, apoio nos momentos difíceis, e sobretudo por confiar em minha capacidade.

A toda minha família por acreditarem em mim e pelo apoio de sempre.

Todos aqueles vocês que contribuíram de alguma maneira para realização deste trabalho, principalmente cuidando de meu filho, muito obrigada.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

Ferreira, A. D. **Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2010. 119p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Atualmente, a bioprodução de etanol a partir de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana é de grande interesse nacional e científico. Para utilização destes materiais em processos biotecnológicos procedeu-se sua hidrólise em função de sua constituição complexa em celulose, hemicelulose e lignina. Após hidrólise ácida branda obteve-se um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e outros açúcares juntamente com compostos tóxicos a atividade microbiana como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos. Este trabalho avaliou a necessidade da suplementação nutricional bem como a concentração inicial de xilose e células no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre os parâmetros fermentativos de sua bioconversão a etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2. Os ensaios foram realizados de acordo com um planejamento fatorial completo 2^3 com face centrada tendo como resposta o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$). Na suplementação do hidrolisado avaliou-se a adição dos seguintes nutrientes: $MgSO_4$ (0 a 1,0 g/L), extrato de levedura (0 a 5,0 g/L) e uréia (0 a 5,0 g/L). Neste estudo observou-se que o extrato de levedura (5,0 g/L) exerceu maior influência sobre o processo fermentativo alcançando máximos valores de $Y_{P/S}$ (0,13 g/L) e produtividade volumétrica em etanol (0,07 g/L.h) não necessitando da adição dos demais nutrientes. Ao se avaliar a concentração inicial de xilose (30; 52,5; 75 g/L) bem como a concentração celular inicial (0,5; 1,0; 2,0 g/L) no hidrolisado observou-se uma melhoria significativa no valor de $Y_{P/S}$ (0,19 g/g) utilizando máxima concentração celular inicial (2 g/L) associada com menor concentração de xilose inicial (30 g/L). Estes resultados indicaram que a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 favoreceu a conversão em etanol $Y_{P/S}$ (0,19 g/g), mostrando que a levedura teve melhor comportamento a baixas concentrações de xilose. Este estudo demonstrou que a levedura *P. stipitis* UFMG-IMH 43.2 mostrou-se como uma alternativa viável para a produção de bioetanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Hidrolisado hemicelulósico. Bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação. *Pichia stipitis*. Etanol.

ABSTRACT

Ferreira, A. D. **Utilization of *Pichia stipitis* IMH 43.2 yeast for ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.** 2010. 119p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

Currently, ethanol bioproduction from lignocellulosic materials such as sugarcane bagasse is of great national and scientific interest. For utilization of these materials in biotechnological processes according mild acid hydrolysis is required to complex constitution of cellulose, hemicellulose and lignin. After mild acid hydrolysis, a hemicellulosic hydrolyzate rich in xylose and other sugars together with toxic compounds to microbial activity as acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural and phenolics was obtained. The studies on the hydrolysate supplementation evaluated the nutrients addition: MgSO_4 (0 to 1.0 g/L), yeast extract (0 to 5.0 g/L) and urea (0 to 5.0 g/L) and effects of initial xylose and cell concentration for ethanol production by *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 yeast were evaluated. The experiments were performed according to factorial design central composite face centered 2^3 using $Y_{P/S}$ as response factor. This study showed that only the addition of 5.0 g/L yeast extract was enough to obtained $Y_{P/S}$ equal to 0.13 g/L and productivity of 0.07 g/L-h. The evaluation of initial xylose concentration (30; 52,5; 75 g/L) and initial cell concentration (0,5; 1,0; 2,0 g/L) showed a significant influence on fermentation parameter $Y_{P/S}$. The best conditions were achieved using initial cell concentration of 2.0 g/L and initial xylose concentration of 30 g/L with $Y_{P/S}$ equal to 0.19 g/g, showing that this yeast strain had better performance at low xylose concentrations. This study demonstrated that *P. stipitis* UFMG-IMH 43.2 yeast was a promising alternative for bioethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.

Key-words: Hemicellulosic hydrolysate, sugarcane bagasse, fermentation, *Pichia stipitis*, Ethanol.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1. Materiais Lignocelulósicos – Composição e Processos de Hidrólise	17
2.1.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar – <i>Composição e Utilização</i>	26
2.2. Etanol – Propriedades e Aplicações.....	28
2.2.1 Produção de Etanol	29
2.2.1.1 Processo Químico	29
2.2.1.2 Processo Microbiológico de Produção de Etanol de Segunda Geração.....	29
2.2.1.2.1 Fermentação de Pentose.....	31
2.2.1.2.1.1 Via Metabólica de Xilose em Leveduras.....	34
2.2.1.2.2 A levedura <i>Pichia stipitis</i> fermentadora de xilose a etanol.....	37
2.2.1.2.2.1 A levedura <i>Pichia stipitis</i> UFMG-IMH 43.2.....	38
2.2.1.2.3 Alguns Fatores que Influenciam na produção de Etanol a partir de Xilose.....	40
2.2.1.2.3.1 pH	40
2.2.1.2.3.2 Temperatura.....	41
2.2.1.2.3.3 Oxigênio	42
2.2.1.2.3.4 Suplementação e Fonte de Carbono.....	44
2.2.1.2.3.5 Tolerância a Etanol.....	47
3. OBJETIVOS	49
3.1. Geral	49
3.2. Específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1. Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	50
4.2. Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico	50

4.3. Fermentações	51
4.3.1 Microrganismo.....	51
4.3.2 Preparo do Inóculo	52
4.3.3 Efeito da suplementação do Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	53
4.3.4 Efeito da Concentração celular inicial e de Hidrolisado	54
4.4. Métodos Analíticos	56
4.4.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, glicerol e etanol.....	56
4.4.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	56
4.4.3 Determinação da concentração celular	57
4.4.4 Determinação do pH.....	57
4.4.5 Viabilidade e Pureza da Cultura.....	57
4.4.6 Cálculo dos Parâmetros Fermentativos	58
4.4.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$)	58
4.4.6.2 Eficiência de conversão de açúcares totais em etanol ($\eta\%$)	58
4.4.6.3 Produtividade em etanol (Q_P , g etanol/L.h).....	58
4.4.6.4 Porcentagem de consumo de xilose ($Y\%$).....	58
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	59
5.2. Processo Fermentativo	62
5.2.1. Efeito da suplementação do hidrolisado.....	62
5.2.2. Efeito da concentração de xilose e células na produção de etanol	78
6. CONCLUSÕES	98
7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	100
REFERÊNCIAS	101
APÊNDICES	112

1. INTRODUÇÃO

O atual abastecimento energético no mundo é representado em cerca de 80% pelos combustíveis fósseis, 6,9% pela energia nuclear e 13,6% por fontes renováveis de energia (GOLDEMBERG, 2008). Nesse contexto, as fontes de energia baseadas em petróleo, carvão e gás natural são responsáveis por cerca de 3/4 do consumo de energia primária no mundo, correspondendo a 33, 24 e 19% desse consumo, respectivamente, e as alternativas a essas fontes de energia representam, somente, cerca de 1/4 do consumo de energia primária (STOCKER, 2008).

À medida que aumenta a preocupação a respeito de questões de natureza política entre países, decréscimo das reservas de petróleo, aumento da demanda e dependência sobre os combustíveis fósseis, e das mudanças climáticas e de poluição ambiental, a pesquisa por fontes de energia renováveis que possam reduzir ou mesmo sanar tais problemas tem se tornado uma questão de atenção generalizada (DE OLIVEIRA; VAUGHAN; RYKIEL JR., 2005; STOCKER, 2008). Desta forma torna-se importante a busca por tecnologias que mais rápido para fontes limpas e renováveis (RAGAUSKAS et al., 2006).

O combustível renovável mais comum é o etanol, o qual é também utilizado como insumo industrial e na área de bebidas. Em média, 73% da produção mundial de etanol correspondem ao etanol combustível, 17% ao etanol utilizado em bebidas e 10% ao etanol destinado a fins industriais (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). Estes combustíveis usam como matéria-prima elementos renováveis para a natureza, como a cana-de-açúcar, o amido de milho e o açúcar de beterraba, entre outros.

Entretanto, o uso de áreas destinadas ao cultivo de tais culturas voltadas para essa aplicação causa competição com áreas necessárias ao cultivo de alimentos e áreas de preservação ambiental. Tal fato tornou-se a principal força motriz para o desenvolvimento e implementação de tecnologias avançadas na produção de etanol a partir de produtos agrícolas de baixo valor ou resíduos, como aparas de madeira, bagaço de cana, sabugo de milho, palha de casca de arroz, cavacos de eucalipto (LUO; VAN DER VOET; HUPPES, 2009).

Estes resíduos são formados por celulose, hemicelulose e lignina e podem transformar-se em biocombustível quando submetidos a reações de hidrólise, um processo químico, físico ou enzimático de quebra de moléculas. Uma grande vantagem dessa abordagem seria reduzir a competição crescente em relação ao destino das culturas, ou para alimentação (humana ou animal) ou para fins energéticos, produzindo, no caso do aproveitamento do bagaço, mais etanol por área plantada.

Neste contexto os materiais lignocelulósicos, por representar uma abundante fonte de energia renovável em todo o mundo, apresentam grande potencial de uso como matéria prima em processos industriais para produção de bens de consumo diversos como combustíveis, insumos químicos, alimentos dentre outros (TAYLOR, 2008).

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é uma das matérias-primas lignocelulósicas mais abundantes. Esta condição é muito vantajosa fazendo com que o bagaço de cana se sobressaia na corrida para produção de etanol de segunda geração. Dessa forma, a conversão custo-efetiva, sustentável e economicamente eficiente do bagaço de cana de açúcar a etanol implica em uma hidrólise eficiente e com baixo custo e na utilização de linhagens microbianas

capazes de fermentar não somente a glicose, mas todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos, tais como xilose, arabinose, celobiose, galactose e manose, com alto rendimento e produtividade em etanol (VAN MARIS et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; BETTIGA; HAHN-HÄGERDAL; GORWA-GRAUSLUND, 2008; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009).

A xilose é o segundo açúcar mais abundante em materiais lignocelulósicos e sua conversão eficiente a etanol tem sido estudado recentemente (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Entretanto as pentoses, por sua vez, são mais difíceis de fermentar (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; GÍRIO et al., 2010), sendo fonte de diferentes estudos envolvendo processos biotecnológicos de utilização destes açúcares para a produção de etanol.

A habilidade dos microrganismos de fermentar glicose e xilose a etanol é a chave para tornar o processo economicamente viável. Cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de metabolizar xilose (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999). Já, leveduras tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* são capazes de fermentar glicose e xilose a etanol. Dessa forma, o futuro para produção de etanol de segunda geração, depende da descoberta e obtenção de microrganismos e enzimas mais baratos e eficientes para emprego no processo fermentativo.

A bioconversão da xilose em etanol é regulada por diversos fatores como pH, temperatura, aeração, substrato e suplementação nutricional. Os estudos em meios sintéticos têm apresentado resultados promissores frente à otimização dos diferentes fatores em comparação com hidrolisados hemicelulósicos de bagaço

de cana-de-açúcar devido à que estes hidrolisados apresentam uma complexa composição química.

Os estudos envolvendo o aproveitamento de materiais lignocelulósicos é uma das linhas de pesquisa bastante consolidada, na Área de Conversão de Biomassa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da Universidade de São Paulo(USP) que visa o aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica de bagaço de cana-de-açúcar por processos fermentativos.

Neste trabalho utilizou-se a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 isolada da Mata Atlântica brasileira cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. A proposta deste trabalho foi avaliar o comportamento dessa levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em função da variação da concentração de açúcares do hidrolisado, suplementação do meio e concentração inicial de células.

A capacidade de assimilação da xilose por diferentes leveduras são fatores que impulsionam a busca de alternativas para utilização de bagaço de cana-de-açúcar de modo potencial para bioconversão da xilose em etanol. Desta forma pretende-se contribuir para o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias que contribuíram para o estudo da obtenção de etanol de segunda geração.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Materiais Lignocelulósicos – Composição e Processos de Hidrólise

Os materiais lignocelulósicos, fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentam grande potencial como matéria-prima em processos industriais para produção de alimentos, combustível, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (LATIF; RAJOKA, 2001; U.S. DEPARTMENT, 2009). Estes materiais, correspondendo a resíduos agrícolas e florestais, representam uma das fontes de energia renováveis mais abundantes do planeta.. Dentre os resíduos estudados, destaca-se no Brasil o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo e o cavaco de eucalipto, que são abundantes em diversas regiões do país.

O aproveitamento destes materiais relaciona-se com a sua constituição. Basicamente os resíduos lignocelulósicos são constituídos de celulose, hemicelulose, lignina e uma pequena quantidade de extrativos e cinzas. As proporções de todos os constituintes variam para cada espécie vegetal (KUHAD; SINGH, 1993). A Tabela 2.1 apresenta a composição aproximada de alguns materiais lignocelulósicos encontrados na natureza.

Tabela 2.1 Composição (%) de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Hexosanas	Pentosanas	Lignina	Cinzas
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29	4
Casca de amendoim	38	36	16	5
Casca de arroz	36	15	19	20
Palha de arroz	32	24	13	12
Palha de aveia	41	6	11	12
Palha de cevada	40	20	15	11
Palha de sorgo	33	18	15	10
Palha de trigo	30	24	18	10
Pinus	41	10	27	8
Sabugo de milho	42	39	14	2
Serragem	55	14	21	5
Talo de Milho	35	15	19	5

Fonte: Kuhad e Singh (1993)

A lignina é um polímero derivado de unidades fenilpropanóides que têm sua origem na polimerização desidrogenativa do álcool coniferílico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A lignina deve ser definida claramente de acordo com o trabalho em questão, devido à grande diversidade de maneiras de tratamento para seu isolamento. Lapierre (1993) classificou a lignina em *core* e *não core*, com base em sua susceptibilidade relativa à hidrólise. A lignina *não core*, consiste de compostos fenólicos de baixo peso molecular, liberados da parede celular por hidrólise, que é representada por ácidos p-hidroxicinâmico éster-ligados. A lignina *core*, consiste de polímeros fenilpropanóides da parede celular, altamente condensados e muito resistentes à degradação. Eles são compostos de unidades p-hidroxifenila (H), guaiacila (G) e siringila (S), em proporções diferentes, de acordo com sua origem (Figura 2.1).

Figura 2.1 Compostos da lignina

A lignina é um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, ocorrendo em vegetais e tecidos vasculares. Sabe-se que a lignina tem um importante papel no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica de vegetais, além de proteger os tecidos contra o ataque de microrganismos. Os fungos, algas e líquens não são lignificados (FENGEL; WEGENER, 1989). Sua degradação através da hidrólise dos resíduos lignocelulósicos libera compostos fenólicos, álcoois aromáticos e aldeídos, caracterizados como inibidores do metabolismo microbiano (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000; GÍRIO et al., 2010)

A celulose, outro componente dos resíduos lignocelulósicos, considerada como o mais abundante e importante biopolímero, é formada por moléculas de glicose unidas por ligações β (1 $\rightarrow$ 4). A molécula de celulose é linear e apresenta ligações de hidrogênio intra e intermoleculares (Figura 2.2). As ligações intramoleculares auxiliam na manutenção da rigidez da cadeia de celulose, enquanto que as intermoleculares mantêm as cadeias em um arranjo firme e compacto. Duas regiões distintas são visualizadas na molécula: a região cristalina, que apresenta moléculas altamente orientadas e apresenta resistência à degradação microbiana, e a região amorfa, onde há uma menor orientação

entre as moléculas, sendo, portanto, mais facilmente hidrolisada (FENGEL; WEGENER, 1989).

Assim como a celulose, as hemiceluloses são polímeros que aparecem em grandes quantidades nos resíduos lignocelulósicos. São heteropolissacarídeos formados por cadeias lineares apresentando ramificações laterais, sendo compostas por hexoses (glicose, manose, galactose), pentoses (xilose e arabinose) e ácidos urônicos (Figura 2.2).

Figura 2.2 Estrutura da Celulose, Hemicelulose e Lignina
Fonte: Bidlack, Malone e Benson (1992)

A fração hemicelulósica é mais facilmente hidrolisável do que a celulose graças à heterogeneidade dos componentes e seu estado amorfo (JEFFRIES,

1983), o que permite a utilização dos seus açúcares, como a xilose, para a produção de diferentes produtos de interesse, como, por exemplo, o xilitol (CARVALHO et al., 2004; SANTOS; CONVERTI et al., 2005; SANTOS; MUSSATTO et al., 2005; SARROUH, 2009), etanol, butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001).

A hemicelulose e a lignina juntas formam uma matriz em torno da celulose, e assim penetram nos espaços vazios entre as moléculas de celulose na região amorfa, contribuindo com o aumento na rigidez do vegetal. Os materiais lignocelulósicos *in natura*, devido as suas características, não permitem acessibilidade adequada aos seus componentes. Diversos fatores afetam a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, como a porosidade do material, a cristalinidade da celulose e os conteúdos de lignina e hemicelulose (MCMILLAN JAMES, 1994).

A xilana constitui o principal componente da hemicelulose. É um polissacarídeo formado por um esqueleto de unidades de xilose β -1,4 ligadas, parcialmente substituídas por cadeias laterais de acetil, glicuronosil e arabinosil (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; FEI; HONGZHANG, 2009). Esse polímero é encontrado na interface entre a lignina e a celulose, e acredita-se que seja importante para a coesão das fibras e para a integridade da parede celular (BEG et al., 2001). A xilana é encontrada em grandes quantidades em madeiras mais duras, de angiospermas (15-30% do conteúdo da parede celular) e madeiras macias (resinosas) em gimnospermas (7-10%), assim como em plantas anuais (<30%) (SINGH; MADLALA; PRIOR, 2003). Devido à sua complexidade e

heterogeneidade, a hidrólise completa da xilana requer uma grande variedade de enzimas atuando cooperativamente (SUBRAMANIYAN; PREMA, 2002).

O primeiro passo para o bioprocesso de produção do etanol lignocelulósico é um pré-tratamento (Figura 2.3) e diferentes métodos de pré-tratamento tem sido desenvolvidos (GÍRIO et al., 2010).

De acordo com Galbe e Zacchi (2007), para um pré-tratamento ser considerado efetivo, deve apresentar algumas características, como: resultar em alta extração de açúcares; permitir alta digestibilidade da celulose, no caso de subsequente hidrólise enzimática; produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que serão tóxicos aos microrganismos; ter uma baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário; ter um baixo custo de capital e operacional.

Figura 2.3 Pré-tratamento da estrutura lignocelulósica do bagaço de cana de açúcar. Fonte: U.S. Department (2009)

Estratégias de pré-tratamento têm sido categorizadas em pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos, ou ainda uma combinação deles (BINOD et al., 2010).

Os tratamentos físicos geralmente são empregados como um primeiro estágio na abertura da estrutura lignocelulósica para daí se aplicar um tratamento hidrolítico químico (ácido ou alcalino) ou biológico (com enzimas ou células). Entre os tratamentos físicos destacam-se a moagem, a trituração ou o esfarelamento mecânicos e a explosão com vapor (GALBE; ZACCHI, 2007).

Os processos mecânicos, como a moagem, reduzem o tamanho da partícula, reduzem a cristalinidade e causam a quebra de ligações de longas cadeias moleculares (LASER et al., 2002).

A explosão com vapor consiste em tratar a matéria prima com vapor saturado sob alta pressão, a temperaturas entre 160 e 240 °C por até 20 minutos. Em seguida, a pressão é retirada e a mudança brusca de pressão causa ruptura das ligações de lignina e hemicelulose à celulose. A adição de SO₂ pode aumentar o efeito desse pré-tratamento, assim como a recuperação da hemicelulose (TENGBORG et al., 1998).

No processo biológico, como a biodegradação, são utilizados microrganismos (bactérias e fungos) para degradar determinadas frações do material lignocelulósico. As vantagens deste tipo de pré-tratamento são a baixa energia requerida e condições ambientais brandas. Entretanto, a taxa de hidrólise é ainda considerada baixa (SUN; CHENG, 2002; BINOD et al., 2010).

Os tratamentos químicos geralmente conduzem à formação de compostos intermediários indesejáveis, que podem ser tóxicos aos microrganismos. Um método mais brando e mais específico é a hidrólise enzimática. Visto que

xilanases e esterases mostram diferentes especificidades de substratos, estas enzimas podem ser usadas como ferramentas analíticas na elucidação das formações estruturais (como frequência, posição) das substituições na hemicelulose, bem como para a remoção específica de monossacarídeos e informações sobre as ligações na parede celular (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

O processo de hidrólise enzimática é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores incluindo a glicose. Três tipos de celulasas estão envolvidas no processo de hidrólise: (1) endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase), que age em regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose, (2) exoglucanase (celobiohidrolase ou 1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase), que libera unidades de celobiose, (3) β -glicosidase, que hidrolisa a celobiose liberando, assim, moléculas de glicose. Existem outras enzimas que agem sobre a fração hemicelulósica, como a glucuronidase, acetilesterase, xila β ase, -xilosidade, galactomananase e glucomananase (DUFF; MURRAY, 1996).

Na hidrólise alcalina ocorre o rompimento nas ligações éster entre hemiceluloses e lignina, sendo que o efeito vai depender do conteúdo de lignina do material lignocelulósico. Ocorre um aumento na porosidade do material quando as ligações éster são rompidas. O uso de NaOH diluído causa uma intumescência no material, aumenta a área de superfície interna, diminui o grau de polimerização e a cristalinidade, leva a ruptura da estrutura da lignina (SUN; CHENG, 2002; SUN et al., 2004).

O uso de solventes também se faz para esses efeitos. O processo chamado de organosolv utiliza uma mistura de ácido e solvente orgânico,

geralmente etanol, para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose (PAN et al., 2005).

A hidrólise ácida, empregando ácido sulfúrico diluído, tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica em materiais lignocelulósicos, devido ao seu baixo custo e alta eficiência (SUN; CHENG, 2005).

No processo de hidrólise ácida, o uso de ácidos concentrados como H_2SO_4 e HCl pode levar à ocorrência de corrosão no equipamento. Desta forma, o emprego de ácidos diluídos tem mostrado eficiência ao fornecer soluções com alta concentração de açúcares, baixas concentrações de compostos inibitórios, sem causar os problemas causados pelos ácidos concentrados. O processo consiste em hidrolisar a fração hemicelulósica, sendo que as frações lignina e celulose permanecem quase inalteradas. Alguns ácidos diluídos utilizados para a hidrólise ácida são: ácido sulfúrico, hidroclórico, acético e nítrico (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; SARROUH et al., 2007; KUMAR et al., 2009; GÍRIO et al., 2010; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). O produto da hidrólise é uma solução contendo principalmente açúcares, como xilose, glicose e arabinose. Outros produtos como oligômeros, furfural, ácido acético, hidroximetilfurfural, metais pesados (cromo, cobre, níquel e ferro) proveniente dos equipamentos de hidrólise, assim como, compostos aromáticos derivados da lignina e dos extrativos da madeira, são também liberados após o procedimento de hidrólise (TEIXEIRA; LINDEN; SCHROEDER, 1999; BINOD et al., 2010).

Dependendo das condições operacionais produtos de degradação também são formados, a partir de açúcares (furano e seus derivados de ácidos fracos) e, em menor quantidade, a partir de lignina (fenólicos) (OLSSON; HAHN-

HÄGERDAL, 1996). Esses compostos também podem inibir os processos de fermentação levando à menor rendimento e produtividade em etanol e, portanto, é necessário para melhorar o desempenho realizar um tratamento de destoxificação antes da fermentação (GÍRIO et al., 2010).

2.1.1 Bagaço de Cana-de-Açúcar – *Composição e Utilização*

Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de cana de açúcar mundial. Segundo o Ministério da Agricultura, a previsão do total de cana moída deverá atingir uma safra com aproximadamente 665 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas, este volume representa um aumento de 9,9% em relação a safra 2009 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010). Do total da cana processada, 45,4 % foram destinadas à produção de açúcar, e o restante, 54,6 %, destinados à produção de álcool, deve gerar um volume total de 28.500 milhões de litros de álcool, deste total, 8 milhões de litros são de álcool anidro e 20 milhões de litros serão de álcool hidratado (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010). Deste montante, o bagaço representa cerca de 30 % (199,2 milhões de toneladas). Considerado um combustível não eficiente em seu estado bruto devido a umidade variável e da falta de densidade sendo a maior parte utilizada pela própria indústria sucroalcooleira como fonte de energia (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

O Estado de São Paulo continua liderando o *ranking* produtivo do país, com uma estimativa de 384 milhões de toneladas representando cerca de 58 % da cana que será processada em todo o Brasil. Do total produzido, aproximadamente 50 % é destinado à produção de açúcar, 39 % para o álcool e

cerca de 10 % destina-se à fabricação de outros produtos, como cachaça, rapadura e açúcar mascavo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2010).

O processamento industrial de cana-de-açúcar proporciona um aproveitamento total da matéria-prima, ou seja, além da produção de açúcar e álcool, subprodutos podem ser utilizados como fontes geradoras de energia, na produção de adubos, papel e plásticos biodegradáveis (TORQUATO, 2006).

No processamento de cana-de-açúcar são gerados cerca de 270 kg de bagaço a partir de uma tonelada de matéria-prima, sendo que 50 % do total de bagaço gerado se destinam à demanda de energia da usina sucroalcooleira (FROLLINI; PIMENTA, 1997).

O bagaço de cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira (PANDEY et al., 2000), sendo caracterizado como um resíduo fibroso que é produzido após a moagem e extração do caldo de cana-de-açúcar (PANDEY et al., 2000; ANSELMO FILHO; BADR, 2004). Numa primeira fase, o bagaço substituiu a lenha para a geração de calor nas usinas. Atualmente, o vapor produzido através da queima do bagaço é utilizado para gerar três tipos de energia: térmica, transferindo calor para os processos industriais; mecânica, na movimentação de máquinas; e elétrica, através da movimentação de turbinas, suprimindo o consumo energético do parque industrial (COSTA, 2005).

Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de uma utilização sustentável de bagaço de cana-de-açúcar, que contém cerca de 40-45 % de celulose, 30-35 % de hemicelulose e 25 % de lignina (PANDEY et al., 2000). Além da geração de energia elétrica, o bagaço pode ser utilizado ainda para a produção de papel e papelão, aglomerados, ração animal e adubo (PANDEY et

al., 2000). Por um mecanismo de hidrólise, a fração hemicelulósica é separada e os açúcares, como xilose, glicose e arabinose são liberados, podendo ser utilizados em diversos processos biotecnológicos (PANDEY et al., 2000; LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005). O aproveitamento deste resíduo se fundamenta com seu aproveitamento na transformação em produtos úteis para a sociedade, por exemplo, de processos fermentativos para obtenção de proteína microbiana (CRAWFORD et al., 1973); butanodiol (JANSEN; FLICKINGER; TSAO, 1984); xilitol (RODRIGUES et al., 2008); etanol (SARROUH et al., 2007) dentre outros.

2.2. Etanol – Propriedades e Aplicações

O emprego do etanol está centrado na geração energética, em todo o mundo, e sua mistura com a gasolina, ou em seu uso direto como combustível. É um composto de extrema importância e possui um papel considerável na matriz energética mundial (LIN; TANAKA, 2005). Todavia, a utilização do etanol é muito mais abrangente do que simplesmente, a produção de energia. O etanol, desde a sua descoberta, esteve ligado ao dia a dia do homem sendo a indústria alimentícia a pioneira em seu uso. Este álcool é utilizado em diversos segmentos como solvente, componente de formulações médicas, na indústria de higiene e limpeza, alimentícia e muitas outras de origem química, petroquímica ou biotecnológica. É matéria prima para processos de produção de ácidos orgânicos, éteres, ésteres, óxidos, hidrocarbonetos e produção de biopolímeros (LIN; TANAKA, 2005).

2.2.1 Produção de Etanol

2.2.1.1 Processo Químico

O etanol pode ser produzido por via química através da hidratação do etileno em um processo catalisado por um ácido forte. O mais conhecido, e já ultrapassado, é o processo de hidratação catalisado por ácido sulfúrico. Neste, o etileno reage diretamente com o sulfato de etila, que é posteriormente hidrolisado, convertendo-se em etanol e com regeneração de ácido sulfúrico, como se pode observar nas seguintes reações 1 e 2 (SCHLITTLER, 2006).

Os processos mais modernos possibilitam produção de etanol através da utilização de zeólitas, carvão ou de sílica aero-gel impregnadas com ácido fosfórico ou tugnístico. Estes processos apresentam a vantagem de serem executados em um único estágio, em termos reacionais, além da possibilidade de regeneração do catalisador e redução dos riscos de segurança e de impacto ambiental (SCHLITTLER, 2006). O etanol também pode ser produzido através da redução química do acetaldeído numa reação em fase vapor, catalisada por óxido de níquel ou cobre (SPEIGHT, 2002).

2.2.1.2 Processo Microbiológico de Produção de Etanol de Segunda Geração

A produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos ocorre através das seguintes etapas: (1) degradação da estrutura lignocelulósica de

matérias-primas para a liberação de substratos fermentescíveis, (2) fermentação e (3) destilação do mosto fermentado (Figura 2.4) (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Figura 2.4 Processo de produção de etanol de segunda geração
Fonte: Peña (2008)

Existem dois principais problemas observados na produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos, de acordo com Olsson e Hahn-Hägerdal (1996) e Hahn-Hägerdal et al. (2007). O primeiro problema surge após a hidrólise do material lignocelulósico, uma vez que o hidrolisado contém não somente açúcares fermentescíveis, mas também substâncias com efeitos inibitórios sobre

os microrganismos utilizados na fermentação. A variação na presença de tais compostos depende do tipo de material lignocelulósico utilizado, bem como da química e natureza do processo de hidrólise empregado. Outro aspecto importante é relacionado ao tipo de açúcar, já que o hidrolisado contém hexoses e também pentoses. Hexoses são facilmente fermentadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, cujo processo já está bem explorado e divulgado. Já as pentoses, por sua vez, são mais difíceis de fermentar (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; GÍRIO et al., 2010), sendo fonte de diferentes estudos envolvendo processos biotecnológicos de utilização destes açúcares para a produção de etanol.

2.2.1.2.1 Fermentação de Pentose

A fermentação é um conjunto de reações enzimáticas, que ocorrem no interior da célula microbiana, com o intuito de gerar energia para o crescimento e manutenção das atividades metabólicas.

A conversão custo-efetiva, sustentável e economicamente eficiente da biomassa a etanol implica na utilização de linhagens microbianas capazes de fermentar não somente glicose, mas todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos, tais como xilose, arabinose, celobiose, galactose e manose, com alto rendimento e produtividade em etanol (VAN MARIS et al., 2006; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; BETTIGA; HAHN-HÄGERDAL; GORWA-GRAUSLUND, 2008; FUKUDA; KONDO; TAMALAMPUDI, 2009). Embora muitas leveduras sejam capazes de assimilar arabinose aerobicamente, a maioria não é capaz de fermentar essa pentose a etanol, por exemplo, a levedura *Pichia stipitis* produz

etanol de glicose, galactose, manose, xilose e celobiose, entretanto, a arabinose é assimilada, mas não fermentada (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; DELLWEG et al., 1990; AGBOGBO et al., 2006; VAN MARIS et al., 2006; GÍRIO et al., 2010).

Usualmente, hexoses em hidrolisados podem ser completamente fermentadas dentro de poucas horas. Entretanto, a completa conversão de xilose a etanol ocorrerá a partir de 48 a 72 horas ou mais (GONG et al., 1999). Particularmente, a fermentação de pentoses, nomeadamente os açúcares xilose e arabinose, representa um desafio único, e a obtenção de organismos eficientes para a fermentação tem sido perseguido nas ultimas décadas (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008; BAJWA et al., 2010; XAVIER et al., 2010).

As leveduras, como são o fator chave na conversão de açúcares a etanol. Organismos capazes de fermentar pentoses presentes na biomassa hemicelulósica podem ser divididos em dois grupos: microrganismos naturalmente fermentadores e microrganismos geneticamente modificados. Os microrganismos naturalmente fermentadores incluem linhagens das leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Organismos geneticamente modificados com capacidade de fermentação de pentoses incluem a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, e as bactérias *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* (SKOOG; HAHN- HAGERDAL, 1988). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, uma das mais eficazes produtoras de etanol, é caracterizada por apresentar uma alta produção de etanol a partir de hexoses e alta tolerância a etanol e outros compostos inibitórios, como os que estão presentes em hidrolisados ácidos de biomassa lignocelulósica (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1993; HAHN-HAGERDAL et al., 2001). Entretanto, a transformação

das pentoses segue uma via metabólica diferente das hexoses, chamada de via das pentoses-fosfato, o que não é comum a todos os microrganismos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b). Devido ao fato da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não ser capaz de utilizar pentoses, a produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos utilizando-se linhagens naturais de *S. cerevisiae* torna-se imprópria. Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que fermenta xilose a etanol com elevado rendimento (BOTHAST; SAHA, 1997; GONZÁLEZ-BENITO et al., 2009; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009; CHO et al., 2010)

As propriedades desejadas para os microrganismos fermentadores necessárias à fermentação de hidrolisados de hemicelulose são: eficiente utilização de hexoses e pentoses; taxas de fermentação rápidas, alta produção de etanol, alta tolerância ao etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado, fermentação em valores baixos de pH e a altas temperaturas, alta viabilidade e rentabilidade, posse de características apropriadas de floculação e de utilização de uma ampla variedade de substratos (PASHA; KUHAD; RAO, 2007). No entanto, nenhum microrganismo capaz de satisfazer a todas essas características foi encontrado ou desenvolvido até o momento (PASHA; RAO, 2009). Dessa forma, o futuro depende da descoberta e obtenção de microrganismos e enzimas mais baratos e eficientes para emprego no processo fermentativo do etanol de segunda geração. Novos microrganismos podem também permitir a combinação de etapas do processo de obtenção de etanol em um único passo, como a fermentação de diferentes açúcares aliada à produção de enzimas (LYND, 1996).

2.2.1.2.1.1 Via Metabólica de Xilose em Leveduras

A via metabólica utilizada pelas leveduras para a bioconversão de xilose em etanol (Figura 2.5) se inicia com o transporte de xilose para o interior da célula através da membrana celular por mecanismos que tem sido estudado por vários autores (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). A seguir a xilose é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase XR, na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela enzima NAD⁺ ligado a xilitol desidrogenase – XDH. A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, a intermediários da via EMP (gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato), os quais podem então ser metabolizados por esta via, a qual está conectada a outras como o ciclo de Krebs e as reações de fermentação alcoólica (Figura 2.5). A especificidade das enzimas XR e XDH aos cofatores reduzidos e oxidados varia de acordo com a espécie de levedura (DA SILVA et al., 1996; WILSON et al., 2003). Na levedura *Pichia stipitis* a enzima XR é dependente dos cofatores NADPH ou NADH e a enzima XDH é dependente principalmente do cofator NAD⁺ (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Há uma íntima relação entre a especificidade da enzima XR aos cofatores NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do microrganismo, com sua posterior excreção para o meio.

Quando a atividade da XR de um determinado microrganismo depende de NADH ou NADPH, o cofator NAD⁺ utilizado na redução da xilose a xilitol pode ser recuperado na etapa seguinte, seja em condições anaeróbicas ou de limitação de

oxigênio. Neste caso, e sob tais condições, o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol, não havendo acúmulo de xilitol. Quando a atividade da XR de um dado microrganismo depende apenas de NAPH, sob condições de limitação de oxigênio observa-se acúmulo de xilitol, uma vez que, nestas condições, a capacidade da cadeia respiratória de recuperação do cofator oxidado é baixa, o que acarreta diminuição da atividade da enzima XDH, diminuindo a velocidade de transformação (JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

Figura 2.5 Metabolismo de xilose por leveduras (esquema simplificado)
 Fonte: Parajó, Domínguez e Domínguez (1998a)

2.2.1.2.2 A levedura *Pichia stipitis* fermentadora de xilose a etanol

Muitos microrganismos entre eles vários gêneros de leveduras, fungos e bactéria tem sido largamente utilizadas para a produção de etanol (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). O número de espécies, incluindo *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, tem sido encontrado com boa eficiência para fermentar xilose para produção de etanol (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007). Entre estas leveduras a levedura *Pichia stipitis* apresenta grande potencial para aplicações industriais por ter bom rendimento e conversão em etanol (AGBOGBO et al., 2006). No entanto, esta levedura é sensível a presença de ácidos orgânicos, incluindo o ácido acético, que estão presentes nos hidrolisados lignocelulósicos. Estes compostos podem reduzir o crescimento celular e diminuir a produção de etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; NIGAM, 2001; ALMEIDA et al., 2007).

Segundo Van Vleet e Jeffries (2009) a levedura *Pichia stipitis* apresenta um conjunto de características fisiológicas que a torna muito interessante para a bioconversão em etanol, apresentar capacidade para fermentar xilose, e também, é capaz de fermentar outros açúcares como glicose, manose, galactose e celobiose. Isto faz da *Pichia stipitis* um microrganismo com grande uso em potencial em processos de fermentação para produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos ou através da sacarificação e fermentação simultânea (SSF).

Os açúcares presentes na fração hemicelulósica são facilmente recuperados em tratamento com álcali, ácido diluído ou auto-hidrólises, sendo, sua utilização fundamental para uma bioconversão econômica (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Meyrial et al. (1997) observaram que células da levedura *Pichia stipitis* NRRL Y7124 crescidas em meio contendo glicose e xilose como fonte de carbono, quando submetidas à escassez de glicose não realizaram transporte ativo de prótons significativo, quando incubadas em meio contendo somente xilose. Estes autores sugeriram que este fato está provavelmente relacionado com a incapacidade destas células em metabolizar xilose instantaneamente. Conforme demonstrado por Bicho et al. (1988) em *Pichia stipitis* NRRL Y7124, a presença de glicose reprime as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Além disso, o efeito inibitório da glicose no transporte de xilose, demonstrado em *Pichia stipitis* IGC 4374 por Kilian e Van Uden (1988) causou nas células crescidas em meio contendo glicose a incapacidade de metabolizar eficientemente a xilose.

2.2.1.2.2.1 A levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2

A espécie *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 foi coletada de intestino de insetos - cupins e larvas de coleópteros - encontrada nas amostras de madeira, provenientes da Reserva do Patrimônio Particular Natural Woodstock localizada em Rio Grande de Cima, no município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro. A região compreende o bioma Mata Atlântica, com a transição de floresta umbrófila densa e semidecídua (CADETE, 2009)

A levedura isolada a partir de insetos foi submetida aos testes de fermentação de hexoses e pentoses e à verificação da produção de exoenzimas. Dentre as leveduras que fermentaram xilose no teste com tubo de Durham, a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 foi selecionada para os testes de fermentação de glicose e xilose em laboratório (CADETE, 2009).

A levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2, apresentou fermentação completa, com período inicial médio de quatro dias e final de sete dias, obteve valor de parâmetros fermentativos superior ou equivalente entre os açúcares testados – glicose e xilose, e ainda os maiores valores de conversão de substrato em etanol, produtividade e rendimento a partir de xilose que as leveduras de referência testadas. Segundo Cadete (2009) essa levedura é promissora para o emprego em futuros testes voltados para a produção de etanol lignocelulósico

A Figura 2.6 apresenta uma microfotografia de lâmina microscópica contendo a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após 60h de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com um aumento de 100X.

Figura 2.6 Microfotografia da lâmina microscópica da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2

2.2.1.2.3 Alguns Fatores que Influenciam na produção de Etanol a partir de Xilose

Muitos estudos vêm sendo realizados visando melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de pentoses (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; BINOD et al., 2010; GÍRIO et al., 2010; TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010). Fatores como pH, temperatura, aeração, agitação, concentração celular inicial, suplementação, meio de cultivo, cepa, subprodutos e outros, influenciam na fermentação de etanol.

2.2.1.2.3.1 pH

O pH é um fator significativo devido a sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto no seu efeito sobre o crescimento da levedura, velocidade de fermentação e formação de subprodutos, além disso exerce forte influência na bioconversão de etanol (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1980). Segundo Pelczar, Chan e Krieg (1980), de acordo com a espécie, o limite de pH pode se situar entre pH 2,2 e 8,0.

Em estudos realizados com a *Candida shehatae* a produção de etanol aumentou de 45 para 55 g/L quando o pH passou de 4,5 para 6,0 (KASTNER; ROBERTS; JONES, 1996). Segundo Maia (1989), pH interno da célula se mantém na faixa de 5,8 a 6,9, seja qual for o pH extracelular na faixa de 2 a 7. Entretanto, baixos valores de pH tornam o meio mais agressivo, uma vez que exigem das leveduras um maior gasto de energia na manutenção do pH interno, além de afetar as proteínas de transporte da membrana citoplasmática que ficam expostas ao meio externo. O pH do meio externo também afeta a velocidade de

crescimento das leveduras, a qual atinge um máximo quando o pH está entre 5 e 6. Na fermentação alcoólica, o estabelecimento e controle do pH do meio em valores inferiores a 5 é também considerado importante como meio para prevenir contaminação por bactérias lácticas e acéticas (MAIA, 1989). No geral, o pH ótimo para a produção de etanol pela levedura *Sacharomyces cerevisiae* encontra-se na faixa de pH 4 a 5. Neste caso, o aumento do pH para 7,0 observou-se uma diminuição no fator de conversão em etanol e aumento da produção de ácido acético (MAIA, 1989; DU PREEZ, 1994) reportou que o rendimento em etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 7126 sofreu grande influência por variações de pH entre 2,5 e 6,5, estando o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. O conhecimento do efeito do pH sobre a produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é importante pois, dependendo do pH de fermentação, o efeito tóxico de ácido acético é acentuado ou a solubilidade de alguns nutrientes do meio pode ser afetada, tornando impossível a sua assimilação (FELIPE et al., 1997).

2.2.1.2.3.2 Temperatura

A Temperatura ótima de produção de etanol pelas espécies fermentadoras de pentose como as leveduras *Pichia* e *Candida*, encontram-se na faixa de 30 a 32 °C, a qual pode variar dependendo da cepa, do tipo e concentração de substrato (DU PREEZ, 1994). De acordo com Slininger et al. (1991), que avaliaram a faixa de temperatura capaz de favorecer o processo de bioprodução de etanol a partir de xilose, a máxima produtividade e concentração de etanol foram obtidas pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 utilizando 40 g/L de

xilose em uma faixa de 23 e 30 °C, no entanto para elevada concentração inicial de xilose (150 g/L) esta faixa foi entre 27 e 33 °C.

Para as leveduras *P. stipitis* CBS 7126 e *Candida shehatae* CBS 2779 a máxima velocidade específica de crescimento celular, produtividade específica e produtividade volumétrica em etanol ocorre em 30 °C (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). Estes autores também constataram um tempo menor de fermentação nesta temperatura, e que para *P. stipitis* o fator de conversão em etanol permaneceu constante, em 0,42 g/g até 33 °C e apresentou decréscimo para 0,29 g/g após elevação da temperatura para 36 °C.

2.2.1.2.3.3 Oxigênio

O oxigênio é um fator que afeta diretamente a característica e o crescimento da levedura principalmente para organismos aeróbicos ou anaeróbicos facultativos; a agitação permite uma maior aeração do meio e conseqüentemente um favorecimento no crescimento aeróbico e anaeróbico facultativo, podendo promover uma homogenização dos nutrientes no meio de cultura e dispersão dos produtos metabólicos (SCHMIDELL et al., 2001b).

Dentre todos os parâmetros citados, a variável de controle mais importante nesta bioconversão é o nível de aeração, o qual afeta as rotas bioquímicas envolvidas na metabolização da xilose (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999).

O oxigênio é requerido para a assimilação eficiente de xilose; sob baixas condições de oxigênio dissolvido, o sistema de transporte de elétrons não é capaz de oxidar o NADH eficientemente. Isto causa um desbalanço de NADH/NAD⁺ que conduz ao acúmulo de xilitol. Um aumento na concentração de oxigênio dissolvido aumentará o crescimento celular e a fermentação de xilose a etanol; quando o

oxigênio está em excesso, a atividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) será aumentada resultando em crescimento celular excessivo e assimilação do etanol produzido. A assimilação de etanol conduz ao acúmulo de acetaldeído e ácido acético. Os níveis ótimos de oxigênio dissolvido levarão ao menor acúmulo de xilitol com rendimento de etanol mais alto (LAPLACE et al., 1991; MOUTTA, 2009; FROMANGER et al., 2010).

Um parâmetro importante a ser utilizado é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), o qual descreve muito bem a oxigenação de um sistema fermentativo. Este parâmetro está relacionado ao projeto do biorreator, suas características geométricas, e as propriedades do meio de cultura utilizado, além de proporcionar informações para processos de escalonamento (WINKELHAUSEN; AMARTEY; KUZMANOVA, 2004).

Com relação à transferência de oxigênio, tem-se que sob condições anaeróbicas, uma grande fração da xilose é convertida para xilitol, e a produção de etanol correspondentemente é baixa (DU PREEZ, 1994). Segundo Taniguchi et al. (1997), em cultivo anaeróbio *Pichia stipitis* CBS 5773 consumiu uma quantidade insignificante de xilose, não sendo capaz de produzir etanol. Segundo Nigam (2001) níveis insuficientes de aeração na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 levaram a um consumo lento de xilose, por outro lado, níveis excessivos de aeração reduzem o rendimento devido à oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado, sendo um nível de aeração adequado um parâmetro importante para atingir elevados valores de conversão.

2.2.1.2.3.4 Suplementação e Fonte de Carbono

Os microrganismos retiram do meio ambiente todas as substâncias necessárias para a síntese de material celular e de obtenção de energia (METCALF; EDDY, 1991). As necessidades nutricionais dos microrganismos variam muito. Organismos autotróficos podem sintetizar todos os metabólitos necessários pela célula a partir de compostos inorgânicos; os heterotróficos requerem um ou mais nutrientes orgânicos (METCALF; EDDY, 1991). A habilidade em usar diferentes compostos como fonte de energia e de sintetizar proteínas e compostos do citoplasma a partir de compostos inorgânicos depende da presença de muitas enzimas (METCALF; EDDY, 1991). A falta ou a repressão de um ou mais genes que codificam a formação de uma destas enzimas reflete-se diretamente nas necessidades nutricionais da célula (METCALF; EDDY, 1991).

Um aspecto importante é de que todos estes constituintes do material celular devem ser obtidos do meio, e a falta de algum deles pode limitar o crescimento do microrganismo (PELCZAR; CHANG; KRIEG, 1996). Além da água, as principais substâncias que devem estar contidas no meio é o carbono que representa de 45 a 50% do peso seco celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Sendo este o componente básico para a biossíntese, fazendo parte de todos os compostos sintetizados pela célula (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Geralmente a mesma fonte de carbono serve como fonte de energia (METCALF; EDDY, 1991). As fontes de carbono mais comuns são os açúcares (pentoses, hexoses, polissacarídeo) (METCALF; EDDY, 1991). Outras fontes de carbono menos comuns abrangem uma ampla faixa de compostos, indo desde as mais simples como metano e metanol, às mais complexas celulose e hemicelulose (METCALF; EDDY, 1991).

O nitrogênio consiste de 10 a 15% do peso seco das células. É o componente básico na formação de aminoácidos que formam as proteínas. É assimilado sob forma amoniacal. Fontes de nitrogênio em outras formas que não a amoniacal são primeiramente transformadas em íons amônio dentro da célula (CARMOUZE, 1994). Muitas substâncias servem como fonte de nitrogênio e classificam-se em: a) fontes inorgânicas de nitrogênio: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , N_2 , etc. b) fontes orgânicas de nitrogênio: aminoácidos e hidrolisados de proteínas naturais, peptídeos, uréia, purinas e pirimidinas (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994).

O nitrogênio é considerado um macronutriente (nutriente necessário em grandes quantidades) além de ser nutriente limitante para o crescimento microbiano (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994).

Os elementos minerais são necessários em concentrações da ordem de miligramas por litro (PELCZAR; CHANG; KRIEG, 1996). Dentre os minerais destacam-se o magnésio que é o co-fator de várias enzimas. Este, participa na ativação das enzimas glicolíticas, estimula a síntese de ácidos graxos essenciais, regula os níveis iônicos celulares, a ativação de ATPases na membrana e a absorção de fosfato juntamente com potássio. O magnésio é envolvido em muitas funções fisiológicas como de crescimento de leveduras, divisão celular e atividade de enzima, e tem um papel importante na proteção celular á níveis tóxicos de etanol (ALEXANDRE; ROUSSEAU; CHARPENTIER, 1994).

A suplementação do meio de fermentação é primordial uma vez que proporciona condições para o crescimento do microrganismo (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009). Por exemplo, o sulfato de amônio $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ serve como fonte de nitrogênio e o farelo de arroz como fonte de aminoácidos. Ambos os

nutrientes favorecem o crescimento de leveduras (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002).

Existe uma grande disponibilidade de fontes de nitrogênio orgânico de grande aplicação em bioprocessos industriais, como a uréia. Dentre as principais fontes de nitrogênio complexas empregadas em bioprocessos, o extrato de levedura tem sido um dos mais utilizados por ter uma composição rica em vitaminas do complexo B e aminoácidos (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008). Vitaminas e minerais, são necessários como micronutrientes de leveduras para facilitar as reações bioquímicas (KOTARSKA; CZUPRYNSKI; KLOSOWSKI, 2006).

As células de leveduras também requerem vitaminas, como mio-inositol, ácido pantotênico, biotina e tiamina para o crescimento delas e aceleração de fermentação (ALFENORE et al., 2002). O ácido pantotênico faz parte de uma coenzima, a qual esta envolvida em muitos passos de metabolismo intermediário de carboidratos, gorduras e proteínas. E também aumenta a tolerância da levedura ao etanol por estimular a síntese de lipídios (KOTARSKA; CZUPRYNSKI; KLOSOWSKI, 2006). A biotina é um cofactor de muitas enzimas envolvido em reações de carboxilação, como gluconeogeneses, metabolismo de aminoácido, biogênese ácida gordurosa e metabolismo de energia. Sua assimilação e armazenamento condicionam a velocidade de crescimento de leveduras e produção de etanol (ALFENORE et al., 2002). Mio-inositol também é fator de crescimento essencial para leveduras e contribui com a alta tolerância á etanol e aumento da viabilidade de celular (FURUKAWA et al., 2004).

Os íons metálicos como, potássio magnésio, cálcio e zinco podem mudar a velocidade da glicólise e a conversão de piruvato a etanol dando um impacto

significante no progresso e eficiência da fermentação. Zinco é um elemento necessário em várias atividades enzimáticas relacionadas com as enzimas álcool desidrogenase, aldolase, fosfatase alcalina, DNA e RNA-polimerase (MAYALAGU; PATTURAJAN; CHATTERJI, 1997). Estes em meio de fermentação são fatores importantes com efeito significativo sobre a fisiologia de leveduras e produção de etanol (BIRCH; WALKER, 2000). O íon magnésio influencia diretamente a velocidade de crescimento das leveduras, o consumo de açúcar e a produção de etanol (REES; STEWART, 1997). Em geral, é exigido pela levedura na faixa de concentração milimolar. De acordo com estes autores, a adição de 10 mM de magnésio contribuiu para aumento da produção de etanol. O impacto de magnésio na produção de etanol por *S. cerevisiae* tem sido relatada por vários autores. Birch e Walker (2000) relataram que elevadas concentrações de magnésio no meio (até 50 mM) resultou em melhoria na viabilidade celular em condições com elevadas concentrações de etanol provavelmente por este ter exercido efeito protetor sobre as células, reduzindo a mortalidade celular. Dombek e Ingram (1986) relatam que a suplementação de fermentações com 0.5 mM de magnésio prolongou a fase de crescimento exponencial, resultando em aumento da biomassa, e também na redução no declínio da atividade fermentativa

2.2.1.2.3.5 Tolerância a Etanol

A eficiência de conversão de xilose e glicose em etanol a partir de materiais lignocelulósicos são limitadas pela baixa tolerância ao etanol por leveduras fermentadoras de xilose. De acordo com Laplace et al. (1991), leveduras que convertem xilose em etanol com eficiência, como *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*, apresentam crescimento completamente inibido quando a

concentração de etanol atinge valores superiores a 30 g/L, enquanto que na conversão de glicose em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* o crescimento celular é inibido em concentrações de etanol acima de 70 g/L. Diferentes estudos apresentam sugestões para a ação inibidora do etanol sobre a célula, que incluem a inibição de sistemas de transporte de diversos nutrientes (LOUREIRO-DIAS; PEINADO, 1982) bem como a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo da glicose (PASCUAL et al., 1988). Meyrial et al. (1997) avaliaram o efeito do etanol sobre o fluxo de prótons em *Pichia stipitis* crescida em glicose e em xilose. Esses autores observaram que o transporte passivo de prótons em células crescidas tanto em glicose quanto em xilose não foi afetado quando a levedura se encontrava em concentrações baixas de etanol. Já o transporte ativo de prótons em células que cresceram em presença de xilose é reduzido quando a concentração de etanol é alta. O crescimento celular em baixa concentração de etanol (10 g/L) não interferiu no influxo de próton nas células crescidas em xilose.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de etanol por via biotecnológica, a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.
- Avaliar o comportamento da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2. Específicos

- Avaliar a influência dos nutrientes (uréia, extrato de levedura e MgSO_4) sobre os parâmetros fermentativos do processo de bioprodução de etanol a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.
- Avaliar o efeito do fator de concentração de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e da concentração celular inicial sobre os parâmetros fermentativos do processo de bioprodução de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Utilizou-se no presente trabalho o bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina São Francisco localizada na cidade de Sertãozinho, SP. Este bagaço após secagem a atmosfera ambiente, teve seu teor de umidade determinado antes do processo de hidrólise ácida por ácido sulfúrico diluído.

A hidrólise foi realizada em reator de aço inox com capacidade de 100 litros localizado no Departamento de Biotecnologia (LOT) da EEL/USP. O bagaço foi percolado com H_2SO_4 98%, em uma razão de 100 mg H_2SO_4 e 1g de matéria seca de bagaço, durante 30 minutos à temperatura de 150°C, utilizando-se uma proporção de 1,75Kg massa seca de bagaço e 10L de solução de H_2SO_4 . Após a hidrólise, o hidrolisado foi centrifugado e armazenado em bombonas de 50L em câmara fria a 0,5°C.

4.2. Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida foi concentrado a vácuo em cinco vezes seu volume inicial, sob temperatura de 70 °C, visando aumentar o teor inicial de xilose, além de remover parcialmente os compostos tóxicos voláteis. Nesta etapa utilizou-se um concentrador a vácuo com capacidade volumétrica de 30 L (Figura 4.1). A seguir, o hidrolisado foi tratado utilizando a destoxificação química, conforme metodologia descrita por Alves (1997). Este procedimento envolveu a elevação do pH inicial do hidrolisado para pH 7,0 pela adição de CaO, seguida da redução do pH para 5,5 pela adição de ácido fosfórico concentrado. A seguir o hidrolisado foi

adicionado de 2,5 % (m/v) de carvão vegetal ativado em pó e mantido sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório, a 30 °C, por 1h. Entre as etapas de alterações de pH bem como de remoção de carvão ativo, o hidrolisado foi filtrado a vácuo utilizando papel de filtro para remoção dos precipitados formados. O hidrolisado concentrado e tratado foi autoclavado a 111 °C por 15 minutos. Os hidrolisados sem concentrar (original), concentrado e tratado foram caracterizados quanto ao pH e concentrações de açúcares (glicose, xilose e arabinose), ácido acético, hidroximetilfurfural e furfural.

Figura 4.1 Concentrador com capacidade volumétrica de 30L. Departamento de Biotecnologia (LOT) da EEL/USP.

4.3. Fermentações

4.3.1 Microrganismo

Em todos os ensaios foi utilizada a linhagem da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2, para produção de etanol, mantida a 4 °C em tubos inclinados com ágar extrato de malte. A levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2, foi repicada

e mantida em estufa a 30°C durante 24h (Figura 4.2) para posteriormente ser utilizada nos ensaios.

Figura 4.2 Repique da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

4.3.2 Preparo do Inóculo

Alçadas da cultura da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2, recém repicada foi transferida para meio YPX (xilose 30 g/L, peptona 10% m/v e extrato de levedura 5% m/v). O cultivo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio em incubadora com movimento rotatório com agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas (Figura 4.3).

Figura 4.3 Preparo do inóculo

As células foram recuperadas por centrifugação a 3000x g por 15 min, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados

desta solução foram utilizados como inóculo de forma a se obter uma concentração celular inicial de 2,0; 1,0 e 0,5 g/L (Figura 4.4).

Figura 4.4 Obtenção de células da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

4.3.3 Efeito da suplementação do Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

O efeito da adição dos nutrientes – MgSO_4 , extrato de levedura e uréia assim como as possíveis interações - foram estudados como a metodologia de planejamento experimental fatorial composto central de face centrada 2^3 .

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de hidrolisado destoxificado, 2 g/L de inóculo e suplementado de acordo com o delineamento experimental apresentado nas Tabelas 4.1 e 4.2. Os frascos foram mantidos em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C. Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a ocorrência de erros sistemáticos. As análises dos dados foram feitas com o auxílio do programa STATISTICA versão 5.0.

Tabela 4.1 Níveis em valores reais e codificados para os fatores investigados no planejamento fatorial central composto de face centrada 2^3 .

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
X ₁ MgSO ₄	0,0	0,5	1,0
X ₂ Extrato de levedura	0,0	2,5	5,0
X ₃ Uréia	0,0	2,5	5,0

Os parâmetros foram analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao nível inferior, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior.

Tabela 4.2 Planejamento fatorial do tipo 2^3 , com 4 repetições no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado com nutrientes, na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis Reais (g/L)		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	0,0	0,0	0,0
2	+1	-1	-1	1,0	0,0	0,0
3	-1	+1	-1	0,0	5,0	0,0
4	+1	+1	-1	1,0	5,0	0,0
5	-1	-1	+1	0,0	0,0	5,0
6	+1	-1	+1	1,0	0,0	5,0
7	-1	+1	+1	0,0	5,0	5,0
8	+1	+1	+1	1,0	5,0	5,0
9	0	0	0	0,5	2,5	2,5
10	0	0	0	0,5	2,5	2,5
11	0	0	0	0,5	2,5	2,5
12	0	0	0	0,5	2,5	2,5

4.3.4 Efeito da Concentração celular inicial e de Hidrolisado

A partir das condições obtidas de suplementação de nutrientes foi estudado o efeito da variação da concentração inicial de células da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 e variação da concentração do hidrolisado, sobre a produção de etanol. Os ensaios foram realizados através de um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições nos pontos centrais. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de hidrolisado destoxificado,

diluído para atingir as concentrações de 30g/L, 52,5 g/L e 75,0 g/L , com 2 g/L, 1,0 g/L e 0,5 g/L de inóculo de acordo com o delineamento experimental apresentado nas Tabelas 4.3 e 4.4. Logo após foi adicionado soluções nutrientes estoque de extrato de levedura (250 g/L) para obtenção das concentrações desejadas conforme descrito no planejamento.

Os frascos foram mantidos em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C (Figura 4.5). Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a ocorrência de erros sistemáticos. As análises dos dados foram feitas com o auxílio do programa STATISTICA versão 5.0.

Figura 4.5 Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

Tabela 4.3 Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial completo codificação dos níveis para variáveis avaliadas

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
X ₁ Concentração do Hidrolisado	30,0	52,5	75,0
X ₂ Concentração inicial de Células	0,5	1,0	2,0
X ₃ Extrato de Levedura	0,0	2,5	5,0

Os parâmetros foram analisados dentro de uma faixa onde -1 corresponde ao nível inferior, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior.

Tabela 4.4 Planejamento fatorial do tipo 2^3 , com 4 repetições no ponto central, na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis Reais (g/L)		
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1	30,0	0,5	0,0
2	+1	-1	-1	75,0	0,5	0,0
3	-1	+1	-1	30,0	2,0	0,0
4	+1	+1	-1	75,0	2,0	0,0
5	-1	-1	+1	30,0	0,5	5,0
6	+1	-1	+1	75,0	0,5	5,0
7	-1	+1	+1	30,0	2,0	5,0
8	+1	+1	+1	75,0	2,0	5,0
9	0	0	0	52,5	1,0	2,5
10	0	0	0	52,5	1,0	2,5
11	0	0	0	52,5	1,0	2,5
12	0	0	0	52,5	1,0	2,5

4.4. Métodos Analíticos

4.4.1 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, glicerol e etanol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) cromatógrafo Waters 410, Milford, MA, USA. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração Waters 410; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6 ml/min.

4.4.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a análise do teor de furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas no cromatógrafo (CLAE)

Waters 410, Milford, MA, USA, utilizando-se as seguintes condições: coluna RP 18 (200 X 4,6mm) mantida à temperatura de 25°C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta Waters (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,9 ml/min.

4.4.3 Determinação da concentração celular

A concentração de celular no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/l) por meio de uma curva de calibração previamente construída. O branco utilizado foi o meio de fermentação sem células diluído na mesma proporção do meio de fermentação com células. O restante das amostras coletas foram centrifugadas a 3000x g por 10 min. O sobrenadante foi armazenados em freezer para posterior análise em CLAE.

4.4.4 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria em aparelho Micronal modelo B474, com correção de temperatura.

4.4.5 Viabilidade e Pureza da Cultura

A viabilidade das células foi verificada a partir da observação microscópica de lâminas preparadas a fresco, onde foram coradas pela adição de igual volume de solução de 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO et al., 1992). A pureza da cultura foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular equipado com câmera digital.

4.4.6 Cálculo dos Parâmetros Fermentativos

4.4.6.1 Fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$)

A estimativa de $Y_{P/S}$ foi obtida conforme Schmidell et al. (2001a) correlacionando o ΔP produzido com o ΔS consumido (substrato consumido para produzir P, obtido descontando do total de substrato inicial o substrato consumido). O coeficiente angular da reta que passa pela origem, forneceu a estimativa de $Y_{P/S}$.

4.4.6.2 Eficiência de conversão de açúcares totais em etanol ($\eta\%$)

$$\eta (\%) = \frac{Y_{P/S} \text{ obtido}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \times 100$$

Sendo, $Y_{P/S}$ teórico = 0,51

4.4.6.3 Produtividade em etanol (Q_P , g etanol/L.h)

$$Q_P = \frac{P_f - P_i}{t}$$

Sendo: t o tempo de fermentação.

4.4.6.4 Porcentagem de consumo de xilose (Y%)

$$Y (\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100$$

Sendo: S_f a concentração final de açúcar (g/L) e S_i a concentração inicial de açúcar (g/L)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 5.1 apresenta a caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, antes e após os procedimentos de concentração a vácuo e destoxificação.

Tabela 5.1 Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos original, concentrado e destoxificado

Componentes	Hidrolisado Original	Hidrolisado Concentrado 5X	Hidrolisado Destoxificado
pH	1,10	0,50	5,05
Arabinose (g/L)	1,79	8,98	8,87
Glicose (g/L)	2,14	10,71	10,14
Xilose (g/L)	15,56	78,21	76,07
Ác. acético (g/L)	1,59	3,07	2,92
Furfural (g/L)	0,03	0,12	0,02
Hidroximetilfurfural (g/L)	0,02	0,12	0,01

Observa-se, pela Tabela 5.1, que a hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar permitiu a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose (15,56 g/L) e contendo pequenas concentrações de arabinose (1,79 g/L) e glicose (2,14 g/L). Além disso, verifica-se que após a concentração do hidrolisado houve um aumento no teor desses açúcares proporcional ao fator de concentração (5X). Tal fato foi também reportado por Carvalho et al. (2004) e Sarrouh (2009) e demonstra que durante a etapa de concentração não houve degradação destes açúcares.

A concentração total de açúcares obtida na hidrólise (hidrolisado não concentrado), foi cerca de 19,5 g/L, assim como a proporção entre estes foi de

8,7:1,2:1 para xilose, glicose e arabinose, respectivamente. Estes valores foram bem próximas ao reportado em outros trabalhos que empregaram hidrólise ácida com ácido diluído como os de Sarrouh (2009) e Chaud (2010). Estes autores obtiveram um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar contendo cerca de 19 g/L de açúcares totais, na proporção de 10,8:1,3:1 de xilose, glicose e arabinose, respectivamente.

Além da xilose e outros açúcares o hidrolisado hemicelulósico contém de compostos tóxicos como ácido acético (1,59 g/L) furfural (0,02 g/L) e hidroximetilfurfural (0,024 g/L) sendo estes últimos os quais são gerados a partir da degradação de pentoses e hexoses. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Sarrouh (2009) e Chaud (2010).

Após a etapa de concentração a vácuo o teor de ácido acético aumentou de 1,5 g/L para 3,0 g/L mas de forma não proporcional ao fator de concentração (5X). Isto ocorreu provavelmente devido a volatilização deste composto durante o processo de concentração a vácuo a 70°C sob pressão reduzida fato este também observado por Rodrigues et al. (2001). Concentrações acima de 3 g/L de ácido acético é considerada prejudicial ao metabolismo celular microbiano da levedura *Candida guilliermondii* (FELIPE et al., 1997).

Observa-se um decréscimo no pH inicial após a etapa de concentração a vácuo do hidrolisado (Tabela 5.1). Tal queda no valor de pH foi também reportada por Silva e Felipe (2006) e é atribuída ao aumento da concentração de íons H⁺ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise do bagaço e ao aumento da concentração de ácido acético.

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural após o processo de destoxificação observadas foram similares às reportadas por outros autores. Nos

trabalhos de Carvalho (2004), Santos (2005), Cunha (2006) e Chaud (2010), onde as hidrólises foram realizadas em condições semelhantes as empregadas neste trabalho, as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural variaram de 0,003g/L a 0,03 g/L e 0,001 a 0,02 g/L, respectivamente. As concentrações destes compostos encontrados neste trabalho, estão dentro destas faixas, sendo portanto estes resultados encontrados coerentes com os reportados na literatura. Verificou-se que o processo de destoxificação promoveu a remoção parcial de hidroximetilfurfural e furfural reduzindo suas concentrações em 85 % e 89 %, respectivamente.

Observou-se que as perdas no teor de açúcares (xilose, glicose e arabinose) no hidrolisado após o tratamento de destoxificação foram de 2,9 %. Segundo Rodrigues et al. (2001), Marton et al. (2003), Carvalho et al. (2004) e Sarrouh (2009) as perdas de açúcares totais após do tratamento de destoxificação variaram de 6,8 a 15 %. Estas diferenças podem ser atribuídas as condições de hidrólise empregadas, o que pode ter levado a liberação de outros compostos de natureza ainda desconhecida que possam ter contribuído para modificar as características do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Observa-se também que houve uma perda de 40 % no volume final do hidrolisado tratado, fato este também reportado por Carvalho et al. (2004) e Sarrouh (2009).

5.2. Processo Fermentativo

5.2.1. Efeito da suplementação do hidrolisado

Segundo Silva (2007), devido à baixa fermentabilidade a levedura *Pichia stipitis* NRRLY-7124 em hidrolisado contendo concentrações de xilose próximas a 90 g/L, os ensaios de bioconversão realizados neste trabalho visando avaliar a suplementação foram conduzidos em hidrolisado contendo cerca de 75 g/L de xilose.

As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 apresentam o crescimento celular da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar após suplementação, onde os experimentos foram realizados de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2). Observa-se que o crescimento celular foi favorecido com a adição de extrato de levedura independentemente da adição de uréia. No entanto, a maior formação de biomassa (7,0 g/L) foi obtida no ensaio E4, onde o extrato de levedura e o MgSO_4 estavam presentes em seus níveis superiores (+1) e sem a presença de uréia.

Figura 5.1 Concentração celular da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana após suplementação de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2). Os ensaios de E1 a E4 sem adição de uréia.

Figura 5.2 Concentração celular (g/L) da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana após suplementação para os ensaios de E5 a E8 com adição de uréia de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Figura 5.3 Concentração celular da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana após suplementação para os ensaios de E9 a E12 são os pontos centrais de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

De acordo com as Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 observa-se uma elevação de pH superiores a 7,0, nos ensaios onde a uréia estava presente. Da mesma forma, no ensaio E3 adicionando apenas extrato de levedura e $MgSO_4$ observou-se o mesmo comportamento.

Figura 5.4 Variação de pH no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios de E1 a E4 sem adição de uréia de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Figura 5.5 Variação do pH no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios E5 a E8 com adição de uréia de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Figura 5.6 Variação de pH no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios E9 a E12 são os pontos centrais de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Conforme nas (Figura 5.7, 5.8 e 5.9) os ensaios E3, E4, E7 e E8 que continham extrato de levedura obtiveram maior consumo de açúcar do que os ensaios que não continha este nutriente (E1, E2 e E5). No ensaio E6, que continha a associação dos nutrientes $MgSO_4$ e uréia, sem extrato de levedura, observou-se também um consumo de açúcar semelhante aos ensaios que continham extrato de levedura.

Figura 5.7 Concentração de açúcares no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios de E1 a E4 sem adição de uréia de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Figura 5.8 Concentração de açúcares no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios de E5 a E8 com adição de uréia de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Figura 5.9 Concentração de açúcares no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após suplementação para os ensaios E9 a E12 são os pontos centrais de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2).

Os máximos valores de $Y_{P/S}$ (0,13 g/g) foram obtidos nos ensaios E3 onde continha apenas extrato de levedura (5 g/L) (Tabela 5.2) e no E8 onde continha todos os nutrientes avaliados. Observou-se também os valores máximos de produtividade em etanol (Q_P) igual a 0,07 g/L.h e eficiência de conversão (η) igual a 25,5 %. No entanto, estes parâmetros fermentativos são considerados baixos se comparados com os relatados por Silva (2007), onde a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz pela levedura *Pichia stipitis* NRRLY-7124 foi realizada com a adição 3 g/L de extrato de levedura obtendo resultados de $Y_{P/S}$ igual a 0,29 g/g e produtividade em etanol de 0,24 g/L.h.

Apesar de ter obtido baixos valores de Q_P e $Y_{P/S}$, a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 apresentou 90 % de consumo de açúcares em todos os ensaios com exceção dos ensaios E1 (49,26 %) e E2 (46,30 %), os quais não foram adicionados de nenhuma das fontes de nitrogênio estudadas (uréia e extrato de

levedura). Este fato, reforça a importância da adição de extrato de levedura nos ensaios para alcançar um consumo de açúcares totais maior que 90 %.

Tabela 5.2 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar após 156h de fermentação.

Ensaio	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	Consumo de Açúcares (%)	Eficiência (%)
1	0,10	0,027	49,26	19,61
2	0,11	0,029	46,30	21,57
3	0,13	0,067	92,14	25,49
4	0,10	0,051	92,80	19,61
5	0,08	0,027	62,30	15,69
6	0,10	0,052	96,56	19,61
7	0,12	0,063	98,50	23,53
8	0,13	0,071	96,92	25,49
9	0,11	0,054	89,96	21,18
10	0,12	0,061	93,35	23,14
11	0,12	0,069	88,92	22,75
12	0,12	0,063	92,19	24,12

Na Figura 5.10 observa-se a produção de subprodutos como o glicerol e xilitol, em concentrações inferiores a 0,5 g/L. Em alguns ensaios observou-se ausência da produção de xilitol (E1 e E2). Estes baixos valores podem estar relacionados com a elevada concentração de xilose inicial no hidrolisado (75 g/L) utilizadas nos ensaios fermentativos. O glicerol tem sido encontrado como subproduto da fermentação de xilose a xilitol pelas leveduras *Pichia stipitis*, *C. shehatae* e *P. tannophilus*. Segundo Taherzadeh, Adler e Lidén (2002), a formação de glicerol durante o cultivo de *Sacharomyces cerevisiae* ocorreu como forma de compensar um desbalanço redox que ocorreu durante o crescimento da levedura, verificando uma diminuição do rendimento com a redução do crescimento celular.

Figura 5.10 Concentração de glicerol, xilitol e etanol (g/L) pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 após 156 h de fermentação em meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana suplementação de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.2). Os ensaios de 1 a 4 sem adição de uréia e 5 a 8 com adição de uréia.

A influência da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P , no processo de bioprodução de etanol por *Pichia stipitis*, foi estudada de maneira mais detalhada, utilizando-se metodologia estatística apresentada a seguir.

Na Tabela 5.3, encontra-se a matriz de planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central. Encontram-se também os fatores das variáveis quantitativas, $MgSO_4$ (X_1), extrato de levedura (X_2) e uréia (X_3) contendo as condições experimentais na forma de valores reais e codificados tendo como fator resposta $Y_{P/S}$ por *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Tabela 5.3 Matriz para o $Y_{P/S}$ apresentando os níveis codificados e reais do planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Ensaio	MgSO ₄ (g/L)	EL (g/L)	Uréia (g/L)	Variáveis Codificadas			$Y_{P/S}$ (g/g)
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	
1	0,0	0,0	0,0	-1	-1	-1	0,10
2	1,0	0,0	0,0	+1	-1	-1	0,11
3	0,0	5,0	0,0	-1	+1	-1	0,13
4	1,0	5,0	0,0	+1	+1	-1	0,10
5	0,0	0,0	5,0	-1	-1	+1	0,08
6	1,0	0,0	5,0	+1	-1	+1	0,10
7	0,0	5,0	5,0	-1	+1	+1	0,12
8	1,0	5,0	5,0	+1	+1	+1	0,13
9	0,5	2,5	2,5	0	0	0	0,11
10	0,5	2,5	2,5	0	0	0	0,12
11	0,5	2,5	2,5	0	0	0	0,12
12	0,5	2,5	2,5	0	0	0	0,12

O diagrama de Pareto que representa cada um dos efeitos estimados em ordem decrescente de importância foi usado para examinar o efeito das variáveis e suas interações sobre o fator $Y_{P/S}$ pela *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (Figura 5.11). O comprimento de cada barra é proporcional ao efeito padronizado, que é o efeito estimado dividido pelo seu erro padrão.

Apesar de somente o efeito principal extrato de levedura ter sido significativo no nível de 95% de confiança, os outros como MgSO₄ e uréia permaneceram por hierarquia, visto apresentarem suas interações significativas (Figura 5.11).

Figura 5.11 Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90 % de confiança para o fator $Y_{P/S}$ de acordo o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central (Tabela 4.2).

A análise de variância (ANOVA) para o fator $Y_{P/S}$ está representado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Análise de variância (ANOVA) para o $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
$MgSO_4$ [X_1]	1,25E-05	1	1,25E-05	0,16	0,70
E. de Levedura [X_2]	1,01E-03	1	1,01E-03	13,35	0,01
Uréia [X_3]	1,25E-05	1	1,25E-05	0,16	0,70
$X_1 X_2$	3,13E-04	1	3,13E-04	4,12	0,10
$X_1 X_3$	3,13E-04	1	3,13E-04	4,12	0,10
$X_2 X_3$	3,13E-04	1	3,13E-04	4,12	0,10
Erro Total	3,79E-04	5	7,59E-05	-	-
Total	2,35E-03	11	-	-	-

$R^2=0,8389$

R^2 (ajustado)=0,6456

Pela análise dos resultados pode-se fazer uma triagem inicial dos fatores e interações de segunda ordem que foram significativos a um nível de 90 e 95 % de confiança. De acordo com a Figura 5.11 todas as interações foram

estatisticamente significativas no nível de 90 % de confiança. Deve se observar também que os efeitos principais MgSO_4 e uréia não foram estatisticamente significativos no nível de 90 % de confiança, porém permaneceram no modelo por hierarquia, ou seja, apresentaram interações significativas.

O gráfico dos efeitos principais (Figura 5.12A) mostra a variável resposta $Y_{P/S}$ como uma função de cada fator experimental. Em cada parcela, os nutrientes foram variados de seu nível inferior (-1) para o seu nível superior (+1). Observa-se que o extrato de levedura foi o único fator principal que apresentou uma maior influência do que os outros fatores resposta.

Na Figura 5.12 B, apresenta as interações de 2ª ordem dos fatores $Y_{P/S}$ como uma função. Em cada parcela, dois nutrientes foram variados de seu nível inferior (-1) para o seu nível superior (+1), enquanto o terceiro nutriente foi mantido constante em seu nível central (0). Observou-se que os valores mais elevados para o fator de $Y_{P/S}$ foram obtidos na interação MgSO_4 e extrato de levedura, na condição de nível inferior de MgSO_4 (0 g/L) mantendo-se o extrato de levedura em seu nível superior (5,0 g/L) e a uréia em seu nível central (2,5 g/L). Porém, nesta condição observa-se uma queda nos valores de $Y_{P/S}$ com a elevação da concentração de MgSO_4 para o seu nível +1 (1,0 g/L). Valores similares de $Y_{P/S}$ (0,13 g/g) podem ser obtidos se o extrato de levedura e a uréia foram mantidos em seus níveis superiores (5,0 g/L) mantendo-se o MgSO_4 em seu nível central (0,5 g/L).

Figura 5.12 Gráficos dos efeitos principais (A) e dos efeitos de interações (B) para o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central (Tabela 4.2).

Na Tabela 5.5 encontram-se os coeficientes de regressão da equação representativa do modelo proposto para o fator de conversão dos açúcares totais (glicose e xilose) em etanol por *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 5.5 Coeficiente de Regressão para o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Variáveis independentes	Coeficiente de Regressão
Média/Interação	0,11125
MgSO ₄ [X ₁]	0,00125
EL [X ₂]	0,01125
Uréia [X ₃]	-0,00125
X ₁ X ₂	-0,00625
X ₁ X ₃	0,00625
X ₂ X ₃	0,00625

Na Tabela 5.6, encontra-se a análise de variância de ajuste do modelo estatístico aos dados das Tabelas 5.5, onde o resíduo total foi dividido em falta de ajuste e erro puro sendo este procedimento válido uma vez que, foram realizadas as repetições no ponto central, para poder se obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro), podendo assim julgar de maneira quantitativa se o modelo representa satisfatoriamente os ensaios. No entanto, o modelo proposto para os dados experimentais de $Y_{P/S}$ não apresentou curvatura significativa (Tabela 5.6).

Observa-se ainda na Tabela 5.6, que o F estimado pelos dados experimentais tanto do residual total quanto o da falta de ajuste foram menores do que o F tabelado, respectivamente. Este fato indica assim que tanto o resíduo total quanto a falta de ajuste se encontram dentro da distribuição F, ou seja, não foram estatisticamente significativos, evidenciando assim que o modelo é altamente significativo, dentro da região estudada, visto que os modelos empíricos são locais e aplicados a uma determinada região.

Tabela 5.6 Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.3, que representa o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	0,00	0	-	-	-
Curvatura	1,50E-04	1	1,50E-04	0,68	0,43
Resíduos	2,20E-03	10	7,59E-05	-	-
Falta de ajuste	2,09E-03	7	1,31E-04	7,66	0,06
Erro puro	1,17E-04	3	3,89E-05	-	-
Corr. Total	2,35E-03	11	-	-	-

$R^2=0,8389$

R^2 (ajustado)=0,6456

Com relação aos coeficientes de determinação obtidos, observa-se pela Tabela 5.6 que 83,89 % da variação total em torno da média são explicadas pela regressão. Após a verificação dos fatores e interações que foram significativas, obteve-se a equação 5.1 de regressão ajustada aos dados que representam o fator $Y_{P/S}$ por *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, a partir dos coeficientes de regressão da Tabela 5.5:

$$y = 0,11125 + 0,00125X_1 + 0,01125X_2 - 0,00125X_3 - 0,00625X_1X_2 + 0,00625X_1X_3 + 0,00625X_2X_3 \quad (5.1)$$

Onde: y é o fator $Y_{P/S}$, X_1 é Fator $MgSO_4$, X_2 é Fator Extrato de levedura e X_3 é Fator uréia.

Com relação aos efeitos da concentração de nutrientes no fator $Y_{P/S}$ por *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pode-se observar pela Figura 5.7 que o fator extrato de levedura em seu nível superior apresentou máximo valor de $Y_{P/S}$ (0,13 g/g) em duas condições diferentes, uma delas mantendo-se tanto os fatores principais $MgSO_4$ e uréia em

seus níveis inferiores, ou seja, sem adição destes nutrientes e também após adição de ambos nutrientes em seus níveis superiores.

Figura 5.13 Diagrama de interpretação dos efeitos entre os nutrientes $MgSO_4$, extrato de levedura (EL) e uréia sobre o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento completo 2^3 (Tabela 4.2).

No entanto, pelos dados da Figura 5.14 em que se manteve o $MgSO_4$ e o extrato de levedura em seus níveis superiores pode-se observar a necessidade da adição de uréia ao hidrolisado para obter um aumento no valor de $Y_{P/S}$ de 0,11 para 0,13 g/g.

Figura 5.14 Gráfico da resposta $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central, fixando-se o extrato de levedura em seu nível superior (5g/L).

Na Figura 5.14, pode-se também observar que independentemente da concentração de uréia utilizada na ausência de MgSO_4 não se observou favorecimento significativo no fator $Y_{P/S}$. Deve-se salientar que em ambos os casos o extrato de levedura foi utilizado em seu nível superior (+1). Desta forma, para validação do modelo (equação 5.1) que melhor represente os dados experimentais optou-se em fixar em seus níveis inferiores os fatores principais MgSO_4 e uréia (0 g/L, sem adição, respectivamente), mantendo-se o fator extrato de levedura em seu nível superior (5,0 g/L). Nesta condição experimental, o valor estimado do fator $Y_{P/S}$ pela equação 5.1 foi de 0,12 g/g. Esta condição experimental mostrou de certa forma, a melhor condição nutricional para o hidrolisado visando a obtenção de elevados valores de $Y_{P/S}$. Experimentalmente foi obtido o valor de $Y_{P/S}$ 0,13 g/g, indicando que o modelo pode representar matematicamente o fator de $Y_{P/S}$. Neste caso, foi obtido os máximos valores de produtividade em etanol (0,067 g/L.h), consumo de açúcares totais (92,14 %) e fator de conversão teórico (25,49 %).

5.2.2. Efeito da concentração de xilose e células na produção de etanol

Nas Figuras 5.15 a 5.26 são apresentados o comportamento da concentração de células, substrato e produto, para o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

Figura 5.15 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 1 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.16 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 2 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.17 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 3 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.18 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.19 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 5 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.20 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 6 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.21 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 7 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.22 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 8 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.23 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 9 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.24 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 10 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.25 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.26 Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 12 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

A máxima concentração de etanol alcançada nos ensaios de fermentação foi cerca de 9,2 g/L, com consumo de 83% dos açúcares presentes no meio com concentrações iniciais de xilose e células de 52,5 g/L e 1,0 g/L, respectivamente (Figuras 5.23, 5.24, 5.25 e 5.26).

Nas Figuras 5.17, 5.19 e 5.21, após 96 horas do ensaio 3 e 48 horas dos ensaios 5 e 7, a concentração de etanol no meio de fermentação diminuiu gradativamente. Esta redução na concentração de etanol pode ser atribuída a um possível consumo pela levedura, diante da escassez de açúcares no meio de fermentação. Esta hipótese pode ser apoiada no modelo de crescimento de leveduras em xilose e glicose apresentando por Olsson e Hahn-Hägerdal (1996) e Hahn-Hägerdal et al. (2007). Segundo estes autores, a capacidade respiratória das células governa o metabolismo da xilose e glicose ou do etanol, e a formação de produtos em células em crescimento, e representa uma restrição ou estrangulamento para utilização oxidativa do substrato. Como a utilização de etanol é um processo oxidativo e a sua utilização tem uma prioridade menor que a da glicose e xilose, não há consumo de etanol nestas condições, ou seja, o princípio da capacidade respiratória limitada não permite o consumo e produção, simultâneos, de etanol.

Na Figura 5.19 atingiu em 48 horas uma concentração de etanol de 2,65 g/L, consumindo cerca de 87 % dos açúcares presentes, sendo tanto o consumo de açúcares quanto a produção de etanol significativamente maiores que os alcançados com o ensaio 1 (Figura 5.15). Esta diferença foi observada por Silva (2007) e Moutta (2009) e pode ser atribuída a suplementação com extrato de levedura por ser uma fonte de nitrogênio que permite melhorar o metabolismo da levedura. Este mesmo comportamento pode ser observado nos

ensaios 2 e 6 (Figura 5.16 e 5.20), 3 e 7 (Figura 5.17 e 5.21) e finalmente 4 e 8 (Figura 5.18 e 5.22).

Na Figura 5.21 se observa uma produção de etanol de 6,43 g/L e um consumo de açúcares aproximadamente de 93% com condições iniciais de 30 g/L de xilose; 2,0 g/L de células e 5,0 g/L de extrato de levedura. Enquanto que para o ensaio 8 (Figura 5.22) aumentando a concentração de xilose a 75 g/L e mantendo as mesmas condições anteriores de células e extrato de levedura, a concentração de etanol obtida foi de 5,91 g/L com um consumo de açúcares de 68 %, sugerindo a dificuldade da célula metabolizar altas concentrações de açúcares presentes no meio. Um comportamento semelhante foi observado por Silva (2007) para o processo de bioconversão de hidrolisado de palha de arroz a etanol pela levedura *Pichia stipitis* NRRLY-7124.

Na Figura 5.27 observa-se que nos ensaios 5 a 12 (com extrato de levedura) apresentam produção de glicerol e os ensaios 5 e 7 além de glicerol, apresentam também produção de xilitol. Nos ensaios sem extrato de levedura (1 ao 4) não foi observado a produção destes subprodutos. Segundo Rodrigues et al. (2003) e Arruda, Rodrigues e Felipe (2007) a formação desses subprodutos são relatados como uma resposta ao estresse celular provocado pelas condições ambientais impostas a levedura, indicando que pH superior a 7,0 favorecem a formação destes subprodutos.

Figura 5.27 Produção de xilitol e glicerol no processo de fermentação de hidrolisado pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Na Figura 5.11 são apresentados o comportamento de ácido acético e pH, para o hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Observou-se que a concentração de ácido acético diminuiu e o pH aumentou em todos os ensaios, comportamento semelhante aos reportados na literatura (SILVA, 2007; MOUTTA, 2009).

Figura 5.28 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 1 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.29 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 2 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.30 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 3 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 31 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 5.32 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 5 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 33 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 6 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 34 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 7 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 35 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 8 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 36 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 9 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 37 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 10 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 38 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

Figura 39 Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para o ensaio 12 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)

O máximo valor do fator $Y_{P/S}$ (0,19 g/g) foi obtido no ensaio 7, contendo 30 g/L de concentração de xilose no hidrolisado, 2,0 g/L de concentração inicial de células e 5,0 g/L de extrato de levedura (Tabela 5.7). Neste ensaio observou-se também o valor máximo de eficiência de conversão (37,45 %).

Tabela 5.7 Parâmetros fermentativos da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Açúcares (%)	Eficiência (%)
1	0,09	88,74	17,25
2	0,04	54,21	7,33
3	0,16	75,16	31,29
4	0,10	62,13	19,79
5	0,09	87,51	18,43
6	0,05	71,58	9,80
7	0,19	93,28	37,45
8	0,11	68,14	22,18
9	0,17	84,14	32,94
10	0,17	83,81	32,92
11	0,17	83,73	32,55
12	0,17	83,00	32,75

A influência da concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e concentração celular sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, no processo de bioprodução de etanol pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2, foi estudada de maneira mais detalhada, por análise estatística apresentada a seguir.

Na Tabela 5.8, encontra-se a matriz de planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central. Encontram-se também os fatores das variáveis quantitativas, concentração inicial de xilose no hidrolisado de bagaço de cana-de-

açúcar (X_1), concentração celular inicial (X_2) e extrato de levedura (X_3) contendo as condições experimentais na forma de valores reais e codificados tendo o fator $Y_{P/S}$ pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 como fator resposta.

Tabela 5.8 Matriz para o fator $Y_{P/S}$ apresentando os níveis codificados e reais do planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Ensaio	Xilose (g/L)	Células (g/L)	EL (g/L)	Variáveis Codificadas			$Y_{P/S}$ (g/g)
	X_1	X_2	X_3	X_1	X_2	X_3	
1	30,0	0,5	0,0	-1	-1	-1	0,09
2	75,0	0,5	0,0	1	-1	-1	0,04
3	30,0	2,0	0,0	-1	1	-1	0,16
4	75,0	2,0	0,0	1	1	-1	0,10
5	30,0	0,5	5,0	-1	-1	1	0,09
6	75,0	0,5	5,0	1	-1	1	0,05
7	30,0	2,0	5,0	-1	1	1	0,19
8	75,0	2,0	5,0	1	1	1	0,11
9	52,5	1,0	2,5	0	0	0	0,17
10	52,5	1,0	2,5	0	0	0	0,17
11	52,5	1,0	2,5	0	0	0	0,17
12	52,5	1,0	2,5	0	0	0	0,17

Os dados mostrados na análise de variância ANOVA (Tabela 5.9) indicam que o modelo linear já não é o mais adequado para a estimativa do fator $Y_{P/S}$. Esta mesma tabela mostra que os valores de probabilidade (p) foram não significativos, exceto o fator concentração celular inicial. Isto indica que o modelo mais adequado para o fator resposta ($Y_{P/S}$) seria um modelo quadrático. Isto pode ser observado pelos dados apresentados na Tabela ANOVA (Tabela 5.10) supondo um modelo quadrático onde se observa a curvatura significativa um nível de 5% de confiança.

Tabela 5.9 Análise de variância (ANOVA) para o fator $Y_{P/S}$ de acordo o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Concentração do Hidrolisado [X_1]	6,61E-03	1	6,62E-03	3,10	0,1387
Concentração celular [X_2]	1,01E-01	1	1,08E-02	5,06	0,0743
Extrato de Levedura [X_3]	4,81E-04	1	4,81E-04	0,23	0,6552
$X_1 X_2$	2,21E-04	1	2,21E-04	0,10	0,7609
$X_1 X_3$	2,45E-05	1	2,45E-05	0,01	0,9188
$X_2 X_3$	8,45E-05	1	8,45E-05	0,04	0,8501
Erro Total	1,07E-01	1	2,13E-03	-	-
Total		5			

$$R^2 = 0,6307$$

Tabela 5.10 Análise de variância para o ajuste de um modelo estatístico aos dados da Tabela 5.8, que representa o fator $Y_{P/S}$ de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	0,00E+00	0	-	-	-
Curvatura	1,10E-02	1	1,10E-02	5,78	0,0371
Resíduos	1,80E-02	10	1,83E-03	-	-
Falta de ajuste	1,80E-02	7	2,62E-03	2853,74	< 0,0001
Erro puro	2,75E-06	3	9,17E-07	-	-
Corr. Total	2,90E-02	11	-	-	-

$$R^2 = 0,6307$$

De uma maneira geral, nos ensaios onde se estudou o efeito dos nutrientes ($MgSO_4$, uréia e extrato de levedura) mantendo constante a concentração de xilose no hidrolisado (75 g/L) e a concentração celular inicial (2 g/L) obteve-se um $Y_{P/S}$ na faixa de 0,13 g/g. Este fator foi melhorado quando foi feita a variação da concentração de xilose no hidrolisado (30 a 75 g/L) e da concentração celular

inicial (0,5 a 2,0 g/L), apresentado valores próximos a 0,19 g/g, observando-se um aumento de 1,5 vezes.

O melhor valor de $Y_{P/S}$ foi obtido no ensaio 7, utilizando em seu nível inferior a concentração de xilose no hidrolisado (30 g/L) e em seu nível superior a concentração celular inicial (2 g/L). Isto permite afirmar que uma redução na concentração inicial de xilose no hidrolisado favoreceu a produção de etanol.

6. CONCLUSÕES

A levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 foi capaz de crescer em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em diferentes concentrações iniciais de xilose (30; 52,5; 75 g/L) e produzir etanol.

O aumento da concentração de açúcares no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar desfavoreceu o crescimento celular desta levedura.

Os melhores resultados de $Y_{P/S}$ e produtividade em etanol foram obtidos em meio suplementado com 5 g/L de extrato de levedura. Esta suplementação se mostrou favorável e permitiu reduzir a composição do meio diminuindo o número de nutrientes adicionados.

No processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contendo concentrações iniciais de xilose elevadas (75 g/L), quando se manteve o nutriente $MgSO_4$ em seu nível superior, observou-se a necessidade da adição de uréia para obter valores de $Y_{P/S}$ próximos aos encontrados com adição de somente extrato de levedura (0,13 g/g).

No processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, na condição de nível inferior de concentração de xilose no hidrolisado (30 g/L) e em seus níveis superiores de concentração celular inicial e de extrato de levedura (2,0 e 5,0 g/L, respectivamente) mostrou o melhor valor de $Y_{P/S}$ e produtividade em etanol (0,19 g/g e 0,03 g/L) com relação aos outros

ensaios, mostrando que a levedura teve melhor comportamento a baixas concentrações de xilose.

7. SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Otimizar as condições experimentais do processo (concentração de xilose, células iniciais e extrato de levedura) visando aumentar a produtividade de etanol.

Avaliar a influência dos fatores: aeração, pH e temperatura no processo fermentativo com a levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Journal Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, 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, n. 11, p. 2333-2336, 2006.
- ALEXANDRE, H.; ROUSSEAU, I.; CHARPENTIER, C. Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 20, p. 173-183, 1994.
- ALFENORE, S.; MOLINA-JOUE, C.; GUILLOUET, S.; URIBELARREA, J.-L.; GOMA, G.; BENBADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 1-2, p. 67-72, 2002.
- ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVES, L.A. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 1997. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1997.
- ANSELMO FILHO, P.; BADR, O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. **Applied Energy**, v. 77, n. 1, p. 51-67, 2004.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 56-62, 2007.
- BAJWA, P.K.; PINEL, D.; MARTIN, V.J.J.; TREVORS, J.T.; LEE, H. Strain improvement of the pentose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by genome shuffling. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, n. 2, p. 179-186, 2010.
- BEG, Q.K.; KAPOOR, M.; MAHAJAN, L.; HOONDAL, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326-338, 2001.
- BETTIGA, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 16, p. 0-8, 2008.
- 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.

BIDLACK, J.; MALONE, M.; BENSON, R. Molecular Structure and Component Integration of Secondary Cell Walls in Plants. **Proceedings of the Oklahoma Academy of Science**, v. 75, p. 51-56, 1992.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

BIRCH, R.M.; WALKER, G.M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9-10, p. 678-687, 2000.

BOTHAST, R.J.; SAHA, B.C. Ethanol Production from Agricultural Biomass Substrates. In: NEIDLEMAN, S.L.; LASKIN, A.I. (Ed.). **Advances in Applied Microbiology**. San Diego: Academic Press, 1997. p. 261-286.

CADETE, R.M. **Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, L-arabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanases associadas à madeira em decomposição**. 2009. 98 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A. Obtenção Biotecnológica de Xilitol a partir de Cavacos de Eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

CARDONA, C.A.; SÁNCHEZ, Ó.J. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2415-2457, 2007.

CARMOUZE, J.P. **O Metabolismo dos Ecossistemas Aquáticos: fundamentos teóricos, métodos de estudo e análises químicas**. São Paulo: Editora Edgard Blücher - FAPESP, 1994. 254 p.

CARVALHO, W. **Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2004.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 12, p. 2135-2141, 2004.

CHAUD, L.C.S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

CHO, D.H.; SHIN, S.-J.; BAE, Y.; PARK, C.; KIM, Y.H. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4947-4951, 2010.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB. Produção de cana. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=305>>. Acesso em: 15 Abr. 2010

COSTA, F. Moagem: a Transformação da cana em riqueza. **Revista Rural**, v. 86, n. 4, 2005. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2005/artigos/rev86_moagem.htm>. Acesso em: 13 Nov. 2009.

CRAWFORD, D.L.; MCCOY, E.; HARKIN, J.M.; JONES, P. Production of microbial protein from waste cellulose by *Thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 5, p. 833-843, 1973.

CUNHA, M.A.A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 105 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

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

DE OLIVEIRA, M.E.D.; VAUGHAN, B.E.; RYKIEL JR., E.J. Ethanol as Fuel: Energy, Carbon Dioxide Balances, and Ecological Footprint. **BioScience**, v. 55, p. 593-602, 2005.

DELLWEG, H.; KLEIN, C.; PRAHL, S.; RIZZI, M.; WEIGERT, B. Kinetics of ethanol production from D-xylose by the yeast *Pichia stipitis*. **Food Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 137-148, 1990.

DOMBEK, K.M.; INGRAM, L.O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 975 - 981, 1986.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting -xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 944-956, 1994.

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, n. 6, p. 360-364, 1986.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, 1996.

FEI, C.; HONGZHANG, C. Absorption of ethanol by steam-exploded corn stalk. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 3, p. 1315-1318, 2009.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, p. 11-14, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter De Gruyter Inc, 1989. 613 p.

FROLLINI, F.; PIMENTA, M.S.A. Lignin: Utilization as a macromonomer in the synthesis of phenolic type resins. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 46, n. 1, p. 43-49, 1997.

FROMANGER, R.; GUILLOUET, S.E.; URIBELARREA, J.L.; MOLINA-JOUE, C.; CAMELEYRE, X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 437-445, 2010.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: Sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 2-12, 2009.

FURUKAWA, K.; OBATA, H.; KITANO, H.; MIZOGUCHI, H.; HARA, S. Effect of cellular inositol content on ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in sake brewing. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n. 2, p. 107-113, 2004.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41-65, 2007.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1, n. 6, p. 1-7, 2008.

GONG, C.S.; CAO, N.J.; DU, J.; TSAO, G.T. Ethanol Production from Renewable Resources. In: **Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics**. New York: Springer, 1999.

GONZÁLEZ-BENITO, G.; RODRÍGUEZ-BRAÑA, L.; BOLADO, S.; COCA, M.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Batch ethanol fermentation of lignocellulosic hydrolysates by *Pichia stipitis*. Effect of acetic acid, furfural and HMF. **New Biotechnology**, v. 25, n. Supplement 1, p. S261-S261, 2009.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bioethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937-953, 2007.

HAHN-HAGERDAL, B.; WAHLBOM, C.F.; GARDONYL, M.; VAN ZYL, W.H.; CORDERO OTERO, R.R.; JONSSON, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 73, p. 53-84, 2001.

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.V.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.

JANSEN, N.B.; FLICKINGER, M.C.; TSAO, G.T. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 4, p. 362-369, 1984.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: **PENTOSEs and Lignin**. Berlin: Springer, 1983. p. 1-32.

KASTNER, J.R.; ROBERTS, R.S.; JONES, W.J. Effect of pH on cell viability and product yields in D-xylose fermentations by *Candida shehatae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 1-2, p. 224-228, 1996.

KILIAN, S.G.; VAN UDEN, N. Transport of xylose and glucose in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 5-6, p. 545-548, 1988.

KOTARSKA, K.; CZUPRYNSKI, B.; KLOSOWSKI, G. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 965-971, 2006.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151 - 172, 1993.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

LAPIERRE, C. Application of new methods for the investigation of lignin structure. In: JUNG, H.G. et al (Ed.). **Forage cell wall structure and digestibility**. Madison: American Society for Agronomy, 1993. p. 133-163.

LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Combined alcoholic fermentation of D-xylose and D-glucose by four selected microbial strains: Process considerations in relation to ethanol tolerance. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 6, p. 445-450, 1991.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S.G.; LICHWA, J.; ANTAL, M.J.; LYND, L.R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.

LATIF, F.; RAJOKA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 1, p. 57-63, 2001.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, n. 5, p. 367-380, 2002.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 6, p. 627-642, 2005.

LOUREIRO-DIAS, M.C.; PEINADO, J.M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 4, n. 11, p. 721-724, 1982.

LUO, L.; VAN DER VOET, E.; HUPPES, G. Life cycle assessment and life cycle costing of bioethanol from sugarcane in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 6-7, p. 1613-1619, 2009.

LYND, L.R. Overview and evaluation of fuel ethanol from cellulosic biomass: technology, economics, the environment, and policy. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 21, p. 403-465, 1996.

LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity Engineering. **Biotechnology Progress**, v. 15, n. 5, p. 777-793, 1999.

MAIA, A.B.R.A. **Fundamentos de Fermentação Alcoolica**. 1989. Trabalho de Conclusão do Curso (Engenharia Química) - Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 1989.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; PESSOA JUNIOR, A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, v. 3, n. 2, p. 45-53, 2003.

MAYALAGU, S.; PATTURAJAN, M.; CHATTERJI, D. The presence of two tightly bound Zn²⁺ ions is essential for the structural and functional integrity of yeast RNA polymerase II1. **Gene**, v. 190, n. 1, p. 77-85, 1997.

MCMILLAN JAMES, D. Conversion of Hemicellulose Hydrolyzates to Ethanol. In: **ENZYMATIC Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 411-437. ACS Symposium Series.

METCALF; EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment, Disposal, and Reuse**. 3rd. ed. Boston: McGraw-Hill, 1991. 1334 p.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; DAVISON, J.; SALMON, J.M.; MOLETTA, R.; GOUNOT, A.M. Relationship Between Effect of Ethanol on Proton Flux Across Plasma Membrane and Ethanol Tolerance, in *Pichia stipitis*. **Anaerobe**, v. 3, n. 6, p. 423-429, 1997.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

MOUTTA, R.D.O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol**. 2009. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

NIGAM, J.N. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 145-150, 2001.

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

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysate. **Process Biochemistry** v. 28, p. 249-257, 1993.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000.

PAN, X.J.; ARATO, C.; GILKES, N.; GREGG, D.J.; MABEE, W.; PYE, E.K.; XIAO, Z.; ZHANG, X.; SADDLER, J.N. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping - preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, n. 4, p. 473-481, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 191-201, 1998a.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998b.

PASCUAL, C.; ALONSO, A.; GARCIA, I.; ROMAY, C.; KOTYK, A. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, n. 3, p. 374-378, 1988.

PASHA, C.; KUHAD, R.C.; RAO, L.V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology** v. 103, n. 5, p. 1480-1489, 2007.

PASHA, C.; RAO, L.V. Thermotolerant Yeasts for Bioethanol Production using lignocellulosic substrates. In: INGLEDEW, W.M. et al (Ed.). **The Alcohol Text Book**. England: Nottingham University Press, 2009. p. 581-588.

PELCZAR, M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980. 566 p.

PELCZAR, M.J.; CHANG, E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ª. ed. São Paulo: Makron Books, 1996. p.

PEÑA, M. **Optimización de las condiciones de cultivo de las cepas *Pichia stipitis* CBS 5770, 5773 y 6054 para la producción de bioetanol apartir del hidrolizado de aserrin de curupau como residuo lignocelulósico**. 2008. 100 f. Trabalho de Conclusão do Curso (Licenciatura em Bioquímica) - Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andres, La Paz - Bolivia, 2008.

PEREIRA JR., N.; BON, E.P.S.; FERRARA, M.A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 62 p. Séries em Biotecnologia - Tecnologia de Bioprocessos.

RAGAUŠKAS, A.J.; WILLIAMS, C.K.; DAVISON, B.H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C.A.; FREDERICK, W.J., JR.; HALLETT, J.P.; LEAK, D.J.; LIOTTA, C.L.; MIELENZ, J.R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, n. 5760, p. 484-489, 2006.

REES, E.M.R.; STEWART, G.G. The Effects of Magnesium and Calcium on Yeast Fermentation Performance in High Gravity Worts. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 103, n. 5, p. 287-291, 1997.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Influence of k_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 21, n. 6, p. 505-508, 1999.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, p. 103-107, 2003.

RODRIGUES, R.C.L.B.; LU, C.; LIN, B.; JEFFRIES, T.W. Fermentation Kinetics for Xylitol Production by a *Pichia stipitis* d-Xylulokinase Mutant Previously Grown in Spent Sulfite Liquor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 199-209, 2008.

SÁNCHEZ, Ó.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 13, p. 5270-5295, 2008.

SANTOS, J.C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar em reator de leito fluidizado: Avaliação das condições operacionais**. 2005. 159 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2005.

SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; DE CARVALHO, W.; MUSSATTO, S.I.; DA SILVA, S.S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 113-118, 2005.

SANTOS, J.C.; MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2005.

SARROUH, B.F. **Estudos da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito Fluidizado Utilizando Bagaço de cana-de-açúcar e Células Imobilizadas: Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica** 2009. 185 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SARROUH, B.F.; DA SILVA, S.S.; SANTOS, D.T.; CONVERTI, A. Technical/Economical Evaluation of Sugarcane Bagasse Hydrolysis for Bioethanol Production. **Chemical Engineering & Technology**, v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SCHLITTLER, L.A.F.S. **Engenharia de um Bioprocesso para Produção de Etanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar**. 2006. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.D.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: **BIOTECNOLOGIA industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001a. p. 123-178.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.D.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Transferência de oxigênio em biorreatores. In: **BIOTECNOLOGIA industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001b. p. 277-331.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

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

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

SINGH, S.; MADLALA, A.M.; PRIOR, B.A. Thermomyces lanuginosus: properties of strains and their hemicellulases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 1, p. 3-16, 2003.

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

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, n. 10, p. 973-980, 1991.

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, n. 3, p. 778-790, 2009.

SPEIGHT, J.G. **Chemical Process and Design Handbook**. New York: McGraw-Hill, 2002. 1000 p.

STOCKER, M. Biofuels and Biomass-To-Liquid Fuels in the Biorefinery: Catalytic Conversion of Lignocellulosic Biomass using Porous Materials. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 47, p. 9200-9211, 2008.

SUBRAMANIYAN, S.; PREMA, P. Biotechnology of microbial xylanases: enzymology, molecular biology, and application. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 33-64, 2002.

SUN, J.X.; SUN, X.F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195-204, 2004.

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

SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 14, p. 1599-1606, 2005.

TAHERZADEH, M.J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol--a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 1-2, p. 53-66, 2002.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: An overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

TANIGUCHI, M.; TOHMAT.; ITAYAT.; M., F. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 4, p. 364-370, 1997.

TAYLOR, G. Biofuels and the biorefinery concept. **Energy Policy**, v. 36, n. 12, p. 4406-4409, 2008.

TEIXEIRA, L.C.; LINDEN, J.C.; SCHROEDER, H.A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**, v. 16, n. 1-4, p. 1070-1073, 1999.

TENGBORG, C.; STENBERG, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G.; LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Comparison of SO₂ and H₂SO₄ impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 3-15, 1998.

TORQUATO, S.A. Cana-de-açúcar Para Indústria: O Quanto Vai Precisar Crescer. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 1, n. 10, 2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=7448>>. Acesso em: 10 Nov. 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 920 p.

U.S. DEPARTMENT. From Biomass to Cellulosic Ethanol: Genomics for Alternative Fuels. Disponível em: <http://genomicscience.energy.gov/biofuels/Biofuels_Placemat2.pdf>. Acesso em: 12 Nov. 2009

VAN MARIS, A.J.A.; ABBOTT, D.A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M.A.H.; WISSELINK, H.W.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, n. 4, p. 391-418, 2006.

VAN VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

WILSON, D.K.; KAVANAGH, K.L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo-keto reductases and opportunities for protein engineering. **Chemico-Biological Interactions**, v. 143-144, p. 515-521, 2003.

WINKELHAUSEN, E.; AMARTEY, S.A.; KUZMANOVA, S. Xylitol Production from D-Xylose at Different Oxygen Transfer Coefficients in a Batch Bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 2, p. 150-154, 2004.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of -xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

XAVIER, A.M.R.B.; CORREIA, M.F.; PEREIRA, S.R.; EVTUGUIN, D.V. Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 8, p. 2755-2761, 2010.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

APÊNDICES

Apêndice A - Concentração de açúcares, células e etanol durante a fermentação de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para os ensaios 1 a 12 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.4)

Apêndice B - Concentração de ácido acético e pH durante a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para os ensaios 1 a 12 de acordo com o planejamento fatorial completo 2^3 (Tabela 4.4)