UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LIVIA MELO CARNEIRO

**Avaliação de estratégias de cultivo da levedura
Pichia stipitis em hidrolisado hemicelulósico de
palha de arroz visando à produção de etanol**

Lorena
2011

LIVIA MELO CARNEIRO

Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de conversão de biomassa.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Inês Conceição Roberto.

Edição reimpressa e corrigida

Lorena
Novembro, 2011

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

Carneiro, Livia Melo

Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando à produção de etanol. / Livia Melo Carneiro. –ed. reimp., corr.–2011.

175 p. : il.

Tese (Doutora 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, 2011.

Orientador: Inês Conceição Roberto.

1. Etanol 2. *Pichia stipitis* (Aclimação) 3. Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz 4. Nitrogênio (Fontes). I. Título

661.722 - CDU

Ao João Paulo, pelo amor, apoio, incentivo e companheirismo em todos os momentos.

À minha querida família. À minha mãe Aparecida Inácia Carneiro e à memória do meu pai Sérgio Monteiro Carneiro como um grande exemplo de força, amor e humildade.

Aos meus sogros Gilda e Luiz que me acolheram com muito carinho em sua família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo.

À Prof.^a Dr.^a Inês Conceição Roberto, pela orientação, confiança e apoio que contribuíram imensamente para a minha formação profissional.

À Dr.^a Solange Mussatto e ao Prof. Dr. José António Teixeira pela orientação, apoio e colaboração durante o meu estágio em Portugal.

À Capes, CNPq, Banco Santander e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos amigos, companheiros de laboratório e de Debiq: Dany Garcia, Dani Cortez, Priscila, Ju, Juan, Bruno, Rafael, Joseana, Giovani, Isabela, Dani Borba, Francislene e Professor Arnaldo.

Aos professores Patricio Peralta Zamora e Sérgio Renato Vaz pelos ensinamentos, incentivo à pesquisa e amizade.

Ao meu querido João Paulo pelo amor, apoio, incentivo, confiança e companheirismo sempre.

Aos amigos Érica e João Vicente, Sharlley e Fábio, Barreto e Márcia, Daniely e Luiz, Solange e Giuliano, Lucinha, Juliano, Raul e Márcia.

Aos meus irmãos Léa, Leandra, Ligia e Ricardo, às minhas queridas sobrinhas Camila Cristina e Fernanda pelo amor e incentivo.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), todos os colegas, professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

***“A mente que se abre a uma
nova ideia jamais voltará ao
seu tamanho original”
(Albert Einstein)***

RESUMO

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

O presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da suplementação do meio de fermentação com diferentes fontes de nitrogênio e avaliar estratégias de aclimação da levedura *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando melhorar a produção de etanol. Em uma primeira etapa do trabalho foram realizados estudos em meio semissintético para avaliar o efeito das fontes de nitrogênio arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio sobre a produção de etanol por *P. stipitis*. Os resultados em meio semissintético demonstraram que o meio composto por ácido glutâmico, fosfato de amônio e extrato de levedura nas concentrações de 3 g/L proporcionou os melhores resultados de conversão ($Y_{P/S} = 0,36$ g/g) e produtividade ($Q_P = 0,71$ g/L.h). O estudo de suplementação nutricional do hidrolisado mostrou que o crescimento de *P. stipitis* foi inibido pela suplementação com ácido glutâmico, e que a presença de extrato de levedura e fosfato de amônio não apresentou qualquer efeito sobre a produção de etanol, sendo o hidrolisado hemicelulósico capaz de suprir a necessidade nutricional da levedura, dispensando a sua suplementação para o uso como meio de fermentação. Na etapa de aclimação da levedura *P. stipitis* ao hidrolisado, foram avaliadas cinco estratégias (A, B, C, D e E), baseadas em transferências sucessivas de células para meios com concentrações crescentes de hidrolisado, 45, 60 e 75 % (v/v). Durante a estratégia de aclimação A foi possível isolar uma colônia (A_{75-2}) capaz de fermentar em hidrolisado contendo 70 g/L de xilose, alcançando valores dos parâmetros $Y_{P/S}$ (0,35 g/g) e Q_P (0,23 g/L.h), 10 e 28 % superiores, respectivamente, aos obtidos pela cepa original. Os resultados das estratégias B e C mostraram que mesmo empregando um maior número de transferências, assim como a utilização de elevadas concentrações celulares, não foram capazes de contribuir com o processo de aclimação. Na avaliação das estratégias D e E, verificou-se que o emprego de condições de maiores níveis de fornecimento de oxigênio durante as etapas de transferências sucessivas propiciaram condições mais adequadas para que a levedura superasse os efeitos de inibição ocasionados pelos compostos tóxicos presentes no hidrolisado. A estratégia E, realizada sob condição de maior aeração, apresentou os melhores resultados dentre as estratégias de aclimação avaliadas, sendo obtida uma produção de 27 g/L de etanol após 72 horas. Além disso, esta estratégia foi a única em que a levedura foi capaz de manter os valores de $Y_{P/S}$ (0,33 g/g) e Q_P (0,35 g/L.h) durante todas as transferências, indicando uma maior aclimação ao hidrolisado. Na fermentação em biorreator, o emprego de inóculo proveniente de cultivo sucessivo de células, quando comparado à fermentação realizada sem cultivo sucessivo, proporcionou um aumento de 7 e 50% sobre os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente. Com os resultados do presente trabalho pode-se concluir que estratégias de aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado não destoxificado são métodos eficazes para a superação de inúmeros problemas relativos às condições de *stress* fisiológico e inibição do metabolismo microbiano. Porém, a resposta fisiológica da levedura *P. stipitis* é dependente do número de transferências, concentração celular e oxigenação do meio.

Palavras-chave: Etanol. *Pichia stipitis* (Aclimação). Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Nitrogênio (Fontes).

ABSTRACT

CARNEIRO, L. M. **Evaluation of *Pichia stipitis* cultivation strategies on rice straw hemicellulosic hydrolysate aiming to ethanol production.** 2011. 175 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

In this work, different acclimatization strategies employing the yeast *Pichia stipitis* on rice straw hemicellulosic hydrolysate with high xylose concentration were evaluated. Initially, the effects of nitrogen sources supplementation in the semisynthetic and hydrolysate medium on *P.stipitis* fermentation were studied. The results showed that in semisynthetic medium the addition of glutamic acid, ammonium phosphate and yeast extract at concentrations of 3 g/L provided the best conversion ($Y_{P/S} = 0.36$ g/g) and productivity ($Q_P = 0.71$ g/L.h). On the other hand, the hydrolysate supplementation with yeast extract and ammonium phosphate did not show effect on the fermentative parameters, whereas glutamic acid supplementation inhibited completely the cellular growth. These results show that the hemicellulosic hydrolysate can be used as a fermentation medium without any nutritional supplementation. To overcome the effects of inhibition caused by toxic compounds present on rice straw hemicellulosic hydrolysate, five acclimatization strategies (A, B, C, D and E) were performed by sequentially transferring of the cells in hydrolysate containing increasing concentrations (45, 60 and 75% (v/v). During the strategy A was possible isolate a colony (A₇₅-2) with ability to ferment the hydrolysate containing xylose at 70 g/L ($Y_{P/S} = 0.35$ g/g and $Q_P = 0.23$ g/L.h), which corresponded to increase of 10 and 28%, respectively, as compared to the values obtained by the original strain. Employing a greater number of transfers, as well as the use of high cell concentrations (strategies B and C) was not possible improve to the acclimatization process. Regarding the strategy E, which employed higher levels of oxygen supply during periods of successive transfers, showed the most appropriate for the yeast overcome the effects of inhibition caused by toxic compounds present in the hydrolysate. With this strategy the best results (27 g/L ethanol after 72 hours) among all assessed, were observed. Moreover, this approach was the only in which the yeast was able to keep the values of $Y_{P/S}$ (0.33 g/g) and Q_P (0.35 g/L.h) for all transfers, indicating greater acclimatization to hydrolysate. By using this strategy in bioreactor fermentation, it was obtained an increase of 7 and 50% on the values of $Y_{P/S}$ and Q_P , respectively, in relation the reference fermentation (without successive transfer). It is possible conclude that acclimatization strategies of the yeast *P. stipitis* in no detoxified hydrolysate are effective methods to overcome numerous problems concerning the physiological stress and inhibition of microbial metabolism. However, the physiological response of yeast is dependent on the transfers number, cell concentration and oxygenation level of the medium.

Keywords: Ethanol. *Pichia stipitis* (Acclimatation). Rice straw hemicellulosic hydrolysate. Nitrogen (Source).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1** – Produção mundial de etanol (bilhões de litros) em 2009 e principais países produtores (Adaptado de RFA – Renewable Fuels Association, 2010).....27
- Figura 2.2** – Principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol (Adaptado de Bioenergy today and tomorrow, 2010).....30
- Figura 2.3** – Estrutura da parede celular dos vegetais; arranjo das microfibras de celulose, cadeias de hemicelulose e da lignina; e exemplo de monossacarídeos presentes nestas estruturas (Adaptado de Yarris, 2010).....32
- Figura 2.4** - Principais produtos de degradação gerados durante o processo de fracionamento de materiais lignocelulósicos (Adaptado de BALAT, 2011). Onde as cores representam: polissacarídeos (■), açúcares simples (■), furanos (■), ácidos carboxílicos (■); compostos fenólicos (■).....36
- Figura 2.5** - As três principais unidades fenólicas constituintes da lignina: *p*-hidroxibenzil (H), guaiacil (G) e siringil (S). A função **R** indica que as ligações éster ou éter podem ocorrer nestas posições, e R = H representa o fenol livre. No lugar do polímero, são possíveis muitos tipos diferentes de estruturas (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).....38
- Figura 2.6** – Processos de aclimação de leveduras empregando cultivos sucessivos em meio sólido, frascos agitados e reatores (Hahn-Hagerdal et al., 200.....43
- Figura 2.7** - Representação esquemática do mecanismo de resposta de uma levedura a condições ambientais de estresse (QUEROL et al, 2003.....44
- Figura 2.8** – Vias metabólicas da assimilação de monossacarídeos por leveduras: Embden-Meyerrhof (glicólise), Fosfo pentose (PPP), ciclo do ácido cítrico (CAC) e a assimilação de NH_4^+ . As linhas pontilhadas indicam transporte através da mitocôndria (adaptado de Taherzadeh, 1999 e Gírio et al., 2010).....52
- Figura 2.9** – Visão geral da assimilação de nitrogênio por leveduras (Walker, 1998).....54
- Figura 2.10** – Variação do meio base para encontrar a combinação ótima entre uréia e aminoácidos, visando maximizar a produção de etanol por *P. stipitis* NRRL Y-7124, em meio contendo 150 g/L de xilose (SLININGER et al., 2006).....57
- Figura 4.1** – Esquema da aclimação da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleção e isolamento das cepas durante a estratégia de aclimação “A”. Pré-inóculo em meio semissintético (MS); Inóculo em hidrolisado a 25% (v/v), Fermentação 1A (H45) e transferências sucessivas: 1^aT e 2^aT em hidrolisado a 60 e 75 % (v/v), respectivamente.....69
- Figura 4.2** – Procedimento utilizado para a seleção e o isolamento das cepas adaptadas da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, provenientes de cultivos sucessivos em meio líquido.....70

- Figura 4.3** – Esquema da aclimação da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleção e isolamento das cepas durante a estratégia de aclimação “B” e “C”. Pré-inóculo em meio semissintético (MS); Inóculo em hidrolisado a 25% (v/v), e transferências sucessivas realizados em hidrolisado a 45, 60 e 75% (v/v).....72
- Figura 4.4** – Esquema da aclimação da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleção e isolamento das cepas durante as estratégias de aclimação “D” e “E”. Inóculo em hidrolisado a 25% (v/v), e cultivos sucessivos: C1, C2, e C3 realizados em hidrolisado a 45, 60 e 75% (v/v), respectivamente. Proporção de 2,5:1 e 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ nas estratégias D e E, respectivamente.....74
- Figura 5.1** – Crescimento celular dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.....94
- Figura 5.2** – Consumo de xilose (●) e glicose (▲) dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.....95
- Figura 5.3** – Produção de etanol dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.....96
- Figura 5.4** – Parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ (a), $Y_{X/S}$ (b), Q_P (c) e Q_S (d) dos ensaios do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.....99
- Figura 5.5** – Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança e erro puro com 2 graus de liberdade ($t = 4,30$) para as variáveis respostas: fator de conversão de substrato etanol, $Y_{P/S}$ (a) e produtividade volumétrica em etanol, Q_P (b).....102
- Figura 5.6** – Crescimento celular (a), consumo de xilose (●) e glicose (▲) (b) e produção de etanol (c) dos ensaios de otimização dos níveis de concentração de ácido glutâmico e fosfato de amônio para . P.C. (ponto central) em meio semissintético por *P. stipitis*.....108
- Figura 5.7** – Crescimento celular (a), consumo de xilose (b) e produção de etanol (c) dos ensaios realizados em meio semissintético pela levedura *P. stipitis* para avaliação de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio.....109
- Figura 5.8** – Consumo de glicose (a) e consumo de xilose (b) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da adição de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol por *P. stipitis*.....114

- Figura 5.9** – Crescimento celular (a) e produção de etanol (b) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da adição de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol por *P. stipitis*.....115
- Figura 5.10** – Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança para as variáveis respostas: ($Y_{P/S}$) fator de conversão de substrato em produto e (Q_P) produtividade volumétrica em etanol . Variáveis: A = Extrato de levedura; B = Ácido glutâmico; C = Fosfato de amônio.....117
- Figura 5.11** – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.....120
- Figura 5.12** - Consumo de xilose e glicose (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c) dos cultivos da cepa isolada A₇₅-2 e cepa original de *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 60% (v/v).....127
- Figura 5.13** – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação B.....130
- Figura 5.14** – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação C.....133
- Figura 5.15** – Colônias de *P. stipitis* isoladas em meio sólido, contendo hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 25 (B e C) e 45% (v/v) (B₃, B₄, C₃ e C₄); (B e C) colônias de *P. stipitis* sem aclimação; (B₃) 3ª transferência da estratégia de aclimação B; (B₄) 4ª transferência da estratégia de aclimação B; (C₃) 3ª transferência da estratégia de aclimação C; (D₄) 4ª transferência da estratégia de aclimação C.....137
- Figura 5.16** – Microscopia óptica das células de *P. stipitis* provenientes das colônias lisas (1) e rugosas (2). Fotos obtidas no microscópio com um aumento de 40 vezes.....137
- Figura 5.17** – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas transferências sucessivas de células das estratégias de aclimação D (linha pontilhada) e E (linha sólida).....141
- Figura 5.18** – Perfis de consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) da levedura *P. stipitis* de diferentes transferências realizadas durante as estratégias de aclimação A, B, C, D e E em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 75% (v/v).....149

Figura 5.19 – Perfis de consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v), durante a 1ª transferência da estratégia E e o ensaio de referência realizado na condição de maior aeração (proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$).....152

Figura 5.20 – Consumo de açúcares (xilose e glicose), crescimento celular e produção de etanol dos ensaios CTS (—) e STS (—), realizados em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v) pela levedura *P. stipitis*....152

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição química (% peso seco) da palha de arroz em diversos trabalhos reportados na literatura.....	35
Tabela 2.2 – Parâmetros fermentativos da produção de etanol empregando leveduras adaptadas em diversos hidrolisados hemicelulósicos.....	48
Tabela 2.3 – Efeito da composição nutricional do meio sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas da levedura <i>Pichia stipitis</i>	58
Tabela 4.1 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	64
Tabela 4.2 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^4 para avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	64
Tabela 4.3 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 para otimização das concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio no meio de fermentação para a produção de etanol a partir da levedura <i>Pichia stipitis</i>	65
Tabela 4.4 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^2 para otimização de ácido glutâmico e fosfato de amônio no meio de fermentação para a produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	66
Tabela 4.5 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 com duplicata no ponto central para avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol a partir da levedura <i>P. stipitis</i>	67
Tabela 4.6 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol a partir da levedura <i>P. stipitis</i>	67
Tabela 5.1 – Composição química da palha de arroz.....	87
Tabela 5.2 – Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz diluído e concentrado.....	89
Tabela 5.3 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 , para avaliação da presença de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	92
Tabela 5.4 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados na composição do meio de fermentação para a produção de etanol por <i>P. stipitis</i> , sobre o fator de conversão de substrato (xilose e glicose) em etanol ($Y_{P/S}$).....	104

Tabela 5.5 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados na composição do meio de fermentação para a produção de etanol por <i>P. stipitis</i> , sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P).....	104
Tabela 5.6 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 , para otimização das concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio em meio semissintético para a produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	106
Tabela 5.7 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito do extrato de levedura (E.L.), ácido glutâmico (A.G.) e fosfato de amônio (F.A) sobre fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por <i>P. stipitis</i> adicionado de 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado.....	112
Tabela 5.8 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.....	122
Tabela 5.9 – Parâmetros fermentativos do cultivo das cepas de <i>Pichia stipitis</i> isoladas durante as diferentes transferências da estratégia de aclimação A, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	125
Tabela 5.10 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células das estratégias de aclimação B e C.....	134
Tabela 5.11 – Parâmetros fermentativos do cultivo das cepas de <i>Pichia stipitis</i> isoladas durante as diferentes transferências das estratégias de aclimação B e C, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	139
Tabela 5.12 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura <i>Pichia stipitis</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.....	143
Tabela 5.13 – Parâmetros fermentativos do cultivo das cepas de <i>Pichia stipitis</i> isoladas durante as diferentes transferências das estratégias de aclimação D e E, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	146
Tabela 5.14 – Parâmetros fermentativos dos ensaios realizados em biorreator com transferência sucessiva de células (CTS) e sem transferência sucessiva (STS).....	157

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE ETANOL	25
2.2 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE ETANOL	28
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	31
2.3.1 Palha de Arroz	34
2.4 COMPOSTOS INIBIDORES LIBERADOS DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO	35
2.5 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA CONTORNAR A TOXICIDADE DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS	39
2.5.1 Métodos de Destoxificação do Hidrolisado	39
2.5.2 Estratégias de Aclimação	42
2.6 METABOLISMO DE XILOSE EM LEVEDURAS	51
2.7 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO	53
3 OBJETIVOS	60
3.1 OBJETIVO GERAL	60
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4 MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO	61
4.2 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO	62
4.3 MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO	63
4.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i> NRRL Y-7124	63
4.4.1 Seleção das Variáveis através do Planejamento Fatorial 2 ⁴	63
4.4.2 Otimização de Fontes de Nitrogênio através de Planejamento Fatorial 2 ² com Face Centrada	65
4.4.3 Efeito da Suplementação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz com Fontes de Nitrogênio previamente selecionadas em Meio Semissintético	66
4.5 ESTRATÉGIAS DE ACLIMATAÇÃO DA LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i>	68
4.5.1 Estratégia de Aclimação "A"	68
4.5.2 Estratégia de Aclimação "B"	71
4.5.3 Estratégia de Aclimação "C"	71
4.5.4 Estratégia de Aclimação "D"	73

4.5.5 Estratégia de Aclimação “E”	73
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL EM REATOR DE BANCADA	74
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	75
4.7.1 Determinação do Teor de Umidade na Palha de Arroz	75
4.7.2 Determinação das Principais Frações Orgânicas Presentes no Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz	75
4.7.3 Determinação de Sólidos Totais, Cinzas e Minerais	78
4.7.4 Determinação de pH e Densidade	80
4.7.5 Determinação dos Teores de Açúcares, Ácido acético, Glicerol, Furanos, Compostos Derivados de Lignina (CDL) e Etanol	80
4.7.6 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	81
4.7.7 Determinação da Concentração Celular	81
4.7.8 Determinação de Nitrogênio Orgânico e Inorgânico	82
4.7.9 Determinação de Proteínas	82
4.7.10 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	83
4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS	83
4.8.1 Fator de Conversão de Substrato em Etanol ($Y_{P/S}$)	83
4.8.2 Fator de Conversão de Substrato em Células ($Y_{X/S}$)	83
4.8.3 Produtividade Volumétrica em Etanol (Q_P)	84
4.8.4 Velocidade de Consumo de Substrato (Q_S)	84
4.8.5 Eficiência de fermentação	85
4.8.6 Análise Estatística	85
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE ARROZ E DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	86
5.2 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i> NRRL Y-7124	91
5.2.1 Seleção das Variáveis através do Planejamento Fatorial 2^4	91
5.2.1.1 Análise Estatística do Planejamento Fatorial 2^4 para Seleção das Fontes de Nitrogênio	101
5.2.2 Otimização dos Níveis de Fosfato de Amônio e Ácido Glutâmico Através de Planejamento Fatorial 2^2 com Face Centrada	105
5.2.3 Efeito da Suplementação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz com Fontes de Nitrogênio Previamente Seleccionadas em Meio Semissintético.	111

5.3 ESTRATÉGIAS DE ACLIMATAÇÃO DA LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i> EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ	119
5.3.1 Perfil dos Cultivos Durante a Estratégia de Aclimação “A”	119
5.3.1.1 Fermentabilidade das Colônias de <i>Pichia stipitis</i> Isoladas Durante a Estratégia de Aclimação “A”	124
5.3.2 Perfil dos Cultivos Durante as Estratégias de Aclimação “B” e “C”	129
5.3.2.1 Fermentabilidade das Colônias Isoladas Durante as Estratégias de Aclimação “B” e “C”	135
5.3.3 Perfil Fermentativo Durante as Estratégias de Aclimação “D” e “E”	140
5.3.3.1 Fermentabilidade das Colônias Isoladas Durante as Estratégias de Aclimação “D” e “E”	145
5.3.4 Análise Comparativa dos Resultados das Diferentes Estratégias de Aclimação.....	148
5.4 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ PELA LEVEDURA <i>PICHIA STIPITIS</i> EM BIORREATOR	153
6 CONCLUSÕES.....	160
REFERÊNCIAS	162

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores desafios para a sociedade no século 21 é atender à crescente demanda de energia para transporte, aquecimento e processos industriais, além do fornecimento de matéria-prima para a indústria de forma sustentável.

O etanol já foi introduzido em grande escala no Brasil e Estados Unidos e, desta forma, espera-se que seja um dos biocombustíveis renováveis mais amplamente utilizados no setor de transportes nos próximos 20 anos. Atualmente, o etanol é produzido a partir de cana-de-açúcar (Brasil) ou milho (EUA), a preços competitivos. No entanto, estas matérias-primas também são amplamente utilizadas na alimentação, não sendo suficientes para atender à crescente demanda de etanol combustível.

Dentro deste contexto, os materiais lignocelulósicos representam uma promissora fonte de matéria-prima para a produção de etanol através de bioconversão, visto que a maioria dos materiais lignocelulósicos são subprodutos de atividades agrícolas e resíduos agro-industriais. Porém, o desenvolvimento de tecnologias que permitam conversões eficientes destes resíduos constitui um dos grandes desafios para avanços tecnológicos nesta área.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido realizados buscando viabilizar a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Entretanto, segundo a literatura científica, várias etapas deste processo necessitam estar bem estabelecidas para aplicações em grande escala. Por exemplo, processos de pré-tratamento e hidrólise da matéria-prima para a liberação dos açúcares fermentescíveis têm sido largamente estudados, porém muitos destes processos em que se utilizam ácidos, bases, solventes orgânicos e elevadas temperaturas podem gerar produtos de degradação de açúcares como furanos, ácidos fracos, além de compostos fenólicos derivados da degradação da lignina. Estes compostos normalmente atuam como inibidores do metabolismo microbiano levando a baixos rendimentos e produtividade em etanol. Desta forma, processos de destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos são geralmente necessários para a obtenção de melhores resultados nos processos fermentativos. Entretanto,

tais procedimentos podem demandar elevados investimentos, além de promover grandes perdas de açúcares dependendo do método empregado.

Estratégias de aclimação de leveduras aos inibidores presentes em hidrolisados hemicelulósicos têm sido amplamente estudadas como uma alternativa promissora aos métodos de destoxificação. Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio e estratégias de aclimação da levedura *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, visando à obtenção de maiores rendimentos e produtividade em etanol sem a necessidade da etapa de destoxificação. O presente projeto de pesquisa está inserido no programa de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), que tem como objetivo o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de matérias-primas lignocelulósicas, especialmente os resíduos agro-industriais visando à produção de materiais de alto valor agregado por via biotecnológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 HISTÓRICO DA PRODUÇÃO DE ETANOL

O histórico de produção de biocombustível no Brasil teve início em 1975 com o Programa Nacional para a Produção de Álcool (ProÁlcool). A crise mundial de petróleo e o baixo preço do açúcar em 1970 levaram o Brasil a iniciar uma estratégia de produção de um biocombustível em substituição à gasolina, na época um produto escasso e de custo elevado.

Com grandes intervenções do governo para aumentar a demanda e suprimento de etanol, o Brasil desenvolveu tecnologias para o uso desta energia renovável em grande escala. Em 1984, a maioria dos carros novos vendidos no Brasil utilizava etanol hidratado como combustível (96 % de etanol e 4 % de água) (BALAT; BALAT, 2009). Quando, em 1986, os preços do petróleo caíram (US\$ 14/barril), o programa Pró-Álcool, que havia se tornado rentável pelo alto preço do petróleo, acima de US\$ 40/barril, não era mais economicamente atrativo. O aumento do preço do açúcar e a liberalização da exportação do produto em 1988 levaram à redução da produção do etanol. Depois de 1989, com o crescente aumento do preço desse combustível, aumentaram as vendas de veículos movidos a gasolina, levando nos anos 90, ao final da produção de motores movidos somente a etanol. Entretanto, em 1993, passou a ser obrigatória no Brasil a utilização de uma mistura de 20 a 25% de etanol na gasolina automotiva (BALAT; BALAT, 2009; CERQUEIRA LEITE et al., 2009; SOCCOL et al., 2010).

Com base na discussão mundial sobre a substituição de energias fósseis por energias renováveis e em razão da queda do preço do açúcar no mercado mundial, em meados da década de 90 aumentaram-se os incentivos privados para a produção de etanol, e ao mesmo tempo a intervenção do governo diminuiu. No ano de 2002, foi apresentado o primeiro veículo com motor *flex-fuel* (combustível flexível), modelo desenvolvido por empresas alemãs e produzido em série no Brasil a partir de março de 2003 (KOHLHEPP, 2010). Em março de 2004, 16% dos veículos novos vendidos no Brasil já eram equipados com esse tipo de motor, em fevereiro de 2006 já havia 76,6% da frota e hoje mais de 92% (KOHLHEPP, 2010; XAVIER, et al. 2010; CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

Nos Estados Unidos, uma combinação de aumento de impostos e disponibilidade de petróleo barato efetivamente extinguiu o etanol como um combustível para o transporte no início do século 20, porém, com a necessidade de produção de biocombustíveis, particularmente etanol produzido a partir de milho, o mercado do etanol teve início na década de 80, principalmente para revitalizar o setor agrícola em uma época de excesso de oferta proveniente deste setor (BALAT; BALAT, 2009). A indústria de etanol foi reconstruída nos Estados Unidos mais gradualmente do que no Brasil, porém a partir de 2006 os Estados Unidos superaram a produção do Brasil e se tornaram os líderes mundiais na produção de etanol, utilizando atualmente em alguns estados uma mistura denominada E85 (85% etanol e 15% gasolina) em veículos projetados especialmente para o uso desta mistura (BALAT; BALAT, 2009; KLINE, et al.,2008).

O etanol é produzido por outros países além do Brasil e Estados Unidos, porém em quantidades menos expressivas. A experiência no setor de etanol na China, por exemplo, teve início em 2001 usando milho e trigo como matéria-prima. Na Ásia (Índia e Tailândia) a cana-de-açúcar é produzida por pequenos produtores, sendo a mandioca a principal matéria-prima utilizada na Tailândia. O Canadá produz etanol essencialmente a partir de trigo e milho e países da União Européia utilizam açúcar de beterraba (ROSILLO-CALLE; WALTER, 2006).

A produção mundial de etanol em mais de 40 países aumentou cerca de 400 % desde 2000, alcançando em 2009 uma produção de 74 bilhões de litros de etanol sendo distribuídos entre Estados Unidos, Brasil, União Européia, China, Tailândia, Canadá e Índia (Figura 2.1). O Brasil atualmente é o maior produtor de cana-de-açúcar com aproximadamente 33% da produção mundial e o segundo maior produtor de etanol alcançando uma produção de aproximadamente 24,9 bilhões de litros de etanol em 2009 (RFA, 2010). O etanol brasileiro é mais barato que o produzido nos Estados Unidos e Europa devido aos menores custos com o processamento, além de ser mais favorável em termos de balanço de energia e redução na emissão dos gases de efeito estufa (GOLDEMBERG, 2009; NIGAM; SINGH, 2010).

Figura 2.1 – Produção mundial de etanol (bilhões de litros) em 2009 e principais países produtores (Adaptado de RFA – Renewable Fuels Association, 2010).

Atualmente, existem 448 unidades de produção de etanol instaladas no país (SOCCOL et al., 2010), das quais 354 unidades estão localizadas no Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Novas unidades de produção de etanol deverão ser instaladas em um futuro próximo, no entanto, uma expansão da produção de etanol a partir de cerca de 24,9 bilhões de litros em 2009 para 104 bilhões de litros em 2025 exigirá uma redução dos custos de produção para sustentar o transporte de áreas mais distantes para o interior e mercados externos (SOCCOL et al., 2010; CERQUEIRA LEITE et al., 2009).

Atualmente, no Brasil, um hectare de cana pode produzir cerca de 6000 L de etanol com custo de produção variando de US\$ 0,25 a 0,30 por litro (CERQUEIRA LEITE et al., 2009). Na União Européia e nos Estados Unidos esse custo é de aproximadamente US\$ 0,29 e US\$ 0,53 por litro, respectivamente (BALAT; BALAT, 2009).

2.2 PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Os processos biotecnológicos de produção de etanol são responsáveis por cerca de 95% do produzido mundialmente (ROSILLO-CALLE; WALTER, 2006). As matérias-primas utilizadas para a bioprodução de etanol podem ser divididas em três grupos: (1) açúcares simples: cana-de-açúcar, beterraba, sorgo, soro de leite e melaço; (2) amiláceos: milho, trigo, cevada, mandioca; (3) biomassa lignocelulósica: madeira, palha, resíduos agrícolas e resíduos de colheita (MUSSATTO et al., 2010). No primeiro grupo, o processo é menos complexo do que aqueles que utilizam materiais amiláceos ou biomassa lignocelulósica. A bioconversão destes materiais requer somente uma etapa de moagem para extrair os açúcares para a fermentação, não necessitando de nenhuma etapa de hidrólise. Neste processo os açúcares são diretamente fermentados a etanol por meio de microrganismos como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. De acordo com Sanches et al. (2004) após a fermentação o excesso de biomassa celular seca pode ser usada na alimentação animal e a vinhaça (subproduto da destilação) pode ser usada como fertilizante.

A produção de etanol a partir de materiais amiláceos envolve a etapa de moagem e hidrólise do amido que é totalmente decomposto em glicose pela combinação de duas enzimas, a amilase e amiloglucosidase, antes de ser fermentado por leveduras para produzir etanol. Em países tropicais, as culturas amiláceas e outros tubérculos como a mandioca, podem ser usadas para a produção de etanol combustível (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007; PRASAD, et al., 2007, KUMAR, SINGH, GHOSH et al., 2010). O amido é o tipo de matéria-prima mais utilizada para produção de etanol na América do Norte e Europa. Os processos de produção de etanol utilizando culturas de amido são considerados bem estabelecidos. Atualmente culturas de amido correspondem a 60% da matéria-prima utilizada na produção mundial de etanol e 40% correspondem à cana-de-açúcar e beterraba (BIOFUELS, 2010).

Os materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a produção de etanol têm sido largamente estudados. As tecnologias envolvidas para a utilização destes materiais como matéria-prima para a produção de etanol são mais complexas e os custos de produção ainda são mais elevados quando comparados à cana-de-açúcar, beterraba ou milho. Os materiais lignocelulósicos

apresentam grande potencial para a produção de etanol em grande escala, tendo em vista que a maioria destes materiais são subprodutos de atividades agrícolas e resíduos agro-industriais. Considera-se que a biomassa lignocelulósica deverá tornar-se a principal matéria-prima para produção de etanol no futuro próximo.

Devido à estrutura mais complexa dos materiais lignocelulósicos é necessário a realização de um pré-tratamento para a sua degradação e consequente liberação dos açúcares fermentescíveis. O processo de pré-tratamento promove a remoção parcial da lignina, quebra parcial ou total da hemicelulose e a diminuição da fração de celulose cristalina relacionada com a celulose amorfa, a forma mais apropriada da celulose para posterior hidrólise enzimática. A Figura 2.2 apresenta um esquema resumido das principais etapas dos processos biotecnológicos de produção de etanol.

As etapas do processo de produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica são: 1) pré-tratamento: com o objetivo de liberar pentoses da fração hemicelulósica e tornar a celulose mais disponível para as etapas subsequentes; 2) hidrólise ácida ou enzimática da celulose, para quebrar os polissacarídeos em açúcares simples; 3) fermentação dos açúcares (hexoses e pentoses) a etanol através de microrganismos; 4) separação e concentração do etanol produzido por fermentação (ALVIRA et al., 2009; BIOFUELS, 2010).

A etapa de pré-tratamento, é vista como uma das etapas mais onerosas para o processo global de conversão de biomassa a açúcares fermentescíveis. Os pré-requisitos de um pré-tratamento ideal dos materiais lignocelulósicos incluem: 1) produção de uma fibra de celulose suscetível ao ataque enzimático, 2) evitar a destruição da hemicelulose e celulose, 3) impedir a formação de possíveis inibidores para as enzimas hidrolíticas e os microrganismos fermentadores, 4) minimizar os custos da demanda de energia, 5) reduzir os custos de materiais para a construção de reatores, 6) produzir menos resíduos e 7) consumo de pouco ou nenhum reagente químico. O pré-tratamento é crucial para assegurar bons rendimentos em açúcares a partir de polissacarídeos. Processos físicos (moagem), físico-químicos (explosão à vapor/auto-hidrólise, hidrotermólise e oxidação via úmida), químicos (álcalis, ácido diluído, agentes oxidantes e solventes orgânicos) e biológicos, têm sido utilizados como pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

Figura 2.2 – Principais matérias-primas e processos utilizados para a produção de etanol (Adaptado de Bioenergy today and tomorrow, 2010).

De acordo com Hahn-Hagerdal et al. (2006), o melhor aproveitamento dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos é obtido quando a hidrólise é realizada em duas etapas. A primeira etapa é realizada em condições que priorizam a hidrólise da hemicelulose para a recuperação de pentoses, e na segunda etapa é realizada a conversão da celulose em glicose que pode ser química ou enzimática.

Após a etapa de hidrólise, os açúcares obtidos podem ser convertidos a etanol por microrganismos. As pentoses são fermentadas por leveduras tais como *Candida* e *Pichia*, ou organismos geneticamente modificados (*Saccharomyces*), e as hexoses são fermentadas por leveduras convencionalmente utilizadas como a *Saccharomyces cerevisiae*. A etapa final do processo consiste na separação, concentração e destilação do etanol, que são tecnologias bem estabelecidas industrialmente.

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A estrutura lignocelulósica é encontrada na parede celular dos vegetais, a qual é composta por fibras de carboidratos (celulose e hemicelulose) ligadas por uma estrutura fenólica complexa denominada lignina. Na Figura 2.3 está mostrado o arranjo dos principais constituintes presentes nestas estruturas.

A composição dos materiais lignocelulósicos é um fator importante que afeta a eficiência da produção de etanol durante os processos de bioconversão. A composição estrutural e química destes materiais é altamente variável devido a variações genéticas da planta e influência do meio ambiente e suas interações. A composição típica dos materiais lignocelulósicos é 48% (p/p) de carbono, 45% (p/p) de oxigênio, 6%(p/p) de hidrogênio, sendo um conteúdo muito pequeno de matéria inorgânica (GÍRIO et al., 2010). As três frações orgânicas com composições representativas na biomassa lignocelulósica em base de porcentagem de peso seco são: 30% a 60% de celulose, 20% a 35% de hemicelulose e 12% a 20% de lignina, correspondentes a 90% da matéria seca, em média.

A celulose e a hemicelulose, que normalmente compõem dois terços da matéria seca da parede celular, são polissacarídeos que podem ser hidrolisados a açúcares e fermentados a etanol. A conversão de etanol a partir de biomassa está diretamente relacionada ao conteúdo de celulose e hemicelulose na matéria-prima, uma vez que a lignina não é constituída por açúcares fermentescíveis (GOLDSTEIN, 1981).

A celulose é o componente presente em maior proporção na biomassa vegetal e o principal constituinte da parede celular desempenhando uma função estrutural nas células. A celulose consiste exclusivamente de unidades de D-glicopiranoose unidas por ligações β -1-4-glicosídicas, formando um polímero linear de glicose de alta massa molar e alta cristalinidade que confere rigidez às fibras deste polímero (BALAT; BALAT, 2009).

Figura 2.3 – Estrutura da parede celular dos vegetais; arranjo das microfibras de celulose, cadeias de hemicelulose e da lignina; e exemplo de monossacarídeos presentes nestas estruturas (Adaptado de Yarris, 2010).

O segundo componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos é a hemicelulose. As hemiceluloses são heteropolissacarídeos formados por unidades de hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose), ou desoxiriboses (L-ramnose ou 6-desoxi-L-manose e raramente L-fucose ou 6-desoxi-L-galactose). Também estão presentes em sua estrutura pequenas quantidades de alguns ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-D-glucurônico, ácido D-galacturônico e ácido D-glucurônico) e grupos acetilas (YOSHIDA et al., 1990). A hemicelulose é mais rapidamente hidrolisada comparada com a celulose, visto que a sua estabilidade química e térmica é geralmente menor, provavelmente devido à sua estrutura amorfa, menor grau de polimerização (100-200 unidades) e à ramificações presentes na molécula. A xilose é o açúcar predominante na hemicelulose da maioria dos materiais lignocelulósicos como as gramíneas e folhosas, porém a arabinose também pode constituir uma quantidade significativa destes materiais. A arabinose geralmente constitui de 2 a 4% do total de pentoses, porém pode chegar a um conteúdo de 20 a 30% em fibras de milho (BALAT; BALAT, 2009; DEMIRBAS; BALAT; BALAT, 2009).

O terceiro componente mais abundante nos materiais lignocelulósicos é a lignina, uma estrutura polifenólica amorfa que difere de outras macromoléculas constituintes dos materiais lignocelulósicos. Ao contrário dos carboidratos, a estrutura química da lignina é irregular no sentido de que diferentes elementos estruturais (unidades de fenilpropano) não estão ligados uns aos outros ordenadamente (HON; SHIRAISHI, 2001). As unidades básicas de fenilpropano na lignina, principalmente siringil, guaiacil e p-hidroxifenol, são unidas por um conjunto de ligações que formam uma matriz muito complexa (BALAT, 2011). Esta matriz compreende uma variedade de grupos funcionais, tais como hidroxilas, metoxilas e carbonilas que concedem uma alta polaridade a esta macromolécula.

Além dos três principais componentes, a parede celular da biomassa vegetal apresenta outros constituintes, em menor proporção, que podem ser classificados como extrativos (ácidos graxos, resinas, taninos, etc.) e não-extrativos (sílica, oxalatos, carbonatos, etc.) que variam suas composições de acordo com cada tipo de material (KUHAD; SINGH, 1993).

2.3.1 Palha de Arroz

A palha de arroz tem um grande potencial como matéria-prima lignocelulósica, visto que é um dos resíduos agrícolas mais abundantes em todo o mundo (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000). Em termos de produção, o arroz é o terceiro grão mais produzido mundialmente depois do trigo e milho. Sua produção mundial em 2009 foi de 771 milhões de toneladas distribuídos em: Ásia (667,6), África (20,9) e Europa (3,9) (YOSWATHANA et al., 2010; FAO, 2010; BINOD et al., 2010) sendo que no Brasil a produção na safra de 2009 foi cerca de 12,6 milhões de toneladas (IBGE, 2010). A cada quilograma de grão colhido são produzidos entre 1,0 e 1,5 quilogramas de palha de arroz (BINOD et al., 2010), o que permite estimar uma produção mundial de palha de arroz de cerca de 1 bilhão de toneladas. Esta quantidade de palha de arroz poderia produzir potencialmente cerca de 205 bilhões de litros de etanol por ano se a tecnologia fosse disponível, o que significa 5% do consumo total de combustíveis automotivos como gasolina e diesel (YOSWATHANA et al., 2010).

A composição da palha de arroz reportada por diversos autores está apresentada na Tabela 2.1. Os valores reportados apresentam uma considerável variação de seus constituintes, tais como o teor de glucanas (34 a 44%), xilanas (15 a 21%), arabinanas (2 a 4%), galactanas (0,5 a 2%), lignina (14 a 19%), proteínas (cerca de 3,6%) e cinzas (11 a 18%).

O alto teor de celulose e hemicelulose na palha de arroz é uma característica que a torna uma matéria-prima promissora para obtenção de açúcares fermentáveis. Em termos de composição, a palha de arroz é um material fibroso, típico da maioria dos resíduos agrícolas de materiais lignocelulósicos, que contém predominantemente celulose (32 a 47%), hemicelulose (19 a 27%) e lignina (5 a 24%), porém difere da maioria dos materiais lignocelulósicos pelo seu alto teor de dióxido de silício (SiO_2) (SAHA, 2003; BINOD et al., 2010; OBEROI et al., 2010). O conteúdo de cinzas em base de peso seco pode variar de acordo com o estado de conservação da palha após a colheita, sendo que as cinzas podem conter (% peso seco): SiO_2 (75), K_2O (10), P_2O_5 (3), Fe_2O_3 (3) e CaO (1,3), além de pequenas quantidades de magnésio, enxofre e sódio (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000; ABOU-EL-ENIN; FADEL; MACKILL, 1999; JENKINS et al., 1998).

Tabela 2.1 – Composição química (% peso seco) da palha de arroz em diversos trabalhos reportados na literatura.

Componente	Referências				
	1	2	3	4	5
Glucanas	34,90	43,40	38,90	34,70	36,60
Xilanas	20,60	20,20	20,40	15,10	16,10
Arabinanas	3,90	2,73	3,40	2,20	-
Galactanas	2,10	-	0,50	-	-
Lignina	15,50	17,20	13,50	19,10	14,90
Proteínas	3,61	-	-	-	-
Cinzas	12,18	11,40	18,00	16,00	14,50
Extrativos	7,21	-	5,30	17,90	-

1: Oberoi et al., 2010; 2: Roberto; Mussatto; Rodrigues., 2003; 3: Kadam; Forrest; Jacobson, 2000; 4: Zhong et al. 2009; 5: Hsu et al., 2009.

2.4 COMPOSTOS INIBIDORES LIBERADOS DURANTE O PRÉ-TRATAMENTO

A etapa de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos destina-se a desorganizar a estrutura cristalina das fibras destes materiais, a fim de liberar as cadeias de celulose e hemicelulose ou modificar os poros do material para permitir que as fibras se tornem suscetíveis à hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Além disso, o pré-tratamento deve evitar a degradação ou perda de carboidratos e a formação de subprodutos inibidores para posterior hidrólise e fermentação (SUN; CHENG, 2002).

De um modo geral as quantidades e os tipos de compostos tóxicos presentes em hidrolisados variam conforme a matéria-prima e as condições de hidrólise utilizadas (CRUZ et al., 2000; TAHERZADEH et al., 2000).

Os compostos inibidores gerados durante o pré-tratamento podem ser divididos em grupos (Figura 2.4), os quais apresentam diferentes origens, como: os furanos que são gerados pela degradação de açúcares; os compostos

fenólicos, gerados pela degradação da lignina; o ácido fórmico e levulínico gerados na degradação de furanos; e o ácido acético, extrativos e íons metálicos, os quais são liberados dos materiais lignocelulósicos durante o pré-tratamento, ou ainda, dos equipamentos utilizados na hidrólise, no caso dos íons metálicos (MUSSATTO; ROBERTO, 2004; FENSKE; GRIFFIN; PENNER, 1998). Estes compostos podem interferir no metabolismo microbiano reduzindo ou mesmo impedindo o crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto (BALAT, 2011; ALMEIDA et al., 2007).

Figura 2.4 - Principais produtos de degradação gerados durante o processo de fracionamento de materiais lignocelulósicos (Adaptado de BALAT, 2011). Onde as cores representam: polissacarídeos (■), açúcares simples (■), furanos (■), ácidos carboxílicos (■); compostos fenólicos (■).

Em elevada temperatura e pressão, as pentoses e hexoses liberadas durante a hidrólise podem ser degradadas dando origem a furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente (ALMEIDA et al., 2007; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Os efeitos de inibição destes compostos são atribuídos a dois diferentes mecanismos. O primeiro mecanismo está ligado à interferência no balanço redox de cofatores devido à alta demanda de NADH necessária para que o microrganismo possa reduzir os furanos a suas formas alcoólicas, as quais apresentam menor efeito inibidor (ALMEIDA et al., 2007; TAHERZADEH et al.,

1999). E o segundo mecanismo é atribuído a inibição direta de algumas enzimas como a álcool desidrogenase, piruvato desidrogenase e aldeído desidrogenase, levando a reduções na atividade destas enzimas e resultando em um efeito de inibição do bioprocesso (ALMEIDA et al., 2007; MODIG; LÍDEN; THAERZADEH, 2002; SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). A presença de furanos pode interferir no crescimento celular, resultando em longas fases de latência, prejudicando a produtividade dos processos de bioconversão (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988, ALMEIDA et al., 2008).

Os ácidos carboxílicos são outro grupo de compostos resultantes do fracionamento dos materiais lignocelulósicos que podem prejudicar processos de bioconversão. Os ácidos carboxílicos tais como ácido fórmico e ácido levulínico resultam da degradação de furanos, enquanto que o ácido acético tem sua origem na liberação dos grupos acetil da hemicelulose durante a etapa de pré-tratamento (ALMEIDA et al., 2007). Os ácidos carboxílicos na sua forma não dissociada são capazes de atravessar a membrana citoplasmática do microrganismo, reduzindo o pH intracelular (LOHMEIER-VOGER; SOPHER; LEE, 1998; CARMELO; SANTOS; SÁ-CORREIA, 1997). Esta redução do pH intracelular leva a uma diminuição da disponibilidade de ATP, visto que este passa a ser usado pela ATPase para fazer o transporte dos prótons para fora da membrana, na tentativa de regular o pH intracelular. Esta redução na disponibilidade de ATP prejudica o transporte ativo de nutrientes, o que tem como consequência a redução do crescimento celular (OLIVA et al., 2006; PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 2000).

Os compostos fenólicos têm sua origem na solubilização e na clivagem hidrolítica ou oxidativa da estrutura da lignina (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004; MARTÍN et al., 2007). A quantidade e tipo dos compostos aromáticos formados dependem do tipo de pré-tratamento e da biomassa usada (ALMEIDA et al., 2007). De um modo geral, os compostos fenólicos podem ser classificados como hidroxibenzil (H), guaiacil (G) e siringil (S), conforme os tipos de resíduos monoméricos da lignina (Figura 2.5), os quais possuem diferentes graus de metoxilação, podendo apresentar ainda diferentes grupos funcionais, tais como aldeídos, cetonas e ácidos ligados aos anéis aromáticos (KLINKE et al., 2002; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Figura 2.5 - As três principais unidades fenólicas constituintes da lignina: *p*-hidroxibenzil (H), guaiacil (G) e siringil (S). A função **R** indica que as ligações éster ou éter podem ocorrer nestas posições, e R = H representa o fenol livre. No lugar do polímero, são possíveis muitos tipos diferentes de estruturas (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Os compostos fenólicos atuam sobre a membrana celular causando a perda de sua integridade, o que interfere na sua capacidade de atuar como barreira seletiva. Ácidos fenólicos também podem interferir na geração de ATP destruindo o gradiente eletroquímico por carrearem o transporte de prótons através da membrana da mitocôndria (ALMEIDA et al., 2007). Grande parte do efeito de inibição observado em hidrolisados pode ser atribuído aos compostos fenólicos, principalmente aos compostos de baixa massa molar os quais tem sido considerados os de maior toxicidade (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; MIKULASOVA; VODNY; PEKAROVICOVA, 1990),

Compostos resultantes da fração de extrativos como resinas ácidas, ácidos tanínicos e terpenos, além de íons metálicos resultantes da corrosão do próprio equipamento de hidrólise, também estão presentes em hidrolisados, podendo muitos destes compostos atuar como agentes inibidores do metabolismo microbiano (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

2.5 ESTRATÉGIAS EMPREGADAS PARA CONTORNAR A TOXICIDADE DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS

Os diversos subprodutos gerados durante o fracionamento dos materiais lignocelulósicos podem interferir negativamente sobre os processos fermentativos devido aos seus efeitos de inibição sobre o metabolismo microbiano, limitando o crescimento celular e consequentemente reduzindo a produção de etanol. Desta forma, o emprego de estratégias que permitam superar os efeitos de inibição, representa um importante aspecto a ser considerado na utilização de hidrolisados lignocelulósicos como matéria-prima em bioprocessos.

Diferentes estratégias para superar o efeito de inibição dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados vêm sendo avaliados, tais como a redução da concentração dos compostos tóxicos a níveis não inibitórios ao processo fermentativo, ou obtenção de cepas mais resistentes aos efeitos de tais compostos tóxicos. O primeiro grupo refere-se aos chamados métodos de destoxificação, enquanto que o segundo grupo é constituído pelas estratégias de aclimação do microrganismo aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado.

2.5.1 Métodos de Destoxificação do Hidrolisado

Os processos empregados para a redução da concentração de compostos tóxicos presentes nos hidrolisados podem ser divididos em três grupos principais, métodos físicos, químicos e biológicos.

Os métodos físicos são aqueles nos quais a diminuição da concentração dos compostos inibidores presentes no meio é realizada pela simples remoção destes compostos, não havendo modificações nas estruturas químicas dos compostos inibidores. Estes métodos são baseados em processos de adsorção ou processos de transferência de fases (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Os processos de adsorção ocorrem por meio de forças de interações entre as superfícies dos materiais adsorventes e as moléculas que neles são adsorvidas. Nos processos de adsorção são empregados materiais tais como o carvão ativado, resinas de troca iônica e terra diatomácea. O emprego de carvão ativado para a remoção de compostos tóxicos presentes em hidrolisados hemicelulósicos

tem sido relatado em diversos trabalhos (VILLARREAL et al., 2006; MIYAFUGI et al., 2003). Este método tem se mostrado eficaz na remoção de compostos como ácido acético, furanos e compostos provenientes da degradação de lignina, permitindo desta maneira obter melhores resultados nos processos fermentativos (MUSSATTO; ROBERTO, 2001). As terras diatomáceas e as resinas de troca iônica são materiais adsorventes que também podem ser empregados em processos de adsorção. As terras diatomáceas apresentam características como alta porosidade, alta permeabilidade e inércia química, podendo ser empregadas de maneira semelhante ao carvão ativado (AL-GHOUTI, 2003). Já as resinas de troca iônica são polímeros complexos os quais possuem uma estrutura na qual os grupos funcionais encontram-se presos por meio de ligações covalentes, sendo a capacidade de adsorção destes materiais atribuída a interações eletrostáticas entre o adsorvente e moléculas com cargas opostas. Tratamentos empregando resina de troca iônica são capazes de remover de forma eficiente íons metálicos, furanos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos (CARVALHO, et al., 2005). Entretanto tais processos apresentam elevados custos quando comparados com os tratamentos que utilizam carvão ativado (LEE et al., 1999).

Nos processos de transferência de fase são utilizados métodos como a remoção por evaporação a vácuo ou extração dos inibidores por meio do uso de solventes imiscíveis em fase aquosa. Na extração com solvente orgânico uma solução aquosa, que no caso são os hidrolisados lignocelulósicos, é colocada em contato com um solvente orgânico imiscível, sendo promovida a transferência de um ou de mais solutos do primeiro para o segundo solvente (LOGSDAIL; SLATER, 1993). Nestes processos podem ser utilizados solventes orgânicos como tricloroetileno, benzeno, acetato de etila, éter etílico, clorofórmio e hexano, os quais são capazes de remover seletivamente inibidores como furfural, ácido acético e derivados de lignina a partir de hidrolisados (CONVERTI; PEREGO; DOMINGUÉS, 1999; DIZ et al., 2002). Já os processos de evaporação a vácuo limitam-se a promover a remoção apenas de compostos voláteis presentes em hidrolisados, tais como ácido acético, furfural, vanilina e outros (HUANG et al., 2009; CONVERTI et al., 2000; PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998).

Os principais métodos químicos empregados para a destoxificação de hidrolisados baseiam-se em processos de alteração do pH e na adição de substâncias redutoras. A adição de substâncias redutoras como Na_2SO_3 ,

NaHSO_3 , $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, KHSO_3 , Na_2S , entre outras, pode proporcionar modificações químicas de compostos inibidores, alterando o grau de toxicidade de tais compostos (PARAJÓ; DOMÍNGUES; DOMÍNGUES, 1998). Com relação aos processos baseados em alteração de pH, a redução da toxicidade de hidrolisados pode estar relacionada a dois diferentes mecanismos. O primeiro é a precipitação de certos compostos tóxicos, tais como íons metálicos e o segundo é a decomposição de compostos inibidores, como furanos, que apresentam instabilidade química em determinadas condições de pH (MARTINEZ et al., 2000; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000).

Os chamados métodos biológicos de destoxificação de hidrolisados são aqueles que se baseiam no emprego de agentes biológicos como certas enzimas e determinados microrganismos, capazes de promover modificações na estrutura química dos compostos inibidores, resultando em substâncias de menor toxicidade (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Enzimas obtidas de fungos lignolíticos, como as peroxidases e as lacases, podem ser empregadas no tratamento de hidrolisados, promovendo uma redução na toxicidade e contribuindo para a melhoria dos processos fermentativos. Tais enzimas são capazes de promover a polimerização oxidativa de compostos fenólicos de menor massa molar, convertendo-os a compostos aromáticos de menor efeito tóxico (JONSSON et al., 1998; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000). O uso de microrganismos tais como alguns fungos filamentosos e leveduras, tem sido também proposto para remover compostos inibidores de hidrolisados lignocelulósicos. Na literatura são encontrados trabalhos que descrevem a utilização de microrganismos capazes de metabolizar compostos como ácido acético, furfural e compostos fenólicos, com baixos consumos de açúcares (SCHNEIDER, 1996; BUGOS; SUTHERLAND; ADLER, 1988; PALMQVIST et al., 1997; HAHN-HAGERDAL et al., 2006).

2.5.2 Estratégias de Aclimação

A obtenção de cepas de microrganismos resistentes aos compostos tóxicos presentes em hidrolisado constitui um método biológico capaz de melhorar os resultados da fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos. Estes procedimentos, também conhecido como processos de adaptação, baseiam-se no cultivo sucessivo do microrganismo em concentrações crescentes do meio contendo compostos tóxicos (HAN-HAGERDAL et al., 2005).

Na Figura 2.6 são apresentados três diferentes métodos que podem ser empregados para a obtenção de cepas adaptadas. O primeiro método refere-se à adaptação de leveduras em meio semi-sólido através de cultivos sucessivos em meios constituídos com quantidades crescentes do meio seletivo. Ao fim de vários cultivos são isoladas cepas provenientes do meio de maiores concentrações de compostos inibidores. A segunda proposta se refere aos cultivos em frascos agitados em meio líquido, no qual a cepa adaptada é obtida após vários cultivos sucessivos realizados em batelada. O terceiro método consiste na utilização de fermentadores operando em regime contínuo, onde a alimentação é realizada com concentrações crescentes do meio de fermentação onde ao longo do tempo as leveduras mais adaptadas vão prevalecendo dentro do reator.

O aumento da tolerância de cepas decorrente de estratégias de adaptação pode estar relacionado com dois diferentes mecanismos: o primeiro refere-se ao isolamento de cepas mais tolerantes aos inibidores presentes no meio de fermentação, sendo tais cepas capazes de manter suas características mesmo com a diminuição dos inibidores do meio; o segundo mecanismo é atribuído a aumento da expressão gênica e da atividade de determinadas enzimas como consequência da indução pela presença de compostos inibidores no meio. Neste mecanismo as características de maior tolerância não resultam em novas cepas. Desta forma, a maior robustez da levedura, e consequente aumento da capacidade fermentativa, são dependentes tanto do número de transferências empregadas, quanto das condições ambientais e nutricionais, tais como a aeração, pressão osmótica, fontes de nitrogênio entre outras (ALMEIDA, 2009).

Jeffries e Van Vleet (2009) sugerem que a expressão de genes pode ser estimulada pela presença de compostos tóxicos, o que é um comportamento muito interessante, principalmente para o desenvolvimento de estratégias de

Figura 2.6 – Processos de adaptação de leveduras empregando cultivos sucessivos em meio sólido, frascos agitados e reatores (Hahn-Hagerdal et al., 2005).

adaptação ou superação da toxicidade de hidrolisados, uma vez que as células podem através destes mecanismos de expressão gênica, aumentar sua tolerância à presença de compostos inibidores.

A regulação da resposta de leveduras às condições ambientais envolvem sistemas complexos que incluem sensores de estresse e vias de transcrição de genes que resultam na ativação dos chamados genes de resposta ao estresse, resultando na síntese de proteínas ou enzimas responsáveis pelo aumento da tolerância às condições em que as células foram submetidas, como mostrado na Figura 2.7 (QUEROL et al., 2003).

Tanto o isolamento de leveduras após vários cultivos sucessivos em meios contendo compostos inibidores, quanto o aumento da expressão gênica ocasionado por condições de estresse, resultante da presença de compostos tóxicos, tem sido empregado para o aumento da tolerância de leveduras utilizadas em fermentações alcoólicas.

Figura 2.7 - Representação esquemática do mecanismo de resposta de uma levedura a condições ambientais de estresse (QUEROL et al, 2003).

Diferentes estratégias de adaptação de leveduras em hidrolisados lignocelulósicos têm sido reportadas na literatura, podendo o processo de adaptação gradual de microrganismos aos compostos inibidores levar de poucas horas ou até meses de cultivo sob diferentes condições e composições de meio (HUANG et al., 2009; OBEROI et al., 2010; NIGAM; SINGH, 2010; BANERJEE et al., 1981; VILLA, 1992; CHUNG; LEE, 1984). Banerjee et al. (1981) avaliaram a adaptação de *Saccharomyces cerevisiae* em reator de mistura em processo de batelada. Estes autores atribuíram a adaptação da levedura à síntese de novas enzimas e co-enzimas para a redução de furfural, sendo observados aumentos de 78% nos níveis de alcooldesidrogenase quando 2 g/L de furfural foi adicionado ao meio de cultura.

Lawford et al. (1999) utilizando uma cepa de *Zymomonas mobilis* isolada após vários cultivos em meio contendo concentrações crescentes de hidrolisado de 10 a 50% (v/v) e constataram que a cepa adaptada foi capaz de tolerar 7,5 g/L de ácido acético em 50% (v/v) de hidrolisado hemicelulósico de madeira contendo 4 g/L de xilose e 8 g/L de glicose. Segundo os autores, em meio semissintético contendo 4,0 g/L de ácido acético a cepa adaptada foi capaz de alcançar 96% do rendimento teórico ($Y_{P/S} = 0,50$ g/g), atingindo uma produtividade volumétrica em etanol de 0,55 g/L.h, enquanto que a cepa original apresentou o mesmo rendimento, porém um decréscimo na produtividade volumétrica em etanol

($Q_P = 0,44 \text{ g/L.h}$). Segundo estes autores, a adaptação promoveu maiores produtividades em etanol e maior tolerância ao ácido acético.

Almeida et al. (2009), avaliaram a seleção de 12 linhagens de *S. cerevisiae* para crescimento aeróbio em hidrolisado hemicelulósico de madeira, palha de cevada e de trigo. O grau de adaptação variou com os tipos de hidrolisados e as cepas isoladas, sendo que o hidrolisado de palha de cevada, constituído de elevada concentração de furfural foi o mais inibitório. De acordo com os autores, as cepas com bom desempenho em todos os três hidrolisados apresentam melhores respostas adaptativas aos compostos inibidores do que as cepas que apresentam bom desempenho em apenas um único tipo de hidrolisado, sendo que, neste último caso, a adaptação pode estar direcionada para um inibidor específico, o que limita a utilização de diferentes hidrolisados lignocelulósicos.

Huang e colaboradores (2009) desenvolveram uma cepa adaptada de *Pichia stipitis* com o objetivo de aumentar a tolerância aos compostos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. O estudo de adaptação foi realizado utilizando-se uma fração de hidrolisado não tratado (apenas neutralizado com NaOH), suplementado com xilose e glicose, a fim de se obter sempre uma concentração final destes açúcares de 30 e 10 g/L, respectivamente. Inicialmente a adaptação foi realizada com uma fração de 20 % (v/v) de hidrolisado. Após atingir uma fração de 100 % (v/v) de hidrolisado, a cultura foi continuamente transferida para um novo meio e cultivada por mais de 60 vezes. Os rendimentos em etanol a partir da cepa adaptada foram similares ($Y_{P/S} = 0,45 \text{ g/g}$) para ambos hidrolisados avaliados (não-tratado e tratado por "overliming"). No entanto, a produtividade volumétrica em etanol e a conversão de substrato em produto foram aumentadas em 10% com relação à cepa não adaptada em hidrolisado não destoxificado. Segundo os autores a cepa adaptada demonstrou também tolerância ao sulfato e furfural, uma vez que ambos inibidores não foram removidos do hidrolisado neutralizado com NaOH.

Oberoi e colaboradores (2010) estudaram a produção de etanol em hidrolisado de palha de arroz a partir da levedura *Candida tropicalis* ATCC 13803 adaptada. A cepa foi obtida a partir de doze transferências sucessivas em meio líquido contendo hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz constituído de 12,4 g/L de xilose e 3,9 g/L de glicose. Segundo os autores a cepa adaptada produziu 60% mais etanol do que a cepa não adaptada, após 18 horas de

fermentação, alcançando rendimento e produtividade volumétrica em etanol de 0,48 g/g e 0,33 g/L.h, respectivamente.

Nigam (2001a) estudou a adaptação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado de madeira de carvalho contendo 26,7 g/L de xilose e 3,0 g/L de glicose a partir de cultivos em meio líquido e semi-sólido. De acordo com os autores não foi possível adaptar a cultura em meio semi-sólido, uma vez que não foi observado crescimento em placas de agar contendo 20% (v/v) de hidrolisado. A adaptação foi então realizada por transferências sucessivas em meio líquido até que a cultura fosse capaz de tolerar 60% (v/v) do hidrolisado hemicelulósico. Em meio constituído de 50% (v/v) de hidrolisado, a cepa apresentou rendimentos em etanol de 0,31 g/g e produtividade volumétrica em etanol de 0,10 g/L.h, enquanto que a original mostrou valores de 0,22 g/g e 0,034 g/L.h, respectivamente. Os autores relataram ainda que a cepa adaptada se apresentou estável quando testada em hidrolisado hemicelulósico por três meses.

Em outro trabalho de Nigam (2001b), foi relatada a adaptação de *Pichia stipitis* ao licor sulfítico (subproduto da indústria papaleira) destoxificado por "overliming" contendo 30 g/L de xilose e 10 g/L de glicose. Neste estudo foram também empregadas concentrações crescentes de hidrolisado, 20, 40, 60 e 80% (v/v). A cepa adaptada foi isolada após o cultivo em hidrolisado a 80% (v/v) e mantida em meio semi-sólido a 50% (v/v) de hidrolisado. Os resultados revelaram que em hidrolisado não tratado foram alcançados rendimentos de 0,16 e 0,28 g/g para a cepa original e adaptada, respectivamente. Por outro lado, em hidrolisado tratado estes valores foram aumentados para 0,30 e 0,41 g/g para a cepa original e adaptada, respectivamente.

A produção de etanol por cepas de *P. stipitis* original e adaptada foi também avaliada em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo contendo 45 g/L de xilose e 6,4 g/L de glicose (Nigam, 2001c). A adaptação foi realizada cultivando-se a levedura por transferências sucessivas a concentrações crescentes de hidrolisado, 20, 40, 60 e 80% (v/v). A cepa adaptada obtida após 39 subcultivos foi mantida em meio semi-sólido a 50 % (v/v) de hidrolisado. Neste trabalho foram alcançados rendimentos em etanol de 0,15 e 0,27 g/g e produtividade volumétrica de 0,03 e 0,10 g/L.h para a cepa original e adaptada, respectivamente.

Liu et al. (2004) avaliaram as respostas adaptativas ao estresse das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *P. stipitis* NRRL-Y 7124, em diferentes

concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (10, 30 e 60 mmol/L). Segundo os autores, as cepas submetidas à adaptação na presença destes compostos inibidores apresentaram diferenças nas dinâmicas de expressão gênica com consequente melhora na fermentação a etanol. Os autores identificaram aumento da atividade de certas enzimas sob condições de estresse como, por exemplo, a indução da enzima álcool desidrogenase pela presença de furfural, a qual é capaz de reduzir esse composto a álcool furfurílico, um composto de menor toxicidade.

Oliveira (2010) avaliou a aclimação de uma linhagem de *P. stipitis* para a produção de etanol em biorreator de bancada a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado, contendo uma concentração de xilose de 50g/L. Este autor realizou 45 repiques da levedura em meio sólido contendo concentrações crescentes de hidrolisado, sendo posteriormente realizados ainda dois cultivos sucessivos das células em meio líquido contendo hidrolisado a 25 e 50%. O autor reportou uma produção de etanol de 22,5 g/L, tendo a linhagem aclimatada apresentado um aumento de 50, 170, e 55% no crescimento celular, produção de etanol e produtividade volumétrica em etanol, respectivamente, em relação à linhagem sem aclimação.

Na Tabela 2.2 são mostrados os resultados de diferentes estratégias de adaptação reportadas em diversos trabalhos. Observa-se de um modo geral que processos de adaptação têm demonstrado resultados positivos na superação dos efeitos de inibição de diferentes subprodutos presentes no hidrolisado de materiais lignocelulósicos, proporcionando melhores fatores de conversão e produtividades em etanol.

Tabela 2.2 – Parâmetros fermentativos da produção de etanol empregando leveduras adaptadas em diversos hidrolisados hemicelulósicos.

Microrganismo	Meio de adaptação (g/L)	Cultivo	Meio de fermentação (g/L)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade (Q_P (g/L.h))
¹ <i>Pichia stipitis</i> BCRC21777	Hidrolisado: palha de arroz (17-27 de xilose) e açúcares sintéticos (3-13), extrato de levedura (10), peptona (20), pH 5,0	60 vezes	Hidrolisado não tratado: xilose: 21,1; glicose: 3,3	0,40 (original) 0,44 (adaptada)	0,22 (original) 0,24 (adaptada)
			Hidrolisado (Overliming) xilose: 21,1; glicose: 3,3	0,37 (original) 0,45 (adaptada)	0,22 (original) 0,38 (adaptada)
² <i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	Hidrolisado de palha de arroz (12,4 de xilose), extrato de levedura (3), peptona (3), sulfato de amônio (3), pH 5,2	12 vezes	Hidrolisado não tratado: xilose: 12,4; glicose: 3,9; arabinose: 3,3; galactose: 1,74	0,48 (adaptada)	0,33 (adaptada)
³ <i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	Meio líquido: Hidrolisado de sabugo de milho (corn stover) sem destoxificação	overnight	Hidrolisado não tratado 12,5 %: xilose: 25; glicose: 40; agitação 100 rpm	0,38 (original) 0,39 (adaptada)	0,17 (original) 0,19 (adaptada)

1 - Huang et al., (2009); 2 - Oberoi et al., (2010); 3 – Agbogbo; Wenger (2007)

(continua)

(continuação)

Tabela 2.2 – Parâmetros fermentativos da produção de etanol empregando leveduras adaptadas em diversos hidrolisados hemicelulósicos.

Microrganismo	Meio de adaptação (g/L)	Cultivo	Meio de fermentação (g/L)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade (Q_P (g/L.h)
³ <i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	Meio líquido: Hidrolisado de sabugo de milho (corn stover) sem destoxificação	<i>overnight</i>	Hidrolisado não tratado 12,5 %: xilose: 25; glicose: 40; <i>agitação 150 rpm</i>	0,42 (original) 0,41 (adaptada)	0,35 (original) 0,35 (adaptada)
³ <i>Pichia stipitis</i> CBS 6054	Meio Sólido: Hidrolisado, extrato de levedura (10), peptona (20), agar (20).	<i>overnight</i>	Hidrolisado tratado 12,5 %: xilose: 25; glicose: 40; <i>agitação 100 rpm</i>	0,41 (adaptada)	0,20 (adaptada)
⁴ <i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	Hidrolisado: madeira de carvalho: xil (26,7), gli (3,0), galactose (1,7) ara (1,5), man (6,5), até 60 % de concentração, suplementado com xil (30), gli (5), ara (1,5), extrato de levedura (1,5) peptona (3), KH ₂ PO ₄ (2), (NH ₄) ₂ SO ₄ (1), MgSO ₄ (0,5)	45 dias	Hidrolisado não tratado 30 % (8 g/L de açúcares totais); pH 5,5	0,25 (original) 0,40 (adaptada)	0,1 (original) 0,21 (adaptada)
			Hidrolisado não tratado a 50 % (16,5 g/L de açúcares totais); pH 5,5	0,22 (original) 0,31 (adaptada)	0,034 (original) 0,1 (adaptada)

(continuação)

Tabela 2.2 – Parâmetros fermentativos da produção de etanol empregando leveduras adaptadas em diversos hidrolisados hemicelulósicos.

Microrganismo	Meio de adaptação (g/L)	Cultivo	Meio de fermentação (g/L)	Rendimento $Y_{P/S}$ (g/g)	Produtividade (Q_P (g/L.h)
⁵ <i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	Hidrolisado: licor sulfítico: xil (30), gli (10), extrato de levedura (2,5), $MgSO_4$ (0,5), (NH_4) ₂ HPO ₄ (2), até 80 % de concentração	15 vezes	Meio sintético	0,47 (adaptada)	0,68 (adaptada)
			Hidrolisado não tratado	0,16 (original) 0,28 (adaptada)	0,01 (original) 0,07 (adaptada)
			Hidrolisado tratado	0,30 (original) 0,41 (adaptada)	0,11 (original) 0,44 (adaptada)
⁶ <i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	Hidrolisado de palha de trigo: xil (45), gli (6,4) e ara (9) até 80 % da concentração, suplementado com: xil (30), gli (10), ara (5), extrato de levedura (1), (NH_4) ₂ HPO ₄ (2), $MgSO_4$ (0,5), (NH_4) ₂ SO ₄ (1)	39 vezes	Hidrolisado não tratado	0,15 (original) 0,27 (adaptada)	0,03 (original) 0,10 (adaptada)
			Hidrolisado tratado	0,36 (original)	0,17 (original)

2.6 METABOLISMO DE XILOSE EM LEVEDURAS

Microrganismos fermentadores de pentoses podem ser divididos em dois grupos, os encontrados na natureza e os geneticamente modificados. Os microrganismos encontrados na natureza incluem *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus*, entre outros. Os microrganismos geneticamente modificados com capacidade de fermentar pentoses incluem diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, *E. coli*, *Zymomonas mobilis* e *Klebsiella oxytoca* (HAHN-HAGERDHAL et al., 2006; AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). *E. coli* e *Klebsiella oxytoca*, capazes de consumir pentoses, são geradas a partir da introdução de genes etanologênicos provenientes de *Zymomonas mobilis* (HAHN-HAGERDAL et al., 2006). Da mesma forma, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* com a capacidade de fermentar pentoses podem ser geradas através da introdução de genes provenientes de *Pichia stipitis*, que são capazes de gerar enzimas necessárias para metabolizar pentoses.

Na Figura 2.8 são apresentadas as vias metabólicas (Embden Meyerrhof Parnas -EMP, fosfo pentose-PPP e ciclo do ácido cítrico-CAC) de assimilação de açúcares e íons NH_4^+ por leveduras. O catabolismo de hexoses, como a glicose, manose e frutose, ocorre pela glicólise. Em relação ao catabolismo de pentoses, como a xilose e arabinose, a assimilação destes açúcares por leveduras depende da capacidade destes microrganismos de sintetizar enzimas como a xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD).

Após chegar ao citoplasma a xilose é convertida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima da via da pentose fosfato, sendo tal reação dependente da coenzima NADH e/ou NADPH (JEFFRIES, 1983). O xilitol resultante desta reação pode ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, com a participação de NAD^+ como coenzima, ou ser excretado pela célula (SLININGER et al., 1987). A xilulose produzida é fosforilada pela ação da enzima xilulose quinase, formando xilulose-5P, que é metabolizada na via das pentoses fosfato (WEBB; LEE, 1990). Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, como a frutose-6P e gliceraldeído-3P, são metabolizados na glicólise (via Embden Meyerhof Parnas), onde são levados a piruvato. O piruvato resultante do catabolismo de açúcares, dependendo da disponibilidade

Figura 2.8 – Vias metabólicas da assimilação de monossacarídeos por leveduras: Embden-Meyerrhof (glicólise), Fosfo pentose (PPP), ciclo do ácido cítrico (CAC) e a assimilação de NH_4^+ . (adaptado de Taherzadeh, 1999 e Gírio et al., 2010).

de oxigênio para a célula, pode ser oxidado no Ciclo do Ácido Cítrico, sendo as coenzimas, neste caso, recuperadas através da cadeia respiratória, ou ser convertido a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, havendo a reoxidação do NADH resultante da oxidação do gliceraldeído 3P.

Segundo Agbogbo e Coward-Kelly (2008), a levedura *Pichia stipitis* tem características únicas que a tornam o organismo natural mais promissor para a conversão dos açúcares provenientes da hemicelulose, fração rica em pentoses, o que se deve ao seu sistema enzimático. Esta levedura possui dois mecanismos que favorecem a produção de etanol, minimizando a formação de xilitol. O primeiro mecanismo refere-se à possibilidade de utilização de ambos os cofatores, NADH e NADPH, pela enzima XR, o que favorece o equilíbrio entre os cofatores. Este mecanismo também pode ser encontrado em outros microrganismos como *Pachysolen tannophilus*, que possuem capacidade semelhante à da *Pichia stipitis* (VAN DIJKEN; SCHEFFERS, 1986). O segundo mecanismo, exclusivo da levedura *P. stipitis*, refere-se à existência de um sistema respiratório oxidativo complexo na mitocôndria, o qual possui duas vias diferentes de transporte de elétrons, a cadeia tradicional de transporte via citocromo-C e uma via alternativa que utiliza o ácido salicil-hidroxiâmico (SHAM), proporcionando um maior controle do potencial redox para lidar com o desequilíbrio de cofatores (JEPPSSON; ALEXANDER; HAHN-HAGERDAL, 1995; SHI et al., 2002).

2.7 COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE FERMENTAÇÃO

A produtividade de qualquer processo de bioconversão é influenciada por parâmetros ambientais tais como: pH, temperatura, oxigênio, entre outros, e pela composição nutricional do meio de fermentação incluindo fontes de nitrogênio, minerais, vitaminas, dentre outros (SUNITHA; LEE; OH, 1999; HANH-HAGERDAL et al., 1994). De acordo com a literatura, o estabelecimento de condições ótimas da composição do meio de cultura é uma importante maneira de aumentar a produtividade e melhorar a eficiência de um bioprocessamento (PHAM et al., 1998).

As fontes de nitrogênio desempenham papel fundamental na produção de etanol por leveduras. As leveduras são capazes de assimilar diferentes fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico para incorporação nos componentes estruturais e funcionais nitrogenados da célula, como está mostrado na Figura 2.9.

Figura 2.9 – Visão geral da assimilação de nitrogênio por leveduras (Walker, 1998).

Geralmente os meios de fermentação industriais empregam fontes de nitrogênio orgânico na forma de uréia ou de uma mistura complexa de aminoácidos (extrato de levedura e peptona) e na forma de nitrogênio inorgânico tais como sulfato de amônio (WALKER, 1998). Os íons amônio, suplementados ao meio ou derivados do catabolismo de outros compostos nitrogenados, são transportados e assimilados ativamente pelas leveduras para síntese de aminoácidos, particularmente glutamato e glutamina, os quais atuam como precursores da biossíntese de outros aminoácidos. Glutamato e glutamina são, portanto, os produtos primários da assimilação do amônio e são compostos fundamentais tanto para o metabolismo de carbono quanto para o de nitrogênio (WALKER, 1998; TAHERZADEH et al. 1999). A uréia é amplamente utilizada pelas leveduras como uma fonte de nitrogênio orgânico e, dependendo de sua concentração extracelular, pode ser assimilada pela célula por transporte ativo ou difusão facilitada, além disso esta fonte de nitrogênio pode ser empregada como um suplemento de baixo custo (WALKER, 1998).

Em meios de fermentação industriais, a concentração e o tipo de aminoácidos são de fundamental importância para o sucesso da fermentação. Thomas e Ingledew (1990) estudaram a fermentação de hidrolisado de trigo por

Saccharomyces cerevisiae e verificaram que a adição de ácido glutâmico ao meio estimulou o crescimento celular e reduziu o tempo de fermentação. Também, Albers et al. (1996), mostraram que a adição de aminoácidos ao meio quimicamente definido promoveu aumento no rendimento em etanol enquanto que os níveis de glicerol foram reduzidos.

Outro fator importante a ser avaliado na formulação de meios de fermentação é com relação ao custo de seus componentes. Por exemplo, Kadam e Newman (1997) demonstraram que um meio contendo 0,3 % de farelo de milho e 2,5 mM de sulfato de magnésio (US\$ 0,5/L) apresentou desempenho similar ao de um meio nutricional de maior custo, formulado com extrato de levedura e peptona (US\$ 27,86/L), tanto no que diz respeito à formação de biomassa quanto à produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*.

Amartey e Jeffries (1994) avaliaram a bioconversão de xilose em etanol por *P. stipitis* em meios formulados com nutrientes de baixo custo. Segundo estes autores o rendimento ($Y_{P/S} = 0,36$ g/g) e a produtividade volumétrica em etanol ($Q_P = 0,66$ g/L.h) em meio suplementado com 3% de “corn steep liquor” (subproduto da fabricação do amido de milho) foram comparáveis aos obtidos em meios formulados com nutrientes de alto custo, tais como extrato de levedura e extrato de malte em concentrações de 3 g/L.

Guebel et al. (1992), avaliaram a influência de fontes de nitrogênio, como íons amônio e extrato de levedura sobre o crescimento celular e a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124 em meio semissintético. Estes autores constataram que a presença de íons amônio no meio de fermentação contribuiu para o aumento da produção de etanol e crescimento celular em 57 e 113%, respectivamente, em relação ao meio suplementado com extrato de levedura como principal fonte de nitrogênio.

Silva et al. (2011) avaliou a influência de uréia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, sobre a produção de etanol a partir de xilose pela levedura *P. stipitis*. Este autor verificou grande influência do tipo de fontes de nitrogênio sobre a produtividade volumétrica em etanol e a velocidade de consumo de substrato. Quando empregado uréia como única fonte de nitrogênio, a levedura consumiu pobremente a xilose e conseqüentemente não produziu etanol. No entanto, quando foi utilizado extrato de levedura como única fonte de nitrogênio, foram obtidos valores de Q_P e Q_S de cerca de 0,33 e

0,89 g/L.h, respectivamente, e com a combinação uréia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, a levedura apresentou valores Q_P e Q_S próximos a 0,50 e 1,38 g/L.h, respectivamente

Outro trabalho na literatura que também reporta a avaliação nutricional do meio de fermentação semissintético para a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* é o de Slininger et al. (2006), que avaliaram o emprego de fontes de nitrogênio na forma de aminoácido, além de minerais em meio semissintético contendo xilose como a principal fonte de carbono. Os autores verificaram que os aminoácidos foram capazes de aumentar a produtividade volumétrica em etanol quando adicionados de maneira combinada, e também verificaram que a adição de aminoácidos de forma isolada não acarretou em benefícios para o processo fermentativo, visto que a levedura utiliza os aminoácidos para diversos fins, principalmente para a síntese de proteínas, e por isso maiores benefícios só são conseguidos com a adição de grupos de aminoácidos, visto que estes não agem somente como fonte de nitrogênio. Além da utilização de aminoácidos para a formação de proteínas, estes possuem ainda a função de proteção para as células contra os vários fatores de *stress* do meio que poderiam levar ao desequilíbrio redox, reduzindo a capacidade de produção de etanol. Segundo Mauricio et al. (2001), aminoácidos além de suprir a necessidade de fontes de nitrogênio pelas leveduras, ainda atuam como agentes reguladores do equilíbrio redox sob condições restritas de oxigênio.

Além do tipo da fonte de nitrogênio, a relação carbono e nitrogênio (C:N) tem sido apontada como um fator de fundamental importância para melhorar os parâmetros fermentativos da bioprodução de etanol a partir de xilose por *P. stipitis* (SLININGER et al., 2006; AMARTEY; JEFFRIES, 1994).

Slininger et al. (2006) também avaliaram o efeito da adição de diferentes fontes de nitrogênio, incluindo uma série de aminoácidos, sobre a produção de etanol por *P. stipitis*. Segundo estes autores, os aminoácidos arginina e ácido glutâmico foram os que apresentaram os maiores efeitos sobre o aumento da produtividade volumétrica em etanol. Além disto, foi constatado que a faixa ótima da razão C:N em concentrações de xilose de 50, 100 e 150 g/L foi de 127:1 a 24:1, 126:1 a 33:1 e 182:1 a 57:1, respectivamente. Neste estudo foram também avaliados o efeito da uréia em combinação com diferentes aminoácidos sobre a produção de etanol por *P. stipitis* (Figura 2.10). De acordo com os autores quando

uréia ou aminoácidos foram utilizados como única fonte de nitrogênio, o acúmulo de etanol foi de 11 e 24 g/L, respectivamente. Porém quando se utilizou uma combinação destas fontes (80 % de uréia e 20 % de aminoácidos) a uma relação C:N de 37:1 a produção de etanol atingiu 46 g/L.

Figura 2.10 – Variação do meio base para encontrar a combinação ótima entre uréia e aminoácidos, visando maximizar a produção de etanol por *P. stipitis* NRRL Y-7124, em meio contendo 150 g/L de xilose (SLININGER et al., 2006).

A Tabela 2.3 sumariza os principais resultados de crescimento celular e produção de etanol por *Pichia stipitis* em função da composição nutricional do meio de fermentação.

Tabela 2.3 – Efeito da composição nutricional do meio sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas da levedura *Pichia stipitis*.

Nutriente	Cepa	Efeito no crescimento celular	Efeito na produção de etanol	Referências
Aminoácido	NRRL Y-7124	Arginina, histidina, isoleucina e prolina aumentaram o crescimento. Alanina, ácido glutâmico, leucina e tirosina diminuíram o crescimento celular	Ala, Arg, Asp, Glu, Gli, Hist, Leu e Tir aumentaram a concentração de etanol. Isoleucina reduziu a concentração de etanol	Slininger (2006)
Cálcio	NRRL Y-7124; CBS 6054	Aumentou o crescimento a baixas concentrações (0,34 mM). Diminuiu crescimento a altas concentrações (1 mM)	Abaixou ligeiramente a concentração de etanol	Guebel e Nudel (1992), Agbogbo e Wenger (2007)
Corn steep liquor	CBS 6054	Aumento do crescimento celular	Aumento da velocidade de produção de etanol e concentração final	Amartey e Jeffries (1994)
Extrato de malte, extrato de levedura e sulfato de amônio	CBS 6054	Diminuiu crescimento celular	Diminuiu a velocidade de produção de etanol e a concentração final	Amartey e Jeffries (1994)

continua

(continuação)

Tabela 2.3 – Efeito da composição nutricional do meio sobre o crescimento e produção de etanol por diferentes cepas da levedura *Pichia stipitis*.

Nutriente	Cepa	Efeito no crescimento celular	Efeito na produção de etanol	Referências
Peptona, extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato de potássio	CBS 6054	Diminuiu o crescimento celular	Aumentou a velocidade de produção de etanol e concentração final	Amartey e Jeffries (1994)
Purinas e pirimidinas	NRRL Y-7124	Nenhum efeito significativo no crescimento	Nenhum efeito na produção de etanol	Slininger (2006)
YNB com aminoácidos	CBS 6054	Diminuiu o crescimento celular	Diminuiu a velocidade de produção de etanol, mas aumentou a concentração final	Amartey e Jeffries (1994)
Vitaminas (tiamina, riboflavina, niacina, ácido fólico, biotina, B12)	NRRL Y-7124	Geralmente melhorou o crescimento celular	Nenhum efeito na produção de etanol	Slininger (2006)

final

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo melhorar o processo de produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando estratégias nutricionais e de aclimação da levedura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes fontes de nitrogênio sobre a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* em meio semissintético;
- Estudar o efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com as fontes de nitrogênio previamente selecionadas em meio semissintético, sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*;
- Avaliar diferentes estratégias de aclimação da levedura *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando aumentar a tolerância da levedura aos compostos inibidores presentes no meio;
- Avaliar o perfil cinético de produção de etanol em biorreator de bancada, pela levedura *Pichia stipitis* adaptada, segundo a estratégia selecionada;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL – USP), e no Laboratório de Fermentações do Departamento de Engenharia Biológica (DEB), da Universidade do Minho (Uminho) em Portugal.

4.1 OBTENÇÃO E CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

A palha de arroz utilizada neste trabalho foi obtida após a colheita do grão na cidade de Canas, São Paulo. O material foi seco naturalmente ao sol e cominuído em moínho de martelo a fim de se obter um tamanho de aproximadamente 5 mm. A palha de arroz foi estocada em sacos de polipropileno de 5 kg de capacidade e mantida em local seco a temperatura ambiente até a realização da hidrólise.

A hidrólise da hemicelulose da palha de arroz foi realizada pelo processo de hidrólise ácida segundo as condições otimizadas e descritas por Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003). Para a realização das hidrólises foi utilizado um reator de aço inoxidável com o volume total de 50 litros de capacidade e volume útil de 40 litros, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. As reações de hidrólise foram realizadas sob as seguintes condições: temperatura de 120 °C, tempo de 30 minutos, agitação de 3 rpm, pressão manométrica de 180 KPa. A concentração de ácido sulfúrico foi de 100 mg/g de matéria seca e a relação sólido/líquido de 1:10 (m/v).

Visando alcançar uma concentração de cerca de 120 g/L de xilose no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, este foi submetido a um processo de concentração sob vácuo a uma temperatura de 65°C em concentrador confeccionado em aço inoxidável com 30 litros de capacidade, aquecido por resistência elétrica. Após a concentração, o hidrolisado foi estocado a 4 °C em câmara fria, para posterior utilização.

4.2 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

Neste trabalho foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois. A cultura foi mantida repicada em tubos contendo agar extrato de malte inclinado e conservada a 4°C.

Os inóculos foram preparados transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para frascos Erlenmeyer de 250 ou 500 mL contendo 50 ou 100 mL de meio, respectivamente, mantendo-se a proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Os frascos foram inoculados e incubados em agitador rotatório a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação em centrífuga Jouan modelo MR 18-12, a 2000 x g por 20 minutos e ressuspensas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão celular concentrada de cerca de 50 g/L. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular inicial de 1 g/L.

O inóculo utilizado para as fermentações em meio semissintético foi cultivado em um meio constituído por (g/L): xilose (30,0), glicose (5,0), arabinose (5,0), $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (3,0), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0) e extrato de levedura (3,0). As soluções utilizadas para a composição do meio de cultivo foram preparadas em concentrações mais elevadas e esterilizadas separadamente em autoclave a 121°C por 20 minutos, com exceção dos açúcares que foram autoclavados a 112°C por 15 minutos. Estas soluções foram então adicionadas assepticamente aos frascos Erlenmeyer de forma a se obter a concentração desejada de cada componente ao meio de cultura.

Para fermentações em hidrolisado, o inóculo foi preparado cultivando as células em hidrolisado diluído de forma a se obter uma concentração inicial de xilose, glicose e arabinose de 30, 5 e 5 g/L, respectivamente. Antes da diluição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado, este teve seu pH ajustado para o valor de 5,5 com solução 10 mol/L de hidróxido de sódio, e em seguida, o sólido precipitado foi removido por centrifugação em centrífuga Jouan modelo MR 18-12, a 2000 x g por 20 minutos. Os cultivos em hidrolisado foram realizados sem qualquer suplementação nutricional.

4.3 MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Para as fermentações realizadas em hidrolisado, utilizou-se o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado (Item 4.1), o qual foi devidamente diluído em água esterilizada a fim de se obter as concentrações desejadas em cada ensaio. Nas fermentações em meio semissintético, o meio padrão foi constituído por uma concentração dos açúcares xilose:glicose:arabinose nas proporções encontradas no hidrolisado hemicelulósico concentrado de 6:1:1. Desta forma o meio foi composto por (g/L): xilose (60,0), glicose (10,0), arabinose (10,0), extrato de levedura (3,0) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1,0).

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio ou em frascos de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação, mantendo-se a proporção de 2,5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Em todos os ensaios os frascos foram inoculados com 1 g/L de células e incubados em agitador rotatório, a 30 °C e 200 rpm, sendo que amostras foram retiradas a cada 12 ou 24 horas para o acompanhamento do crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol.

4.4 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *Pichia stipitis* NRRL Y-7124

4.4.1 Seleção das Variáveis através do Planejamento Fatorial 2^4

A influência da arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio sobre a produção de etanol por *P. stipitis* em meio semissintético foi avaliada através de um planejamento fatorial 2^4 , com triplicata no ponto central (Tabela 4.1), nas concentrações de 0 a 6 g/L, conforme a Tabela 4.2. Nesta etapa, todos os ensaios do planejamento foram realizados na presença 3 g/L de extrato de levedura (9,5% (m/m)), o que corresponde a 0,3 g/L de nitrogênio orgânico, o qual foi determinado no presente trabalho conforme descrito no Item 4.7.8.

Tabela 4.1 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Ensaio	Variáveis			
	Arginina	Ácido glutâmico	Uréia	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Tabela 4.2 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^4 para avaliação de diferentes fontes de nitrogênio na produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
Arginina	0	3,0	6,0
Ácido glutâmico	0	3,0	6,0
Uréia	0	3,0	6,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0	3,0	6,0

4.4.2 Otimização de Fontes de Nitrogênio através de Planejamento Fatorial 2^2 com Face Centrada

A partir dos resultados estatísticos obtidos na etapa de avaliação do efeito de diferentes fontes de nitrogênio, ácido glutâmico e fosfato de amônio foram selecionados para a etapa de otimização através de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada (Tabela 4.3), visando otimizar os níveis de concentração destas variáveis em meio semissintético. Ácido glutâmico e fosfato de amônio foram utilizados em concentrações de 3,0 a 9,0 g/L, conforme está apresentado na Tabela 4.4. Neste estudo, todos os ensaios do planejamento também foram realizados na presença 3 g/L de extrato de levedura (9,5% (m/m)), correspondente a 0,3 g/L de nitrogênio orgânico, o qual foi determinado no presente trabalho conforme descrito no Item 4.7.8.

Tabela 4.3 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 para otimização das concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio no meio de fermentação para a produção de etanol a partir da levedura *Pichia stipitis*.

Ensaio	Variáveis	
	Ácido glutâmico	(NH ₄) ₂ HPO ₄
1	-1	-1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	+1	+1
5	-1	0
6	+1	0
7	0	-1
8	0	+1
9	0	0
10	0	0
11	0	0

Tabela 4.4 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^2 para otimização de ácido glutâmico e fosfato de amônio no meio de fermentação para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	1
Ácido glutâmico	3	6	9
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	3	6	9

4.4.3 Efeito da Suplementação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz com Fontes de Nitrogênio previamente selecionadas em Meio Semissintético

Nesta etapa foi avaliado o efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com diferentes fontes de nitrogênio sobre a bioprodução de etanol por *P. stipitis*. Além das fontes de nitrogênio previamente selecionadas em meio semissintético (ácido glutâmico e fosfato de amônio) foi avaliado também o efeito de extrato de levedura na presença destas fontes de nitrogênio. Em todos os ensaios do planejamento fatorial o meio foi suplementado com 1,0 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado.

Este estudo foi realizado através de um planejamento fatorial 2^3 com duplicata no ponto central, como apresentado na Tabela 4.5. As fontes de nitrogênio foram estudadas em concentrações de 0 a 3,0 g/L, conforme está apresentado na Tabela 4.6.

Tabela 4.5 – Matriz do planejamento fatorial 2^3 com duplicata no ponto central para avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol a partir da levedura *P. stipitis*.

Ensaio	Variáveis		
	Extrato de levedura	Ácido glutâmico	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0

Tabela 4.6 – Níveis e valores reais estudados no planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol a partir da levedura *P. stipitis*.

Variáveis (g/L)	Níveis		
	-1	0	+1
Extrato de levedura	0	1,5	3,0
Ácido glutâmico	0	1,5	3,0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	0	1,5	3,0

4.5 ESTRATÉGIAS DE ACLIMATAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis*

Nesta etapa, diferentes estratégias de aclimação (A, B, C, D e E) foram conduzidas com a levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. As estratégias foram baseadas em transferências sucessivas da cultura para meios contendo várias proporções de hidrolisado: 25 (H₂₅), 45 (H₄₅), 60 (H₆₀) e 75 (H₇₅) (% (v/v)), o que correspondeu a concentrações de xilose de aproximadamente 30, 50, 70 e 90 g/L, respectivamente. Colônias foram isoladas em diferentes etapas do cultivo e foram selecionadas para posterior avaliação quanto ao nível de aclimação ao hidrolisado hemicelulósico. A partir desta etapa, o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não foi suplementado com nutrientes.

4.5.1 Estratégia de Aclimação “A”

A levedura *P. stipitis* foi primeiramente cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semissintético, a 30 °C e 200 rpm de agitação por 24 horas. Aproximadamente 1,0 g/L de células foram transferidas assepticamente para um meio contendo uma proporção de 25% (v/v) de hidrolisado, o que correspondeu a uma concentração de 30 g/L de xilose no hidrolisado. Após o cultivo, cerca de 1,0 g/L de células foram transferidas para um meio contendo hidrolisado mais concentrado. Este procedimento foi repetido até a proporção de 75% (v/v) de hidrolisado, conforme esquema mostrado na Figura 4.1, sendo as transferências para os meios 45, 60 e 75% realizadas nos tempos de cultivo de 24, 48 e 72 horas, respectivamente.

A cada transferência de células para novos meios de cultivo foram retiradas alíquotas, as quais foram diluídas assepticamente cerca de 10.000 vezes por diluição sucessiva em tubos de centrífuga estéreis, sendo que um volume de 0,1 mL da suspensão celular diluída foi transferido para placas de Petri e espalhado com auxílio de uma alça de Drigalski, conforme mostrado na Figura 4.2. O meio sólido utilizado para o isolamento e manutenção foi constituído por hidrolisado a 25 ou 45% (v/v), correspondentes a 30 ou 50 g/L de concentração

Figura 4.1 – Esquema da aclimação da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleção e isolamento das colônias durante a estratégia de aclimação "A". Pré-inóculo em meio semissintético (MS); Inóculo em hidrolisado a 25% (v/v), Fermentação 1A (H45) e transferências sucessivas: 1ªT e 2ªT em hidrolisado a 60 e 75 % (v/v), respectivamente.

Figura 4.2 – Procedimento utilizado para a seleção e o isolamento das colônias aclimatadas da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, provenientes de cultivos sucessivos em meio líquido.

de xilose, além dos seguintes componentes (g/L): extrato de levedura (3,0), extrato de malte (3,0), peptona (5,0) e agar (20). As placas permaneceram em estufa a 30 °C por 72 horas, sendo que apenas as placas contendo uma proporção de 25% (v/v) de hidrolisado apresentaram crescimento. Após o crescimento, as colônias isoladas foram repicadas para tubos contendo agar de hidrolisado a 25% (v/v), sendo mantidas resfriadas a 4 °C para utilizações posteriores.

A partir desta primeira estratégia de aclimação foram selecionadas seis colônias (A₆₀-1, A₆₀-2, A₆₀-3, A₇₅-1, A₇₅-2 e A₇₅-3), como demonstrado na Figura 4.1. As cepas receberam denominações de acordo com a etapa de cultivo da qual foram retiradas.

Com o objetivo de avaliar a capacidade de fermentação das seis colônias selecionadas durante o processo de aclimação A, foram realizadas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a uma concentração de aproximadamente 70 g/L de xilose, correspondente a 60% (v/v) de hidrolisado. Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 50 mL de meio de fermentação, sendo que os meios foram inoculados com aproximadamente 1 g/L de células provenientes de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 25% (v/v) de hidrolisado.

4.5.2 Estratégia de Aclimação “B”

Na estratégia de aclimação “B” a levedura *P. stipitis* foi primeiramente cultivada em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semissintético, a 30 °C e 200 rpm de agitação por 24 horas, sendo cerca de 2,0 g/L de células transferidas sucessivamente para meios contendo proporções crescentes de hidrolisado correspondentes a 25, 45, 60 e 75% (v/v). As células provenientes do cultivo em hidrolisado a 75% (v/v) foram transferidas mais quatro vezes para meios contendo também 75% (v/v) de hidrolisado, conforme está demonstrado na Figura 4.3. As transferências 1^aT, 2^aT, 3^aT e 4^aT foram inoculadas com uma concentração inicial próxima a 3,0 g/L de células. Nesta estratégia foram isoladas e selecionadas quatro colônias aclimatadas de *P. stipitis*, provenientes de cada transferência, conforme mostrado na Figura 4.2.

Para avaliar a capacidade de fermentação das quatro colônias isoladas durante esta estratégia de aclimação, foram realizadas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a uma concentração próxima a 90 g/L de xilose ou 75% (v/v) de hidrolisado. Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 50 mL de meio de fermentação, sendo que os meios foram inoculados com aproximadamente 2 g/L de células provenientes de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 25% (v/v) de hidrolisado.

4.5.3 Estratégia de Aclimação “C”

A estratégia de aclimação “C” foi realizada de maneira semelhante à estratégia de aclimação “B”, porém nesta etapa foram transferidas maiores concentrações de células, cerca de 14 g/L, para os frascos referentes às quatro transferências contendo hidrolisado a 75% (v/v), conforme mostrado na Figura 4.3. Nesta estratégia também foram isoladas quatro colônias de *P. stipitis*, provenientes da 1^aT, 2^aT, 3^aT e 4^aT transferências.

Para avaliar a capacidade de fermentação das quatro colônias isoladas durante esta estratégia de aclimação, foram realizadas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a uma concentração próxima a 90 g/L de xilose ou 75% (v/v) de hidrolisado. Os ensaios fermentativos foram

Figura 4.3 – Esquema da aclimação da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleção e isolamento das colônias durante a estratégia de aclimação “B” e “C”. Pré-inóculo em meio semissintético (MS); Inóculo em hidrolisado a 25% (v/v), e transferências sucessivas realizados em hidrolisado a 45, 60 e 75% (v/v).

realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com um volume de 50 mL de meio de fermentação, sendo que os meios foram inoculados com aproximadamente 2 g/L de células provenientes de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 25% (v/v) de hidrolisado.

4.5.4 Estratégia de Aclimação “D”

Esta estratégia foi realizada de maneira semelhante à estratégia de aclimação “A”, no entanto, sem a etapa do pré-inóculo em meio semissintético. As células foram cultivadas inicialmente em hidrolisado a 25% (v/v) e transferidas para o meio H₄₅, sendo a partir desta etapa realizadas duas transferências para meios contendo proporções crescentes de hidrolisado correspondentes a 60 e 75% (v/v), conforme demonstrado na Figura 4.4, sendo nesta etapa realizada as transferências de cerca de 2,0 g/L de células. Nesta estratégia foram isoladas duas colônias de *P. stipitis*, provenientes das transferências 1^aT e 2^aT em placas contendo meio sólido em proporção de 25% (v/v).

4.5.5 Estratégia de Aclimação “E”

A estratégia de aclimação “E” foi realizada de maneira semelhante à estratégia de aclimação “D”, também sem a etapa do pré-inóculo em meio semissintético. No entanto, esta estratégia diferencia-se de todas as outras pela utilização de condição de maior aeração, representada por uma razão de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$.

As células foram cultivadas inicialmente em hidrolisado a 25% (v/v), transferidas para o meio H₄₅ sendo a partir desta etapa realizadas duas transferências sucessivas para meios contendo proporções crescentes de hidrolisado correspondentes a 60 e 75% (v/v), conforme demonstrado na Figura 4.4, sendo nesta etapa também realizadas transferências de cerca de 2,0 g/L de células. Nesta estratégia foram isoladas e selecionadas duas colônias de *P. stipitis*, provenientes das transferências 1^aT e 2^aT, para placas contendo meio sólido em proporção de 25% (v/v) de hidrolisado.

Figura 4.4 – Esquema da aclimao da levedura *Pichia stipitis* NRRL-Y7124, seleo e isolamento das colnias durante as estratgias de aclimao "D" e "E". Inculo em hidrolisado a 25% (v/v), e cultivos sucessivos: C1, C2, e C3 realizados em hidrolisado a 45, 60 e 75% (v/v), respectivamente. Proporo de 2,5:1 e 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ nas estratgias D e E, respectivamente.

4.6 AVALIAO DA PRODUO DE ETANOL EM REATOR DE BANCADA

As fermentaes em hidrolisado hemicelulsico de palha de arroz foram realizadas na proporo de 70% (v/v), para avaliar a capacidade fermentativa da levedura *P. stipitis* aps ser submetida a trs cultivos sucessivos em hidrolisado nas propores de 25, 45 e 60% (v/v). O inculo foi preparado atravs de transferncias sucessivas em agitador rotatrio a 200 rpm e 30 C, para os quais foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade mantendo-se a

proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. A fermentação controle foi realizada com inóculo preparado nas mesmas condições de aeração, no entanto, a levedura *P. stipitis* passou por apenas um cultivo em hidrolisado a 25% (v/v).

As fermentações foram conduzidas em biorreator modelo BIOSTAT B (B. Braun International) de 2 litros de capacidade equipado com controlador de temperatura, agitação e aeração, além de sonda de pH, munido de duas turbinas com seis pás planas. O volume de meio fermentativo utilizado foi de 1,2 L, sendo a temperatura mantida a 30 °C sem realização de ajuste de pH no decorrer da fermentação. As condições de transferência de oxigênio utilizadas foram k_{La} próximo a 10,0 h⁻¹, (correspondentes a uma aeração de 0,25 vvm e agitação de 350 rpm). Amostras foram retiradas periodicamente a cada 12 horas para o acompanhamento das concentrações de células, açúcares e etanol.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.7.1 Determinação do Teor de Umidade na Palha de Arroz

Amostras de aproximadamente 1g de palha de arroz foram colocadas em uma balança de secagem por radiação infravermelha (IV 2000 Gehaka). A secagem foi realizada a uma temperatura de 105 °C até peso constante (variação de massa menor que 0,0005 g/min) e a umidade da palha de arroz foi determinada pela diferença de massa obtida antes e após o aquecimento em relação à massa úmida (Equação 4.1).

$$\% \text{ umidade} = \frac{m_{\text{úmida}} - m_{\text{seca}}}{m_{\text{úmida}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.1}$$

Onde: $m_{\text{úmida}}$ = massa úmida da palha de arroz (g); m_{seca} = massa da palha de arroz após secagem na balança (g).

4.7.2 Determinação das Principais Frações Orgânicas Presentes no Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz

A palha de arroz foi caracterizada quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, baseando-se nas metodologias descritas por Browning

(1967). Amostras de aproximadamente 1,0 grama de palha de arroz previamente seca em estufa a 105 °C até peso constante, foram transferidas para um béquer de 50 mL e adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ 72 % p/p (pré-aquecido a 45 °C). A reação foi mantida em banho termostatzado Micronal modelo B.15, a 45 °C por 7 minutos, sob agitação constante com bastão de vidro. Após este tempo foram utilizados 275 mL de água para transferir quantitativamente o conteúdo do béquer para um Erlenmeyer de 500 mL, interrompendo desta maneira a reação. Em seguida o Erlenmeyer foi fechado com papel alumínio e autoclavado a 1 atm, 121 °C, durante 45 minutos. Após autoclavagem, o frasco foi resfriado até temperatura ambiente e o material sólido foi separado da fração líquida por filtração utilizando papel de filtro quantitativo previamente tarado. O hidrolisado foi recolhido em um balão volumétrico de 500 mL e o sólido contido no papel de filtro foi lavado com água destilada, sendo esta água também recolhida para o mesmo balão. O resíduo retido no papel de filtro foi em seguida lavado novamente com cerca de 1,5 L de água destilada. O papel de filtro foi seco em estufa a 105 °C até atingir peso constante e, após a secagem o resíduo foi calcinado para determinação de cinzas segundo item 4.7.3. A porcentagem de lignina insolúvel presente na palha de arroz foi calculada através da Equação 4.2.

$$\% \text{ lignina insolúvel} = \frac{\text{massa}_{\text{lignina}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot 100 \quad \text{Equação 4.2}$$

Onde: $\text{massa}_{\text{lignina}}$ = (massa do resíduo retido no papel filtro – massa de cinzas) (g); $\text{massa}_{\text{seca}}$ = massa seca de palha de arroz (g).

Os teores de celulose, hemicelulose e grupo acetil na palha de arroz foram calculados a partir das Equações 4.3, 4.4 e 4.5, respectivamente (IRICK et al., 1988). Inicialmente, as amostras foram filtradas em filtro Sep Pak C18 e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, conforme metodologia detalhada no Item 4.7.5. O teor de celulose foi calculado através da Equação 4.3 que relaciona a massa de glicose encontrada na fração líquida e a massa seca de palha de arroz, considerando a diluição realizada em um balão volumétrico de 500 mL. Os teores de hemicelulose e grupo acetil foram

calculados da mesma forma, porém utilizando as massas dos açúcares presentes na hemicelulose (xilose e arabinose), e do ácido acético, respectivamente, de acordo com as Equação 4.4 e 4.5.

$$\% \text{ celulose} = \frac{\text{massa}_{\text{glicose}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot F_c \cdot F_{ph} \times 100 \quad \text{Equação 4.3}$$

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{\text{massa}_{\text{xilose}} + \text{massa}_{\text{arabinose}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot F_c \cdot F_{ph} \times 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

$$\% \text{ gupo acetil} = \frac{\text{massa}_{\text{ácido acético}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \cdot F_{\text{ác. acético}} \times 100 \quad \text{Equação 4.5}$$

Onde:

$\text{massa}_{\text{glicose}}$ = (concentração de glicose (g/L) x 0,5 L);

$\text{massa}_{\text{xilose}}$ = (concentração de xilose (g/L) x 0,5 L);

$\text{massa}_{\text{arabinose}}$ = (concentração de arabinose (g/L) x 0,5 L);

$\text{massa}_{\text{ácido acético}}$ = (concentração de ácido acético (g/L) x 0,5 L);

F_c = fator de conversão (0,9 para celulose e 0,88 para hemicelulose);

F_{ph} = fator de perda de hidrólise (1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose);

$F_{\text{conversão}}$ = fator de conversão (0,72 para o ácido acético).

$\text{massa}_{\text{seca}}$ = massa seca de palha de arroz.

Para a determinação da lignina solúvel em meio ácido foi utilizada a metodologia descrita por Rocha (2000). Uma amostra de 5 mL da fração líquida foi alcalinizada com solução 6 mol/L de NaOH até atingir pH 12, a amostra foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro Hitachi U-2000 a um comprimento de onda de 280 nm usando água como referência.

O teor de lignina solúvel na palha de arroz foi determinado segundo a Equação 4.6. As concentrações dos produtos de degradação (PD) de xilose e glicose (furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente), foram determinadas por CLAE.

$$\% \text{ lignina solúvel} = \frac{\text{massa}_{\text{lignina}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.6}$$

$$A_{PD\ 280} = C_{\text{furf}} \times E_{\text{furf}} + C_{\text{HMF}} \times E_{\text{HMF}} \quad \text{Equação 4.7}$$

$$C_{\text{lignina solúvel}} \text{ (g/L)} = 4,187 \cdot 10^{-2} \times (Abs_{FL\ 280} - Abs_{PD\ 280}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad \text{Equação 4.8}$$

Onde: Abs_{FL} = absorbância da fração líquida a 280 nm;

Abs_{PD} = absorbância, em 280 nm, de furfural e hidroximetilfurfural (Equação 4.7);

C_{HMF} e E_{HMF} = concentração de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente;

E_{furf} = absortividade molar do furfural (146 L/g.cm);

E_{HMF} = absortividade molar do hidroximetilfurfural (114 L/g.cm).

massa_{lignina} = concentração de lignina solúvel (Equação 4.8) x 0,5 L;

massa_{seca} = massa seca de palha de arroz.

4.7.3 Determinação de Sólidos Totais, Cinzas e Minerais

Para a determinação de sólidos totais presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado, amostras de 10 mL de hidrolisado foram adicionadas a cadinhos previamente tarados. Estes cadinhos foram colocados em estufa a 105 °C para evaporação de água até peso constante. A concentração de sólidos totais na amostra foi determinada segundo a Equação 4.9.

$$C_{\text{sólidos totais}} \text{ (g/L)} = \frac{\text{massa}_{\text{sólidos}}}{\text{Volume}_{\text{hidrolisado}}} \quad \text{Equação 4.9}$$

Onde: (massa_{sólidos}=(massa seca do hidrolisado após evaporação – massa do cadinho tarado); volume_{hidrolisado} = volume de hidrolisado submetido à evaporação (10 mL).

Para determinação do teor de cinzas na palha de arroz, cerca de 1g do material previamente seco em estufa a 105 °C (~7 % de umidade) foi colocado em cadinho de porcelana previamente tarado, o qual foi submetido ao aquecimento em mufla elétrica a 800 °C por 2h. Após o resfriamento os cadinhos foram

colocados em dessecador até atingir a temperatura ambiente e, em seguida pesados. As cinzas foram determinadas pela diferença de massa (g) das amostras, antes e após a calcinação (Equação 4.10).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{\text{massa}_{\text{cinzas}}}{\text{massa}_{\text{seca}}} \times 100 \quad \text{Equação 4.10}$$

Onde:

$\text{massa}_{\text{cinzas}}$ = (massa da amostra calcinada – massa do cadinho) (g);

$\text{massa}_{\text{seca}}$ = massa da amostra seca (g).

Para a determinação de cinzas no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado, obtido conforme descrito no Item 4.1, uma amostra de hidrolisado foi inicialmente submetida à secagem em estufa a 105 °C para evaporação de água até peso constante, sendo este sólido submetido à análise de cinzas como está descrito anteriormente

Os teores dos diversos minerais presentes na palha de arroz e no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, foram determinados por espectrometria de absorção atômica por chama, em um equipamento PerkinElmer modelo Analyst 800, conforme metodologia desenvolvida no Departamento de Engenharia Química (LOQ), EEL-USP. Para as determinações foram pesados cerca de 1 g de palha de arroz previamente seca a 105 °C, sendo em seguida calcinada a 600 °C por 1 hora. Para as determinações de minerais no hidrolisado hemicelulósico concentrado foram tomadas amostras de 10 mL de hidrolisado, as quais foram submetidas ao processo de secagem e calcinação.

Às amostras calcinadas, foram adicionados cerca de 3 mL de solução água régia (3 HCl: 1 HNO₃), e estas foram então aquecidas em chapa de aquecimento durante 1 hora para completar a digestão. O material contido no cadinho foi transferido quantitativamente e avolumado em balão volumétrico de 100 mL com água deionizada (Millipore, condutividade máxima de 18 mΩ.cm), fazendo-se diluição das amostras quando necessário.

4.7.4 Determinação de pH e Densidade

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho Micronal modelo B15, com correção de temperatura.

A densidade do HHPA concentrado foi determinada através de um picnômetro de 50 mL através da Equação 4.11.

$$d_{hidrolisado} = \frac{massa_{hidrolisado}}{massa_{água\ destilada}} \times d_{água}^{t\ ^{\circ}C} \quad \text{Equação 4.11}$$

Onde: $massa_{hidrolisado}$ = massa de hidrolisado contida no volume de 50 mL do picnômetro (g); $massa_{água\ destilada}$ = massa de água destilada do contida no volume de 50 mL do picnômetro (g); $d_{água}^{t\ ^{\circ}C}$ = 0,99716 g/mL (densidade da água na temperatura de 24,5 °C).

4.7.5 Determinação dos Teores de Açúcares, Ácido acético, Glicerol, Furanos, Compostos Derivados de Lignina (CDL) e Etanol

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, glicerol e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) através de curvas de calibração na faixa de concentração de 0,2 e 4,0 g/L, em equipamento Waters com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 mol/L; fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas a 2000 x g por 20 minutos para remoção de sólidos sendo o sobrenadante diluído em água deionizada, em seguida, filtradas em filtro Sep-Pack C18 Cartridge (Waters Associates).

As concentrações de furanos (furfural e hidroximetilfurfural) e os compostos derivados de lignina (CDL) ácido p-hidroxibenzóico, vanilina, ácido vanilínico, ácido siríngico, ácido ferúlico e siringaldeído), também foram determinados por CLAE em equipamento Waters, porém foram utilizados um detector ultravioleta e uma coluna Waters Resolve 5 µm C₁₈ (300 x 3,9mm), nas seguintes condições:

temperatura de 25 °C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:9 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume de amostra de 20 µL. As amostras foram previamente centrifugadas a 2000 x g por 20 minutos para remoção de sólidos sendo o sobrenadante diluído em água deionizada, e em seguida, filtradas em membrana Milipore com poros de 0,45 µm.

4.7.6 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A concentração dos compostos fenólicos totais no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi determinada por espectrofotometria através de metodologia adaptada de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1999), utilizando ácido ferúlico como padrão. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 20 minutos para a remoção de sólidos, filtradas em membrana Milipore com poros de 0,45 µm, e em seguida diluídas em água deionizada.

Para a reação colorimétrica, 3,0 mL de amostra e 0,2 mL de reagente de Folin foram adicionados a tubos de ensaio seguido de agitação. O sistema foi mantido em repouso por 5 minutos, adicionou-se 0,8 mL de solução de Na₂CO₃ 150 g/L e o sistema foi novamente agitado e deixado em repouso durante 30 minutos em ausência de luz. As concentrações dos compostos fenólicos foram determinadas através de curva de calibração realizada na faixa de concentração de 0,2 a 5,0 g/L de ácido ferúlico, sendo as absorbâncias das amostras determinadas por espectrofotometria a 760 nm. Para a composição do branco, água destilada foi adicionada em substituição à amostra realizando-se o mesmo procedimento.

4.7.7 Determinação da Concentração Celular

As concentrações de células durante os processos fermentativos foram determinadas pelas medidas de absorbância das amostras diluídas. As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 20 min, as células foram lavadas e centrifugadas novamente a 2000 x g por 10 min e ressuspensas em água destilada. A absorbância da suspensão celular foi determinada a 600 nm em espectrofotômetro Hitachi U-2000 utilizando-se água como branco. As

concentrações celulares foram calculadas através de curvas de calibração entre peso seco e absorbância para meio semissintético e hidrolisado.

4.7.8 Determinação de Nitrogênio Orgânico e Inorgânico

O teor de nitrogênio total e inorgânico presente no hidrolisado hemicelulósico e na palha de arroz foi determinado pelo método Kjeldahl baseado na metodologia descrita por Vogel (1989) e Harris (2005). Para a determinação de nitrogênio no hidrolisado hemicelulósico e na palha de arroz, amostras de 3 mL e 0,5 g, respectivamente, foram adicionadas a tubos de digestão, seguido da adição de 10 mL de H₂SO₄ concentrado e 0,5 g de catalisador (mistura de K₂SO₄:CuSO₄ 2:1), os quais foram submetidos ao aquecimento em bloco digestor a 350 °C por 3 a 4 horas. Após a completa digestão a amostra foi transferida quantitativamente para um tubo de destilação, sendo adicionado a este cerca de 150 mL de água destilada. O tubo de destilação foi acoplado ao destilador automático Büchi Distillation Unit modelo K-355, sendo o meio alcalinizado, e a destilação realizada por adição de vapor durante 5 minutos, sendo todo o destilado recolhido em solução de HCl 0,1 mol/L previamente aferido. Todo o volume do destilado recolhido em ácido foi titulado por processo de retorno com NaOH 0,1 mol/L, também previamente aferido. Para a determinação de nitrogênio inorgânico a amostra foi submetida somente ao processo de destilação seguido de titulação. O teor de nitrogênio total na amostra foi determinado segundo a Equação 4.12.

$$\% N = \frac{14[(V_{HCl} \cdot C) - (V_{NaOH} \cdot C)]}{m \text{ ou } V}$$

Equação 4.12

4.7.9 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas na palha de arroz foi determinado como o conteúdo total de nitrogênio pelo método Kjeldahl, utilizando o fator de conversão de 6,25 (Proteína = N x 6,25).

4.7.10 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado pelo método estático, proposto inicialmente por Wise (1951). A sonda polarográfica de oxigênio foi calibrada à pressão atmosférica, definindo-se o zero pela injeção de nitrogênio e consequente expulsão de oxigênio, e 100% pela saturação do meio de fermentação com a injeção de ar atmosférico. A cada fermentação o k_La foi determinado nas mesmas condições nas quais as fermentações foram realizadas, porém, na ausência de células. Após a remoção de todo o oxigênio do meio de fermentação por introdução de nitrogênio, foram retomadas as condições de agitação e aeração utilizadas na fermentação, sendo monitoradas a variação da porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo, o que foi utilizado para calcular o valor de k_La através da forma integrada da equação proposta por Stanbury, Whitaker e Hall (1995), onde o valor de $-k_La$ é igual à inclinação resultante da representação linear de $\ln(C^* - CL)$ *versus* tempo.

4.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

4.8.1 Fator de Conversão de Substrato em Etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão de substrato (xilose e glicose) em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g/g, foi calculado através da Equação 4.12.

$$Y_{P/S} = \left(\frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad \text{Equação 4.12}$$

Onde: P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol; S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (xilose e glicose).

4.8.2 Fator de Conversão de Substrato em Células ($Y_{X/S}$)

O fator de conversão de xilose e glicose em células ($Y_{X/S}$), expresso em g/g, foi calculado através da Equação 4.13.

$$Y_{X/S} = \left(\frac{\Delta X}{-\Delta S} \right) = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

Equação 4.13

Onde: X_i e X_f = concentração inicial e final de células; S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (xilose e glicose).

4.8.3 Produtividade Volumétrica em Etanol (Q_P)

A produtividade volumétrica em etanol (Q_P), expressa em g/L.h, foi calculada através da Equação 4.14.

$$Q_P = \frac{(\Delta P)}{(\Delta t)} = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)}$$

Equação 4.14

Onde: P_i e P_f = concentração inicial e final de etanol; t_i e t_f = tempo inicial e final da fermentação.

4.8.4 Velocidade de Consumo de Substrato (Q_S)

A velocidade de consumo de xilose e glicose (Q_P), expressa em g/L.h, foi calculada através da Equação 4.15.

$$Q_S = \frac{(\Delta S)}{(\Delta t)} = \frac{(S_f - S_i)}{(t_f - t_i)}$$

Equação 4.15

Onde: S_i e S_f = concentração inicial e final de substrato (xilose e glicose); t_i e t_f = tempo inicial e final da fermentação.

4.8.5 Eficiência de fermentação

A eficiência de produção de etanol ($\eta\%$) foi calculada pela relação entre os valores de $Y_{P/S}$ obtidos nas fermentações e o valor máximo teórico para este parâmetro (0,51 g/g), calculada através da Equação 4.16.

$$\eta \% = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \times 100 \quad \text{Equação 4.16}$$

4.8.6 Análise Estatística

A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se o programa Statistica versão 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA PALHA DE ARROZ E DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

A palha de arroz utilizada neste trabalho foi analisada quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, grupo acetil, cinzas e minerais, conforme mostrado na Tabela 5.1.

Os teores de celulose (38,8 %) e hemicelulose (25,1 %) da palha de arroz estão dentro da faixa de variação reportada na literatura, situando-se entre 35 e 43% (p/p) para a celulose e entre 17 a 26% para a hemicelulose (OBEROI et al., 2010; KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000; ROBERTO et al., 2003; ZHONG et al., 2009). A porcentagem de hemicelulose na palha de arroz bem como de seus carboidratos foram muito semelhantes aos reportados por Kadam, Forrest e Jacobson (2000), que verificaram a presença de 20,4% de xilanas e 3,4% de arabinanas, correspondente a 24,3% de hemicelulose presente na palha.

Com relação à fração de lignina, o valor obtido (17,8%) é também muito semelhante ao reportado por Kadam, Forrest e Jacobson (2000) e Zhong et al. (2009), que relataram valores de 13,5 a 19,1%, respectivamente. Diferente do observado para os teores de celulose, hemicelulose e lignina, o teor de cinzas da palha de arroz encontrado no presente trabalho (8,7%) foi inferior à faixa de variação normalmente reportada na literatura, entre 12 e 18% (OBEROI et al., 2000; KADAM; FORREST; JACOBSON et al., 2000), o que pode ser atribuído a fatores como o estado de conservação da palha após a colheita (KADAM FORREST; JACOBSON, 2000).

Na fração de cinzas foi quantificada a presença de diversos minerais, tais como cálcio, sódio, potássio, magnésio, alumínio, ferro, manganês, cobre, zinco e fósforo, os quais contabilizam 2,18 % (p/p) dos constituintes da palha de arroz (Tabela 5.1). A fração destes minerais identificados representam 25% do total de cinzas encontrado na palha de arroz, sendo provavelmente os 75% restantes constituídos em sua grande maioria por SiO_2 , visto que, na literatura são encontrados diversos trabalhos que reportam que aproximadamente 75% do conteúdo de cinzas presente na palha de arroz pode ser atribuído à presença de sílica (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000; THY et al., 2006). O teor de

proteínas encontrado na palha de arroz (4,7%) é muito similar aos trabalhos de Oberoi et al. (2010) e Han (1975), que reportaram valores de 3,61 e 4,2%, respectivamente. O teor de extrativos (determinado por diferença) representa 3,3% do conteúdo da palha e pode estar relacionado à presença de gorduras, graxas, amidos, resinas, taninos, óleos essenciais e vários outros constituintes citoplasmáticos (Olsson; Hahn-Hagerdal, 1996).

Tabela 5.1 – Composição química da palha de arroz.

Componente	(% p/p)
Celulose (glucanas)	38,8
Hemicelulose	25,1
Xilana	21,3
Arabinana	3,8
Lignina Total	17,8
Lignina Klason	15,5
Lignina Solúvel em meio ácido	2,3
Grupo Acetil	1,6
Cinzas	8,7
Proteínas ($N \times 6,25$)	4,7
Extrativos (por diferença)	3,3
Minerais	(% p/p)*
Cálcio	0,298
Sódio	0,048
Potássio	1,410
Magnésio	0,133
Alumínio	0,033
Ferro	0,021
Manganês	0,073
Cobre	0,0006
Zinco	0,0021
Fosfato	0,166
Total	2,18

*Incluído no percentual total de cinzas presentes na palha de arroz

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi obtido através do processo de hidrólise com ácido diluído, conforme metodologia descrita no Item 4.1. O processo de hidrólise da hemicelulose apresentou uma eficiência de conversão dos açúcares de 79%, resultado este semelhante ao reportado por Karimi, Kheradmandinia e Taherzadeh (2006), que empregando processo de hidrólise ácida para a palha de arroz, com ácido diluído a 0,5 % de concentração, e uma relação sólido:líquido de 1:7, obtiveram uma eficiência de hidrólise da hemicelulose de aproximadamente 80 %.

No presente trabalho foram realizadas 11 bateladas de hidrólise da palha de arroz, das quais foram obtidos 337 litros de hidrolisado, a partir de aproximadamente 44 kg de palha de arroz. O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido foi analisado para determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, densidade, sólidos totais e cinzas), açúcares (glicose, xilose e arabinose), furanos (furfural e hidroximetilfurfural), compostos derivados de lignina (fenóis totais, ácido p-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, ácido ferúlico, siringaldeído), ácido acético e minerais, sendo estes resultados apresentados na Tabela 5.2. As análises dos parâmetros físico-químicos, açúcares e inibidores presentes no hidrolisado foram realizadas antes e após o processo de concentração a vácuo, sendo a análise de minerais realizada somente no hidrolisado concentrado.

Com o objetivo de obter maiores concentrações de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico foi realizado o processo de concentração a vácuo empregando um fator de concentração de sete vezes, o que levou a um aumento na concentração dos açúcares nesta mesma proporção. Diferente do observado para a concentração de açúcares, os demais constituintes como ácido acético, furanos, compostos derivados de lignina e fenóis totais apresentaram aumento de concentração inferior ao fator de concentração empregado, sendo os menores aumentos de concentração observados para o ácido acético e furfural, 1,3 e 1,4 vezes, respectivamente. O fato do aumento da concentração de tais compostos ter sido inferior ao fator de concentração está relacionado às características de volatilidade destes nas condições utilizadas durante a etapa de concentração, o que levou a uma remoção parcial de tais compostos durante o processo de concentração (Rodrigues et al., 2001).

Tabela 5.2 – Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz diluído e concentrado.

Parâmetros	Hidrolisado diluído	Hidrolisado Concentrado
Físico-químicos		
pH	1,3	0,5
Densidade (g/mL)	1,02	1,14
Sólidos totais (g/L)	43,7	305,0
Cinzas (g/L)	6,4	31,5
Açúcares (g/L)		
Glicose	2,6	20,9
Xilose	16,4	115,9
Arabinose	3,1	21,4
Nitrogênio (g/L)		
Total	n.a	2,80
Inorgânico	n.a	0,33
Orgânico	n.a	2,47
Inibidores (g/L)		
Fenóis totais	3,1	12,8
Furfural	0,153	0,216
Hidroximetilfurfural	0,029	0,126
Ácido p-hidroxibenzóico	0,004	0,016
Ácido vanilínico	0,003	0,034
Ácido siríngico	0,002	0,056
Vanilina	0,008	0,032
Ácido ferúlico	0,077	0,280
Siringaldeído	0,175	0,276
Ácido acético	1,48	1,97
Minerais (mg/L)		
Cálcio	n.a.	137,4
Sódio	n.a.	195,0
Potássio	n.a.	5778,7
Magnésio	n.a.	922,7
Alumínio	n.a.	265,6
Ferro	n.a.	1764,7
Manganês	n.a.	1217,0
Cobre	n.a.	0,4
Zinco	n.a.	29,7
Fosfato	n.a.	926,7
Sulfato	n.a.	9998,0
Cromo	n.a.	332,5

n.a. – não analisado

Foram identificados no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado a presença de alguns íons como o ferro, cromo e cobre, os quais podem ser prejudiciais aos processos de bioconversão. Porém, além destes íons também estavam presentes no hidrolisado íons como magnésio, cálcio, zinco, manganês e fosfato que são reportados como nutrientes importantes para os processos fermentativos (PALUKURTY et al., 2008; WATSON et al., 1984).

Segundo Parajó, Dominguez e Dominguez (1998) alguns íons encontrados em hidrolisados, tais como, cromo, ferro e cobre, podem ser resultantes da corrosão de equipamentos utilizados no processo de hidrólise. Além disso, a presença de sulfato no hidrolisado é atribuída ao ácido sulfúrico utilizado no processo de hidrólise.

Ainda na Tabela 5.2, observa-se uma redução no valor de pH após a etapa de concentração, o que está relacionado ao aumento da concentração de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado no processo de hidrólise.

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz apresentou uma considerável concentração de nitrogênio total (2,8 g/L), sendo a sua maioria (88%) constituída por nitrogênio orgânico, os quais provavelmente podem ser provenientes de aminoácidos liberados durante a etapa de hidrólise da palha de arroz.

5.2 EFEITO DE DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL PELA LEVEDURA *Pichia stipitis* NRRL Y-7124

A composição nutricional do meio de fermentação, principalmente as fontes de nitrogênio, podem afetar fortemente a eficiência de conversão de xilose a etanol por *Pichia stipitis*, visto que estes componentes estão diretamente relacionados com a eficiência de biossíntese, preservação e manutenção celular, e balanço redox de cofatores envolvendo NAD/NADH e NADP/NADPH (SLININGER et al., 2006).

5.2.1 Seleção das Variáveis através do Planejamento Fatorial 2⁴

A seleção de fontes de nitrogênio a serem utilizadas para a composição do meio semissintético visando à produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* foi realizada através de um planejamento fatorial 2⁴ completo. Neste planejamento foram avaliados os efeitos da adição de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio assim como seus possíveis efeitos de interação sobre a produção de etanol. Devido a necessidade mínima de micronutrientes e macronutrientes para a manutenção e crescimento celular da levedura *P. stipitis*, optou-se pelo uso de 3 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de MgSO₄.7H₂O na composição do meio padrão descrito no Item 4.3. De acordo com Hahn-Hagerdal, et al. (2005) o extrato de levedura além de ser uma fonte de vitaminas, peptídeos e elementos traços que são constituintes essenciais para o crescimento e metabolismo de leveduras, também contém fontes de nitrogênio na forma de aminoácidos.

Na Tabela 5.3 estão apresentados os resultados referentes ao consumo de substrato (xilose e glicose) e produção de etanol observados nos ensaios do planejamento. Nota-se que a levedura *P. stipitis* foi capaz de produzir etanol mesmo na ausência das fontes de nitrogênio avaliadas no planejamento (Ensaio E1), o que provavelmente está relacionado à presença de uma quantidade mínima de nutrientes (extrato de levedura e MgSO₄.7H₂O), na composição do meio.

De um modo geral, na maioria dos ensaios do planejamento, tanto o consumo de substrato quanto a produção de etanol atingiram seus valores

Tabela 5.3 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^4 , para avaliação da presença de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Ensaio	Variáveis				Consumo de Substrato (%)	Etanol (g/L)	Tempo (h)
	Arginina (g/L)	Ácido Glutâmico (g/L)	Uréia (g/L)	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (g/L)			
1	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	78,9	16,5	72
2	6,0(+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	93,4	17,1	48
3	0,0 (-1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	87,5	17,8	48
4	6,0(+1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	88,6	20,9	48
5	0,0 (-1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	98,0	20,0	48
6	6,0(+1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	99,3	18,3	48
7	0,0 (-1)	6,0(+1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	94,3	18,9	48
8	6,0(+1)	6,0(+1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	91,8	21,6	48
9	0,0 (-1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	100,0	25,0	48
10	6,0(+1)	0,0 (-1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	100,0	21,6	72
11	0,0 (-1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	99,7	27,5	48
12	6,0(+1)	6,0(+1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	100,0	26,0	48
13	0,0 (-1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	6,0(+1)	100,0	24,6	48
14	6,0(+1)	0,0 (-1)	6,0(+1)	6,0(+1)	71,7	15,0	72
15	0,0 (-1)	6,0(+1)	6,0(+1)	6,0(+1)	100,0	26,7	48
16	6,0(+1)	6,0(+1)	6,0(+1)	6,0(+1)	100,0	29,3	48
17	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	100,0	25,8	48
18	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	100,0	26,6	48
19	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	3,0 (0)	100,0	26,3	48

Substrato: xilose e glicose.

máximos após 48 horas de fermentação, com exceção dos ensaios E1, E10 e E14, nos quais a máxima produção de etanol alcançada pela levedura *P. stipitis* ocorreu após 72 horas de fermentação. Nota-se que a levedura apresentou as maiores concentrações de etanol (25 g/L em média), assim como o consumo completo de substrato nos ensaios que continham fosfato de amônio no meio de fermentação (ensaios E9 ao E19), com exceção do ensaio E14. Observa-se ainda que mesmo quando o meio de fermentação foi suplementado apenas fosfato de amônio (ensaio E9), a levedura *P. stipitis* foi capaz de alcançar uma produção de 25 g/L de etanol. Estes resultados indicam a importância da utilização de fosfato de amônio como fonte de nitrogênio para a suplementação do meio semissintético. Resultado semelhante foi reportado por Guebel et al. (1992), que avaliaram a influência de fontes de nitrogênio, como íons amônio e extrato de levedura sobre o crescimento celular e produção de etanol por *P. stipitis* NRRL Y-7124 em meio semissintético. Estes autores constataram que a presença de íons amônio no meio de fermentação contribuiu para o aumento da produção de etanol e formação de biomassa em 57 e 113%, respectivamente, em relação ao meio suplementado com apenas extrato de levedura como principal fonte de nitrogênio.

No presente estudo a maior produção de etanol (29,3 g/L), foi observada no E16, sendo este ensaio suplementado com todas as fontes de nitrogênio avaliadas (arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio), em seus níveis mais elevados (concentrações de 6 g/L). Resultados muito semelhantes foram reportados por Amartey e Jeffries (1994), que avaliaram a influência de diferentes fontes de nitrogênio para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124 a partir de xilose (80 g/L). Estes autores constataram que o crescimento celular, consumo de xilose e produção de etanol foram fortemente influenciados pelo tipo de fonte de nitrogênio, sendo a maior a concentração de etanol obtida em torno de 29 g/L após 48 horas de cultivo quando foram empregados 3 g/L de peptona e extrato de levedura como fontes de nitrogênio ou apenas 3% de corn steep liquor.

Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 estão mostrados os perfis de crescimento celular, produção de etanol, e consumo de açúcares da levedura *P. stipitis* nos ensaios fermentativos do planejamento 2⁴. Devido ao grande número de experimentos realizados, os ensaios estão apresentados em dois grupos, sendo o primeiro grupo relativo aos ensaios em que fosfato de amônio esteve ausente no

Figura 5.1 – Crescimento celular dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Figura 5.2 – Consumo de xilose (●) e glicose (▲) dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Figura 5.3 – Produção de etanol dos ensaios E1 a E8 (a) e ensaios E9 a E16 e ponto central (b), do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

meio de fermentação (E1 a E8), e o segundo grupo, aos ensaios nos quais fosfato de amônio esteve presente (E9 ao E16 e ponto central).

Na Figura 5.1a, são mostrados os perfis de crescimento celular no grupo de ensaios realizados na ausência de fosfato de amônio no meio de fermentação. De um modo geral, este grupo de ensaios foi aquele em que a levedura *P. stipitis* apresentou os maiores valores de crescimento celular. Nota-se que os comportamentos observados durante as fermentações variaram de acordo com as condições experimentais avaliadas no planejamento, sendo que a concentração celular atingiu o valor máximo após 48 horas de fermentação. Os maiores valores de concentração celular, cerca de 15 g/L, foram observados nos ensaios E2 (suplementado apenas com arginina) e no E6 (suplementado com arginina e uréia), sugerindo um efeito positivo da arginina sobre a formação de biomassa.

Para o grupo de ensaios realizados na presença de fosfato de amônio (Figura 5.1b), nota-se que o crescimento celular foi menor do que o observado no primeiro grupo de ensaios (realizados na ausência de fosfato de amônio), chegando a valores máximos de cerca de 11,0 g/L de células após 48 horas de fermentação. Nota-se ainda que nos ensaios E10 (suplementado com arginina e fosfato de amônio) e E14 (suplementado com arginina, uréia e fosfato de amônio) a levedura apresentou fase de latência de 24 horas no crescimento, atingindo concentrações celulares da ordem de 6 e 3 g/L, respectivamente após 72 horas de fermentação.

Na Figura 5.2 a e b são apresentados os perfis de consumo de açúcares para os diferentes ensaios do planejamento. Observa-se no grupo de ensaios realizado sem adição de fosfato de amônio (Figura 5.2a), que a levedura foi capaz de consumir a glicose e a xilose simultaneamente, tendo apresentado um consumo total de glicose após 24 horas. Com relação ao consumo de xilose nestes ensaios, observa-se que a levedura mostrou um consumo parcial deste açúcar, restando ainda uma concentração entre 5 e 27 g/L de xilose após 48 horas, com exceção do ensaio E6, onde o consumo de xilose foi completo neste mesmo tempo de fermentação. Com relação ao consumo de açúcares nos ensaios com adição de fosfato de amônio (E9 a E16 e ponto central), nota-se em geral que houve um completo consumo de glicose e xilose após 24 e 48 horas, respectivamente, com exceção dos ensaios E10 (arginina e fosfato de amônio) e

E14 (arginina, uréia e fosfato de amônio), os quais apresentaram um consumo reduzido de xilose, sendo que o ensaio E14 mostrou um residual de xilose em torno de 20 g/L após 72 horas. Estes resultados indicam um possível efeito de interação negativa entre arginina e fosfato de amônio na ausência de ácido glutâmico, visto que nos ensaios E12 (arginina, fosfato de amônio e ácido glutâmico) e E16 (arginina, fosfato de amônio, ácido glutâmico e ureia), ambos realizados na presença de ácido glutâmico, a levedura foi capaz de consumir totalmente a xilose após 48 horas de fermentação.

Os resultados referentes à produção de etanol (Figura 5.3), mostraram que no grupo de ensaios em que fosfato de amônio esteve ausente (E1 a E8), a máxima concentração de etanol variou de 13 a 21 g/L, enquanto que no grupo de ensaios em que fosfato de amônio esteve presente, ensaios E9 a E16 e ponto central (Figura 5.3b), a levedura apresentou as maiores concentrações de etanol, em torno de 25 a 30 g/L, após 48 horas, com exceção dos ensaios E10 e E14. De um modo geral, estes resultados demonstram uma grande contribuição da adição de fosfato de amônio sobre a produção de etanol. Dentre este grupo de ensaios, nota-se ainda que nas fermentações relativas aos ensaios do ponto central, a levedura *P. stipitis* foi capaz de produzir cerca de 26 g/L de etanol, concentração próxima à alcançada no ensaio E16 (29 g/L), sugerindo assim que menores concentrações de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio podem ter sido capazes de suprir a necessidade de fontes de nitrogênio pela levedura.

Na Figura 5.4 são mostrados os valores dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, Q_P e Q_S , obtidos nos ensaios do planejamento experimental. Observa-se que estes parâmetros foram fortemente afetados pelas fontes de nitrogênio avaliadas. Em geral os maiores valores do fator de conversão de substrato em etanol, cerca de 0,38 g/g, foram alcançadas nos ensaios em que fosfato de amônio esteve presente, como observados no ensaio E11 (suplementado com ácido glutâmico e fosfato de amônio) e ensaio E15 (suplementado com ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio). Ao contrário do observado para $Y_{P/S}$, os maiores valores de $Y_{X/S}$ (0,20 g/g) foram observados no grupo de ensaios em que fosfato de amônio esteve ausente no meio de fermentação. Tais resultados demonstram que a suplementação com fosfato de amônio foi capaz de influenciar no fluxo de carbono do metabolismo microbiano, tendo a presença desta fonte de nitrogênio favorecido a produção de etanol em detrimento do crescimento celular.

Figura 5.4 – Parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ (a), $Y_{X/S}$ (b), Q_P (c) e Q_S (d) dos ensaios do planejamento fatorial 2^4 para avaliação de arginina, ácido glutâmico, uréia e fosfato de amônio na composição do meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Com relação à produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e velocidade de consumo de substrato (Q_S), apresentados na Figura 5.4 c e d, nota-se uma grande variação dos valores de Q_P (de 0,23 a 0,61 g/L.h) e Q_S (de 0,78 e 1,62 g/L), o que demonstra considerável influência das fontes de nitrogênio avaliadas sobre tais parâmetros fermentativos. Em geral, os maiores valores de produtividade volumétrica em etanol e velocidade de consumo de substrato ocorreram nos ensaios suplementados com fosfato de amônio (E9 a E16, e ensaios do ponto central), dentre os quais destaca-se o ensaio E16, no qual estavam presentes todas as fontes de nitrogênio avaliadas, indicando assim um possível efeito combinado da associação de diferentes tipos de fontes de nitrogênio. De fato, a combinação de diferentes fontes de nitrogênio na composição do meio de fermentação tem demonstrado um forte efeito sobre a produção de etanol por *P. stipitis* como nos trabalhos de Silva et al. (2011) e Slininger et al. (2006). Silva et al. (2011) avaliaram a influência da presença de uréia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, sobre a produção de etanol a partir de xilose pela levedura *P. stipitis*. Estes autores verificaram grande influência do tipo de fontes de nitrogênio sobre a produtividade volumétrica em etanol e a velocidade de consumo de substrato. Quando empregado uréia como única fonte de nitrogênio, a levedura consumiu pobremente a xilose e praticamente não produziu etanol. No entanto, quando foi utilizado extrato de levedura como única fonte de nitrogênio, foram obtidos valores de Q_P e Q_S de cerca de 0,33 e 0,89 g/L.h, respectivamente, e com a combinação uréia e extrato de levedura na composição do meio de fermentação, a levedura apresentou valores Q_P e Q_S próximos a 0,50 e 1,38 g/L.h, respectivamente.

Slininger et al (2006), que também avaliaram fontes de nitrogênio em meio semissintético, relataram que na utilização de uréia ou aminoácidos como única fonte de nitrogênio, o acúmulo de etanol foi de 11 e 24 g/L, respectivamente, porém com a combinação destas fontes (80% de uréia e 20% de aminoácidos), a levedura foi capaz de produzir cerca de 46g/L de etanol a partir de 150 g/L de etanol após 96 horas de fermentação.

5.2.1.1 Análise Estatística do Planejamento Fatorial 2⁴ para Seleção das Fontes de Nitrogênio

Na Figura 5.5 são apresentadas na forma de gráficos de Pareto, as análises estatísticas para as respostas $Y_{P/S}$ e Q_P . Neste gráfico, as barras representam os efeitos padronizados (t calculado) relacionados às variáveis respostas. Desta forma as variáveis representadas pelas barras que ultrapassam a linha vertical (t tabelado), são consideradas estatisticamente significantes ao nível de confiança de 95 %.

Nota-se na Figura 5.5a que o efeito principal das variáveis ácido glutâmico (+16,88) e fosfato de amônio (+16,02), assim como o efeito de interação entre arginina e ácido glutâmico (+7,36) foram positivos e significativos, tendo apenas a variável arginina (-9,09) apresentado efeito principal negativo sobre o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$). Esta análise mostrou que a adição de ácido glutâmico e fosfato de amônio contribuíram para o aumento do fator de conversão de substrato em etanol. Com relação à arginina, apesar de seu efeito de interação com ácido glutâmico ter sido positivo, seu efeito principal foi negativo e com uma influência sobre $Y_{P/S}$ superior à apresentada por seu efeito de interação. Desta forma, o efeito individual da arginina prevalece sobre o efeito da interação com ácido glutâmico, sendo prejudicial para o fator de conversão de substrato em etanol. A variável uréia (C) não apresentou efeito sobre o fator de conversão de substrato em etanol ao nível de confiança de 95 %, o que significa que esta fonte de nitrogênio também não é necessária como constituinte do meio de fermentação para o processo de bioprodução de etanol por *P. stipitis* quando já existe a presença de fosfato de amônio e ácido glutâmico.

Quanto à produtividade volumétrica em etanol (Q_P) (Figura 5.5 b), nota-se que, com exceção da interação entre ácido glutâmico e uréia (BC), todas as outras variáveis estudadas bem como suas interações apresentaram efeitos significativos sobre esta resposta a um nível de 95 % de confiança. Nota-se ainda que as variáveis ácido glutâmico (B), fosfato de amônio (D), uréia (C) bem como as interações AB e BD apresentaram efeito positivo sobre Q_P , enquanto que a variável arginina (A) e as interações AD, CD e AC apresentaram efeito negativo.

Figura 5.5 – Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança e erro puro com 2 graus de liberdade ($t = 4,30$) para as variáveis respostas: fator de conversão de substrato etanol, $Y_{P/S}$ (a) e produtividade volumétrica em etanol, Q_P (b).

Da mesma forma que o observado para o $Y_{P/S}$, as variáveis fosfato de amônio (+42,87) e ácido glutâmico (+34,20) apresentaram os maiores efeitos nesta resposta, o que mostra a importância da presença destas fontes de nitrogênio para o aumento da produtividade do processo. De um modo geral, a adição de arginina contribuiu de maneira negativa para Q_P , o que se deve ao seu efeito principal (-12,55) e a seus efeitos de interação AD (-30,74) e AC (-7,36), os quais foram negativos, superando seu único efeito de interação positivo AB (+24,68).

Comportamento semelhante também foi observado para a uréia (C) que apesar de ter apresentado efeito principal positivo (+9,09), seus efeitos de interação CD (-12,55) e AC (-7,36) foram negativos. Em decorrência dos seus efeitos de interação a adição de uréia acarretou na redução da produtividade volumétrica em etanol.

As análises de variância (ANOVA) dos efeitos principais e suas interações sobre as respostas conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) estão apresentadas nas Tabelas 5.4 e 5.5, respectivamente. Nota-se na Tabela 5.4 que as variáveis ácido glutâmico (B) e fosfato de amônio (D) apresentaram significância estatística ao nível de confiança de 95 %, sendo estas capazes de explicar 35,4 e 31,9 %, respectivamente, de toda variação observada em $Y_{P/S}$. A variável arginina (A) também se mostrou significativa ($p < 0,05$), porém, como foi visto no gráfico de Pareto, o seu efeito foi negativo sobre $Y_{P/S}$. Estes resultados mostram que a conversão de xilose em etanol é aumentada na presença de ácido glutâmico e fosfato de amônio e na ausência de arginina.

Para a resposta produtividade volumétrica em etanol (Tabela 5.5), verifica-se que a variável ácido glutâmico (B) foi a que apresentou a maior contribuição (24,6 %), e que para esta resposta, a falta de ajuste do modelo também se mostrou significativa ao nível de 95 % de confiança, levando a um coeficiente de correlação muito baixo ($R^2 < 0,7$), o que provavelmente pode estar relacionado com o efeito significativo da curvatura. Nota-se que a curvatura foi significativa para as duas respostas avaliadas ($Y_{P/S}$ e Q_P), o que está relacionado a possíveis efeitos quadráticos que não puderam ser avaliados neste modelo linear.

Tabela 5.4 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados na composição do meio de fermentação para a produção de etanol por *P. stipitis*, sobre o fator de conversão de substrato (xilose e glicose) em etanol ($Y_{P/S}$).

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p	Contribuição (%)
Curvatura	0,0031	1	0,0031	94,0	0,0105	*11,7
A – Arginina	0,0028	1	0,0028	82,7	0,0119	*10,3
B - Ácido Glutâmico	0,0095	1	0,0095	285,2	0,0035	*35,4
C – Uréia	0,0003	1	0,0003	9,2	0,0938	1,1
D - Fosfato de amônio	0,0086	1	0,0086	256,7	0,0039	*31,9
AB	0,0018	1	0,0018	54,2	0,0180	6,7
AC	0,0001	1	0,0001	1,7	0,3235	0,2
AD	0,0000	1	0,0000	0,2	0,7072	0,0
BC	0,0000	1	0,0000	0,2	0,7072	0,0
BD	0,0000	1	0,0000	0,2	0,7072	0,0
CD	0,0005	1	0,0005	15,2	0,0600	1,9
Falta de Ajuste	0,0001	5	0,0000	0,8	0,6419	
Erro	0,0001	2	0,0000			
Total	0,0268	18				$R^2 = 0,98$

* Significativo a 95 % de confiança ($p < 0,05$).

Tabela 5.5 - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores avaliados na composição do meio de fermentação para a produção de etanol por *P. stipitis*, sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P).

Fatores	SQ	G.L.	MQ	F	p	Contribuição (%)
Curvatura	0,0355	1	0,0355	1065,0	0,0009	*14,2
A – Arginina	0,0053	1	0,0053	157,7	0,0063	*2,1
B - Ácido Glutâmico	0,0613	1	0,0613	1837,7	0,0005	*24,6
C – Uréia	0,0028	1	0,0028	82,7	0,0119	*1,1
D - Fosfato de amônio	0,0390	1	0,0390	1170,2	0,0009	*15,6
AB	0,0203	1	0,0203	609,2	0,0016	*8,1
AC	0,0018	1	0,0018	54,2	0,0180	*0,7
AD	0,0315	1	0,0315	945,2	0,0011	*12,6
BC	0,0000	1	0,0000	0,2	0,7072	0,0
BD	0,0150	1	0,0150	450,2	0,0022	*6,0
CD	0,0053	1	0,0053	157,7	0,0063	*2,1
Falta de Ajuste	0,0317	5	0,0063	190,1	0,0052	
Erro	0,0001	2	0,0000			
Total	0,2494	18				$R^2 = 0,67$

* Significativo a 95 % de confiança ($p < 0,05$).

Com base na análise dos gráficos de Pareto e nas Tabelas de ANOVA, as fontes de nitrogênio que apresentaram maior contribuição sobre o processo de produção de etanol por *P. stipitis* foram fosfato de amônio e ácido glutâmico. Desta forma estas fontes de nitrogênio foram selecionadas para a otimização de seus níveis de concentrações no estudo a seguir.

5.2.2 Otimização dos Níveis de Fosfato de Amônio e Ácido Glutâmico Através de Planejamento Fatorial 2^2 com Face Centrada

Com o objetivo de otimizar os níveis de concentração de ácido glutâmico e fosfato de amônio, selecionados na etapa anterior como as fontes de nitrogênio de maior influência sobre a produção de etanol por *P. stipitis*, utilizou-se um planejamento completo 2^2 com face centrada variando os níveis destes componentes de 3 a 9 g/L, conforme mostrado na Tabela 5.6. Nesta Tabela estão apresentados os resultados referentes ao consumo de substrato (xilose e glicose), produção de etanol e os parâmetros fermentativos. Nota-se que o consumo de substrato foi superior a 90 % após 34 horas de fermentação em todos os ensaios, e que apesar da grande variação nas concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio avaliadas através do planejamento (3,0 a 9,0 g/L), houve pequena variação nas concentrações de etanol obtida (23,0 a 25,9 g/L) assim como nos valores dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ (de 0,34 a 0,38 g/g), $Y_{X/S}$ (de 0,08 a 0,12 g/g), Q_P (de 0,68 a 0,76 g/L.h) e Q_S (de 1,9 a 2,1 g/L.h). Esta pequena variação observada nos resultados, mesmo quando empregadas diferentes concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio, pode indicar que a adição destas fontes de nitrogênio nos níveis mais baixos do planejamento pode ter sido suficiente para suprir a necessidade da levedura, não havendo, portanto, ganho considerável quando empregadas maiores concentrações de tais nutrientes.

Desta forma, a pequena variação observada nos resultados do planejamento pode ser atribuída à utilização de concentrações de nitrogênio muito acima da mínima necessária. É importante salientar que na análise estatística do planejamento as variáveis analisadas não apresentaram significância, sendo obtidos baixos valores de correlação ($R^2 < 0,79$, dados não mostrados) para todas as respostas avaliadas, o que pode ser atribuído a pouca variação

Tabela 5.6 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^2 , para otimização das concentrações de ácido glutâmico e fosfato de amônio em meio semissintético para a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

Ensaio	Variáveis		Consumo de substrato (%)	Etanol (g/L)	Parâmetros			
	Ácido Glutâmico (g/L)	(NH ₄) ₂ HPO ₄ (g/L)			Y _{P/S} (g/g)	Y _{X/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	Q _S (g/L.h)
1	3,0 (-1)	3,0 (-1)	97,0	24,0	0,36	0,12	0,71	1,98
2	3,0 (-1)	9,0 (+1)	100,0	25,0	0,35	0,08	0,74	2,13
3	9,0 (+1)	3,0 (-1)	100,0	25,3	0,38	0,10	0,75	1,97
4	9,0 (+1)	9,0 (+1)	91,8	23,8	0,37	0,08	0,70	1,90
5	3,0 (-1)	6,0 (0)	100,0	23,0	0,35	0,10	0,68	2,00
6	9,0 (+1)	6,0 (0)	97,8	23,9	0,34	0,09	0,70	2,06
7	6,0 (0)	3,0 (-1)	100,0	25,9	0,36	0,11	0,76	2,11
8	6,0 (0)	9,0 (+1)	100,0	24,9	0,38	0,09	0,73	2,00
9	6,0 (0)	6,0 (0)	96,5	25,4	0,38	0,11	0,75	1,99
10	6,0 (0)	6,0 (0)	96,4	24,0	0,35	0,10	0,70	2,01
11	6,0 (0)	6,0 (0)	96,6	23,9	0,34	0,10	0,70	2,03

Resultados calculados para o tempo de fermentação de 34 horas em todos os ensaios.

observada para tais respostas nos diferentes ensaios do planejamento.

O comportamento observado nos perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol pela levedura *P. stipitis* (Figura 5.6) foram muito semelhantes para os diferentes ensaios do planejamento experimental. Nota-se que a levedura *P. stipitis* apresentou crescimento celular em torno de 6 a 9 g/L após 34 horas de fermentação. A variação observada na concentração celular pode estar relacionada com a floculação da levedura, observada em praticamente todos os ensaios, o que pode ter interferido na determinação da concentração celular.

Ainda na Figura 5.6, com relação ao consumo de açúcares, observa-se que a levedura *P. stipitis* foi capaz de consumir totalmente a glicose após 24 horas, tendo uma concomitante assimilação da xilose, a qual foi totalmente consumida após 34 horas de fermentação, tendo sido observado após este mesmo período a máxima concentração de etanol alcançada nos ensaios do planejamento, cerca de 25 g/L. A pouca variação de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol ocorridos em função da variação das fontes de nitrogênio segundo as condições dos diferentes ensaios do planejamento experimental, demonstram que a suplementação do meio semissintético com ácido glutâmico e fosfato de amônio nas concentrações empregadas no nível inferior de concentração (3 g/L), foram suficientes para suprir a necessidade da levedura, sendo, portanto, a melhor condição dentre a faixa de variação estudada.

Tendo em vista que em todos os ensaios anteriores de seleção e otimização de fontes de nitrogênio para a produção de etanol por *P. stipitis* o meio padrão continha extrato de levedura (3,0 g/L), novos ensaios foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito do extrato de levedura em combinação com as fontes de nitrogênio que apresentaram os melhores resultados nas etapas anteriores. Desta forma foram realizadas fermentações em meios constituídos de (g/L): ensaio A: ácido glutâmico (3) e fosfato de amônio (3), ensaio B: extrato de levedura (3) e ensaio C: ácido glutâmico (3), fosfato de amônio (3) e extrato de levedura (3), além da presença 1 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em todos os ensaios (Figura 5.7).

Figura 5.6 – Crescimento celular (a), consumo de xilose (●) e glicose (▲) (b) e produção de etanol (c) dos ensaios de otimização dos níveis de concentração de ácido glutâmico e fosfato de amônio para . P.C. (ponto central) em meio semissintético por *P. stipitis*.

Figura 5.7 – Crescimento celular (a), consumo de xilose (b) e produção de etanol (c) dos ensaios realizados em meio semissintético pela levedura *P. stipitis* para avaliação de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio.

Observa-se na Figura 5.7, que no ensaio A, constituído por ácido glutâmico e fosfato de amônio, a levedura apresentou o menor crescimento celular dentre as condições avaliadas, chegando a uma concentração de cerca de 2 g/L de células, com um consumo de xilose de cerca de 34% e uma produção de 8,5 g/L de etanol após 48 horas de fermentação. Com relação ao ensaio B, o qual foi realizado apenas com extrato de levedura como fonte de nitrogênio, o crescimento celular chegou próximo a 8 g/L, tendo consumido cerca de 50% de xilose, alcançando uma produção de etanol de 15 g/L, muito superior ao observado no ensaio A. Em relação ao ensaio C, realizado na presença das três fontes de nitrogênio (ácido glutâmico, fosfato de amônio e extrato de levedura), nota-se que este ensaio apresentou os melhores resultados, tendo em vista que em tais condições, a levedura *P. stipitis* alcançou uma concentração de 9 g/L de células, com um consumo total da xilose e produção de 25 g/L etanol de após 34 horas de fermentação.

No presente trabalho foi constatado que a adição de ácido glutâmico e fosfato de amônio juntamente com extrato de levedura apresentaram uma grande contribuição para a produção de etanol por *P. stipitis*, o que torna importante a avaliação da suplementação do hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz com tais nutrientes.

5.2.3 Efeito da Suplementação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz com Fontes de Nitrogênio Previamente Selecionadas em Meio Semissintético

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz além de ser uma importante fonte de carbono também contém vários nutrientes incluindo fontes de nitrogênio e minerais, necessários ao metabolismo celular. Além disso, o custo do meio de fermentação é um dos principais fatores para determinar a viabilidade econômica de um processo de produção de etanol a partir de hidrolisados, sendo muito importante o estabelecimento de um meio de baixo custo capaz de suprir todas as necessidades nutricionais da levedura, garantindo um bom desempenho no processo fermentativo (AMARTEY; JEFFRIES, 1994). Sendo assim, para a utilização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz como meio de fermentação é importante determinar sua necessidade mínima de suplementação com nutrientes.

Com o objetivo de verificar a influência da suplementação do hidrolisado hemicelulósico com ácido glutâmico, fosfato de amônio e extrato de levedura, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 completo, com três repetições no ponto central. Em todos os ensaios do planejamento o hidrolisado hemicelulósico foi adicionado de sulfato de magnésio, exceto no ensaio de referência realizado com hidrolisado sem qualquer suplementação (HNS), conforme apresentado na Tabela 5.7. Nesta Tabela também são mostrados os resultados referentes ao consumo de substrato (xilose e glicose) e a produção de etanol por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico nas diferentes condições de suplementação avaliadas.

Nota-se que quando o hidrolisado foi suplementado com ácido glutâmico, independente da adição de outros nutrientes, a levedura foi incapaz de consumir xilose e, conseqüentemente, produzir etanol (ensaios E3, E4, E7, E8 e ponto central), indicando uma influência negativa desta fonte de nitrogênio. Esta influência pode ser resultante de interações entre ácido glutâmico e alguns dos constituintes presentes no hidrolisado, visto que em meio semissintético a adição desta fonte de nitrogênio favoreceu o processo fermentativo.

Ainda na Tabela 5.7, nota-se que os ensaios realizados na ausência de ácido glutâmico (E1, E2, E5 E6 e ponto central), mostraram pouca variação nos resultados de consumo de substrato (66,8 a 77,8%), produção de etanol (21,2 a

Tabela 5.7 – Matriz experimental do planejamento fatorial 2^3 para avaliação do efeito do extrato de levedura (E.L.), ácido glutâmico (A.G.) e fosfato de amônio (F.A) sobre fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *P. stipitis* adicionado de 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado.

Ensaio	Variáveis			Consumo de substrato (%)	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Q_S (g/L.h)	C:N
	E.L. (g/L)	A.G. (g/L)	F.A. (g/L)							
1	0,0	0,0	0,0	69,1	23,4	0,43	0,25	0,19	0,49	19,1
2	3,0	0,0	0,0	66,8	22,7	0,42	0,25	0,19	0,46	16,4
3	0,0	3,0	0,0	1,6	0,6	0	0	0	0,01	16,4
4	3,0	3,0	0,0	3,0	0,9	0	0	0	0,02	14,3
5	0,0	0,0	3,0	77,8	23,6	0,39	0,18	0,20	0,52	13,9
6	3,0	0,0	3,0	70,9	21,2	0,36	0,18	0,18	0,49	12,4
7	0,0	3,0	3,0	4,9	0,5	0	0	0	0,03	12,4
8	3,0	3,0	3,0	2,4	0	0	0	0	0,02	11,2
9	1,5	1,5	1,5	2,6	0	0	0	0	0,02	14,1
10	1,5	1,5	1,5	0,6	1,1	0	0	0	0	14,1
HNS	-	-	-	73,0	22,6	0,37	0,14	0,23	0,62	19,1

Substrato: xilose e glicose; Resultados calculados para o tempo de 120 horas para os ensaios E1 a E10 e 96 horas para o ensaio HNS (hidrolisado não suplementado).

23,6 g/L), bem como nos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ (0,36 a 0,42 g/g), $Y_{X/S}$ (0,18 a 0,23 g/g), Q_P (0,18 a 0,20 g/L.h) e Q_S (0,46 a 0,52 g/L.h). Tais semelhanças de resultados indicam que a adição de extrato de levedura e fosfato de amônio não apresentou influência sobre o processo fermentativo. Vale ressaltar que o ensaio empregando hidrolisado sem qualquer suplementação de nutrientes (HNS) apresentou um consumo de substrato, produção de etanol e parâmetros fermentativos muito similares aos observados nos ensaios suplementados com as fontes de nitrogênio avaliadas no presente trabalho. Desta forma, é possível afirmar que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz é também uma fonte de nutrientes, dispensando a suplementação para seu uso como meio de cultura para o processo de produção de etanol pela levedura *P. stipitis*. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Mussatto e Roberto (2005), que avaliaram a necessidade de suplementação nutricional de um hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Estes autores avaliaram a influência da adição de sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio, e verificaram que mesmo para aplicações como meio de fermentação o referido hidrolisado dispensou a adição de nutrientes, sendo este capaz de suprir as necessidades nutricionais da levedura.

Nas Figuras 5.8 e 5.9 estão mostrados os perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol dos ensaios do planejamento e do ensaio de referência não suplementado (HNS). Com relação ao perfil de consumo de açúcares, (Figura 5.8), nota-se que no ensaio HNS a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose após 12 horas de fermentação. Verifica-se que nos meios suplementados com fosfato de amônio (ensaios E5 e E6) o consumo completo de glicose ocorreu somente após 48 horas, enquanto que os ensaios E1 e E2, os quais foram realizados na ausência de fosfato de amônio apresentaram o completo consumo deste açúcar somente após 72 horas. Além disso, os demais ensaios suplementados com ácido glutâmico, E3, E4, E7, E8 e ponto central, não apresentaram consumo deste açúcar, indicando uma possível inibição causada por esta fonte de nutriente. Quanto ao consumo de xilose, observa-se também que o ensaio HNS apresentou o maior consumo desta pentose, próximo a 90% após 120 horas, enquanto que em todos os outros ensaios suplementados, os consumos de açúcares mostraram-se mais lentos. De forma semelhante ao

Figura 5.8 – Consumo de glicose (a) e consumo de xilose (b) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da adição de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol por *P. stipitis*.

Figura 5.9 – Crescimento celular (a) e produção de etanol (b) dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da adição de extrato de levedura, ácido glutâmico e fosfato de amônio em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de etanol por *P. stipitis*.

observado no consumo de glicose, os ensaios E1, E2, E5 e E6 mostraram consumos de xilose mais lentos que observado para a fermentação do HNS, os quais foram da ordem de 60 a 70% de consumo após 120 horas, enquanto que os ensaios realizados na presença de ácido glutâmico também não apresentaram consumo deste açúcar.

Nota-se na Figura 5.9, que a levedura *P. stipitis* apresentou um crescimento em torno de 16 g/L nos ensaios E1, E2, E5 e E6, enquanto que os nas fermentações de hidrolisado suplementado com ácido glutâmico (E3, E4, E7, E8 e ponto central) o crescimento celular foi fortemente inibido por esta fonte de nitrogênio. Mesmo tendo apresentado os maiores consumos de açúcares, na fermentação do HNS, o crescimento celular foi inferior aos ocorridos nos ensaios E1, E2, E5 e E6, chegando próximo a 10 g/L após 120 horas. Nota-se ainda que, dentre as fermentações realizados na ausência de ácido glutâmico, apenas os ensaios em que fosfato de amônio foi adicionado (E5 e E6) não apresentaram fase de latência. E que apesar da fase de latência de 36 horas ocorrida nos ensaios E1 e E2, estes alcançaram, após 120 horas, concentrações celulares que próximas as observadas nos ensaios E5 e E6.

Os resultados referentes à produção de etanol (Figura 5.9 d) mostram que a levedura *P. stipitis* atingiu a máxima produção (cerca de 23 g/L) no ensaio HNS após 96 horas de fermentação, enquanto que nos ensaios E1, E2, E5 e E6 a levedura foi capaz de alcançar concentrações de etanol bastante próximas a do hidrolisado não suplementado, porém em um tempo maior de fermentação, ou seja, após 120 horas.

A influência da suplementação do hidrolisado com diferentes fontes de nitrogênio sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$, e Q_P foi avaliada através de ferramentas estatísticas, conforme apresentado nos gráficos de Pareto na Figura 5.10. Nesta análise foi possível confirmar que apenas o ácido glutâmico teve efeito estatisticamente significativo sobre $Y_{P/S}$ e Q_P na fermentação por *P. stipitis*, ou seja, a adição desta fonte de nitrogênio ao hidrolisado hemicelulósico inibiu fortemente o crescimento de *P. stipitis* prejudicando os parâmetros fermentativos.

Figura 5.10 – Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança para as variáveis respostas: ($Y_{P/S}$) fator de conversão de substrato em produto e (Q_P) produtividade volumétrica em etanol. Variáveis: A = Extrato de levedura; B = Ácido glutâmico; C = Fosfato de amônio.

De um modo geral, os resultados obtidos no presente estudo de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz contendo 70 g/L de xilose, demonstram que a levedura *P. stipitis* foi capaz de obter bons resultados de crescimento celular (9 g/L), consumo de xilose (75%) e produção de etanol (22 g/L) após 96 horas de fermentação, apresentando uma conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em etanol de 0,37 g/g e 0,23 g/L.h, respectivamente, dispensando a necessidade de suplementação nutricional para alcançar tais resultados. Desta forma, o hidrolisado hemicelulósico, além de ser uma fonte de carbono, é também rico em micronutrientes (magnésio, zinco, manganês, cálcio, potássio e fosfato) e fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, conforme constado no Item 5.1 do presente trabalho. Desta forma, o emprego do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz como substrato no processo de produção de etanol dispensou a necessidade de suplementação nutricional.

5.3 ESTRATÉGIAS DE ACLIMATAÇÃO DA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ

Visando aumentar a capacidade fermentativa da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com maiores quantidades de compostos inibidores, a levedura foi submetida a diferentes estratégias de aclimação (A, B, C, D e E), as quais, de um modo geral, consistiram em transferências sucessivas do microrganismo para meios com proporções de hidrolisado de 60 e 75 % (v/v), correspondendo a 70 e 90 g/L de xilose, respectivamente. Para a seleção de leveduras mais adaptadas, colônias foram isoladas de diferentes estratégias de aclimação e testadas quanto a sua capacidade de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz contendo xilose nas concentrações entre 70 e 90 g/L.

5.3.1 Perfil dos Cultivos Durante a Estratégia de Aclimação “A”

Nesta etapa, a levedura *Pichia stipitis* foi submetida ao processo de transferência sucessiva para meios contendo hidrolisado em concentrações crescentes, conforme descrito na Figura 4.1 do item 4.5.1. Para esta finalidade, após 48 horas de cultivo em meio constituído de hidrolisado a uma proporção de 45% (v/v), as células foram transferidas para meio constituído de hidrolisado a 60% (v/v) e após 72 horas para meio constituído de hidrolisado a 75% (v/v).

A Figura 5.11 apresenta os perfis de consumo dos açúcares (xilose e glicose), crescimento celular e produção de etanol durante as transferências sucessivas em concentrações crescentes de hidrolisado. Nota-se nesta Figura que durante a fermentação 1A a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose e a xilose após 12 e 48 horas, respectivamente, tendo alcançado cerca de 26 g/L de etanol e 10 g/L de células após 48 horas. Nota-se que quando as células deste cultivo foram transferidas para meio contendo hidrolisado a 60% (v/v) o consumo dos açúcares foi mais lento, visto que a glicose foi totalmente consumida somente após 48 horas e a xilose apresentou um consumo incompleto, restando ainda cerca de 55% deste açúcar após 72 horas de fermentação. Observa-se ainda, que mesmo com a transferência de células para

Figura 5.11 – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.

o meio mais concentrado, 60% (v/v), a levedura apresentou crescimento celular muito próximo ao obtido na fermentação 1A. Já com relação à produção máxima de etanol, foi observada uma redução de 27% quando comparada com a fermentação 1A.

Ainda em relação à Figura 5.11, observa-se que na segunda transferência de células para meio contendo hidrolisado a 75% (v/v), a levedura consumiu pobremente os açúcares (26 e 5,5% de consumo de glicose e xilose, respectivamente) e, praticamente não produziu etanol (< 2 g/L) durante as 120 horas de fermentação. De um modo geral, verifica-se que em concentrações superiores a 70 g/L de xilose no hidrolisado, a levedura *P. stipitis* não foi capaz de fermentar devido às condições de *stress* do meio de fermentação, que neste caso pode estar relacionada a condições como a presença de inibidores no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado ou até mesmo a elevada pressão osmótica do meio. De fato, Silva, Mussatto e Roberto (2009), que estudaram a produção de etanol por *P. stipitis* empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado, constataram que em concentrações de xilose acima de 47 g/L não foram observados produção de etanol, o que foi atribuído a uma inibição do metabolismo da levedura pela presença de compostos tóxicos no hidrolisado mesmo após a remoção de grande parte destes compostos através de tratamento com carvão ativado.

Na Tabela 5.8 estão apresentados os parâmetros dos ensaios fermentativos da levedura *P. stipitis* durante as transferências sucessivas de células. Nota-se que o aumento na concentração de hidrolisado decorrente da transferência H₄₅ para H₆₀ promoveu pouco impacto sobre o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$), ou seja, decresceu de 0,47 para 0,41 g/g, respectivamente, o que representa uma redução de apenas 13% para este parâmetro. Ao contrário do observado para o $Y_{P/S}$, a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) decresceu de 0,55 para 0,26 g/L.h, mostrando uma redução de 53% com o aumento da concentração de hidrolisado de H₄₅ para H₆₀. De fato, alguns trabalhos da literatura mencionam que a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) é mais afetada pela presença de inibidores do que o fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) (LARSSON et al., 1999; VAN ZYL, PRIOR, DU PREEZ, 1988). No trabalho de Van Zyl, Prior e du Preez (1988), foi avaliado o efeito de diferentes compostos inibidores sobre a produção de etanol por *P.*

Tabela 5.8 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.

Parâmetros	Fermentação 1A	1ª Transferência	2ª Transferência	*Referência
Proporção de hidrolisado % (v/v)	45	60	75	75
Xilose inicial (g/L)	50,0	70,3	85,2	84,0
Glicose inicial (g/L)	9,2	12,5	15,1	14,2
Arabinose inicial (g/L)	8,7	12,2	14,5	14,8
Consumo de xilose (%)	93,8	47,3	5,5	3,6
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0	26,5	12,0
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0
Células inicial (g/L)	1,8	1,7	1,7	1,9
Células final (g/L)	9,4	6,9	3,7	3,6
Etanol (g/L)	26,4	18,6	1,5	1,4
Tempo (h)	48	72	120	120
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,47	0,41	0,14	0,27
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,15	0,16	0,18	0,38
Q_P (g/L.h)	0,55	0,26	0,013	0,010
Q_S (g/L.h)	1,17	0,64	0,07	0,04

*Ensaio realizado sem transferência sucessiva de células.

stipitis em meio semissintético constituído de 50 g/L de xilose. Estes autores constataram que apesar do valor do fator de conversão de substrato em etanol (0,42 g/g) obtido nas fermentações na presença e ausência de compostos derivados de lignina (0,4 g/L de ácido p-cumárico e 0,6 g/L de ácido vanílico, vanilina e ácido ferúlico) ter sido o mesmo, a produtividade volumétrica em etanol diminuiu de 0,50 para 0,26 g/L.h, ou seja, cerca de 48% de redução em Q_P , demonstrando que a presença de compostos inibidores tem uma influência maior sobre o parâmetro produtividade volumétrica do que sobre o fator de conversão de substrato em produto. Esta influência pode estar relacionada à aclimação da levedura, visto que a ocorrência de fase de latência em situações de *stress* é atribuída ao período de aclimação, o que leva à diminuição da velocidade de formação do produto.

A produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes biomassas, com concentrações de xilose em torno de 50 g/L tem sido reportada por vários autores (ZHU et al., 2010; WHITE, YOHANNAN, WALKER, 2008). Empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de milho não destoxificado contendo 52,8 g/L de xilose e 7,8 g/L de glicose, Zhu et al. (2010) constataram uma baixa produção de etanol (3,8 g/L) pela levedura *Pichia stipitis*, com Q_P e $Y_{P/S}$ de 0,12 g/L.h e 0,23 g/g, respectivamente, o que foi atribuído à presença de inibidores, tais como ácido acético (3,74 g/L), ácido fórmico (0,31 g/L), furfural (0,03 g/L) e hidroximetilfurfural (0,14 g/L) presentes no hidrolisado não destoxificado. Em trabalho semelhante, White, Yohannan e Walker (2008), empregaram hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, também não destoxificado, com concentração de cerca de 55 g/L de xilose. No referido trabalho a levedura *P. stipitis* foi capaz de produzir cerca de 8,3 g/L de etanol obtendo valores de Q_P e $Y_{P/S}$ de 0,17 g/L.h e 0,32 g/g, respectivamente. Comparando os dados da literatura aos resultados obtidos no presente estudo, nota-se que os valores de Q_P , $Y_{P/S}$ e concentração de etanol (0,55 g/L.h, 0,47 g/g e 26,4 g/L, respectivamente), alcançados na fermentação A1, foram superiores aos normalmente encontrados que utilizam a levedura *P. stipitis* para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos.

Para avaliar o nível de aclimação no hidrolisado a 75% (v/v), um ensaio fermentativo com a levedura *P. stipitis* foi realizado sem transferência sucessiva

de células, o qual foi denominado de ensaio referência (Tabela 5.8). Comparando a segunda transferência de células ao ensaio de referência observa-se que o consumo de xilose e a produção de etanol foram muito semelhantes, o que indica que mesmo com duas transferências sucessivas de células, a levedura não foi capaz de superar a toxicidade quando cultivada em hidrolisado com concentração de xilose superior a 85 g/L de xilose.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que o processo de transferência de células para meios contendo hidrolisado a 60 e 75% (v/v) afetou fortemente a capacidade da levedura em consumir açúcares e produzir etanol, o que está provavelmente relacionado ao consequente aumento na concentração de inibidores e pressão osmótica do meio de fermentação. No entanto, vale ressaltar que a levedura *P. stipitis* foi capaz de mostrar bons resultados em fermentação contendo hidrolisado a 45% (v/v) não destoxificado, os quais se apresentaram superiores aos encontrados na literatura.

5.3.1.1 Fermentabilidade das Colônias de *Pichia stipitis* Isoladas Durante a Estratégia de Aclimação “A”

Durante a estratégia de aclimação A foram isoladas seis colônias da levedura *Pichia stipitis* provenientes das transferências sucessivas de células, conforme está mostrado na Figura 4.1 do Item 4.5.1. Nesta etapa as colônias foram isoladas em meio sólido constituído de hidrolisado a 25% (v/v), uma vez que a levedura não apresentou crescimento em meio sólido com concentrações superiores de hidrolisado. Para comparação do desempenho das colônias isoladas foram realizados ensaios fermentativos em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 60% (v/v), tendo em vista que esta foi a maior proporção que promoveu crescimento da levedura durante as transferências sucessivas em meio líquido.

Na Tabela 5.9 são mostrados os parâmetros fermentativos do cultivo das colônias isoladas e do ensaio de referência realizado com a cepa original de *P. stipitis*. Nota-se que os valores dos parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P variaram de 0,31 a 0,38 g/g e 0,17 a 0,23 g/L.h, respectivamente, tendo a cepa A₇₅₋₂ apresentado os maiores valores destes parâmetros ($Y_{P/S} = 0,38$ g/g e $Q_P = 0,23$ g/L.h). Quando comparado ao ensaio de referência, o qual foi realizado

Tabela 5.9 – Parâmetros fermentativos do cultivo das colônias de *Pichia stipitis* isoladas durante as diferentes transferências da estratégia de aclimação A, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Parâmetros	Colônias isoladas						Cepa original
	A ₆₀ -1	A ₆₀ -2	A ₆₀ -3	A ₇₅ -1	*A ₇₅ -2	A ₇₅ -3	
Proporção de hidrolisado % (v/v)	60	60	60	60	60	60	60
Xilose inicial (g/L)	69,0	69,0	70,3	69,3	71,1	68,5	66,7
Glicose inicial (g/L)	12,4	12,5	12,7	12,3	12,9	11,8	11,7
Arabinose inicial (g/L)	12,8	12,9	12,8	13,1	13,0	12,4	12,5
Consumo de xilose (%)	82,1	86,7	85,3	86,0	90,1	82,3	87,2
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0	0	0	0
Células inicial (g/L)	1,1	1,0	1,1	1,8	1,3	1,2	1,3
Células final (g/L)	8,0	8,2	8,3	9,7	9,5	9,1	9,0
Etanol (g/L)	20,8	20,7	21,4	24,4	28,1	23,5	22,0
Tempo (h)	120	120	120	120	120	120	120
Y _{P/S} (g/g)	0,32	0,31	0,31	0,35	0,38	0,34	0,32
Y _{X/S} (g/g)	0,11	0,10	0,10	0,11	0,10	0,10	0,11
Q _P (g/L.h)	0,17	0,17	0,18	0,20	0,23	0,20	0,18
Q _S (g/L.h)	0,58	0,60	0,61	0,60	0,64	0,57	0,58

*Significativo a 90% de confiança (teste *t*).

com a cepa original de *P. stipitis*, o aumento de $Y_{P/S}$ e Q_P proporcionado pela cepa A₇₅-2 foi de 19 e 28%, respectivamente

Para verificar a significância estatística das diferenças entre os valores dos parâmetros fermentativos apresentados pelos ensaios com as colônias isoladas, foi realizado o teste *t* de Student. Esta análise mostrou que somente a levedura A₇₅-2 apresentou o valor de *t* calculado (2,26) superior ao valor de *t* tabelado (1,9), para distribuição de Student a 90% de confiança com 7 graus de liberdade. Desta forma somente a levedura A₇₅-2 apresentou uma produção de etanol estatisticamente superior às apresentadas pelas demais cepas isoladas e a cepa original.

Na Figura 5.12 estão apresentados os perfis de consumo de substrato, produção de etanol e crescimento celular empregando a levedura A₇₅-2 e a cepa original de *P. stipitis*. Nota-se que a levedura isolada consumiu mais rapidamente a glicose do que a cepa original. Enquanto a levedura isolada consumiu totalmente este açúcar após 24 horas, neste mesmo período a cepa original mostrou um consumo de apenas 50%. Com relação ao consumo de xilose observa-se um comportamento similar para ambas as leveduras, visto que tanto a isolada quanto a original consumiram cerca de 90% de xilose após 120 horas. Com relação ao crescimento celular, o perfil de ambas as leveduras foi também bastante semelhante, chegando a uma concentração de células próximo a 9 g/L. Apesar do perfil de consumo e crescimento celular terem se mostrado similar, a produção de etanol no ensaio realizado com a levedura isolada A₇₅-2 apresentou maiores concentrações no decorrer da fermentação, chegando a um valor próximo a 28 g/L, o qual foi cerca de 30% superior ao observado para a cepa original.

O emprego de estratégias de aclimação através de transferências sucessivas e o isolamento de leveduras visando melhorar a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* tem sido reportado por vários autores na literatura. Nigam (2001c) avaliou a produção de etanol por uma cepa de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 adaptada em hidrolisado de palha de trigo não destoxificado contendo 45 g/L de xilose. Segundo este autor foi obtido aumento de 35 e 140% no fator de conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em etanol, respectivamente, quando comparado com a cepa original. No referido trabalho a aclimação foi realizada por três transferências sucessivas de células para meios

Figura 5.12 - Consumo de xilose e glicose (a), produção de etanol (b) e crescimento celular (c) dos cultivos da levedura isolada A₇₅-2 e cepa original de *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 60% (v/v).

contendo concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico, além de 39 repiques consecutivos em meio sólido contendo hidrolisado a 50% (v/v).

Em outro trabalho, Nigam (2001a), comparou a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 e uma cepa adaptada em hidrolisado hemicelulósico de madeira não destoxificado, constituído de (g/L): xilose (40,2), glicose (5,4), arabinose (21,0) e manose (9,0). A levedura adaptada foi isolada após três transferências sucessivas para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado até a proporção de 80% (v/v), correspondente a 32 g/L de xilose. Na fermentação do hidrolisado não destoxificado, a levedura adaptada foi capaz de produzir 6,7 g/L de etanol com uma produtividade de 0,07 g/L.h e um fator de conversão de substrato em produto de 0,28 g/g. Estes resultados mostraram que a fermentação com a cepa adaptada proporcionou um aumento de cerca de 600% na produtividade volumétrica em etanol, duplicando o fator de conversão de substrato em produto. Apesar do considerável aumento percentual nos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P reportados por Nigam 2001 a e b com a levedura *P. stipitis* adaptada, os valores destes parâmetros ainda foram inferiores aos obtidos com a levedura A₇₅-2 isolada no presente trabalho ($Y_{P/S} = 0,38$ e $Q_P = 0,23$ g/L.h). Outro ponto relevante refere-se ao fato de que a concentração de xilose do hidrolisado utilizada no presente estudo (cerca de 70 g/L), foi muito superior às utilizadas nos trabalhos de Nigam, que utilizou concentrações em torno de 40 g/L de xilose. Além disso, é importante salientar que a cepa A₇₅-2 foi isolada após duas transferências sucessivas para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado e apenas um único repique em meio sólido, reduzindo a necessidade de longas etapas de transferências e repiques sucessivos de células.

Embora a levedura tenha apresentado perda da capacidade fermentativa no decorrer das transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A, foi possível isolar uma levedura mais tolerante ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, visto que foram observados aumento nos valores dos parâmetros fermentativos, como Q_P e $Y_{P/S}$, assim como na máxima concentração de etanol alcançada, em relação à cepa de *P. stipitis* não adaptada nas fermentações realizadas em hidrolisado a 60% (v/v).

Apesar do baixo consumo de açúcares e pouco crescimento celular em hidrolisado a 75% (v/v), a levedura isolada (A₇₅-2) nesta concentração de hidrolisado foi a que demonstrou maior capacidade de crescimento, consumo de

substrato e produção de etanol quando comparada à cepa original de *P. stipitis*. De um modo geral, os resultados da estratégia de aclimação A demonstraram que o emprego de cepas aclimatadas é capaz de contribuir para o aumento da tolerância da levedura *P. stipitis* ao efeito inibidor de compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

5.3.2 Perfil dos Cultivos Durante as Estratégias de Aclimação “B” e “C”

De modo semelhante à estratégia A, nas estratégias de aclimação B e C, as células foram sucessivamente transferidas para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado até 75% (v/v), porém, a partir deste cultivo, as células foram submetidas a mais quatro transferências sucessivas mantendo a proporção de 75% (v/v) de hidrolisado, conforme mostrado na Figura 4.3 do Item 4.5.2. Para a chamada estratégia B, a quantidade de células transferidas esteve entre 3,0 g/L, enquanto que na estratégia C, a concentração de células transferidas foi aumentada para cerca de 14,0 g/L.

Na Figura 5.13 estão apresentados os perfis de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular das transferências H₄₅, H₆₀ e H₇₅, as quais foram realizadas de maneira semelhante à estratégia de aclimação A. Nesta Figura estão apresentados ainda os perfis relativos às quatro transferências sucessivas em meio contendo hidrolisado a 75% (v/v), referentes à estratégia de aclimação B. Nota-se nesta Figura que os perfis de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular das transferências H₄₅ e H₆₀ foram muito semelhantes aos resultados obtidos na estratégia de aclimação A, porém quando as células foram transferidas para o meio H₇₅ a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose após 120 horas, apresentando um baixo consumo de xilose (cerca de 6%), resultando em uma concentração de cerca de 8 g/L de etanol e células. Verifica-se ainda que na primeira transferência da estratégia B, a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose após 72 horas com um consumo maior de xilose (17%) após 120 horas. Neste tempo, a produção de etanol atingiu 12 g/L, enquanto que a concentração celular atingiu o valor de 10 g/L. Já na segunda transferência, nota-se que a produção de etanol e o crescimento celular mostraram resultados bastante semelhantes aos obtidos na

Figura 5.13 – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação B.

primeira transferência, até o tempo de 120 horas. Entretanto, com o maior tempo de fermentação (264 horas), ocorreu um maior consumo de xilose (cerca de 65%) e um crescimento celular de cerca de 15 g/L. Apesar do maior consumo deste açúcar não foi observado aumento na produção de etanol, a qual foi próxima à observada na primeira transferência, ou seja, uma concentração máxima de cerca de 15 g/L após 216 horas. Nota-se ainda nesta transferência que a levedura assimilou parte do etanol produzido (cerca de 5 g/L), após 216 horas, mesmo na presença de xilose no meio de fermentação. A assimilação do etanol pela levedura *P. stipitis* mesmo na presença de xilose foi também observada nos trabalhos de Silva, Mussatto e Roberto (2009) e Skoog et al. (2009), que avaliaram a produção de etanol por *P. stipitis* a partir de xilose em meio semissintético em diferentes condições de oxigenação do meio. Estes autores observaram o consumo de etanol mesmo na presença de xilose quando empregadas condições de maior aeração, sendo a reassimilação de etanol favorecida por condições de maior disponibilidade de oxigênio. Skoog et al. (1992) também verificaram a reassimilação do etanol através da formação de acetaldeído, uma vez que o etanol é primeiro oxidado à acetaldeído e então a acetato, tanto a reassimilação do etanol quanto a formação do acetato estão relacionados a variações no equilíbrio redox das células. De acordo com a literatura, a presença de compostos tóxicos e elevada pressão osmótica do meio de fermentação também podem levar a um desequilíbrio redox das células (JEFFRIES; VAN VLEET, 2009; KEATING et al., 2004). Desta forma, no presente trabalho a reassimilação do etanol pode estar relacionada à presença de inibidores no hidrolisado hemicelulósico, tendo em vista que a levedura não foi capaz de superar os possíveis problemas relativos ao desequilíbrio redox.

Com relação a terceira e quarta transferências de células, observa-se que a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose, tendo alcançado a máxima produção de etanol (9 e 4 g/L, respectivamente) após 72 horas. Nota-se ainda que após este período, além do consumo de xilose o etanol foi reassimilado pela levedura, a qual atingiu uma concentração celular em torno de 15 e 11 g/L na terceira e quarta transferências, respectivamente.

Ao contrário do esperado, a estratégia de aclimação B mostrou que o aumento do número de transferências não proporcionou aumento na capacidade da levedura em consumir açúcares e produzir etanol. De fato, segundo Keating,

Panganiban e Mansfield (2005), ao longo do processo de aclimação, com a realização de várias transferências sucessivas de células, a exposição aos inibidores presentes no meio pode em alguns casos limitar a eficiência do processo de aclimação levando a uma perda de tolerância das linhagens a tais compostos. Este comportamento pode explicar a perda da capacidade de consumo de açúcares e produção de etanol observado a partir da terceira transferência.

Os resultados referentes à estratégia de aclimação C estão mostrados na Figura 5.14. Observa-se que tanto o consumo de xilose quanto a produção de etanol diminuíram gradualmente com a realização das transferências apesar dos tempos mais longos de cultivo. Nota-se que na fermentação H₇₅, a qual foi realizada com uma maior concentração inicial de células (6 g/L) do que a fermentação H₇₅ da estratégia B (1,6 g/L), tanto o consumo de xilose (cerca de 53%) quanto a máxima concentração de etanol (20 g/L) foram bastante superiores aos obtidos na fermentação H₇₅ da estratégia B, após 96 horas de fermentação. Com a realização da primeira transferência da estratégia C, mesmo tendo sido transferida uma elevada concentração de células (14 g/L), tanto o consumo de xilose (14,7%) quanto a máxima produção de etanol (11 g/L) após 120 horas, foram inferiores quando comparados com a fermentação (H₇₅).

Com relação à 2ª, 3ª e 4ª transferências (Figura 5.14), observa-se um consumo completo de glicose pela levedura após 120 horas, a qual coincidiu com a produção máxima de etanol (cerca de 5 g/L). Verifica-se ainda que a xilose não foi assimilada neste período, sugerindo que apenas a glicose foi utilizada como fonte de carbono para a produção de etanol. Após 120 horas o consumo de xilose ocorreu juntamente com a reassimilação do etanol, tendo o crescimento celular alcançado uma concentração entre 8 a 10 g/L de células. Estes resultados indicam que o substrato consumido foi utilizado preferencialmente para a produção de biomassa.

Na Tabela 5.10 estão apresentados os parâmetros fermentativos da levedura *P. stipitis* durante as transferências sucessivas de células referentes às estratégias de aclimação B e C. Nota-se que tanto na estratégia B como na estratégia C, ocorreu uma redução na capacidade fermentativa da levedura *P. stipitis* com o número de transferências realizadas. Entretanto, nestas estratégias, observa-se que ocorreu aclimação da levedura já na primeira transferência

Figura 5.14 – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação C.

Tabela 5.10 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células das estratégias de aclimação B e C.

Parâmetros	Transferências								*Referência
	Estratégia B				Estratégia C				
	1ª	2ª	3ª	4ª	1ª	2ª	3ª	4ª	
Proporção de hidrolisado % (v/v)	75	75	75	75	75	75	75	75	75
Xilose inicial (g/L)	90,9	89,8	87,9	86,7	89,2	86,3	85	80,4	84
Glicose inicial (g/L)	14,8	14,5	15,2	13,1	14,3	13,6	14,0	12,4	14,2
Arabinose inicial (g/L)	14,9	15,1	15,4	13,7	14,6	14,1	14,8	12,9	15,2
Consumo de xilose (%)	16,4	57,2	3,1	5,4	14,7	3,5	3,5	1,5	3,6
Consumo de glicose (%)	100	100	100	100	100	100	100	100	12
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células inicial (g/L)	3,0	3,0	3,1	2,5	13,8	12,9	14,1	9,5	1,9
Células final (g/L)	10,0	12,0	10,8	5,9	18,0	17,7	19,8	14,3	3,6
Etanol (g/L)	12,5	14,5	9,0	4,1	11,0	5,8	5,4	5,7	1,4
Glicerol (g/L)	0,0	0,0	2,2	3,4	0,0	0,0	4,2	3,6	0,0
Tempo (h)	120	216	72	72	120	120	120	72	120
Y _{P/S} (g/g)	0,40	0,21	0,44	0,25	0,38	0,25	0,31	0,38	0,27
Y _{X/S} (g/g)	0,25	0,16	0,35	0,22	0,16	0,24	0,36	0,25	0,38
Q _P (g/L.h)	0,10	0,07	0,13	0,06	0,10	0,05	0,05	0,08	0,01
Q _S (g/L.h)	0,25	0,30	0,25	0,22	0,23	0,13	0,14	0,17	0,04

*Ensaio realizado sem transferência sucessiva de células.

quando comparadas ao ensaio de referência realizado sem transferência sucessiva de células. Observa-se que tanto na estratégia B quanto na estratégia C, a levedura apresentou valores de $Y_{P/S}$ (0,40 e 0,38 g/g, respectivamente) e Q_P (0,10 g/L.h) cerca de 1,5 e 10 vezes superiores, respectivamente, aos observados para o ensaio de referência ($Y_{P/S} = 0,27$ g/g e $Q_P = 0,01$ g/L.h). Na segunda transferência da estratégia B a levedura apresentou um maior consumo de xilose (57,2%), e uma produção de etanol de 14,5 g/L após 216 horas, e embora a produtividade volumétrica em etanol ainda tenha sido superior ao ensaio de referência, o fator de conversão de substrato em produto mostrou uma redução de 22%. A partir da terceira transferência da estratégia B e da segunda transferência da estratégia C, houve uma redução da capacidade de consumo de xilose e produção de etanol pela levedura *P. stipitis*, tendo sido observados consumos de xilose inferiores a 5%. Nota-se ainda que na terceira e quarta transferências de ambas as estratégias a levedura apresentou uma produção de glicerol, tendo sido observadas concentrações entre cerca de 2 a 4 g/L deste produto após 72 horas de fermentação, o que pode ser atribuído a uma resposta fisiológica das células em condições de *stress* do meio de fermentação, visto que alterações na expressão de determinados genes tem como consequência a formação de determinados metabólitos com o glicerol (WALKER, 1998).

Com os resultados obtidos, pode-se inferir que a levedura foi capaz de aumentar a capacidade de consumir xilose e produzir etanol em meio contendo concentração de cerca de 90 g/L deste açúcar, com a realização de transferências sucessivas nas estratégias B e C, sendo constatado um aumento na tolerância ao meio de fermentação até a primeira transferência.

5.3.2.1 Fermentabilidade das Colônias Isoladas Durante as Estratégias de Aclimação “B” e “C”

Assim como na estratégia A, durante as transferências das estratégias de aclimação B e C foram isoladas oito colônias de *P. stipitis*, as quais foram avaliadas quanto à capacidade de produção de etanol em meio constituído de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v). Diferente da estratégia de aclimação A, em que as colônias foram isoladas de meio sólido constituído de 25% (v/v) de hidrolisado, as colônias provenientes das estratégias B e C foram

isoladas de meio sólido contendo hidrolisado a uma proporção de 45% (v/v), visto que estas foram capazes de crescer em meio sólido contendo maior proporção de hidrolisado.

Na Figura 5.15 são mostradas colônias de leveduras cujas células são provenientes do crescimento na terceira e quarta transferências das estratégias de aclimação B e C. Nota-se que, em decorrência do processo de aclimação, as colônias isoladas apresentaram diferenciação morfológica, ou seja, apresentaram colônias com características lisas e rugosas. De fato, modificações morfológicas de colônias têm sido relatadas por Mohandas, Whelan e Panchal (1995), que avaliaram a aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de madeira, verificaram que durante o isolamento de cepas de *P. stipitis* em meio contendo ácido acético a uma concentração de 0,5% (v/v), ocorreu diferenciação morfológica de colônias, sendo que as cepas adaptadas apresentaram tamanho maior e aspecto mais regular e sem ramificações como o observado para a cepa original. De acordo com Walker (1998), modificações morfológicas durante o isolamento de cepas mais adaptadas estão relacionadas com condições de *stress* ambiental, tais como elevada pressão osmótica, presença de compostos e metabólitos tóxicos, bem como a exaustão de nutrientes, que são capazes de levar a alterações nas características morfológicas de colônias de leveduras. Tal comportamento é corroborado pela análise microscópica das colônias isoladas (Figura 5.16). Nota-se nesta Figura, que as colônias rugosas apresentaram a formação de pseudo-hifas, enquanto que as colônias lisas apresentaram aspecto ovalado durante o crescimento. Jeffries et al. (2007) também constatou a formação de pseudo-hifas as quais estão geralmente relacionadas à condições de *stress* nas quais a levedura *P. stipitis* foi submetida devido às transferências sucessivas para meios contendo compostos tóxicos.

Figura 5.15 – Colônias de *P. stipitis* isoladas em meio sólido, contendo hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 25 (B e C) e 45% (v/v) (B₃, B₄, C₃ e C₄); (B e C) colônias de *P. stipitis* sem aclimação; (B₃) 3ª transferência da estratégia de aclimação B; (B₄) 4ª transferência da estratégia de aclimação B; (C₃) 3ª transferência da estratégia de aclimação C; (D₄) 4ª transferência da estratégia de aclimação C.

Figura 5.16 – Microscopia óptica das células de *P. stipitis* provenientes das colônias lisas (1) e rugosas (2). Fotos obtidas no microscópio com um aumento de 400 vezes.

Como já mencionado, a avaliação da capacidade de fermentação das colônias isoladas nas estratégias B e C, foi realizada pela comparação de seus desempenhos durante o cultivo em meio constituído de hidrolisado a 70% (v/v). Os parâmetros fermentativos do cultivo das colônias isoladas e da cepa original de *P. stipitis* estão apresentados na Tabela 5.11. Nota-se que para todas as isoladas, o consumo de xilose variou de 17 e 24%, sendo a maior concentração de etanol, cerca de 5,0 g/L, obtida após 120 horas de fermentação. Observa-se ainda a produção de glicerol em todos os ensaios com as leveduras isoladas, com concentrações variando de 0,7 a 4,3 g/L. Quando comparados ao ensaio de referência, o qual foi realizado com a cepa original de *P. stipitis*, os ensaios com as isoladas apresentaram resultados semelhantes de consumo de xilose e produção de etanol. Tais resultados indicam que, apesar da melhoria observada nas fermentações em hidrolisado a 75% (v/v) durante a primeira transferência de ambas as estratégias de aclimação B e C, as leveduras isoladas não foram capazes de manter tais características de consumo de xilose e produção de etanol.

De um modo geral, os resultados das estratégias de aclimação B e C mostraram que, a levedura *P. stipitis* perdeu gradativamente a capacidade de consumir xilose e produzir etanol em hidrolisado a 75% (v/v) com a realização de várias transferências sucessivas de células, sendo que o aumento da concentração de células transferidas não contribuiu para o aumento da fermentabilidade da levedura. Além disso, este estudo mostrou que a realização de uma etapa de transferência com menor concentração de células (estratégia B), foi importante para aumentar a fermentabilidade da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a uma concentração de 75% (v/v).

Tabela 5.11 – Parâmetros fermentativos do cultivo das colônias de *Pichia stipitis* isoladas durante as diferentes transferências das estratégias de aclimação B e C, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Parâmetros	Colônias isoladas								Cepa original
	B ₇₅ -1	C ₇₅ -1	B ₇₅ -2	C ₇₅ -2	B ₇₅ -3	C ₇₅ -3	B ₇₅ -4	C ₇₅ -4	
Proporção de hidrolisado % (v/v)	65	65	65	65	65	65	65	65	70
Xilose inicial (g/L)	76,2	78,8	78,2	76,7	78,3	76,4	75,8	78,5	84,0
Glicose inicial (g/L)	12,9	13,2	13,3	12,6	12,6	12,1	12,2	13,0	14,2
Arabinose inicial (g/L)	13,1	13,6	14,2	13,7	13,6	13,7	13,1	14,2	14,9
Consumo de xilose (%)	19,5	19,7	24,0	17,0	21,0	21,4	23,0	20,0	3,6
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	12,0
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Células inicial g/L)	1,7	1,8	1,3	1,6	1,7	1,5	1,6	1,7	1,9
Células final (g/L)	8,2	8,3	7,8	4,3	4,0	8,7	9,9	7,7	3,6
Etanol (g/L)	3,1	4,8	5,2	4,5	3,8	3,3	3,2	3,4	1,4
Glicerol (g/L)	3,3	3,5	0,7	4,3	2,8	3,3	3,2	3,7	0,0
Tempo (h)	120	120	120	120	120	120	120	120	120
Y _{P/S} (g/g)	0,11	0,16	0,16	0,16	0,13	0,12	0,11	0,12	0,27
Y _{X/S} (g/g)	0,30	0,30	0,23	0,16	0,14	0,29	0,32	0,26	0,38
Q _P (g/L.h)	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03	0,01
Q _S (g/L.h)	0,23	0,24	0,27	0,21	0,24	0,24	0,25	0,24	0,04

5.3.3 Perfil Fermentativo Durante as Estratégias de Aclimação “D” e “E”

De maneira semelhante à estratégia de aclimação A, nesta etapa, a levedura *Pichia stipitis* foi submetida ao processo de transferência sucessiva para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado até a proporção de 75% (v/v), porém nas estratégias D e E a levedura não foi submetida à etapa de pré-ativação em meio semissintético, conforme descrito na Figura 4.4, do Item 4.5.4. A estratégia D foi realizada em condições de menor aeração, mantendo a proporção de 2,5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$, enquanto que a estratégia E foi realizada em condições de maior aeração, tendo sido mantida uma proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$.

A Figura 5.17 apresenta os perfis de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular durante as transferências sucessivas de células para concentrações crescentes de hidrolisado das estratégias D e E. Observa-se que tanto o consumo de xilose quanto a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* aumentaram com o aumento da aeração do meio em todas as transferências realizadas. Nota-se que na fermentação 1 (H₄₅), de ambas as estratégias de aclimação, a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose e a xilose após 24 e 48 horas, respectivamente. Nota-se ainda que a aeração do meio favoreceu a velocidade de consumo de xilose pela levedura *P. stipitis*. Por exemplo, a concentração residual de xilose após 24 horas no meio menos aerado foi de 40 g/L, enquanto que no meio de maior aeração este valor foi de 25 g/L. Com relação à máxima produção de etanol alcançada nestes ensaios, observa-se uma produção de 15 g/L no meio menos aerado e 20 g/L no meio mais aerado após 36 horas. Estes resultados demonstram o impacto da aeração sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado por *P. stipitis*.

Quando as células foram transferidas para o meio H₆₀ (Figura 5.17), o consumo de xilose e a produção de etanol no meio mais aerado (estratégia E) foram também superiores ao obtido no meio menos aerado (estratégia D). No meio mais aerado a levedura *P. stipitis* consumiu praticamente toda a xilose e produziu cerca de 27 g/L de etanol após 72 horas. No entanto, na condição de menor aeração a levedura não foi capaz de consumir totalmente a xilose,

Figura 5.17 – Consumo de xilose e glicose (a), crescimento celular e produção de etanol (b) pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas transferências sucessivas de células das estratégias de aclimação D (linha pontilhada) e E (linha sólida).

restando ainda cerca de 20 g/L deste açúcar, tendo produzido 20 g/L de etanol após o mesmo tempo de fermentação.

Com a realização da segunda transferência para meios contendo hidrolisado a 75% (v/v), observou-se um consumo reduzido de xilose e incompleta assimilação desta pentose para ambas as condições de aeração avaliadas. Na estratégia de menor aeração (D) a máxima produção de etanol alcançada foi de 15 g/L após 96 horas, restando ainda cerca de 40 g/L de xilose neste tempo de fermentação, enquanto que na estratégia de maior aeração (E) a máxima produção de etanol foi 25 g/L após 72 horas, restando cerca de 25 g/L de xilose par este período.

A partir destes resultados, é possível afirmar que a levedura *P. stipitis* é capaz de fermentar hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado com elevadas concentrações de xilose (76 g/L), após uma transferência sucessiva de células sob condições mais aeradas (estratégia E). Tais resultados demonstram a importância de um fornecimento adequado de oxigênio, juntamente com o cultivo sucessivo como um modo de superar a presença de compostos tóxicos presentes no hidrolisado. Resultados semelhantes foram obtidos por Agbogbo et al. (2008), que avaliaram a aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado de sabugo de milho não destoxificado contendo 40 g/L de glicose e 25 g/L de xilose, em diferentes condições de agitação (100 e 150 rpm). Estes autores reportaram que a levedura *P. stipitis* adaptada quando cultivada na condição de menor aeração foi capaz de consumir 72% dos açúcares, alcançando a máxima produção de etanol, cerca de 18,4 g/L, após 96 horas. Já com o aumento da aeração (150 rpm), a levedura adaptada apresentou um consumo de 95% de açúcares, tendo produzido cerca de 25,1 g/L de etanol em um tempo menor, após 72 horas. Desta forma, semelhante ao observado no presente trabalho, estes autores constataram que a aclimação da levedura *P. stipitis* aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado foi favorecida em condições de maior disponibilidade de oxigênio.

Na Tabela 5.12 são mostrados os parâmetros fermentativos de *P. stipitis* durante as transferências realizadas nas estratégias de aclimação D e E. Com relação à fermentação 1 (H_{45}), observa-se que o uso de condições de maior aeração (estratégia E) proporcionou um ganho de aproximadamente 17% nos

Tabela 5.12 – Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, durante as transferências sucessivas de células da estratégia de aclimação A.

Parâmetros	Fermentação 1		1ª Transferência		2ª Transferência		*Referência	
	D	E	D	E	D	E	D	E
Proporção de hidrolisado % (v/v)	45	45	60	60	75	75	75	75
Xilose inicial (g/L)	53,6	49,3	76,3	75,8	86,1	82,8	84,0	78,5
Glicose inicial (g/L)	9,6	8,8	12,4	11,3	15,8	15,0	14,2	14,5
Arabinose inicial (g/L)	10,1	9,8	12,7	12,9	16,3	15,9	15,4	15,6
Consumo de xilose (%)	58,4	76,0	71,2	96,0	49,6	68,3	3,6	57,4
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	12,0	100,0
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0	0	0	0	0
Células inicial (g/L)	1,7	1,3	1,8	1,8	2,5	2,2	1,9	2,7
Células final (g/L)	7,5	12,5	12,4	18,5	13,5	18,5	3,6	12,9
Etanol (g/L)	15,9	20,3	20,0	26,8	15,6	24,1	1,4	14,8
Tempo (h)	36	36	72	72	96	72	120	72
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,40	0,47	0,31	0,32	0,26	0,33	0,27	0,24
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13	0,25	0,16	0,16	0,18	0,22	0,38	0,15
Q_P (g/L.h)	0,44	0,56	0,28	0,37	0,16	0,34	0,01	0,20
Q_S (g/L.h)	1,14	1,29	0,93	1,17	0,61	1,00	0,04	0,80

*Referências D e E: proporção de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ de 2,5:1 e 5:1, respectivamente, sem transferência sucessiva de células.

valores de conversão de substrato em produto, e 27% na produção de etanol e na produtividade volumétrica em etanol.

Observa-se ainda na Tabela 5.12, que durante as transferências das células para concentrações crescentes de hidrolisado sob condições de maior aeração (estratégia E), a levedura foi capaz de manter o fator de conversão de substrato em produto em torno de 0,33 g/g, e a produtividade volumétrica em etanol próxima a 0,35 g/L.h, indicando uma aclimação da levedura aos meios contendo concentrações crescentes de compostos inibidores. Por outro lado, sob condições de menor aeração (estratégia D), observa-se uma queda gradativa nos valores de produtividade volumétrica em etanol (de 0,28 para 0,16 g/L.h) e na velocidade de consumo de substrato (de 0,93 para 0,61 g/L.h) quando a proporção de hidrolisado foi aumentada de 60 para 75% (v/v), respectivamente.

Para avaliar a aclimação de *P. stipitis* na maior concentração de xilose, ensaios fermentativos com a levedura foram realizados sem transferência sucessiva de células nas condições de maior e menor aeração (referência). Nota-se na Tabela 5.12, que no ensaio de referência realizado na condição de menor aeração, a levedura foi capaz de consumir 12 e 3,6% de glicose e xilose, respectivamente, apresentando uma produção de apenas 1,4 g/L de etanol após 120 horas. Já no ensaio de referência realizado na condição de maior aeração, os resultados foram bastante superiores, sendo que a levedura apresentou um consumo total de glicose, além de um consumo de 57,4% de xilose e uma produção de etanol de 14,8 g/L após 72 horas. Estes resultados confirmam a importância de condições adequadas de fornecimento de oxigênio para a levedura com o objetivo de contornar os efeitos de inibição causados pela presença de compostos tóxicos.

Os resultados da Tabela 5.12 mostram também que os valores de Q_P (0,34 g/L.h) e $Y_{P/S}$ (0,33 g/g) obtidos na segunda transferência foram consideravelmente superiores aos observados nos ensaios realizados sem transferência sucessiva mesmo na condição de maior aeração ($Q_P = 0,20$ g/L.h e $Y_{P/S} = 0,24$ g/g). Tais resultados indicam que tanto as transferências sucessivas de células bem como o aumento da aeração favoreceram o processo de produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não destoxificado.

5.3.3.1 Fermentabilidade das Colônias Isoladas Durante as Estratégias de Aclimação “D” e “E”

Durante as estratégias de aclimação D e E foram isoladas quatro colônias provenientes das transferências realizadas em hidrolisado a 60 e 75% (v/v), conforme demonstrado na Figura 4.2 do Item 4.5.1. As colônias foram isoladas em meio sólido constituído de 25% (v/v) de hidrolisado, uma vez que as mesmas não apresentaram crescimento em meios contendo maiores proporções de hidrolisado. Para avaliar o perfil fermentativo das colônias isoladas, ensaios foram realizados em meio constituído por hidrolisado na proporção de cerca de 60% (v/v) na condição de maior aeração, ou seja, mantendo-se uma proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$.

Na Tabela 5.13, estão mostrados os parâmetros fermentativos do cultivo das leveduras isoladas durante as estratégias D e E, bem como do ensaio realizado com a cepa original nas mesmas condições de aeração. Observam-se poucas variações nos valores dos parâmetros fermentativos de todas as leveduras isoladas, tendo em vista que o consumo de xilose ficou em torno de 65% e a concentração de etanol situou-se em torno de 14,0 g/L após 120 horas de fermentação, indicando que as cepas isoladas não mantiveram as características observadas durante as transferências sucessivas. Segundo Almeida (2009), o aumento da tolerância de leveduras decorrente de estratégias de aclimação, podem estar relacionados com dois diferentes mecanismos: o primeiro refere-se a mutações genéticas espontâneas e o segundo ao aumento da expressão gênica e de atividades enzimáticas, sendo que neste último as características de maior tolerância não se mantêm após o isolamento de cepas. Desta forma, a maior robustez da levedura e, conseqüente aumento da capacidade fermentativa é dependente do processo de aclimação utilizado, como o número de transferências de células, e condições ambientais como a presença de inibidores, pressão osmótica, aeração e fontes de carbono.

Tabela 5.13 – Parâmetros fermentativos do cultivo das colônias de *Pichia stipitis* isoladas durante as diferentes transferências das estratégias de aclimação D e E, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Parâmetros	Colônias isoladas				Cepa original
	D ₆₀	E ₆₀	D ₇₅	E ₇₅	
Proporção de hidrolisado % (v/v)	70	70	70	70	70
Xilose inicial (g/L)	80,5	77,4	73,3	80,0	78,5
Glicose inicial (g/L)	14,6	14,0	13,3	14,6	14,5
Arabinose inicial (g/L)	15,1	14,9	14,5	15,4	15,1
Consumo de xilose (%)	65,0	67,6	74,2	70,3	57,4
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Consumo de arabinose (%)	0	0	0	0	0
Células inicial g/L)	2,2	2,8	2,8	2,7	2,7
Células final (g/L)	12,0	12,2	13,6	12,8	12,9
Etanol (g/L)	15,6	14,1	11,8	12,1	14,8
Tempo (h)	72	72	72	72	72
Y _{P/S} (g/g)	0,24	0,22	0,15	0,16	0,24
Y _{X/S} (g/g)	0,14	0,14	0,14	0,14	0,15
Q _P (g/L.h)	0,22	0,20	0,16	0,17	0,20
Q _S (g/L.h)	0,93	0,92	0,94	0,98	0,80

De acordo com a literatura as condições ambientais, tais como oxigenação do meio, fontes de carbono e compostos inibidores do metabolismo microbiano influenciam fortemente a expressão gênica e a síntese de enzimas em leveduras. Jeffries e Van Vleet (2009) avaliaram a influência da oxigenação e de diferentes fontes de carbono sobre a expressão gênica e enzimática da levedura *Pichia stipitis*. Os autores avaliaram 88 transcrições de genes envolvidos direta ou indiretamente nas vias glicolítica, pentose fosfato e ciclo do ácido cítrico, para cultivos da levedura *P. stipitis* CBS 6054, em diferentes condições de fornecimento de oxigênio (aeróbio e oxigênio limitado), assim como diferentes fontes de carbono (glicose, xilose ou arabinose). Estes autores observaram uma grande influência de ambas as condições ambientais avaliadas (nível de fornecimento de oxigênio e tipo de fonte de carbono), sobre a expressão gênica assim como na síntese enzimática. Os autores sugerem ainda que a expressão de genes pode ser estimulada por diferentes fatores ambientais, inclusive pela presença de compostos tóxicos, o que é um comportamento muito interessante, principalmente para o desenvolvimento de estratégias de aclimação ou superação da toxicidade de hidrolisados, uma vez que as células podem através destes mecanismos de expressão gênica aumentar sua tolerância à presença de compostos inibidores.

Liu et al. (2004) avaliaram as respostas adaptativas das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *P. stipitis* NRRL-Y 7124, em diferentes concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (10, 30 e 60 mmol/L). Segundo os autores, as leveduras submetidas à aclimação na presença destes compostos inibidores apresentaram diferenças nas dinâmicas de expressão com consequente melhora na fermentação a etanol. O autor identificou aumento da atividade de certas enzimas sob condições de *stress* como, por exemplo, a indução da álcool desidrogenase pela presença de álcool furfúrico (produto de degradação do furfural). Os autores propõem ainda que a fase de latência no crescimento da levedura em meio contendo compostos tóxicos pode ser vista como uma medida do nível de tolerância para as diferentes cepas submetidas às mesmas condições, uma vez que durante a fase de latência as leveduras passam por processos de aclimação, principalmente ligados a síntese enzimática, e deste modo, menores períodos de latência representam uma maior aclimação da levedura às condições ambientais do meio de cultura.

5.3.4 Análise Comparativa dos Resultados das Diferentes Estratégias de Aclimação

Na Figura 5.18 estão apresentados os perfis de consumo de xilose e produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz nas diferentes estratégias de aclimação avaliadas. Observa-se que as estratégias de aclimação foram capazes de influenciar o perfil de consumo de xilose e a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*. Nota-se que nas estratégias B e C a levedura *P. stipitis* foi capaz de consumir cerca de 16% de xilose, tendo produzido cerca de 12 g/L de etanol após 120 horas. Estes resultados indicam que a realização de muitas etapas de transferências sucessivas (estratégias B e C), quando comparada às demais estratégias, foram as que apresentaram menor contribuição para o processo fermentativo. Nota-se ainda que a emprego de elevadas concentrações de células durante as transferências, como realizado na estratégia C, não mostrou grande influência, tendo em vista que os resultados de ambas as estratégias, B e C, foram muito semelhantes.

Verifica-se ainda na Figura 5.18, que na estratégia de aclimação D, a levedura *P. stipitis* apresentou um consumo de xilose de cerca de 75% após 72 horas de cultivo, enquanto que na estratégia A, para este mesmo tempo, o consumo de xilose apresentado pela levedura foi de apenas 47%, tendo a levedura apresentado ainda um consumo reduzido deste açúcar. Em relação à produção de etanol, a máxima concentração alcançada na estratégia A foi de 19 g/L após 72 horas, enquanto que na estratégia D, a levedura foi capaz de atingir concentração semelhante 24 horas antes do observado na estratégia A. O maior desempenho da levedura *P. stipitis* no consumo de xilose e produção de etanol observado na estratégia D em relação à estratégia A, sugerem que a realização de etapas de cultivo em meio semissintético, como realizado na estratégia A, podem interferir de forma negativa na aclimação.

Com relação à influência da aeração no processo de aclimação, verifica-se na Figura 5.18, que o emprego de condições de maior disponibilidade de oxigênio na estratégia E, favoreceu tanto o consumo de xilose quanto a produção de etanol, em relação à estratégia D, realizada nas mesmas condições, exceto

Figura 5.18 – Perfis de consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) da levedura *P. stipitis* de diferentes transferências realizadas durante as estratégias de aclimação A, B, C, D e E em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 75% (v/v).

pelo menor nível de aeração. Na estratégia D, a levedura foi capaz de consumir cerca de 70% da xilose e produzir cerca de 20 g/L de etanol após 72 horas, enquanto que na estratégia E, para este mesmo período, houve um consumo total da xilose e a produção de cerca de 27 g/L de etanol, o que corresponde a uma produção 35% superior. Estes resultados sugerem que em condições de maior aeração a levedura é capaz de superar mais facilmente os efeitos de inibição causados por compostos tóxicos como furanos, ácido acético e compostos fenólicos, os quais estão presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz utilizado no presente trabalho. Muitos autores reportam que a presença destes inibidores pode levar a um desequilíbrio no balanço redox das células, tendo em vista que na presença de furfural, por exemplo, ocorre uma escassez de NADH, acarretando em um acúmulo de acetaldeído com consequente diminuição da produção de etanol, além da diminuição dos níveis de ATP interferindo no crescimento microbiano. Desta forma, no presente trabalho os maiores níveis de fornecimento de oxigênio utilizados na estratégia E propiciaram condições mais adequadas para que a levedura superasse os possíveis problemas relativos ao desequilíbrio do balanço redox causado pela presença de compostos inibidores. Estes resultados corroboram com o reportado por Agbogbo (2008) que também observaram que em condições de maior aeração, a aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico foi favorecida em condições de maior disponibilidade de oxigênio, levando ao aumento da tolerância aos compostos inibidores.

É importante salientar que o objetivo das estratégias de aclimação no presente trabalho foi também de se utilizar elevadas proporções de hidrolisado hemicelulósico sem destoxificação. Desta forma a estratégia E, após uma transferência sucessiva de células e com a utilização de maior aeração foi a estratégia que proporcionou os resultados mais relevantes de produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com uma concentração de xilose próxima a 80 g/L, alcançando produção de etanol de cerca de 27 g/L e um fator de conversão de substrato em produto e produtividade volumétrica em etanol de 0,32 g/g e 0,37 g/L.h, respectivamente. Estes resultados são ainda mais relevantes quando levado em conta a concentração de açúcares utilizada no presente trabalho, visto que tal concentração é bastante superior às encontradas

na literatura em trabalhos de aclimação da levedura *P. stipitis* a hidrolisados hemicelulósicos, como nos trabalhos de Zhu et al. (2009) e Huang et al. (2009).

Zhu et al. (2009) avaliaram a aclimação da levedura *P. stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de palha de milho constituído de 30 g/L de xilose através de transferências sucessivas para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado. A aclimação foi realizada em concentrações de hidrolisado que variaram entre 10 e 50% (v/v), sendo que em cada concentração foram realizados três cultivos sucessivos da levedura. Além disso, em todas as etapas de transferência, a concentração de xilose se manteve em 30 g/L por adição de açúcar comercial ao meio. Neste trabalho, os autores reportam produções de etanol de 11 g/L a partir de 30 g/L de xilose a 10% (v/v) de hidrolisado, e um $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,36 g/g e 0,50 g/L.h. Entretanto, na primeira transferência para meio contendo hidrolisado a 50% (v/v) o autor relatou reduções nos valores dos parâmetros $Y_{P/S}$ (53%) e Q_P (60%). Além da gradual perda da capacidade fermentativa da levedura *P. stipitis*, o autor relata ainda que a levedura foi capaz de suportar a presença de inibidores até uma concentração de 50% (v/v) de hidrolisado hemicelulósico.

Huang et al. (2009) também empregaram a aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz constituído de 20 e 5 g/L de xilose e glicose, respectivamente. O hidrolisado foi ainda suplementado com açúcares para obter sempre uma concentração final de 30 g/L de xilose e 10 g/L de glicose. Neste trabalho, o autor reporta a realização de cinco transferências sucessivas de células para concentrações crescentes de hidrolisado até 100% (v/v), além da realização de 60 repiques sucessivos em meio sólido para isolar a cepa adaptada. Segundo os autores, a fermentação realizada com a cepa mais tolerante produziu cerca de 10 g/L de etanol e apresentou um aumento de 10% em Q_P (0,24 g/L.h) e $Y_{P/S}$ (0,44 g/g) quando comparada com a cepa não adaptada, ambas realizadas em meio constituído de hidrolisado a uma concentração de xilose de cerca de 25 g/L. De acordo com os autores a aclimação da levedura *P. stipitis* pode ser atribuída à síntese de novas enzimas ou cofatores que levam a um metabolismo de açúcares mais eficiente, reduzindo os efeitos dos compostos inibidores.

Para comparar a aclimação da levedura *P. stipitis* na concentração próxima a 80 g/L de xilose, estão apresentados na Figura 5.19 os perfis de

consumo de xilose e produção de etanol da 1ª transferência de células da estratégia E juntamente com o ensaio de referência, o qual foi realizado sem transferência sucessiva de células. Nota-se que a levedura *P. stipitis* foi capaz de consumir totalmente a xilose, tendo apresentado uma produção de etanol próxima a 27 g/L após 72 horas. Já no ensaio realizado sem cultivo sucessivo de células, a levedura apresentou um consumo parcial de xilose, apenas 32%, tendo apresentado uma concentração de cerca de 10 g/L após 72 horas. Estes resultados foram muito superiores aos observados no ensaio de referência, indicando que o ganho da realização de transferências sucessiva de células em meio contendo maior aeração.

Figura 5.19 – Perfis de consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v), durante a 1ª transferência da estratégia E e o ensaio de referência realizado na condição de maior aeração (proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$).

Embora as estratégias de aclimação avaliadas no presente trabalho não tenham resultado em cepas mais robustas aos inibidores, tais estratégias permitiram alcançar resultados relevantes no aumento da tolerância da levedura *P. stipitis* aos inibidores por meio de cultivos sucessivos, tendo a estratégia E apresentado os melhores resultados dentre as estratégias avaliadas. Portanto, tais condições de aclimação foram escolhidas para ser utilizada na etapa seguinte do presente trabalho.

5.4 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ PELA LEVEDURA *Pichia stipitis* EM BIORREATOR

Com a finalidade de avaliar a cinética de fermentação da levedura *P. stipitis* na melhor condição proposta a partir dos estudos de aclimação, foram realizadas fermentações em biorreator a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v). Para a aclimação das células de *P. stipitis* foram realizados três cultivos sucessivos em meios contendo hidrolisado hemicelulósico nas proporções de 25, 45 e 60% (v/v), mantendo-se a condição mais aerada em frascos Erlenmeyer, ou seja, uma proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Para fins de comparação também foi realizada uma fermentação controle com inóculo proveniente de um único cultivo realizado em hidrolisado a 25% (v/v) por 24 horas.

Na Figura 5.20 estão mostrados os perfis de consumo de açúcares, produção de etanol e crescimento celular das fermentações em biorreator empregando células provenientes de cultivos com transferências sucessivas (CTS) e sem transferência sucessiva (STS). Na fermentação realizada com células sem transferência sucessiva (STS) a levedura apresentou um consumo completo de glicose após 60 horas de cultivo, e um consumo incompleto de xilose de cerca de 50% após 120 horas. Com relação à fermentação empregando células adaptadas (CTS), a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose após 36 horas, consumindo aproximadamente 70% da xilose após 120 horas. Estes resultados indicam que a aclimação da levedura ao hidrolisado por transferências sucessivas foi capaz de aumentar consideravelmente o consumo de açúcares, indicando uma menor inibição do metabolismo da levedura, e

Figura 5.20 – Consumo de açúcares (xilose e glicose), crescimento celular e produção de etanol dos ensaios CTS (—) e STS (—), realizados em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 70% (v/v) pela levedura *P. stipitis*.

consequentemente uma maior tolerância das células aos compostos inibidores presentes no hidrolisado. De fato, o aumento do consumo de açúcares em decorrência da aclimação de leveduras está relacionado ao aumento na tolerância das células aos compostos inibidores presentes no hidrolisado (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; BOYER, 1992).

Com relação ao crescimento celular, mostrado na Figura 5.20b, observa-se uma fase de latência de 24 horas no ensaio realizado sem transferência sucessiva de células, enquanto que no ensaio realizado com transferência sucessiva a levedura foi capaz de crescer logo no início da fermentação. De fato, a redução ou a completa eliminação da fase de latência no crescimento de leveduras adaptadas tem sido observada em diversos trabalhos como o de Nigam (2001a) e Huang et al. (2009). Nigam (2001a) reportou uma redução da fase de latência no crescimento e na produção de etanol de cerca de 30 a 35 horas em decorrência da aclimação da levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de madeira. Em trabalho semelhante, Huang et al. (2009) também reportaram uma completa eliminação da fase de latência quando utilizada uma cepa adaptada de *P. stipitis* na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Segundo Liu et al. (2004), durante a fase de latência do crescimento celular, as leveduras passam por mudanças fisiológicas relacionadas com a aclimação à presença de compostos inibidores. Desta forma, a redução na fase de latência, em decorrência de processos de aclimação, indica que as cepas aclimatadas foram capazes de desenvolver uma maior tolerância aos compostos inibidores presentes no hidrolisado.

Em relação à produção de etanol (Figura 5.20c), observa-se que na fermentação em que foram empregadas células adaptadas por cultivos com transferências sucessivas (CTS), a máxima concentração de etanol foi de 18,5 g/L após 108 horas de cultivo, enquanto que na fermentação empregando células não adaptadas (STS), foi alcançada uma concentração de 12,5 g/L, neste mesmo período de cultivo. Estes resultados demonstram que o processo de aclimação contribuiu para uma maior tolerância de *P. stipitis* aos inibidores presentes no hidrolisado, visto que a levedura adaptada apresentou um aumento de cerca de 50% na máxima concentração de etanol produzida, mesmo empregando hidrolisado com elevadas concentrações de açúcares e sem a realização de tratamentos de destoxificação.

Na Tabela 5.14 estão apresentados os parâmetros fermentativos referentes às fermentações com transferência sucessiva (CTS) e sem transferência sucessiva de células (STS). Observa-se nesta Tabela que, apesar da aclimação da levedura não ter proporcionado reduções no tempo necessário para alcançar a máxima concentração de etanol, o consumo de açúcares e a concentração de etanol obtida na fermentação com células adaptadas foram consideravelmente superiores aos observados para o cultivo empregando células não adaptadas.

As velocidades de consumo de substrato observadas nos ensaios CTS e STS foram de 0,58 e 0,43 g/L.h, respectivamente, mostrando um aumento não apenas na quantidade de substrato consumido, mas também um aumento de 35% na sua velocidade de consumo, em decorrência das transferências sucessivas de células. Além da maior velocidade de consumo de substrato, a produção de etanol no ensaio CTS aumentou em cerca de 50% em relação ao ensaio STS. O ensaio CTS mostrou ainda 43% de aumento no crescimento celular e um aumento de 50% na produtividade volumétrica em etanol. No entanto, o fator de conversão de substrato em produto em ambos os ensaios foi bastante similar.

De um modo geral, o cultivo sucessivo de células do inóculo proporcionou tanto aumentos no consumo de açúcares, no crescimento celular e na produção de etanol, além da eliminação da fase de latência. Estes resultados indicam que estratégias de aclimação de levedura a meios constituídos de compostos tóxicos, são métodos eficazes para superação de inúmeros problemas relativos às condições de *stress* fisiológico e inibição do metabolismo microbiano, porém as respostas adaptativas da levedura *P. stipitis* são dependentes do número de transferências sucessivas, concentração celular e oxigenação do meio de fermentação.

De fato, o emprego de estratégias de aclimação como forma de aumentar a tolerância de leveduras a compostos tóxicos presentes em hidrolisados de materiais lignocelulósicos é bastante reportada (Huang et al., 2009; Agbogbo et al., 2008; Nigam, 2001a; Nigam, 2001c), sendo os resultados obtidos no presente trabalho, comparáveis a outros estudos encontrados na literatura que também descrevem o emprego de estratégias de aclimação da levedura *Pichia stipitis* a hidrolisados hemicelulósicos.

Tabela 5.14 – Parâmetros fermentativos dos ensaios realizados em biorreator com transferência sucessiva de células (CTS) e sem transferência sucessiva (STS).

Parâmetros	CTS	STS
Tempo de fermentação (h)	108	108
*Substrato inicial (g/L)	93,3	94,0
Xilose (g/L)	79,0	79,7
Glicose (g/L)	14,3	14,3
Consumo de substrato (%)	67,0	50,6
Consumo de xilose (%)	60,0	42,0
Consumo de glicose (%)	100,0	100,0
Células _{inicial} (g/L)	3,0	2,7
Células _{final} (g/L)	11,6	8,1
Duração da fase <i>lag</i> (h)	0	24
Etanol (g/L)	18,5	12,5
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,31	0,29
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,15	0,11
Q_P (g/L.h)	0,18	0,12
Q_S (g/L.h)	0,58	0,43
$\eta_{P/S}$ (%)	61,0	57,0

*Substrato = glicose e xilose

No trabalho de Nigam (2001c), foi avaliada a produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo contendo 45 g/L de xilose e 6,4 g/L de glicose. A estratégia de aclimação reportada por este autor foi a realização de transferências sucessivas da levedura para concentrações crescentes de hidrolisado (20, 40, 60 e 80 % (v/v)), sendo isolada uma cepa do meio de maior concentração, que em seguida foi submetida a 39 subcultivos em hidrolisado a 50% (v/v), sendo a levedura adaptada mantida em meio sólido contendo a mesma proporção de hidrolisado. Neste trabalho a cepa adaptada alcançou um fator de conversão de substrato em produto de 0,27 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,10 g/L.h, o que quando comparados a cepa

original ($Y_{P/S}=0,15$ g/g e $Q_P=0,03$ g/L.h), representam aumentos da ordem de 85 e 230% para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho também foram reportados por Oliveira (2010), que avaliou a aclimação de uma linhagem de *P. stipitis* para a produção de etanol em biorreator de bancada a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado contendo uma concentração de xilose de 50 g/L. Este autor realizou 45 repiques da levedura em meio sólido contendo concentrações crescentes de hidrolisado, sendo realizado posteriormente dois cultivos sucessivos das células em meio líquido contendo hidrolisado a 25 e 50%. O autor reportou uma produção de etanol de 22,5 g/L, bastante similar ao alcançado no presente trabalho. Segundo o autor a linhagem aclimatada proporcionou aumentos de 50, 170, e 55% no crescimento celular, produção de etanol e produtividade volumétrica em etanol, respectivamente, em relação à linhagem sem aclimação.

Em outro trabalho, Nigam (2001b) avaliou o emprego de uma cepa adaptada da levedura *P. stipitis* sobre a produção de etanol a partir de licor sulfítico (subproduto da indústria papaleira). A aclimação da levedura foi realizada através de cultivos com transferências sucessivas para meios de fermentação contendo concentrações crescentes de licor sulfítico (20, 40, 60 e 80 % (v/v)), sendo as células adaptadas isoladas deste cultivo, e mantidas em meio sólido constituído de 50% (v/v) de licor. Para avaliar a influência da aclimação da levedura sobre o processo de produção de etanol foram realizadas fermentações em reator de bancada usando a levedura adaptada e a cepa original (*Pichia stipitis* NRRL Y-7124), em meio de fermentação constituído de licor sulfítico com uma concentração de cerca de 40 g/L de xilose, 10 g/L de manose e 6 g/L de glicose. Na fermentação empregando a cepa original, a levedura foi capaz de produzir 1,2 g/L de etanol, consumindo apenas 14 % dos açúcares após 90 horas, e alcançando uma produtividade volumétrica em etanol e fator de conversão de substrato em produto de 0,01 g/L.h e 0,16 g/g, respectivamente. Quando comparado aos resultados obtidos na fermentação com a cepa adaptada, na qual a levedura alcançou uma concentração de etanol de 6,7 g/L e consumindo 44 % dos açúcares, após 90 horas de cultivo, foi verificado que o processo de aclimação foi capaz de aumentar em sete vezes a produtividade volumétrica em etanol, dobrando o valor do fator de conversão de substrato em produto.

O emprego de células aclimatadas por transferências sucessivas na fermentação em biorreator proporcionou ganhos de 7% em $Y_{P/S}$ e 50% em Q_P quando comparado com a fermentação realizada sem transferência sucessiva. Apesar deste aumento observado nos valores dos parâmetros em biorreator, a fermentação realizada em frascos agitados empregando a mesma estratégia resultou em maiores aumentos nos valores de $Y_{P/S}$ (35%) e Q_P (85%) quando comparadas ao ensaio de referência em frascos agitados. Os melhores resultados observados em frascos agitados podem estar relacionados às diferentes condições de aeração empregadas em frascos e em biorreator. Desta forma, o emprego de condições de aeração mais adequadas em biorreator pode contribuir para a melhoria do processo de produção de etanol, possibilitando alcançar ganhos comparáveis aos observados em frascos agitados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho evidenciaram que tanto o tipo de fonte de nitrogênio, quanto a adequada combinação de tais fontes são aspectos importantes a se considerar em um processo fermentativo. No presente trabalho foi constatado que a adição de ácido glutâmico, fosfato de amônio e extrato de levedura apresentaram uma grande contribuição para a produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio semissintético.

O estudo da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz mostrou que a adição de extrato de levedura, sulfato de magnésio e fosfato de amônio não favoreceram a produção de etanol. Além disso, a adição de ácido glutâmico resultou em uma inibição do crescimento da levedura *Pichia stipitis*, impossibilitando o consumo de açúcares e a produção de etanol. Desta forma, o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz além de ser uma fonte de carbono, é também rico em micronutrientes e fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico, dispensando a sua suplementação para o uso como meio de fermentação.

O processo de transferência de células para meios contendo concentrações crescentes de hidrolisado de 60 até 75% (v/v) afetou fortemente a capacidade da levedura em consumir açúcares e produzir etanol. Ainda assim, durante esta estratégia de aclimação (estratégia A), foi possível isolar uma levedura (A₇₅-2) mais tolerante ao hidrolisado hemicelulósico, a qual apresentou ganhos em termos de produção de etanol e parâmetros fermentativos Q_P e $Y_{P/S}$ de 28 e 19%, respectivamente, em relação à cepa de *P. stipitis* original.

O emprego de um maior número de transferências sucessivas em hidrolisado a 75% (v/v) e o aumento da concentração celular (estratégias B e C) não contribuíram para uma efetiva aclimação da levedura *P. stipitis*. Entretanto, a levedura mostrou um aumento de tolerância até a segunda transferência da estratégia B e primeira transferência da estratégia C em fermentações realizadas em hidrolisado contendo 90 g/L de xilose.

O emprego de condições de maior fornecimento de oxigênio durante as etapas de transferências sucessivas (estratégia E) propiciaram condições mais adequadas para que a levedura superasse os efeitos de inibição causados pelos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz,

favorecendo o processo de aclimação e proporcionando uma maior tolerância aos compostos inibidores mesmo com as transferências para meios contendo maior concentração destes compostos.

A maioria das cepas isoladas durante as estratégias de aclimação não mantiveram as características relativas à maior tolerância observadas durante as transferências sucessivas. No entanto, o emprego de estratégias de transferências sucessivas permitiu alcançar resultados bastante relevantes no aumento da tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico e, consequente aumento no consumo de xilose e produção de etanol pela levedura *P. stipitis*.

O emprego de células aclimatadas por transferências sucessivas em fermentação em biorreator proporcionou ganhos de 7% em $Y_{P/S}$ e 50% em Q_P , no entanto, a fermentação em frascos agitados proporcionou maiores aumentos nos valores destes parâmetros, 35% em $Y_{P/S}$ e 85% em Q_P com relação à fermentação realizada sem transferência sucessiva.

Com os resultados obtidos, é possível concluir que o emprego de estratégias de aclimação da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, é um método eficaz para superação de inúmeros problemas relativos às condições de estresse fisiológico e inibição do metabolismo microbiano causado pela presença de compostos tóxicos. Porém, a resposta adaptativa da levedura *P. stipitis* é dependente do número de transferências sucessivas, concentração celular e oxigenação do meio de fermentação.

REFERÊNCIAS

ABOUL-EL-ENIN, O.H; FADEL, J.G.; MACKILL, D.J. Differences in chemical composition and fibre digestion of rice straw with, and without, anhydrous ammonia from 53 rice varieties. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 129-136, 1999.

AGBOGBO, F.K.; WENGER, K.S. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 34, p. 723–727, 2007.

AGBOGBO, F. K.; HAAGENSEN, F. D.; MILAM, D.; WENGER, K. S. Fermentation of acid-pretreated corn stover to ethanol without detoxification using *Pichia stipitis*. **Biochem. Biotechnol.**, v. 1145, p. 53-58, 2008.

ALBERS, E.; LARSSON, C.; LIDÉN, G.; NIKLASSON, C.; GUSTAFSSON, L. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 3187-3195, 1996.

AL-GHOUTI, M. A.; KHRAISHEH, M. A. M.; ALLEN, S. J.; AHMAD, M. N. The removal of dyes from textile wastewater: a study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth. **Journal of Environmental Management**, v. 69, p. 229–238, 2003.

ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 340-349, 2007.

ALMEIDA, J.R.M.; BERTILSSON, M.; GRAUSLUND, M.F.G; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 82, p. 625-638, 2009.

ALVIRA, P.; PEJÓ, E.T.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2009.

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 2, p. 211-214, 1994

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

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. **Applied Energy**, v.86, p. 2273-2282, 2009.

BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of Glycolysis by Furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **European J Appl Microbiol Biotechnol**, v. 11, p. 226- 228, 1981.

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, p. 4767–4774, 2010.

BIOFUELS PLATFORM. ENERS, Energy Concept. **Production of biofuels in the world**, 2008. Disponível em: <<http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bioethanol>>. Acessado em: 09/08/2009

BOYER, L. J.; VEGA, J.L.; KLASSON, K.T.; CLAUSEN, E.C.; GADDY, J.L. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, nº 1, p. 41-48, 1992.

BUGOS R.C; SUTHERLAND, J.B.; ADLER, J.H. Phenolic Compound Utilization by the Soft Rot Fungus *Lecythophora hoffmannii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, nº 7, p. 1882-1885, 1988.

Browning, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York. Ed. Wiley, 1967., v.2 498 p.

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

CARMELO, V.; SANTOS, H.; SÁ-CORREIA, I. Effect of extracellular acidification on the activity of plasma membrane ATPase and on the cytosolic and vacuolar pH of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1325, p. 63–70, 1997.

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

CERQUEIRA-LEITE, R. C.; LEAL, M. R. L. V.; CORTEZ, A. B.; GRIFFIN, W. M.; SCANDIFFIO, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? **Energy**, v. 34, p. 655-661, 2009.

CHUNG, S.; LEE, Y. Y. Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula. **Biotechnol Bioeng**, v. 27, p. 308–315, 1984.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUÉS, J.M. Xylitol Production from Hardwood Hemicellulose Hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*, **Humana Press Inc.**, v. 82, p. 141-151, 1999.

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J.M.; PEREGO, P.; SILVA, S.S.; ZILLI, M. Wood Hydrolysis and Hydrolysate Detoxification for Subsequent Xylitol Production. **Chem. Eng. Technol.**, v. 23, n 11, p. 1013-1020, 2000.

CRUZ, S. J.; DOMINGUEZ, J. M.; DOMINGUES, H.; PARAJO, J. C. Preparation of Fermentation Media from Agricultural Wastes and Their Bioconversion into Xilitol. **Food Biotechnology**, v. 14, p. 79-97, 2000.

DEMIRBAS, M. F.; BALAT, M.; BALAT, H. Potential contribution of biomass to the sustainable energy development. **Energy Conversion and Management**, v. 50, p. 1746–1760, 2009.

DIZ, J.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Xylitol Production from Eucalyptus Wood Hydrolysates in Low-Cost Fermentation Media. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 40, n. 3, p. 191–197 2002.

FAO. **Food and agriculture organization of the united nations**, Preliminary 2010 Data. 2010. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>>. Acessado em: 06/09/2010.

FENSKE, J.J.; GRIFFIN, D.A.; PENNER, M.H. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass Prehydrolysates. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 364-368, 1998.

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

GOLDEMBERG, J.; GUARDABASSI, P. Are biofuels a feasible option? **Energy Policy**, v. 37, p. 10-14, 2009.

GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from Biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981, 309 p.

GUEBEL, D. V.; CORDENONS, A.; NUDEL, B.C.; GIULIETTI, A. M. Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 7, p. 287-292, 1992.

HAHN-HAGERDAL, B.; GALBE, M.; GRAUSLUND, M. F. G.; ZACCHI, L. G. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v.24, nº 12, p. 549-556, 2006.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; LARSSON, C. U. GRAUSLUND, M. G.; GÖRGENS, J.; VAN ZYL, W. Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. **Microbial Cell Factors**, v. 31, n. 4, p. 1-16, 2005. doi:10.1186/1475-2859-4-31.

HAN, Y. Microbial Fermentation of Rice Straw: Nutritive Composition and In Vitro Digestibility of the Fermentation Products. **Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 510-514, 1975.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 2005.

HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. **Wood and cellulosic chemistry**. 2nd edition. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001, 914 p.

HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907–4913, 2010.

HUANG, C. F.; LIN, T. H.; GUO, G. L.; HWANG, W. S. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technolog**, v. 100, p. 3914–3920, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201009_5.shtm>. Acessado em: 05/09/2010.

IRICK, T. J.; WEST, K.; BROWNELL, H. H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J. N. Comparison of Colorimetric and HPLC Techniques for Quantitating the Carbohydrate Components of Steam – Treated Wood. Scientific Note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 137-149, 1988.

JEFFRIES, T. W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts, and Fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 27, p. 1-32, 1983.

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

JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y. S.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnology**, v.25, n. 3, p. 319-326, 2007.

JENKINS, B. M.; BAXTER, L. L.; MILES JR.; T. R.; MILES, T. R. Combustion properties of biomass. **Fuel Processing Technology**, v. 54, p. 17–46, 1998.

JEPPSSON, H.; ALEXANDER, N. J.; HAHN-HAGERDAL, B. Existence of Cyanide-Insensitive Respiration in the Yeast *Pichia stipitis* and Its Possible Influence on Product Formation during Xylose Utilization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n 7, p. 2596-2600, 1995.

JONSSON, L. J.; PALMQVIST, E.; NILVEBRANT, N. O.; HAHN-HAGERDAL, B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 6, p. 691-697, 1998.

KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice Straw a Lignocellulosic Resource: Collecting, Processing, Transportation, and Environmental Aspects. **Biomass and Bioenergy**. v. 18, p. 369-389, 2000.

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

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 247-253, 2006.

KEATING, J. D.; PANGANIBAN, C.; MANSFIELD, S. D. Tolerance and Adaptation of Ethanologenic Yeasts to Lignocellulosic Inhibitory Compounds. **Biotechnol Bioeng**, v. 93, n. 6, p.1196-206, 2006.

KLINE, K.; OLADOSU, G. A.; WOLFE, A. K.; PERLACK, R. D.; DALE, V. H.; MCMAHON, M. **Biofuel feedstock assessment for selected countries**. U.S. Department of Energy. 2008. Disponível em: <http://info.ornl.gov/sites/publications/files/Pub10201.pdf>. Acessado em: 15/08/2010.

KLINKE, H. B.; AHRING, B. K.; SCHMIDT, A. S.; THOMSEN, A. B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, p. 15-26, 2002.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 66, p. 10–26, 2004.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos avançados**, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

KUHAD, R.C.; SING, 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. **Ind. Eng. Chem. Res**, v. 48, p. 3713–3729, 2009.

KUMAR, A.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3293–3297, 2009.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Comparison of Different Methods for the Detoxification of Lignocellulose Hydrolyzates of Spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77–79, p. 91-103, 1999.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D.; MOHAGHEGHI, A.; MCMILLAN, J. D. Fermentation Performance Characteristics of a Prehydrolyzate-Adapted Xylose-Fermenting Recombinant *Zymomonas* in Batch and Continuous Fermentations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n°79, 191-204, 1999.

LEE, W.G., LEE, J.S., SHIN, C.S., PARK, S.C., CHANG, H.N., CHANG, Y.K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 77–79, p. 547–559, 1999.

LIU, Z. K.; SLININGER, P.J.; DIEN, B.S.; BERHOW, M.A.; KURTZMAN, C.P.; GORSICH, S.W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 31, n. 8, p. 345-352, 2004.

LOGSDAIL, D. H.; SLATER, M. J. **Solvent Extraction in the Process Industries**. London: Elsevier Science Publishers, 1993.

LOHMEIER-VOGER, E. M.; SOPHER, C. R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

MARTÍN, C.; ALRIKSSON, B.; SJODE, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, A. L. J. Dilute Sulfuric Acid Pretreatment of Agricultural and Agro-Industrial Residues for Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136–140, p. 339-352, 2007.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Use of UV Absorbance To Monitor Furans in Dilute Acid Hydrolysates of Biomass. **Biotechnol. Prog.**, v. 16, p. 637–641, 2000.

MIKULASOVA, M.; VODNY, S.; PEKAROVICOVA, A. Influence of Phenolics on Biomass Production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. **Biomass**, v. 23, p. 149-154, 1990.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysate with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Technology**, v. 32, p. 396-400, 2003.

MODIG, T.; LÍDEN, G.; THAERZADEH, M. J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochem. J.**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MOHANDAS, D.; WHELAN, D. R.; PANCHAL, C. J. Development of Xyiose-Fermenting Yeasts for Ethanol Production at High Acetic Acid Concentrations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51, p. 307-318, 1995.

MUSSATTO, S. I.; Dragone, G.; Guimarães, P. M. R; Silva, J. P. A.; Carneiro, L. M.; Roberto, I. C.; Vicente, A.; Domingues, L.; Teixeira, J. A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, 2010, doi:10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 497-502, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681–1684, 2001.

NIGAM, J.N. Development of xilose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **J. of Applied Microbiology**, v. 90, p. 208-215, 2001a.

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

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

NIGAM, P. S., SINGH, A. Production of liquid biofuels from renewable resources. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 37, p. 52-68, 2011.

OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V.; BRIJWANI, K.; BHARGAV, V. K.; PATIL, R. T. P. Enhanced ethanol production via fermentation of rice straw with hydrolysate-adapted *Candida tropicalis* ATCC 13803. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p.1299-1306, 2010.

OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1223–1228, 2006.

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. 2010, 143 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Química – UFRJ, Rio de Janeiro.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, HAHN-HAGERDAL, B.; SZENGYEL, Z.; ZACCHI, G.; RECZEY, K. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 286-293, 1997.

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

PALUKURTY, M. A.; TELGANA, N. K.; BORA, H. S. R. B.; MULAMPAKA, N. Screening and optimization of metal ions to enhance ethanol production using statistical experimental designs. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 87-94, 2008.

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Energetic of the effect of acetic acid on growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, p. 69-72, 2000.

PARAJÓ, J. C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysate. **Bioresource Technology**, London, v. 66, p. 25-40, 1998.

PENNINGTON, D. **Bioenergy today & tomorrow**. Disponível em: http://www.maes.msu.edu/upes/agtomm_2009/bioenergy.pdf. Acessado em: 09/09/2010.

PHAM, P. L.; TAILLAMDIER, P.; DELMAS, M.; STREHAIANO, P. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. Using statistical

experimental design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 185-190, 1998.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JAIN, N.; JOSHI, H. C. Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India. **Energy & Fuels**, v., 21, p. 2415-2420, 2007.

QUEROL, A.; ESPINAR, M.T.F.; OLMO, M.; BARRIO, E. Adaptive evolution of wine yeast. Review. **International Journal of Food Microbiology**, v.86, p. 3-10, 2003.

RFA - RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, **Ethanol Industry Outlook – Growing Innovation**, 2009. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/page/-/objects/pdf/outlook/RFA_Outlook_2009.pdf?nocdn=1> Acessado em: 02/10/2010.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; 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. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 18, n. 3, p. 299-311, 2001.

ROSSILO-CALLE, F; WALTER, A. Global market for bioethanol: historical trends and future prospects. **Energy for Sustainable Development**, v. 10, nº 1, p. 20-32, 2006.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.10, nº 5, p. 315-318, 1988.

SANCHEZ, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIG, T.; GALBE, M.; LINDEN, G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 249-256, 2004.

SCHNEIDER, H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 94-98, 1996.

SHI, N. Q.; CRUZ, J.; SHERMAN, F.; JEFFRIES, T. W. SHAM-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *Pichia stipitis*. **Yeast**, v. 19, p. 1203-1220, 2002.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, n. 5, p. 1305-1315, 2009.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J. A. *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 01, p. 151-156 2011a.

SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteus Reagent. *Methods in Enzymology*, v.299, p.152-178, 1999.

SKOOG, K.; HAHN-HAGERDAL, B.; DEGN, H.; JACOBSEN, J. P.; JACOBSEN, H. S. Ethanol Reassimilation and Ethanol Tolerance in *Pichia stipitis* CBS 6054 as Studied by ¹³C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 8, p. 2552-2558, 1992.

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

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

SOCCOL, C.; VANDENBERGHE, MEDEIROS, A.; KARP, S.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.; PITARELO, A.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.; FERRARA, M.; BON, E.; MORAES, L.; ARAÚJO, J.; TORRES, F. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820–4825, 2010.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2th Edition. Great Britain, 1995. 357 p.

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

SUNITHA, K.; LEE, J. K.; OH, T. K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 477-481, 1999.

TAHERZADEH M. J.; KARIMI, K. Enzyme-Based Hydrolysis Processes for Ethanol from Lignocellulosic Materials: A Review. **BioResources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Conversion of Furfural in Aerobic and Anaerobic Batch Fermentation of Glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 2, p. 169-174, 1999.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Physiological Effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 701-708, 2000b.

THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Fuel Alcohol Production: Effects of Free Amino Nitrogen on Fermentation of Very-High-Gravity Wheat Mash. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, nº 7, p. 2046-2050, 1990.

UDOP. União dos Produtores de Bioenergia. **Indicadores de mercado**. Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=alcool>. Acessado em: 20/05/2010.

VAN DIJKEN, J. P.; SCHEFFERS, A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 199-224, 1986

VAN ZYL, C.; PRIOR, A. B.; DU-PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, p. 357-369, 1988.

VILLA, G. P. Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biotechnol**, v. 12, p. 509–512, 1992.

VILLARREAL, M. L. M.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, A. E. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 17–24, 2006.

VOGEL, A. I. **Química Analítica Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1989.

WALKER, G. M. **Yeast** – Physiology and Biotechnology. New York, Wiley, 1998. 321 p.

WATSON, N. E.; PRIOR, B. A.; LATEGAN, P. M.; LUSSI, M. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen Tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, n. 10, p. 451-456, 1984.

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

WHITE, J. S.; YOHANNAN, B. K.; WALKER, G. M. Bioconversion of brewer's spent grains to bioethanol. **FEMS Yeast Res**, v. 8, 1175–1184, 2008.

WISE, W. S. The Measurement of the Aeration of Culture Media. **J. Gen. Microbiol.**, v. 5, p. 167-177, 1951.

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

YARRIS, L. U. S. Department of Energy. **The Evolutionary Road to Biofuels**. 2010. Disponível em: <<http://www.lbl.gov/Publications/YOS/Feb/index.html>>. Acessado em: 22/07/2010.

Yoshida, S.; KUSAKABE, I.; MATSUO, N.; SHIMIZU, K.; YASUI, T. Structure of Rice-straw arabinoglucuronoxylan and Specificity of *Streptomyces* Xylanase toward the Xylan. **Agric. Biol. Chem.**, v. 54, p. 449-457, 1990.

YOSWATHANA, N.; PHURIPHIPAT, P.; TREYAWUTTHIWAT, P.; ESHTIAGHI, M. N. Bioethanol Production from Rice Straw. **Energy Research Journal**, v. 1, n. 1, p. 26-31, 2010.

ZHONG, C.; LAU, M. W.; BALAN, V.; DALE, B. E.; YUAN, Y. J. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 84, p. 667–676, 2009.

ZHU, J.J.; YONG, Q.; XU, Y.; CHEN, S.X.; YU, S.Y. Adaptation fermentation of *Pichia stipitis* and combination detoxification on steam exploded lignocellulosic prehydrolyzate. **Natural Science**, v. 1, p. 47-54. 2009.

ZHU, J.; YONG, Q.; XU, Y.; YU, S. Detoxification of corn stover prehydrolyzate by trialkylamine extraction to improve the ethanol production with *Pichia stipitis* CBS 5776. **Bioresour. Technol.**, v. 102, n. 2, p. 1663-1668, 2010.