**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

DANIELY GARCIA

**Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a
partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**

Lorena – SP
2012

DANIELY GARCIA

**Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do
hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte**

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 concentração de conversão de biomassa.

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

LORENA
2012

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

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Especializada em Engenharia de Materiais
EEL/USP

Garcia, Daniely

Estudo da produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte./ Daniely Garcia. – 2012.

153 f.: il.

Tese (Doutor em Ciências – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo.

1. Etanol 2. *Pichia stipitis* 3. Fermentação 4. Bagaço de malte I. Título.

CDU 662.754

***Ao meu marido Luiz pelo amor,
respeito e companheirismo
sempre.***

***À minha família e
especialmente aos meus pais
José e Eunice, pelo amor
incondicional e apoio em todos
os momentos da minha vida.***

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que sou e tenho.

À Prof.^a Dr.^a Inês Conceição Roberto pelo empenho e dedicação neste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Fermentação I: Livia, João Paulo, Dani, Bruno, Rafael, Jú e mais recentemente, Isabela, Tathi, Túlio e Bárbara, pelos impagáveis momentos de desabafo, fofocas e descontração ao longo destes anos de convivência.

Um agradecimento especial aos meus pseudo-co-orientadores: João Paulo, Dani e Livia pelos ensinamentos e, principalmente pela amizade.

Aos colegas do Debiq pelos agradáveis momentos de convivência.

Aos meus primeiros incentivadores na área acadêmica: Dr.^a Clarice Abramo, Dr. Henrique Couto Teixeira e Dr.^a Ana Paula Ferreira.

Ao meu amado marido Luiz, por ser meu melhor amigo e por ser tão compreensivo, paciente e generoso durante este período.

Aos meus irmãos, pelo cuidado e amor que sempre tiveram comigo.

À minha avó Constância por ser um exemplo de mulher para mim.

À minha tia e madrinha Ondinha pelo amor e carinho.

Às minhas fiéis e eternas amigas: Eliane Aquino, Jacqueline Oliveira, Kellen Leal e Patrícia Cleary por fazerem parte da minha vida, mesmo distantes.

À Lilia, minha cunhada querida, por me acolher com tanto carinho em sua família.

Aos professores e orientadores do estágio de docência: Marco Alcântara e Maria das Graças de Almeida Felipe pela disponibilidade e ensinamentos.

À Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), aos professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A educação é a mais poderosa
arma pela qual se pode mudar o
mundo”.*

(Nelson Mandela)

RESUMO

GARCIA, D. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte**. 2012. 153p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*, a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte (HHBM). Primeiramente estudou-se o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado adicionando-se extrato de farelo de arroz (0 a 20% v/v), uréia (0 a 3 g/L) e extrato de levedura (0 a 3 g/L). Os resultados mostraram que o hidrolisado suplementado apenas com extrato de levedura proporcionou os melhores resultados de conversão ($Y_{P/S} = 0,44$ g/g) e produtividade em etanol ($Q_P = 0,33$ g/L.h). Em seguida foi avaliado o nível ótimo deste nutriente sobre a bioconversão, sendo confirmada a suplementação do HHBM com 3,0 g/L de extrato de levedura. Após o estabelecimento das condições nutricionais, a levedura foi cultivada em HHBM após o crescimento de 24 horas em meio semissintético, visando aclimatar as células aos inibidores presentes no hidrolisado. Este estudo resultou no aumento das velocidades do processo, sendo 16% sobre a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e 10% sobre a velocidade de consumo de substrato (Q_S), quando comparado ao cultivo das células somente em meio semissintético. Na etapa seguinte utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 com face centrada para otimização das condições de pH e concentração inicial de células (X_0) na fermentação em HHBM não destoxificado e após a destoxificação com carvão ativado. Foram obtidos modelos para descrever os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P na região estudada, sendo que para o HHBM não destoxificado os valores destes parâmetros foram 0,40 g/g e 0,65 g/L.h, respectivamente, em pH 6,4 e $X_0 = 5,0$ g/L (modelo 1). Em HHBM destoxificado, as condições ótimas foram obtidas em pH 6,0 e 1,36 g/L de células (modelo 2), obtendo-se $Y_{P/S}$ de 0,40 g/g e Q_P de 0,46 g/L.h. Nas condições otimizadas foram então realizados ensaios que confirmaram a validade dos modelos 1 e 2, obtendo-se a máxima concentração de etanol (23,4 g/L), $Y_{P/S}$ de 0,41 g/g e Q_P de 0,65 g/L.h em HHBM não destoxificado. Realizou-se ensaios para avaliação do efeito do ácido acético sobre a fermentação em meio semissintético por *P. stipitis*, empregando-se as condições de pH e X_0 otimizadas em HHBM não destoxificado (modelo 1) e destoxificado (modelo 2). Este estudo mostrou que nas condições do modelo 1, o ácido acético favoreceu a bioconversão sendo os melhores resultados obtidos na presença deste ácido ($Y_{P/S} = 0,47$ g/g e $Q_P = 1,08$ g/L.h). Por outro lado, nas condições do modelo 2, os valores de $Y_{P/S}$ foram similares, enquanto que com a adição de ácido acético ao meio de fermentação, o valor de Q_P foi reduzido em 53%. Na fermentação em biorreator, o emprego das condições otimizadas em frascos (pH 6,4 e 5,0 g/L de células) resultaram em valores de Q_P 48% inferiores ao obtido em frascos (0,65 para 0,44 g/L.h), entretanto $Y_{P/S}$ foi apenas 10% inferior (0,41 para 0,37 g/g). No presente estudo, conclui-se que a suplementação nutricional do HHBM e a otimização das condições de pH e X_0 resultaram em valores promissores para os principais parâmetros da fermentação por *P. stipitis*, ressaltando o potencial deste hidrolisado em processos biotecnológicos para produção de etanol.

Palavras-chave: Etanol. *Pichia stipitis*. Fermentação. Bagaço de malte.

ABSTRACT

GARCIA, D. **Study of ethanol production by *Pichia stipitis* from brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate.** 2012. 153 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

This study aimed to evaluate the ethanol production by *Pichia stipitis* in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate (BSGHH). Initially, the effect of nutritional supplementation was evaluated by adding rice bran extract, urea and yeast extract. The results showed that supplementation only with yeast extract promoted the highest conversion values ($Y_{P/S} = 0.44$ g/L) and ethanol productivity ($Q_P = 0.33$ g/L.h). Additional assays showed that the optimal concentration of this nutrient was 3.0 g/L. To acclimate the cells to inhibitors present in BSGHH the yeast was cultivated in hydrolysate after growth for 24 hours in semisynthetic medium. This study resulted in increased of the process rates, 16% of the ethanol productivity (Q_P) and 10% on the substrate consumption (Q_S) when compared to growing cells only in the semisynthetic medium. In the second step a 2^2 full factorial centered-face design was employed to optimized the conditions of pH and initial cells concentration (X_0) in fermentation of hydrolysate undetoxified and after detoxification with activated charcoal. Mathematical models that relate the $Y_{P/S}$ and Q_P were obtained. For non-detoxified BSGHH (model 1) the optimal conditions of pH (6.4) and X_0 (5.0 g/L) showed values parameters of 0.41 g/g and 0.65 g/L.h, respectively. In detoxified BSGHH (model 2) the optimum conditions of pH (6.0) and X_0 (1.36 g/L), resulted in $Y_{P/S}$ and Q_P values of 0.40 g/g and 0.46 g/L.h, respectively. Under these conditions, the the validity of the models were confirmed. The effect of acetic acid on fermentation by *P. stipitis* in semisynthetic medium, employing optimized conditions of pH and X_0 in model 1 and model 2 was evaluated. The results showed that under the conditions of model 1 and in a concentration of 2,9 g/L, the acetic acid favored the bioconversion by *P. stipitis*, increasing the $Y_{P/S}$ (15 %) and Q_P (66 %). On the other hand, in the conditions of the model 2 the $Y_{P/S}$ values were similar, whereas the Q_P values were reduced by 53% when the acetic acid was added. By using these optimized conditions in bioreactor fermentation it was obtained the ethanol productivity was approximately 48% lower (0.65 to 0.44 g/L.h), however the ethanol production was similar as compared to fermentation flasks. It is possible conclude that the HHBSG requires nutritional supplementation and that the optimized conditions of pH and initial cells concentration can be used as a strategy in order to raising the fermentation parameters.

Key-words: Ethanol. *Pichia stipitis*. Fermentation. Brewer's spent grain.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Ciclo do carbono e conversão da energia solar	26
Figura 2.2 – Principais países produtores de etanol 2008 e 2010	27
Figura 2.3 – Estrutura da parede celular dos vegetais mostrando o arranjo das microfibrilas de celulose, cadeias de hemicelulose e de lignina, além de monossacarídeos presentes nestas estruturas	30
Figura 2.4 – Produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica	33
Figura 2.5 – Representação esquemática da produção de bagaço de malte	40
Figura 2.6 – Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose	45
Figura 2.7 – Vias de fermentação de xilose	48
Figura 5.1 – Consumo de açúcares (glicose e xilose) (a) e ácido acético (b) pela levedura <i>P. stipitis</i> sob diferentes condições nutricionais, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^3 , em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte	81
Figura 5.2 – Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) pela levedura <i>P. stipitis</i> sob diferentes condições nutricionais, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^3 , em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte	83
Figura 5.3 – Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança e erro puro com 3 graus de liberdade ($t = 3,18$) para as variáveis resposta: $Y_{P/S}$ (a), $Y_{X/S}$ (b), Q_P (c), Q_S (d)	87
Figura 5.4 – Consumo de açúcares (glicose e xilose) (a) e produção de etanol (b) por <i>P. stipitis</i> , a partir da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte com diferentes concentrações de extrato de levedura	90
Figura 5.5 – Influência de diferentes concentrações de extrato de levedura na bioconversão do HHBM por <i>Pichia stipitis</i> , sob os parâmetros fermentativos. (a): rendimento em etanol; (b): rendimento em células; (c): produtividade em etanol; (d): velocidade de consumo de substrato. EL: extrato de levedura	91
Figura 5.6 – Consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) por <i>P. stipitis</i> , a partir do cultivo da levedura em meio semissintético (●) e do cultivo em duas etapas: meio semissintético seguido pelo cultivo em hidrolisado de bagaço de malte (●)	93

- Figura 5.7** – Consumo de glicose (a), xilose (b) e de ácido acético (c) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células 97
- Figura 5.8** – Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células 99
- Figura 5.9** – Superfície de resposta relacionando a conversão do substrato em etanol (a) e a produtividade volumétrica em etanol (b) com a concentração inicial de células e pH em níveis codificados 106
- Figura 5.10** – Comportamento cinético da levedura *P. stipitis*, observado nas condições otimizadas pelo modelo, visando à produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte 108
- Figura 5.11** – Espectros de varredura na região do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte concentrado antes (—) e após (—) o processo de destoxificação 111
- Figura 5.12** – Consumo de glicose (a), xilose (b) e de ácido acético (c) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células 114
- Figura 5.13** – Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células 116
- Figura 5.14** – Fator de conversão do substrato e produtividade volumétrica em etanol, obtidos nos ensaios do planejamento 2^2 , realizados em HHBM não destoxificado (●) e após destoxificação (●). Ensaios realizados em pH 5,5 à direita e em pH 6,5 à esquerda 119
- Figura 5.16** – Superfície de resposta relacionando a conversão do substrato em etanol (a) e a produtividade volumétrica em etanol (b) com a concentração inicial de células e pH, em níveis codificados 124
- Figura 5.17** – Comportamento cinético da levedura *P. stipitis*, observado nas condições otimizadas pelo modelo, visando à produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado 126

- Figura 5.18** – Comportamento cinético observado na bioconversão de açúcares pela levedura *P. stipitis* em meio semissintético, simulando as condições otimizadas em HHBM: consumo de glicose e xilose (a) e arabinose (b); formação de etanol (c) e biomassa (d) 129
- Figura 5.19** – Comportamento cinético apresentado pela levedura *P. stipitis*, na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, em biorreator e em frascos agitados, empregando-se as condições otimizadas de pH e concentração inicial de células (modelo 134
- Figura 5.20** – Parâmetros fermentativos obtidos nas fermentações por *P. stipitis* realizadas em meio semissintético (MSS), em frascos agitados (FA) e em biorreator (BR), sendo empregadas as condições otimizadas de pH (6,5) e concentração inicial de células (5 g/L). (a): conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$); (b): produtividade volumétrica em etanol (Q_P) 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Potencial de produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas	30
Tabela 2.2 – Principais métodos utilizados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica	36
Tabela 2.3 – Composição química (% peso seco) do bagaço de male (BM)	41
Tabela 2.4 – Comparação dos ensaios fermentativos realizados em hidrolisados lignocelulósicos, empregando diferentes linhagens da levedura <i>Pichia stipitis</i> , visando à produção de etanol	50
Tabela 4.1 – Planejamento fatorial do tipo 2 ³ , com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação nutricional do HHBM na produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	61
Tabela 4.2 – Planejamento fatorial do tipo 2 ² com face centrada, com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células na produção de etanol a partir de <i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	63
Tabela 5.1 – Composição química do bagaço de malte obtido no processo cervejeiro	73
Tabela 5.2 – Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte original e concentrado três vezes	75
Tabela 5.3 – Planejamento fatorial do tipo 2 ³ , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de BM sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i>	79
Tabela 5.4 – Planejamento fatorial do tipo 2 ³ , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito da suplementação nutricional do HHBM sobre a conversão do substrato em etanol e em células, a produtividade em etanol e a velocidade de consumo de substrato, por <i>P. stipitis</i>	85
Tabela 5.5 – Parâmetros da fermentação por <i>P. stipitis</i> cultivada em meio semissintético e em hidrolisado de bagaço de malte, após 72 horas de fermentação	93
Tabela 5.6 – Planejamento fatorial do tipo 2 ² , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito do pH e da concentração inicial de células (X ₀) em hidrolisado hemicelulósico de BM sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol pela levedura <i>P. stipitis</i> , após 36 horas de fermentação	96

- Tabela 5.7** – Matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células sobre a fermentação do HHBM pela levedura *P. stipitis* 101
- Tabela 5.8** – Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de BM por *P. stipitis*, sob diferentes condições de pH (1) concentração inicial de células (2) 103
- Tabela 5.9** – Análise de variância de regressão para os modelos representativos da conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) 105
- Tabela 5.10** – Equações do modelo para otimização de pH e concentração inicial de células na fermentação do HHBM por *P. stipitis*, ajustados aos dados experimentais para o fator de conversão em etanol (Y_1) e produtividade volumétrica em etanol (Q_1) 105
- Tabela 5.11** - Parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios visando à confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de açúcares (glicose e xilose) em etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte 108
- Tabela 5.12** – Açúcares e principais compostos inibidores, dados em g/L, detectados durante o processo de destoxificação do HHBM 110
- Tabela 5.13** – Planejamento fatorial do tipo 2^2 , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito do pH e da concentração inicial de células (X_0) sobre a conversão do substrato em etanol pela levedura *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, após 48 horas de fermentação 113
- Tabela 5.14** – Matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células em HHBM destoxificado sobre a conversão de substrato a etanol e em células, a produtividade em etanol e a velocidade de consumo de substrato por *P. stipitis* 118
- Tabela 5.15** – Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, empregando a levedura *P. stipitis*, sob diferentes condições de pH (1) concentração inicial de células (2) 121
- Tabela 5.16** – Análise de variância de regressão para os modelos representativos da conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) em hidrolisado de bagaço de malte destoxificado 123

- Tabela 5.17** – Equações do modelo para otimização de pH e concentração inicial de células na fermentação do HHBM destoxificado, por *P. stipitis* ajustados aos dados experimentais para o fator de conversão do substrato (Y_2) e produtividade volumétrica em etanol (Q_2)
123
- Tabela 5.18** – Parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios visando à confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de açúcares (glicose e xilose) em etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado
126
- Tabela 5.19** – Parâmetros fermentativos obtidos na fermentação em meio semissintético pela levedura *P. stipitis*, empregando-se as condições dos modelos obtidos em hidrolisado não destoxificado (modelo 1) e destoxificado (modelo 2), na presença ou não de ácido acético
131
- Tabela 5.20** – Parâmetros fermentativos obtidos na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte não destoxificado pela levedura *P. stipitis*, sob as condições otimizadas de pH e concentração inicial de células em biorreator
135
- Tabela 5.21** – Fator de conversão do substrato ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) obtidos nas fermentações em frascos (meio semissintético e HHBM) e em biorreator (HHBM), por *P. stipitis*. Foram empregadas as condições de pH (6,4) e concentração inicial de células (5,0 g/L) otimizadas em HHBM
136

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Aproveitamento de biomassas visando à produção de etanol	25
2.1.1	Tendência global da produção de bioetanol	25
2.1.2	Materiais lignocelulósicos	29
2.1.3	Fracionamento de materiais lignocelulósicos	32
2.2	Bagaço de Malte: características e principais aplicações	40
2.3	Metabolismo de pentose em leveduras	44
2.3.1	Metabolismo de xilose	44
2.3.2	Microorganismos fermentadores de pentoses	46
2.3.3	<i>Pichia stipitis</i>	47
2.4	Fatores nutricionais e ambientais que interferem na bioconversão	50
3	OBJETIVOS	57
3.1	Objetivo geral	57
3.2	Objetivos específicos	57
4	MATERIAIS E MÉTODOS	58
4.1	Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte	58
4.2	Microorganismo e preparo do inóculo	58
4.3	Meio e condições de fermentação	59
4.3.1	Efeito da suplementação nutricional do HHBM na produção de etanol pela levedura <i>Pichia stipitis</i>	61
4.3.2	Efeito da concentração do extrato de levedura e do cultivo de <i>Pichia stipitis</i> em HHBM sobre a produção de etanol	62
4.3.3	Otimização do pH e da concentração inicial de células sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i> em HHBM não destoxificado	62

4.3.4 Otimização do pH e da concentração inicial de células sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i> em HHBM destoxificado	63
4.3.5 Efeito do ácido acético sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i> em meio semissintético	64
4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS	64
4.4.1 Determinação do teor de umidade	64
4.4.2 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina	64
4.4.3 Determinação do teor de cinzas	67
4.4.4 Determinação do teor de proteínas	67
4.4.5 Determinação da concentração celular	68
4.4.6 Determinação dos teores dos açúcares, de ácido acético e de etanol	68
4.4.7 Determinação dos teores de furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos	68
4.4.8 Determinação dos Teores de Compostos Fenólicos Totais	69
4.4.9 Determinação do pH	69
4.4.10 Determinação da Densidade	69
4.4.11 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	70
4.5 PARÂMETROS FERMENTATIVOS	70
4.5.1 Fator de Conversão (rendimento) de Substrato em Células: $Y_{X/S}$ (g/g):	71
4.5.2 Fator de Conversão de Substrato (rendimento) em Etanol: $Y_{P/S}$ (g/g):	71
4.5.3 Produtividade Volumétrica em Etanol: Q_P (g/L.h):	71
4.5.4 Eficiência de Fermentação	71
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	72
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 Caracterização do bagaço de malte e do hidrolisado hemicelulósico	73
5.2 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>	77
5.2.1 Análise estatística dos resultados	86
5.3 Efeito da concentração do extrato de levedura e do pré-cultivo de <i>Pichia stipitis</i> em HHBM sobre a produção de etanol.	88

5.4 Otimização das condições de pH e concentração de células sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>, em HHBM não destoxificado	94
5.4.1 Análise estatística do Planejamento Fatorial Composto 2 ² com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células.	102
5.4.2 Confirmação experimental das condições otimizadas	107
5.5 Otimização das condições de pH e concentração inicial de células visando à produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>, em HHBM destoxificado	109
5.5.1 Análise estatística do planejamento fatorial 2 ² composto com face centrada, para otimização do pH e da concentração inicial de células, a partir do HHBM destoxificado.	120
5.5.2 Confirmação dos Modelos Obtidos	125
5.6 Efeito do ácido acético sobre a produção de etanol por <i>Pichia stipitis</i>, em meio semissintético	128
5.7 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte pela levedura <i>Pichia stipitis</i> em biorreator	133
6 CONCLUSÕES	139
REFERÊNCIAS	141

1 INTRODUÇÃO

Na década de 70, a crise mundial do petróleo motivou a busca por fontes energéticas renováveis e alternativas, visando diminuir o consumo de petróleo. Em resposta à crise foi criado o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), que deu origem atualmente ao maior sistema de produção de energia comercial a partir de biomassa do mundo, levando à substituição de cerca de 40% da gasolina por etanol. Desse modo, o Brasil tornou-se pioneiro no desenvolvimento de tecnologia para automóveis movidos a álcool hidratado, sendo o PROÁLCOOL ainda hoje, referência mundial.

Atualmente as principais matérias primas utilizadas para a produção de etanol são a cana de açúcar (Brasil) e o milho (EUA), mas devido à ampla utilização destes produtos para alimentação, há um crescente interesse por novas alternativas para a produção de etanol. O interesse pela produção de etanol a partir de diferentes biomassas tem aumentado sendo os materiais lignocelulósicos grande alvo de pesquisas nessa área. Estes materiais representam uma abundante fonte de energia em todo o mundo, estando disponíveis na forma de resíduos agrícolas e florestais. Assim, o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem uma conversão eficiente de tais resíduos torna-se necessário, bem como processos de destoxificação de hidrolisados lignocelulósicos que sejam capazes de retirar seletivamente os inibidores gerados durante o pré-tratamento ou ainda estratégias nutricionais e condições do processo que possam minimizar a presença destes inibidores diminuindo assim, o tempo gasto e o custo gerado pelo emprego dos processos de destoxificação.

Neste trabalho foi avaliado o potencial para a produção de etanol, de um dos maiores subprodutos da indústria cervejeira, o bagaço de malte, obtido a partir a produção da cerveja, e que é destinado praticamente à alimentação animal. O hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte foi utilizado como meio de fermentação para a conversão dos açúcares presentes em etanol, pela levedura *Pichia stipitis*. Alguns aspectos importantes para a bioconversão dos hidrolisados visando eficientes conversão e produtividade em etanol foram estudados, como a suplementação nutricional, pH e concentração inicial de células, uma vez que sob o ponto de vista industrial, a otimização dos níveis dos nutrientes pode representar uma redução no custo de formulação do meio e maior

simplicidade do processo fermentativo. Do mesmo modo que pH e concentração inicial de células são fatores determinantes para o processo e podem contribuir para diminuir ou eliminar as etapas dos processos de destoxificação. O presente estudo está inserido no programa de pesquisas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), que apresenta como objetivo o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de matérias-primas lignocelulósicas, especialmente resíduos agro-indústriais visando à produção de materiais de alto valor agregado por via biotecnológica.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aproveitamento de biomassas visando à produção de etanol

2.1.1 *Tendência global da produção de bioetanol*

O consumo mundial de energia vem aumentando em ritmos cada vez maiores e o mundo presencia o esgotamento progressivo de seus recursos energéticos baseados em energia não renovável. Além disso, este consumo gera grandes quantidades de gases na atmosfera aumentando os níveis de poluição ambiental, com conseqüente aquecimento global (MOHAN et al., 2008). De acordo com Wildeborg e Lokhorst (2005), a queima de combustíveis fósseis é responsável por cerca de 73% do CO₂ produzido.

Desse modo, o interesse em biocombustíveis está crescendo no mundo todo e alguns países têm lançado medidas visando diminuir a poluição através da redução da dependência do uso do petróleo como combustível e da emissão de gases do efeito estufa. Biocombustíveis são importantes porque podem substituir o petróleo gerando uma série de benefícios econômicos, como a produção para uso interno e exportação para outros países e, ambientais (BALAT; BALAT, 2009).

O biocombustível possui origem biológica, não fóssil e normalmente é produzido a partir de uma ou mais plantas. Todo material gera energia, mas o biocombustível é fabricado em escala comercial a partir de produtos agrícolas como a cana de açúcar, mamona, soja, canola, babaçu, mandioca, milho, beterraba, entre outros. Desse modo, tem-se que combustíveis tais como biodiesel e bioetanol são tipos de biocombustível.

Como recurso renovável, a maior vantagem do uso de biocombustíveis é a redução da emissão de CO₂ por automóveis, pois o fato do bioetanol ser produzido a partir de matéria-prima de origem vegetal faz com que este gás seja reciclado pelas plantas (Figura 2.1).

Atualmente, o etanol (C₂H₅OH ou EtOH) é o biocombustível mais amplamente utilizado em veículos, podendo ser usado diretamente como combustível ou misturado à gasolina, elevando seu conteúdo de oxigênio e conseqüentemente permitindo uma maior combustão da mesma, além de

diminuir a emissão de gases poluentes (WANG et al., 1999; DERMIBAS, 2005). O bioetanol é comumente utilizado em uma mistura conhecida como E10 (10% de etanol e 90% de gasolina), entretanto existem variações entre os diferentes países. Nos Estados Unidos, a mistura varia de 10 a 15% de etanol adicionados a 90 e 85% de gasolina, respectivamente e entre os países membros da União Européia observa-se uma porcentagem de etanol adicionado à gasolina, que vai de 5% a 15% (DERMIBAS, 2007). No Brasil, utiliza-se uma mistura conhecida como “gasool” que consiste de 25% de etanol e 75% de gasolina, sendo que o etanol utilizado é anidro com menos de 1% de água. Esta mistura é obrigatória no Brasil e foi fixada entre 20 a 25% de álcool misturado com gasolina convencional (LEI nº 8.723, 1993) e desde julho de 2007, esta é a mistura utilizada (E25) (PORTARIA nº 143, 2007). Os veículos “flex” do mercado brasileiro utilizam E25 ou qualquer mistura com etanol até E100 (etanol hidratado com até 4,9% de água). A mistura E100 é utilizada somente no Brasil (ANP, 2005).

Figura 2.1. Ciclo do carbono e conversão da energia solar (Adaptado de RFA, 2008).

Segundo Dufey (2006), cerca de 60% da produção mundial de bioetanol é feita a partir da cana de açúcar e 40% de outros resíduos. Os Estados Unidos e o Brasil são os líderes em produção, a partir do milho e da cana de açúcar, respectivamente, e juntos são responsáveis por cerca de 70% do bioetanol produzido no mundo todo (Figura 2.2). De acordo com a Energy Independence and Security Act (EISA) dos Estados Unidos, a perspectiva em relação à produção de biocombustível para 2022 é de cerca de 36 bilhões de galões, sendo que 21 bilhões devem ser derivados de recursos sustentáveis, tais como materiais lignocelulósicos. Visando alcançar este objetivo torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias de custo efetivo e capazes de promover uma bioconversão eficiente.

Figura 2.2. Principais países produtores de etanol (Modificado a partir de RFA (*Renewable Fuels Association*) 2008 e 2010).

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol e o maior exportador mundial, sendo considerado o líder internacional em matéria de biocombustíveis e a primeira economia a ter atingido o uso sustentável dos combustíveis (USDA, 2009). 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). O papel do Brasil na história da produção de biocombustível teve início em 1975 com o Programa Nacional para a Produção de Álcool – PROÁLCOL, um programa bem sucedido que teve como objetivo a substituição dos derivados de petróleo. Foi desenvolvido para evitar o aumento da dependência externa de divisas quando dos choques de preço de petróleo (PROÁLCOL, 2009). Em 1984 grande parte dos carros produzidos no Brasil exigia o etanol hidratado [(96 bioetanol + 4 água)/100] como combustível (KLINE et al., 2008) e, em 1993, o governo determinou que toda gasolina produzida no Brasil deveria conter 20-25% de etanol (MARTINES-FILHO et al., 2006). Entre 1999 aumentaram-se os incentivos privados para a produção de bioetanol, ao mesmo tempo em que a intervenção do governo diminuiu e, em 2000, a grande difusão de automóveis *flex* juntamente com o aumento do preço do petróleo, culminou num rápido aumento na produção de cana-de-açúcar e, conseqüentemente, de bioetanol (KLINE et al., 2008). De 1975 a 2000, foram fabricados cerca de 5,6 milhões de veículos a álcool hidratado. Adicionalmente, o Programa substituiu por uma fração de álcool anidro (entre 1,1% a 25%), um volume de gasolina pura consumida por uma frota superior a 10 milhões de veículos a gasolina, evitando nesse período, emissões de gás carbônico da ordem de 110 milhões de toneladas, além da importação de aproximadamente 550 milhões de barris de petróleo. Com isso, ocorreu uma economia de divisas da ordem de 11,5 bilhões de dólares (PROÁLCOL, 2009).

Em março de 2007, Brasil e Estados Unidos assinaram um memorando (MOU-*Memorandum of Understanding*) cujo objetivo foi o avanço bilateral em pesquisas e desenvolvimento tecnológico, incentivar a construção de indústrias em países em desenvolvimento e incentivar e possibilitar o uso dos biocombustíveis no mundo. Desde janeiro de 2012 o combustível brasileiro tem acesso livre ao mercado dos EUA, pela primeira vez em três décadas, entretanto segundo a ÚNICA (ÚNICA, 2012), o mercado brasileiro demorará a sentir os efeitos positivos devido à queda da produção interna do etanol.

De acordo com Balat e Balat, (2009) mais de 80% dos automóveis fabricados no país são capazes de utilizar combustível *flex*, contra 30% em 2004 (BALAT e BALAT, 2009). Entretanto, em 2011 ocorreu a primeira redução nas vendas destes veículos devido ao aumento do preço do etanol hidratado. Além

disso, no mesmo ano, a produção deste combustível foi reduzida em 30% e, com menos oferta do produto, o preço do combustível nos postos foi elevado tornando-se menos vantajoso para o consumidor, que voltou a utilizar a gasolina (BIOCANA, 2012). De acordo com a União da Indústria de Cana-de-açúcar (ÚNICA, 2012), este quadro decorre dos baixos investimentos nos canaviais a partir de 2008 devido à crise financeira que atingiu um terço do setor, juntamente com os grandes problemas climáticos em termos de seca e geada no país. Adicionalmente, a valorização do açúcar no mercado internacional, responsável pelo aumento de cerca de US\$ 1 bilhão arrecadados com a exportação do produto entre 2010 e 2011, e o aumento da produção do etanol anidro, adicionado à gasolina, contribuíram com este quadro. Segundo o Ministério de Minas e Energia (MME), como o etanol somente no fim de 2010 passou a ser classificado como combustível, agora será exigido dos empresários a estocagem do etanol visando evitar que a falta do produto pressione ainda mais os preços. Entretanto, esta regra só vale para o etanol anidro, portanto o etanol hidratado continua sem uma política que garanta uma oferta constante a um preço que compense utilizá-lo ao invés da gasolina. Desse modo, é evidente que o país precisa investir no etanol hidratado se quiser tornar o custo-benefício atrativo novamente.

2.1.2 Materiais lignocelulósicos

Tendo em vista que a relação custo-benefício é um fator importante para a produção em grande escala do bioetanol e que a produção deste combustível a partir de resíduos agrícolas elimina a concorrência existente entre alimento *versus* combustível (produzido a partir da cana-de-açúcar e/ou do milho), tem-se que os resíduos lignocelulósicos representam uma alternativa de baixo custo e prontamente disponível para tal finalidade (SARKAR et al., 2012). De acordo com Kim e Dale, (2004), estima-se que cerca de 442 milhões de litros de etanol podem ser produzidos a partir da biomassa lignocelulósica gerada e ainda que, resíduos agrícolas desperdiçados poderiam gerar cerca de 491 milhões de litros de etanol por ano.

Os materiais lignocelulósicos são formados de três diferentes polímeros chamados celulose, hemicelulose e lignina, que se apresentam em associação na matéria-prima (Figura 2.3).

Figura 2.3. Estrutura da parede celular dos vegetais mostrando o arranjo das macrofibrilas de celulose, cadeias de hemicelulose e de lignina, além de monossacarídeos presentes nestas estruturas (Adaptado de RUBIN, 2008)

Tabela 2.1. Potencial de produção de bioetanol a partir de diferentes matérias-primas.

Matéria prima	Potencial para produção de bioetanol (L/ton)
Cana-de-açúcar	70
Beterraba	110
Batata doce	125
Batata	110
Mandioca	180
Milho	360
Arroz	430
Cevada	250
Trigo	340
Sorgo	60
Bagaço e outros resíduos lignocelulósicos	280

A celulose é formada por subunidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e consiste de uma estrutura cristalina organizada. (FENGEL; WEGENER, 1984). A hemicelulose é uma complexa estrutura de carboidratos que consiste de diferentes pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e açúcares ácidos. O componente que predomina na hemicelulose de “madeiras duras” e plantas agrícolas é a xilana, enquanto a glucomanana é predominante em “madeiras porosas”. A hemicelulose tem menor massa molar que a celulose e ramificações que consistem de diferentes açúcares, os quais são facilmente hidrolisáveis (FENGEL; WEGENER, 1984). Segundo Laureano-Perez et al. (2005) a hemicelulose faz a conexão entre as fibras de celulose e lignina, conferindo maior rigidez ao material.

A lignina, após a celulose e hemicelulose, é o polímero mais abundante na natureza e está presente por toda a célula. A lignina é um heteropolímero amorfo formado por três unidades diferentes de fenilpropano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) unidas por diferentes tipos de ligações (FENGEL; WEGENER, 1984). A principal função da lignina é dar suporte estrutural à planta e proteger contra o ataque de microorganismos e estresse oxidativo.

A relevância da biomassa lignocelulósica para a produção de etanol é evidente. Os materiais lignocelulósicos são os biopolímeros mais abundantes da Terra, compreendendo cerca de 50% da biomassa mundial e sua produção anual foi estimada em 10-50 bilhões de toneladas (CLASSEN et al., 1999). De acordo com Sánchez e Cardona (2008) muitos materiais lignocelulósicos têm sido testados para a produção de etanol e incluem resíduos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar e milho, palha de trigo e arroz, casca de cevada, bagaço de sorgo e polpa de oliveira), madeiras, papel reciclado, biomassa herbácea (alfafa e capim) entre outros. A Tabela 2.1 apresenta uma comparação do potencial de matérias-primas lignocelulósicas quando comparado a outros recursos de origem sacarínea e amilácea (KUMAR et al., 2006).

Os principais recursos utilizados para a produção de bioetanol podem ser divididos em três categorias: substratos sacaríneos solúveis como cana-de-açúcar, beterraba, frutas e sorgo; polissacarídeos insolúveis de natureza amilácea como milho, trigo, arroz, batata, mandioca, cevada, entre outros; e biomassa lignocelulósica como madeira, palha e bagaço de diferentes materiais (BALAT; BALAT, 2009). Conforme dados apresentados na Tabela 2.1, a biomassa

lignocelulósica representa um recurso promissor para a produção de etanol. A sua disponibilidade, baixo custo e a ampla variedade de materiais lignocelulósicos oferece muitas possibilidades para o desenvolvimento de bioindústrias que podem contribuir para o crescimento do mercado de biocombustível e para a redução de gases poluentes no mundo todo.

2.1.3 Fracionamento de materiais lignocelulósicos

A utilização de materiais lignocelulósicos para fins biotecnológicos requer uma separação seletiva de seus componentes. De acordo com Sánchez e Cardona (2008), a produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica requer o pré-tratamento e a hidrólise da matéria-prima. Durante o pré-tratamento, a matriz de celulose e lignina (ligada por cadeias de hemicelulose) deve ser rompida visando diminuir a cristalinidade e aumentar a fração amorfa da celulose, deixando-a mais adequada para posterior hidrólise enzimática. Além disso, a maior parte da hemicelulose se hidrolisa durante este processo e a lignina é liberada ou degradada. Posteriormente, a celulose liberada é submetida à hidrólise com enzimas específicas obtendo-se uma solução de açúcares fermentescíveis contendo principalmente glicose, assim como pentoses resultantes da hidrólise inicial da hemicelulose (SÁNCHEZ; CARDONA, 2005). Microorganismos são então empregados para converter os diferentes açúcares presentes no material lignocelulósico pré-tratado e hidrolisado. Geralmente *Saccharomyces cerevisiae* é empregado na fermentação da glicose, enquanto a xilose é usualmente metabolizada por leveduras como *Pichia stipitis* (*P. stipitis*).

A Figura 2.4 apresenta um esquema simplificado do fracionamento de biomassa lignocelulósica visando à produção de bioetanol. Processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos têm sido desenvolvidos para promover a separação ou fracionamento dos materiais lignocelulósicos. Os métodos físicos têm por objetivo reduzir o tamanho da matéria-prima e podem ser realizados através da cominuição da mesma, levando à redução da cristalinidade da celulose para posteriormente facilitar o acesso das enzimas celulasas sob a superfície da biomassa. A energia necessária para a fragmentação mecânica dos materiais lignocelulósicos depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa (GOSH; GHOSE, 2003). Outro método físico que tem sido testado é a

pirólise, entretanto, vale ressaltar que a celulose decompõe rapidamente quando submetida a temperaturas superiores a 300°C, liberando produtos gasosos e resíduos de carvão (SHAFIZADEH; BRADBURY, 1979). Por outro lado, a decomposição e liberação de produtos voláteis são muito menores quando se utiliza temperaturas mais baixas.

Figura 2.4. Produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica (Adaptado de RFA, 2008).

Os métodos físico-químicos são considerados mais eficazes que os métodos físicos. A autohidrólise ou explosão a vapor é o método físico-químico mais utilizado para o tratamento da biomassa lignocelulósica (McMILLAN, 1994) e onde a biomassa é primeiramente submetida à alta pressão seguida por uma rápida redução da mesma, levando a reações de autohidrólise e como consequência parte da hemicelulose e da lignina são convertidas em oligômeros solúveis (SHAHBAZI et al., 2005). De acordo com Laser et al. (2002), um dos mais promissores tratamentos físico-químicos é conhecido como termohidrólise

(LHW-*Liquid Hot Water*) e, quando realizado sob condições ideais (geralmente 210°C por 4 minutos) apresenta rendimentos comparáveis aos da hidrólise com ácido diluído, com a vantagem de não utilizar ácido. Outro método físico-químico também citado na literatura é a explosão com amônia, que consiste na exposição da biomassa a amônia líquida sob altas temperaturas e pressão, por um determinado período de tempo, quando então a pressão é rapidamente reduzida. O fundamento deste método é o mesmo da explosão a vapor e da explosão com CO₂, entretanto a explosão com CO₂ apresenta rendimentos mais baixos (SUN; CHENG, 2002).

Os pré-tratamentos químicos utilizam diferentes agentes químicos como ozônio, ácidos, bases, peróxido e solventes orgânicos. A ozonólise tem como agente químico o ozônio e utiliza temperatura e pressão ambientes, resultando principalmente na degradação da lignina, podendo ser utilizada para o tratamento de palha de trigo, bagaço entre outros (SUN; CHENG, 2002). Os ácidos inorgânicos, como H₂SO₄ e HCl têm sido preferencialmente utilizados para o tratamento da biomassa lignocelulósica. Os métodos de pré-tratamento com ácido concentrado possibilitam a hidrólise eficiente da celulose, entretanto são tóxicos, corrosivos e necessitam de reatores resistentes à corrosão (SILVERS; ZACCHI, 1995). Por outro lado, os métodos que utilizam ácido diluído têm sido amplamente utilizados e podem ser realizados sob duas condições diferentes: altas temperaturas (> que 160°C), favorecendo a hidrólise da celulose (McMILLAN, 1994) e temperaturas mais baixas (< que 160°C). A utilização de temperaturas baixas (121°C) evita a degradação de hexoses e pentoses em furfural e hidroximetilfurfural (HMF), respectivamente (SAHA et al., 2005a e b). De acordo com Mussatto e Roberto (2005b), na hidrólise da biomassa lignocelulósica com ácido diluído, o ácido libera os prótons que rompem as ligações éter entre os açúcares existentes na cadeia polimérica, formada por celulose e hemicelulose. Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), dentre os métodos descritos na literatura, a hidrólise com ácido diluído é o método mais utilizado para a separação da hemicelulose, pois devido à sua estrutura ramificada e grau de cristalinidade inferior ao da celulose, as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-xilose são menos estáveis do que as ligações entre os monômeros de D-glicose na celulose. Desse modo, as pentoses são mais facilmente extraídas da hemicelulose através desta técnica, onde geralmente utiliza-se ácidos como HCl

ou H_2SO_4 sob temperaturas de 120°C a 200°C. Mussatto e Roberto (2005a) utilizando o bagaço de malte proveniente da indústria cervejeira, estudaram as condições de hidrólise com ácido diluído variando a concentração de ácido (8-12 g/g), matéria seca (100-140 mg/g) e tempo de reação (17-37 min), e observaram que em 17 minutos, 100 mg de H_2SO_4 /g de matéria seca e sob temperatura de 120°C houve uma eficiente recuperação de açúcares (92,7%).

Outro tipo de pré-tratamento químico é a hidrólise alcalina, que utiliza bases diluídas (NaOH) para tratar a biomassa lignocelulósica e tem por objetivo aumentar a superfície interna da mesma, diminuir a polimerização e a cristalinidade da celulose e destruir as ligações entre a lignina e outros polímeros. A eficácia deste método depende do conteúdo de lignina presente na biomassa (SUN; CHENG, 2002).

A deslignificação oxidativa é um método que resulta na biodegradação da lignina catalisada pela enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar utilizando esta técnica resultou na solubilização de cerca de 50% da lignina e de quase toda a hemicelulose, utilizando-se 2% de H_2O_2 , a 30°C e no período de 8 horas (AZZAM, 1989). Além disso, a suscetibilidade da biomassa à hidrólise enzimática aumentou consideravelmente.

O processo conhecido como “organosolv” utiliza uma mistura de solvente orgânico ou aquoso (metanol, etanol, acetona, entre outros) com ácido inorgânico (comumente H_2SO_4 ou HCl) como catalisador e, é usado para quebrar ligações internas da lignina e hemicelulose (LYND et al., 1999).

De acordo com Sánchez e Cardona (2008), os tratamentos biológicos requerem baixa energia e condições amenas, entretanto a maioria dos processos utilizados apresenta uma taxa de hidrólise muito baixa. O pré-tratamento utiliza fungos produtores de enzimas que degradam a lignina da biomassa, como *Pleurotus ostreatus*. Khyami et al. (2005) relataram a utilização uma cultura de células de *Pseudomonas putida* e *Streptomyces setonii* para destoxificar uma solução diluída de palha de milho.

Os principais métodos de pré-tratamento estão sumarizados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2. Principais métodos utilizados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Método	Procedimento	Observações	Exemplo de biomassa	Referências
<u>Pré-tratamentos físicos</u>				
Cominuição mecânica	Trituração e moagem. Moinho vibratório ou de facas (0,2-6,0 mm)	Reduz o tamanho das partículas e a cristalinidade da biomassa. A eficiência depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa.	Madeira compacta, palha, bagaço de cana de açúcar, alfafa	Sun; Cheng (2002); Cadoche; López (1989)
Pirólise	T>300°C ou a vácuo (400 °C, p=1mm Hg, 20 min)	Formação de produtos voláteis e carvão. Os resíduos da pirólise podem ser submetidos à hidrólise ácida branda (1N H ₂ SO ₄ , 2,5h, T=97°C) para produzir 80-85% de açúcares (>50% de glicose).	Madeira porosa, resíduos de algodão, palha de milho	Khiyami et al. (2005); Sun; Cheng (2002)
<u>Pré-tratamentos físico-químicos</u>				
Explosão a vapor	Vapor saturado (160-290 °C) e pressão de 0,69-4,85 MPa por vários seg ou min.	Altas concentrações de sólidos. Recuperação de 80-100% da hemicelulose, com destruição de parte da xilose obtida (35-55%). Formação de inibidores. Menor gasto energético e redução das fibras quando comparado ao tratamento mecânico.	Bagaço, palha de arroz, palha de trigo, cevada	Persson et al. (2009); Duarte et al. (2008); Carvalheiro et al. (2004); Sun; Cheng (2002)

Tabela 2.2. Principais métodos utilizados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Método	Procedimento	Observações	Exemplo de biomassa	Referências
Termohidrólise	Água quente pressurizada (170-230°C) por 1-46 min	Concentração de sólido <20%. Ocorre certa despolimerização da celulose. Recuperação de 80-100% da hemicelulose com >50% de oligômeros. Solubilização parcial da lignina (20-50%). Formação de inibidores.	Bagaço de cana de açúcar	Lynd (1996); Laser et al. (2002)
Explosão com amônia	Relação amônia:matéria seca de 1-2:1(Kg/Kg), 90°C, 30 min	Não é muito eficiente para biomassa com alto teor de lignina (conversão da celulose <50%). Recuperação de até 60% de hemicelulose (>90% de oligômeros). Formação de inibidores.	Palha de trigo e cevada, casca de arroz, resíduos sólidos urbanos, alfafa, bagaço	Ko et al. (2009); Sun; Cheng (2002)
Explosão com CO₂	Relação CO ₂ : fibra de 4:1(Kg/Kg); p=5,62MPa	Conversão da glicose durante a hidrólise da celulose pode ser >75%. Baixa formação de inibidores.	Bagaço de cana de açúcar, alfafa, papel reciclado	Sun; Cheng (2002)

(Continuação)

Tabela 2.2. Principais métodos utilizados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Método	Procedimento	Observações	Exemplos de biomassa	Referências
<u>Pré-tratamentos químicos</u>				
Ozonólise	Ozônio, temperatura e pressão ambientes	Degradação da lignina. Conversão da celulose durante a hidrólise pode ser >57%. Baixa formação de inibidores.	Palha de trigo, bagaço, <i>Pinus</i> , palha de algodão	Sun; Cheng (2002)
Hidrólise com ácido concentrado	H ₂ SO ₄ 10-30%, 170-190°C, proporção de 1:1,6 sólido/líquido	A recuperação do ácido é necessária. Eficiente para a hidrólise da celulose. O ácido concentrado é tóxico, perigoso e corrosivo.	Serragem de álamo, bagaço de cana de açúcar	Cuzens; Miller (1997); Teixeira et al. (1999)
Hidrólise com ácido diluído	H ₂ SO ₄ , HCl ou HNO ₃ 0,75-5%, p~1 MPa, baixas concentrações de sólidos (5-10%), 160-200°C; processo em batelada para altas concentrações de sólidos (10-40%), 120-160°C	Recuperação de 80%-100% da hemicelulose, com solubilização de 75-90% de xilose. Altas temperaturas favorecem a posterior hidrólise da celulose. A lignina é parcialmente solubilizada.	Serragem, bagaço, palhada de milho, centeio, palha de trigo, bagaço de malte, palha de arroz	Xiros; Christakopoulos (2009); Purwadi; Taherzadeh (2008); White; Yohannan; Walker (2008); Mussatto; Roberto (2005 a e b); Mussatto; Roberto (2004); Sun; Cheng (2002)

(Continuação)

Tabela 2.2. Principais métodos utilizados para pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.

Método	Procedimento	Observações	Exemplos de Biomassa	Referências
Hidrólise alcalina	NaOH diluído, 24 h, 60°C; Ca(OH) ₂ , 4 h, 120°C; pode ser complementada pela adição de H ₂ O ₂ (0,5-2,15 % vol), 35°C	Recuperação da hemicelulose >50% e solubilização de 60-75% de xilose. Baixa formação de inibidores. 24-55% da lignina removida de madeiras compactas e quase nenhum efeito em madeiras porosas	Madeira compacta, palhada de milho, palha com baixo conteúdo de lignina (10-18%), bagaço de cana de açúcar	Saha; Cotta (2009); Fukuda et al. (2009); Mussatto; Roberto (2007), Sun; Cheng (2002)
Solventes orgânicos	Solventes orgânicos (etanol, metanol, acetona, etilenoglicol, trietilenoglicol) ou sua mistura com 1% de H ₂ SO ₄ ou HCl; 185-198°C, 30-60 min, pH=2,0-3,4	Recuperação quase completa da lignina e da hemicelulose com altos rendimentos de xilose. Necessidade de remoção do solvente do sistema.	Serragem de madeira compacta	Lynd et al. (2002); Sun; Cheng (2002)
<u>Pré-tratamentos biológicos</u>				
Utilização de fungos	Fungos de decomposição branca, marrom e branda (<i>soft rot</i>); decomposição das frações orgânicas	As enzimas produzidas degradam a celulose, hemicelulose e/ou lignina. Processo muito lento.	Palha de trigo, palha de milho	Sun; Cheng (2002)

Adaptado de Sánchez e Cardona, (2008).

(final)

2.2 Bagaço de Malte: características e principais aplicações

O bagaço de malte (BM) é uma biomassa rica em fibras e proteínas e pode ser considerada uma grande fonte de açúcares para a produção de etanol. De acordo com White, Yohannan e Walker (2008) o processo de bioconversão do BM representa uma valiosa contribuição para a produção de biocombustíveis de segunda geração. Ao contrário dos biocombustíveis de primeira geração, ou seja, aqueles que são produzidos a partir de matérias vegetais oriundas da agricultura (milho, trigo, girassol entre outros), os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de fibras vegetais como a celulose e a hemicelulose presentes na madeira e outras partes não comestíveis dos vegetais, e desse modo não entram em concorrência com culturas alimentícias.

O BM consiste basicamente da casca do grão de cevada obtida após a elaboração do mosto cervejeiro (Figura 2.5).

Figura 2.5. Representação esquemática da produção de bagaço de malte (MUSSATTO et al., 2006).

Após o processo de maltagem (obtenção do malte a partir da cevada), a primeira etapa da produção de cerveja consiste na moagem do malte, visando facilitar sua dissolução na água pela redução de tamanho, e consequentemente aumento da superfície de contato. Posteriormente é realizado o processo de mosturação, que consiste na solubilização do malte moído à água sob diferentes temperaturas, para que possam ocorrer processos enzimáticos, como a conversão do amido em açúcares fermentáveis (maltose e maltotriose) e não-fermentáveis (dextrinas). Ao final do processo, realiza-se uma filtração, onde a fração líquida, denominada mosto, é utilizada como substrato para o crescimento de leveduras, visando à produção de cerveja. A fração sólida consiste no bagaço de malte produzido a partir da cevada. O bagaço é constituído essencialmente pela casca do malte e atua como coadjuvante na filtração com peneiras, sendo a parte do resíduo que não é solúvel pelas enzimas e que apresenta em grande parte de sua constituição, proteínas e fibras (HOUGH, 1996). A Figura 2.5 apresenta um esquema da produção do bagaço de malte, adaptada de Mussatto et al. (2006).

A composição química do bagaço de malte pode variar de acordo com o tipo de cevada utilizada e o tempo de colheita, condições de malteação e mosturação a que esta foi submetida e o tipo de adjuntos como arroz e milho, adicionados ao processo cervejeiro (HUIGE, 1994; SANTOS et al., 2003). A Tabela 2.3 mostra a composição química do bagaço de malte.

Tabela 2.3. Composição química (% peso seco) do bagaço de malte (BM).

Componentes	BM¹	BM²	BM³
<i>Celulose</i>	25,4	16,8	21,2
<i>Arabinoxilana</i>	21,8	28,4	29,6
<i>Lignina</i>	11,9	27,8	22,2
<i>Proteína</i>	24,0	15,2	24,6
<i>Cinzas</i>	2,4	4,6	1,1
<i>Lipídeos</i>	10,6	nd	nd

¹ Kanauchi et al. (2001); ² Mussatto & Roberto, (2005a); ³ Duarte et al. (2008)

De acordo com Huige (1994), minerais e vitaminas são usualmente encontrados no bagaço de malte. Os minerais aparecem geralmente em concentrações abaixo de 0,5% e incluem alumínio, bário, cálcio, cromo, cobalto, ferro, magnésio, manganês, fósforo, potássio, selênio, sílica, sódio, cobre, enxofre e zinco. Entre as vitaminas estão a biotina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina e piridoxina.

O bagaço de malte é considerado o subproduto mais importante proveniente da indústria cervejeira (WHITE; YOHANNAN; WALKER, 2008). Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, em 2010 o Brasil alcançou o terceiro lugar no ranking mundial de produção de cerveja, com 12,6 bilhões de litros por ano, estando atrás em volume apenas da China (40,0 bilhões de litros/ano) e Estados Unidos (35,0 bilhões de litros/ano). Considerando que são gerados 20 kg de bagaço de malte a cada 100 litros de cerveja produzida (REINOLD, 1997), é possível estimar que em 2010 foram produzidos cerca de 2,0 milhões de toneladas de bagaço de malte no Brasil.

O uso do bagaço de malte tem sido limitado principalmente à alimentação animal devido ao seu elevado teor de proteínas e fibras (REINOLD, 1997). Devido ao seu relativo baixo custo e alto valor nutritivo, a adição do bagaço de malte na alimentação humana (pães, biscoitos e petiscos) tem sido bastante estudada (SANTOS et al., 2003; BARTOLOMÉ et al., 2002; ÖZTÜRK et al., 2002). Apesar da ampla possibilidade de aplicações, o aproveitamento do bagaço de malte ainda é muito limitado, e desse modo, há um grande interesse no desenvolvimento de novas técnicas de aproveitamento do bagaço de malte, visto que este é produzido em grande quantidade o ano todo.

Alguns autores têm relatado o emprego do bagaço de malte em processos biotecnológicos como substrato para o cultivo de micro-organismos ou para a produção de enzimas. Wang et al. (2001) encontraram uma boa eficiência biológica e valor nutricional do fungo *Pleurotus ostreatus* quando cultivado em bagaço de malte. Segundo estes autores, o bagaço de malte é um dos melhores substratos para cultivo desta espécie de fungo e isto se deve tanto ao elevado teor de proteínas e umidade, como às suas propriedades físicas incluindo tamanho da partícula, densidade, porosidade e capacidade de retenção de água. Brányink et al. (2001, 2002) e Kopsahelis, Kanellaki e Bekatorou (2007) utilizaram o bagaço de malte como suporte para a imobilização das leveduras no processo

de produção de cerveja e consideraram o bagaço de malte uma alternativa promissora para imobilização de leveduras quando comparado a outros materiais normalmente empregados como suporte, apresentando ainda vantagens sob o ponto de vista econômico e simplicidade de preparação.

O emprego do bagaço de malte visando a obtenção de compostos de interesse comercial foi relatado por Carvalheiro et al. (2004). Esses autores obtiveram uma mistura de oligossacarídeos com diferentes pesos moleculares após submeter o bagaço de malte ao processo de autohidrólise sob temperaturas de 150, 170 e 190°C.

De acordo com Xiros e Christakopoulos (2009) a presença de um sistema enzimático lignocelulósico eficiente é essencial para a bioconversão da biomassa lignocelulósica. Esses autores obtiveram uma produção eficiente de enzimas celulolíticas e xilanolíticas pelo fungo *Fusarium oxysporum* em meio cultivo submerso utilizando como substrato proporções iguais de bagaço de malte e sabugo de milho.

A utilização do bagaço de malte como fonte de carbono em processos de bioconversão também tem sido relatada na literatura. Mussatto et al. (2007), visando a produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii*, utilizou hidrolisado celulósico de bagaço de malte sem adição de nutrientes e obteve um fator de conversão de substrato em etanol de 0,73 g/g. A utilização da fração hemicelulósica (rica em xilose) do bagaço de malte para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* foi avaliada por Mussatto et al. (2005). Esses autores compararam a produção de xilitol em meio semi-sintético (sem compostos tóxicos e com as mesmas concentrações de açúcares presentes no hidrolisado), em hidrolisado diluído e em hidrolisado concentrado, observando que o hidrolisado de bagaço de malte apresenta grande potencial como substrato para a produção de xilitol, visto que foram obtidos altos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , 0,65 g/g e 0,38 g/L.h, respectivamente.

Como matéria-prima para a produção de etanol, o bagaço de malte tem sido relativamente pouco estudado. Segundo White, Yohannan e Walker (2008), o bagaço de malte é uma biomassa lignocelulósica promissora para a produção de bioetanol. O hidrolisado celulósico do bagaço de malte foi utilizado por estes autores como meio de fermentação, sob condições não otimizadas, por *P. stipitis* e *Kluyveromyces marxianus* e apresentou um rendimento de 0,32 e 0,23 g/g,

respectivamente. A produção de etanol a partir do hidrolisado celulósico de bagaço de malte pelo fungo *Fusarium oxysporum* foi avaliada utilizando-se o hidrolisado submetido à hidrólise alcalina resultando em 65 g de etanol/g de matéria seca sob condições microaeróbias (XIROS et al., 2008). Esses autores concluíram que o baixo custo desta biomassa juntamente com o alto conteúdo de pentose apresentado (82,5% de xilose no hidrolisado pré-tratado) torna o bagaço de malte uma matéria-prima promissora para a produção de bioetanol, especialmente quando são empregados microorganismos fermentadores de xilose.

2.3 Metabolismo de pentose em leveduras

2.3.1 Metabolismo de xilose

Diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de pentoses, pela compreensão e otimização das condições empregadas e pelos diferentes micro-organismos utilizados. A transformação de açúcares em etanol e CO₂ envolve várias reações de forma ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica, as quais ocorrem no citoplasma celular e, portanto é nesse local onde a fermentação alcoólica se processa. A fermentação é um metabolismo anaeróbio e os substratos usados para este processo, tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio) como exógenos (sacarose, glicose, xilose, entre outros), os quais são fornecidos à levedura através do meio de cultivo.

Ao metabolizar o açúcar anaerobicamente, a levedura visa somente à geração de energia sob a forma de ATP (adenosina trifosfato) para empregá-lo em processos como absorção, excreção e biossínteses, os quais são essenciais ao crescimento e multiplicação celular. O etanol e o CO₂ resultantes constituem produtos de excreção sem utilidade para a célula. No caminho para a produção de ATP, surgem algumas rotas metabólicas destinadas à formação de materiais necessários à formação de biomassa e à sobrevivência e adaptação da célula. Dessa forma, juntamente com a produção de etanol e CO₂, o metabolismo anaeróbio permite a formação e excreção de glicerol, ácidos orgânicos, álcoois

superiores, acetaldeído, entre outros. Vale ressaltar que simultaneamente ocorre o crescimento das leveduras, isto é, formação de biomassa.

Na maioria das bactérias, a conversão de D-xilose em D-xilulose ocorre por isomerização, utilizando-se a xilose isomerase. Nas leveduras e na maior parte dos fungos, a conversão ocorre através de duas oxidoreduktases, a xilose redutase e xilitol desidrogenase (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008).

A Figura 2.6 mostra um esquema simplificado do metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose.

Figura 2.6. Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose (Adaptada de Hahn-Hängerdal et al., 1994).

A eficiência do processo fermentativo é essencial para a bioconversão de açúcares a etanol. De acordo com Vleet e Jeffries (2009) a maior parte das hexoses é facilmente fosforilada assim que entra na célula, enquanto que os açúcares hemicelulósicos devem passar por várias etapas antes da fosforilação. Entretanto, a xilose é a maior constituinte de grande parte dos materiais lignocelulósicos presentes nas plantas, e sua assimilação em processos fermentativos é importante para a bioconversão da biomassa lignocelulósica (JEFFRIES et al., 2007).

2.3.2 Microorganismos fermentadores de pentoses

Ao contrário da fermentação de pentoses, a fermentação da glicose é um processo completamente estabelecido. Historicamente, *Saccharomyces cerevisiae* é o microorganismo mais comumente usado para produção de etanol (LIN; TANAKA, 2006). Através de seu emprego intensivo em fermentação industrial, já passou por um processo de seleção natural, apresentando os melhores desempenhos em conversão de glicose a etanol, produtividade e tolerância alcoólica.

A fermentação de pentoses é um processo que procede mais lentamente que o da glicose e pode ser realizado por bactérias, leveduras e fungos, além disso. Além disso, a conversão de pentoses em etanol é fundamental para se atingir a produção eficiente de biocombustíveis, a partir de materiais lignocelulósicos. Segundo Hahn-Hägerdal et al. (1991) o metabolismo das pentoses exige a presença de um nível mínimo de oxigênio, que deve ser rigorosamente controlado, desse modo este é um fator que deve ser considerado durante os processos fermentativos.

Vários estudos vêm sendo realizados buscando alternativas para a produção de etanol a partir de pentoses. Uma alternativa para a produção de etanol a partir destes carboidratos tem sido o uso de micro-organismos recombinantes e para esta finalidade são feitas modificações no metabolismo de micro-organismos naturalmente produtores de etanol, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*, possibilitando a estas leveduras, a fermentação de xilose e arabinose. Outro mecanismo visa introduzir genes responsáveis pela produção de etanol em micro-organismos com capacidade de metabolizar

pentoses como a *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* (DUMSDAY et al., 1997; SAHA, 2003). Entretanto, apesar da eficiência dos micro-organismos recombinantes, seu uso em processos industriais não é viável, visto que sua estabilidade é insuficiente e muitas vezes necessitam de meios de cultura complexos, levando ao encarecimento do processo (DUMSDAY et al., 1997).

De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (1991), os maiores rendimentos e produtividade em etanol são obtidos pelas leveduras. Várias espécies, incluindo *Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* e *P. stipitis* têm sido consideradas as mais eficientes para a conversão de xilose em etanol (SANCHÉZ; CARDONA, 2008). Segundo Prior et al. (1989) *P. stipitis* e *Candida shehatae* são capazes de converter xilose em etanol, com maior eficiência do que outras leveduras naturalmente fermentadores de xilose. Roberto et al., (1991) comparou a produção de etanol por *P. stipitis*, *Candida utilis*, *Candida tropicalis* e *Pachysolen tannophilus* a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar. De acordo com estes autores, *P. stipitis* apresentou a melhor eficiência de conversão xilose em etanol, cerca de 0,38 g/g.

Diversos trabalhos têm relatado *P. stipitis* como a levedura mais promissora para conversão de xilose a etanol. Esta levedura exibe um grande potencial para aplicação industrial devido à sua capacidade de fermentar uma ampla variedade de açúcares, incluindo celobiose. Além disso, não necessita da adição de vitaminas ao meio de fermentação e apresenta altos rendimentos em etanol a partir da xilose (NIGAM, 2001; AGBOGBO et al., 2006).

2.3.3 *Pichia stipitis*

Segundo Pignal (1967), *P. stipitis* é uma levedura predominantemente haplóide, relacionada à *Candida shehatae* e a outras espécies de leveduras do *Phylum Ascomycota* (KURTZMAN, 1990; VAUGHAN, 1984). Diferente de *Saccharomyces cerevisiae* que é capaz de produzir etanol em meios com baixas concentrações de açúcares, sob condições aeróbias (Efeito Crabtree), *P. stipitis* é uma levedura do trato respiratório que produz etanol em resposta à limitação de oxigênio (KLINNER et al., 2005; PASSOTH et al., 2003). Entretanto, quando em presença de altas taxas de oxigênio, a produção de massa celular é favorecida.

Segundo Agbogbo e Coward-Kelly (2008), *P. stipitis* é uma das poucas espécies de leveduras capazes de fermentar xilose a etanol sob condições anaeróbias. Isso pode ser explicado pela presença de dois mecanismos que visam diminuir a produção de xilitol, visto que este é um subproduto gerado durante a conversão de xilose e reduz o rendimento final de etanol. O primeiro mecanismo consiste na utilização de ambos cofatores (NADH e NADPH) pela enzima xilose redutase, característica também presente em outros micro-organismos como *Pachysolen tannophilus* (VERDUYN et al., 1985). O benefício da utilização do NADH pela xilose redutase é o equilíbrio total de cofatores e, portanto, ocorre baixa ou nenhuma produção de xilitol. A Figura 2.7 mostra as vias de fermentação de xilose para a maioria das bactérias (2.7a), para a maioria dos fungos e leveduras (2.7b) e para *P. stipitis* (2.7c).

Estudos de cinética mostram que NADPH é a coenzima preferida e sua afinidade é cerca de duas vezes maior que a afinidade pelo NADH (VERDUYN et al., 1985). Sob condições anaeróbias, a fermentação de xilose por *Pichia stipitis* deve ocorrer com a utilização de NADH pela enzima xilose redutase para que haja o equilíbrio dos cofatores. A capacidade de *P. stipitis* e *Pachysolen tannophilus* de utilizar o NADH durante a conversão da xilose em etanol faz com que essas espécies sejam capazes de produzir menos xilitol em comparação a outras leveduras.

Figura 2.7. Vias de fermentação de xilose (Agbogbo e Coward-Kelly, 2008)

Alguns estudos mostram que *P. stipitis* produz menos xilitol em relação à *Pachysolen tannophilus*, embora as duas leveduras sejam capazes de utilizar NADH como cofator da xilose redutase (DEBUS et al., 1983) e isto pode ser explicado pela presença de um outro mecanismo que está presente somente em *P. stipitis*. Esta levedura possui um sistema respiratório oxidativo complexo na mitocôndria que contém cadeias transportadoras de elétrons via citocromo e não-citocromo. A cadeia transportadora de elétrons não-citocromo é denominada SHAM (salicyl hydroxinamic acid) e gera um fator redox para superar o desequilíbrio dos cofatores. Desse modo, o uso de cofatores específicos juntamente com o equilíbrio redox resulta em baixa ou nenhuma produção de xilitol.

Recentemente, a sequência genômica de *P. stipitis* NRRL Y-11545 foi publicada e esse sequenciamento mostrou a presença de genes que codificam as enzimas xylanase, endo-1,4- β -glucanase, exo-1,3- β -glucosidase, β -manosidase e α -glucosidase (JEFFRIES et al., 2007). A presença desses genes na levedura favorece a sacarificação e a fermentação simultânea de celulose e hemicelulose. Desse modo, o mecanismo e a regulação do metabolismo de xilose desta espécie têm sido bem caracterizados e seus genes também têm sido usados para melhorar o metabolismo de xilose em espécies como *Saccharomyces cerevisiae* (JEFFRIES et al., 2007).

Segundo Agbogbo et al. (2006), *P. stipitis* apresenta grande potencial para a fermentação de biomassa lignocelulósica, entretanto deve-se considerar vários fatores como tipo de substrato e concentrações de açúcares, pH e aeração. Esses autores avaliaram a produção de etanol empregando diferentes concentrações de açúcares, variando a relação glicose/xilose em meio sintético e concluíram que maiores valores de $Y_{P/S}$ (0,45 g/g) foram obtidos na presença de uma concentração de xilose maior (cerca de 75%) ou quando este foi o único açúcar presente.

Várias linhagens de *P. stipitis* têm sido usadas em processos fermentativos empregando hidrolisados de diferentes materiais lignocelulósicos para a produção de etanol, apresentando resultados promissores (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Comparação dos ensaios fermentativos realizados em hidrolisados lignocelulósicos, empregando diferentes linhagens da levedura *Pichia stipitis*, visando à produção de etanol.

Biomassa	Linhagem de <i>P. stipitis</i>	Açúcar (g/L)	Destoxificação	pH	Y _{P/S} (g/g)	Referência
Bagaço de cana-de-açúcar	NRRL Y-7124	xil: 99,0	NaOH, KOH ou CaO	5,0	3,8	Roberto et al. (1991)
Palha de trigo	NRRL Y-7124	gli: 1,7	<i>overliming</i>	6,5	0,41	Nigam (2001)
Grão de girassol	NRRL Y-7124	total: 37,0	<i>overliming</i>	6,0	0,38	Telli-Okur; Eken-Saraçoglu (2008)
Bagaço de malte	NCYC 1540	total: 56,0	NaOH	5,0-6,0	0,32	White; Yohannan; Walker, (2008)
Palha de arroz	BCRC 21777	gli: 3,5-6,4	<i>overliming</i>	5,0	0,37	Huang et al. (2009)
	BCRC 21777	xil: 17,5-26,4			0,45	
Palha de arroz	BCRC 21777	gli: 3,5-6,4	não utilizado	5,0	0,4	Huang et al. (2009)
	BCRC 21777	xil: 17,5-26,4			0,44	
Jacinto de Água (<i>Eichornia crassipes</i>)	NCIM 3947		<i>overliming</i>	6,0	0,42	Kumar et al. (2009)

(Adaptado de Huang et al., 2009); *overliming*: utilização de Ca(OH)₂

2.4 Fatores nutricionais e ambientais que interferem na bioconversão

Vários fatores podem influenciar a bioconversão de açúcares em etanol por *P. stipitis* como temperatura, pH, oxigenação, adição de nutrientes e concentração inicial de substrato e de inóculo. Desse modo, diversos estudos vêm sendo conduzidos visando melhorar a conversão de xilose em etanol por esta levedura. De acordo com Pham et al. (1998), o estabelecimento das condições ótimas do meio de cultura é uma importante maneira de aumentar a produtividade e

melhorar a eficiência de um bioprocesso. A suplementação do meio de fermentação é um importante recurso utilizado não somente para suprir as necessidades nutricionais do microrganismo, como também para promover ou aumentar a tolerância deste aos compostos inibidores presentes em hidrolisados. Sliniger et al. (2009) avaliando a adição de nutrientes ao meio de fermentação semissintético, observaram que a adição de aminoácidos aumentou significativamente a tolerância da levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124 ao etanol. Além disso, quando a fonte de carbono utilizada foi a xilose, ocorreu um aumento da resistência da levedura à exposição ao furfural e hidroximetilfurfural. A adição de aminoácidos ao meio de fermentação pode funcionar não somente como fonte de nitrogênio para a biossíntese e manutenção celular, mas também como agente redox, promovendo o equilíbrio do potencial de oxido-redução quando sob condições de restrição de oxigênio (MAURICIO et al., 2001). Por outro lado, a composição mineral parecer ter um efeito pequeno sobre a resistência de *P. stipitis* aos compostos inibidores, quando comparado à adição de aminoácidos, conforme observado por Slininger et al., (2006), exceto quando adicionou-se concentrações excessivas de sulfato de magnésio, durante a fase estacionária de crescimento. Esses autores observaram que a suplementação do meio com 150 mg/L resultou em maior resistência ao etanol e aos compostos inibidores. Além disso, a adição de uma fonte de nitrogênio, como a uréia, otimizou a tolerância da levedura a estes compostos.

Silva et al. (2011) avaliou a influência de uréia e extrato de levedura na fermentação de xilose pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124. Estes autores observaram que diferentes fontes de nitrogênio podem influenciar de maneiras diferentes o mesmo processo, visto que quando somente uréia foi empregada como única fonte de nitrogênio, a levedura consumiu pobremente a xilose, não produzindo etanol. Contudo, quando a única fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura, foram obtidos valores de 0,33 e 0,89 g/L.h para Q_P e Q_S , respectivamente, e ainda, quando os dois nutrientes foram adicionados, estes valores foram elevados para 0,50 e 1,38 g/L.h, respectivamente.

Outro fator que deve ser considerado durante os processos de fermentação para obtenção de etanol é a oxigenação. Diversos trabalhos vêm sendo realizados com o objetivo de se estabelecer um nível ótimo de oxigenação visando uma máxima produção de etanol a partir da xilose. Segundo Hahn-

Hägerdal et al. (1991), leveduras naturalmente fermentadoras de xilose como *P. stipitis* requerem um nível reduzido de oxigenação, mas extremamente controlado para que se obtenha uma produção de etanol eficiente. De acordo com du-Prezz (1994) a aeração é um fator que exerce grande influência sobre a fermentação de xilose por leveduras, visto que determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre a formação de biomassa e produto. Segundo Nigam (2001) a utilização de níveis insuficientes de aeração na produção de etanol por *P. stipitis* NRRL Y-7124 diminuem a velocidade de consumo de xilose, enquanto que níveis excessivos de aeração reduzem o rendimento devido à oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado. Assim, a aeração adequada consiste num fator importante para atingir elevados valores de conversão. Roberto et al. (1994) avaliaram o efeito da taxa de aeração na fermentação de xilose por *P. stipitis* CBS 5773 e observaram que a condição com maior aeração resultou na maior conversão de células ($Y_{X/S} = 0,50$ g/g) e menor conversão em etanol ($Y_{P/S} = 0,13$ g/g). Estes autores observaram ainda que a maior conversão e produtividade volumétrica em etanol ocorreram em uma condição intermediária.

O pH é um fator importante, capaz de exercer grande influência sobre o processo de bioconversão. du-Preez (1994) reportou que o rendimento em etanol pela levedura *P. stipitis* CBS 7126 foi fortemente afetado por variações de pH entre 2,5 e 6,5, sendo o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. Slininger e Bothast (1990) relataram que para a fermentação de xilose por *P. stipitis* NRRL Y-7124 a faixa de pH ótimo encontra-se entre 4 e 7, não sendo observada grande influência do pH sobre os parâmetros fermentativos, dentro da faixa de variação estudada. Adicionalmente, os autores observaram que o valor de pH 4,5 é o mais recomendável, pois minimiza a possibilidade de contaminação. Entretanto, por estar próximo do limite inferior da faixa ótima de fermentação, seria recomendável o uso de um controle automático de pH. Resultados semelhantes aos relatados por estes autores foram descritos por Roberto et al., (1994), onde a variação de pH entre 4,0 e 6,0 exerceu pouca influência sobre os parâmetros fermentativos avaliados.

Valores de pH mais elevados também podem ser empregados visando aliviar o efeito tóxico de compostos presentes em hidrolisados. van Zyl et al. (1991) estudando a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, por *P. stipitis*, verificaram que valores a partir de 6,5 podem ser utilizados para

diminuir a toxicidade do ácido acético, considerado um dos mais importantes inibidores da fermentação por esta levedura. É importante ressaltar que pode haver variações entre os valores ou faixas de pH ideal, devido aos diferentes meios de fermentação, condições de cultivo ou ainda diferentes linhagens de micro-organismos.

A temperatura consiste em um dos mais importantes fatores que podem interferir na atividade dos micro-organismos. Leveduras como as do gênero *Pichia* sp e *Candida* sp utilizam temperaturas entre 30 e 32°C, para assimilação de pentoses, entretanto este fator pode variar de acordo com a cepa utilizada, tipo de substrato e concentração celular (du-PREZZ, 1994). Vários autores estudaram a influência da temperatura sobre o processo de conversão, sendo que a máxima produtividade e concentração de etanol foram alcançadas por *P. stipitis* sob temperatura de 23 a 30°C (SLININGER; BOTHAST, 1990).

Outro importante aspecto a ser considerado no processo de produção de etanol é o efeito da concentração inicial de substrato. Roberto et al. (1991), estudando a produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *P. stipitis* CBS 5773, observaram que a produção de etanol não foi afetada quando utilizou-se uma concentração inicial de xilose de 20 a 99 g/L ($Y_{P/S} = 0,38$ g/g). Entretanto, quando a concentração utilizada foi próxima de 145 g/L, observaram uma redução da conversão em etanol para $Y_{P/S} = 0,27$ g/g, mostrando que a partir de concentrações muito elevadas deste açúcar pode ocorrer redução da concentração final de produto, bem como do fator de conversão do açúcar a etanol. du-Prezz et al. (1986) obtiveram resultados semelhantes, onde a máxima produtividade em etanol para *P. stipitis* CBS 7126 foi de 0,85 g/L, a partir de 50 g/L de xilose. Além disso, quando a concentração inicial de xilose foi de 100 g/L, os autores observaram uma queda de 50% na produtividade em etanol.

Recentemente, Silva et al. (2011) estudando a fermentação de diferentes concentrações iniciais de xilose em meio semissintético (32,0 a 88,0 g/L) por *P. stipitis* NRRL Y-7124, observaram que os melhores resultados foram alcançados a partir de 47,0 g/L de xilose ($Y_{P/S} = 0,47$ g/g e $Q_P = 0,34$ g/L.h). Por outro lado, a partir de concentrações superiores (66,0 e 88,0 g/L), a levedura não foi capaz de produzir etanol. Estudo similar foi realizado por Ferreira et al. (2011) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura,

avaliando-se a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* (*P. stipitis*) UFMG-IMH 43.2. Os melhores resultados ($Y_{P/S} = 0,19$ g/g e $Q_P = 0,13$ g/L.h) foram alcançados a partir de 30 g/L de xilose e 5 g/L de extrato de levedura.

A presença de inibidores em hidrolisados hemicelulósicos também constitui uma barreira a ser superada nos processos fermentativos, visto que parte destes compostos é liberada durante o processo de hidrólise, a partir da degradação de açúcares e lignina. A presença de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, compostos fenólicos, entre outros pode afetar o crescimento celular e consequentemente a produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 1991). Segundo van Zyl et al. (1991) o ácido acético é um inibidor para leveduras em geral e concentrações de 2,0 a 5,0 g/L têm sido relatadas como sendo inibidoras do crescimento de *P. stipitis*.

Nigam (2001) estudou o efeito da adição de 6,9 g/L de ácido acético, 0,27 g/L de furfural e derivados da lignina (extrato bruto de lignina) em meio sintético, com o objetivo de simular as condições do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. O autor mostrou que a adição desses inibidores individualmente ou em várias combinações diminuiu a conversão do substrato e a produtividade volumétrica em etanol, entretanto a adição simultânea de todos os inibidores resultou numa redução mais acentuada. A menor redução de $Y_{P/S}$ (inferior a 10%) foi observada a partir da adição de furfural (0,27 g/L), contudo quando a concentração deste inibidor foi elevada para 1,5 g/L ocorreu uma redução em torno de 90% tanto para $Y_{P/S}$ (0,43 para 0,04 g/g) quanto para Q_P (0,47 para 0,07 g/L.h), sugerindo que altas concentrações de furfural inibem a respiração e o crescimento de *P. stipitis*. Foi também verificado que o furfural foi reduzido a álcool furfuril, que também leva à diminuição da taxa de crescimento bem como à produção de etanol. Recentemente foi relatado que *P. stipitis* é capaz de reduzir o grupo aldeído no anel furano do furfural e hidroximetilfurfural (LIU et al., 2004) e que esta levedura reduz a concentração de ácido acético durante a fermentação (Agbogbo et al., 2007), evidenciando a capacidade desta levedura para realizar uma destoxificação *in situ*, dos inibidores gerados durante o pré-tratamento.

A presença de compostos inibidores como o ácido acético, em hidrolisados hemicelulósicos, apresenta forte efeito sobre o pH (van ZYL et al., 1991). Em meios de fermentação contendo ácido acético observa-se a redução do pH devido à sua dissociação dentro do citoplasma celular, influenciando tanto o consumo de

açúcares quanto a formação de biomassa e etanol. De acordo com Telli-Okur e Eken-Saraçoglu (2006), quando o meio de cultivo ou hidrolisado apresenta pH acima de 5,5 observa-se a redução dos efeitos inibitórios.

A tolerância ao etanol é um fator relevante para o crescimento das leveduras, visto que o efeito tóxico deste composto pode ser atribuído pelo acúmulo intracelular do acetaldeído, que pode levar à osmose celular e alterações, nas membranas celulares (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). O nível de tolerância a este produto varia com as cepas e é influenciado pelas condições de cultivo, principalmente a temperatura. Além disso, a formação de biomassa parece ser mais sensível ao etanol do que a formação do produto (du PREEZ; DRIESSEL; PRIOR, 1989). De acordo com Hahn-Hägerdal et al. (1994), durante a fermentação em meio semissintético sob temperatura de 30 °C, a levedura *P. stipitis* CBS 7126 teve seu crescimento inibido por concentrações de etanol entre 32,0 e 34,0 g/L. Além disso, os autores também observaram que para *P. stipitis* CBS 5773, a máxima tolerância observada foi de 65 g/L a 25 °C. Por outro lado, para a levedura *P. stipitis* CBS 7126, a máxima tolerância ocorreu na faixa de temperatura entre 16 e 22 °C, visto que foi observado crescimento celular até a concentração de 60 g/L de etanol e, que esta tolerância foi diminuída para 27,5 g/L, a partir do aumento da temperatura para 32 °C (du-PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1987). Adicionalmente, du Preez, Driessel e Prior (1989), observaram que não existe uma relação entre as concentrações máximas de etanol, toleradas por *P. stipitis* CBS 7126 e as fontes de carbono assimiladas pela levedura, isto é, a tolerância foi a mesma independente do açúcar disponível no meio de fermentação ser glicose ou xilose.

As condições de fermentação podem ser influenciadas pela concentração inicial de células empregada. Maiores concentrações celulares consistem em um número superior de células viáveis para a formação de biomassa e produto, e ainda podem ser empregadas como estratégia para amenizar o efeito tóxico de compostos inibidores presentes no hidrolisado (OLSSON; HÄH-HAGERDAL, 1996; FERREIRA, et al., 2011). Adicionalmente, o aumento da concentração inicial de células pode resultar em valores superiores de produtividade volumétrica em etanol, como observado por Agbogbo et al. (2007). Estes autores alcançaram um aumento de aproximadamente 50% nos valores de Q_P quando elevaram a

concentração celular inicial de 1,82 para 6,45 g/L, na fermentação de xilose em meio semissintético por *P. stipitis*, sob mesmo pH (6,3).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o potencial do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte como substrato para a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

3.2 Objetivos específicos

» Avaliar o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, a partir da adição de extrato de farelo de arroz, uréia e extrato de levedura, sobre os parâmetros fermentativos da bioconversão pela levedura *Pichia stipitis* e, obter a concentração ótima dos nutrientes que forem estatisticamente significativos para o processo;

» Otimizar as condições de pH e concentração inicial de células na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte (destoxificado e não destoxificado), pela levedura *Pichia stipitis*;

» Avaliar o efeito do ácido acético sobre a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* em meio semissintético, sob as condições de pH e concentração inicial de células previamente otimizadas em hidrolisado (destoxificado ou não);

» Avaliar o perfil cinético da produção de etanol a partir do HHBM em biorreator de bancada, pela levedura *Pichia stipitis*, empregando-se as condições de pH e concentração inicial de células, otimizadas em frascos agitados.

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).

4.1 Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte

O bagaço de malte (BM) utilizado neste trabalho foi fornecido pela Microcervejaria do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena-USP. Assim que obtido, o bagaço de malte foi lavado com água para a remoção dos resíduos do processo cervejeiro e secado naturalmente ao sol até apresentar um teor de umidade de aproximadamente 10%, sendo posteriormente armazenado em temperatura ambiente livre de umidade, até a realização da hidrólise.

O bagaço de malte foi submetido a um processo de hidrólise com ácido sulfúrico, em reator de aço inoxidável com capacidade de 50 litros, sob condições previamente otimizadas por Mussatto e Roberto (2005). Foram utilizados 100 mg de H_2SO_4 (98% p/p) por grama de matéria seca mantendo-se a relação de matéria seca: solução ácida de 1:8 (g/g). A hidrólise foi conduzida à temperatura de 120 °C por 17 minutos. Ao término da reação, o hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte (HHBM) foi separado do resíduo sólido contendo celulose e lignina, por filtração. A fim de aumentar em 3 vezes o seu teor de xilose, o hidrolisado hemicelulósico foi concentrado sob vácuo a 70 ± 5 °C, em evaporador com capacidade de 30 litros, aquecido por resistência elétrica. Após esta etapa, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte (HHBM_C) foi mantido em câmara fria a 4°C até sua utilização.

4.2 Microrganismo e preparo do inóculo

Para os ensaios de fermentação foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 (CBS 5773), fornecida pela USDA, Peoria, Illinois. A cultura foi mantida repicada em ágar YMDP, composto por extrato de malte (3 g/L), extrato

de levedura (3 g/L), peptona (5 g/L), glicose (10 g/L) e ágar (20 g/L) e a levedura foi conservada por transferências periódicas e mantida em geladeira a 4°C.

Inicialmente, alçadas de células provenientes de repiques de manutenção foram transferidas para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Após homogeneização da suspensão, alíquotas de 2 mL foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 ou 500 mL contendo 25 ou 50 mL do meio, respectivamente, mantendo-se a proporção de 5:1 de $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Tecnal TE-420) a 30 °C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas.

O inóculo foi cultivado em meio semissintético (MSS) ou em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. Para o preparo do inóculo, inicialmente as células foram separadas por centrifugação em centrífuga Jouan modelo MR 18-12, a 1300 x g por 20 minutos e ressuspensas em água destilada esterilizada de forma a se obter uma suspensão celular de aproximadamente 10 g/L. Esta suspensão foi utilizada para inocular os meios de fermentação.

O meio semissintético foi constituído por 30,0 g/L de xilose, 1,0 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,0 g/L de uréia e 3,0 g/L de extrato de levedura. Para o preparo deste meio foram utilizadas soluções-estoque concentradas de cada componente, previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 20 min, com exceção da xilose que foi autocavada a 112 °C por 15 min. O meio à base de hidrolisado hemicelulósico de BM foi preparado utilizando o hidrolisado concentrado (HHBM_C) conforme descrito no item 4.1. Inicialmente, o HHBM_C teve seu pH elevado para 5,5 com NaOH (10N) e em seguida centrifugado a 1200 x g por 20 minutos para remoção de sólidos. O hidrolisado foi então devidamente diluído com H₂O destilada esterilizada de forma a se obter a concentração 30 g/L de xilose, sendo em seguida suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura.

4.3 Meio e condições de fermentação

Para os ensaios fermentativos, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte foi utilizado como meio de fermentação, tendo o seu pH ajustado para 5,5 com NaOH (10N). Após alteração do pH, o hidrolisado foi centrifugado a 1200 x g por 20 minutos para remoção de sólidos e em seguida foi devidamente diluído com H₂O destilada esterilizada de forma a se obter uma concentração inicial de

55 g/L de xilose. A adição ou não de nutrientes e o valor de pH inicial e a concentração inicial de células variaram de acordo com cada experimento.

Os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório (Tecnal TE-420), à temperatura de 30 °C, sob agitação de 200 rpm.

As fermentações realizadas em meio semissintético simularam as concentrações de açúcares (glicose (5,5 g/L), xilose (56 g/L) e arabinose (27 g/L)) e ácido acético do hidrolisado (2,9 ou 2,3 g/L) presentes no hidrolisado. Como controle foram realizados ensaios fermentativos em MSS ausentes de ácido acético. Todos os ensaios realizados em duplicatas. O meio semissintético foi suplementado com MgSO_4 (1,0 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ (3,0 g/L), KH_2PO_4 (20,0 g/L) apresentando composição similar ao meio descrito por Debus et al., (1983) e igualmente utilizado por Roberto et al., (1991).

Nas fermentações em biorreator foi utilizado meio à base de hidrolisado contendo 55 g/L de xilose, nas condições de pH e concentração inicial de células (X_0) otimizadas em frascos (pH 6,5 e $X_0 = 5,0$ g/L), sendo conduzidas em biorreator modelo BIOSTAT B (B. Braun Biotech International) com 2 litros de capacidade equipado com controlador de temperatura, pH e agitação. A agitação foi promovida duas turbinas com seis pás planas. O inóculo foi preparado conforme em hidrolisado conforme descrito no item 4.2 e o volume do meio de fermentação foi de 1,2 L. A temperatura foi mantida a 30 °C e as condições de transferência de oxigênio utilizadas foram k_La de $11,0 \text{ h}^{-1}$, correspondendo a uma aeração de 0,25vvm e agitação de 320 rpm.

Para todos os ensaios fermentativos, foram retiradas amostras periodicamente para acompanhamento do crescimento celular, pH, consumo de açúcares e ácido acético e produção de etanol. Nos ensaios realizados em duplicata, a média foi utilizada para calcular os resultados.

4.3.1 Efeito da suplementação nutricional do HHBM na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis*

O efeito da adição de nutrientes ao meio de fermentação, assim como suas possíveis interações sobre processo de bioconversão do HHBM em etanol pela levedura *P. stipitis* foi avaliado com o auxílio da metodologia de planejamento experimental, conforme matriz mostrada na Tabela 4.1. Os nutrientes avaliados foram: extrato de farelo de arroz (EFA), uréia (U) e extrato de levedura (EL). Soluções concentradas de U (15%) e EL (15%) foram preparadas separadamente e autoclavadas a 121 °C por 20 minutos. Para a utilização do farelo de arroz, foi preparada uma suspensão de farelo em água destilada numa proporção de 10% (m/v). Após a autoclavagem, esta suspensão foi centrifugada em condições assépticas a 1200 x *g* por 20 min. A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e conservada em geladeira até a sua utilização, nunca por um período superior a uma semana. Os componentes foram então misturados assepticamente, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de fermentação. O inóculo foi preparado em MSS conforme descrito no item 4.2 e a fermentação foi conduzida em frascos Erlenmeyers, com concentração inicial de células de 1 g/L, nas condições descritas no item 4.3.

Tabela 4.1. Planejamento fatorial do tipo 2³, com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação nutricional do HHBM na produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

Ensaio	Níveis Codificados das Variáveis			Níveis Reais da Variáveis		
	EFA	U	EL	EFA (%v/v)	U (g/L)	EL (g/L)
1	-1	-1	-1	0	0	0
2	+1	-1	-1	20	0	0
3	-1	+1	-1	0	3	0
4	+1	+1	-1	20	3	0
5	-1	-1	+1	0	0	3
6	+1	-1	+1	20	0	3
7	-1	+1	+1	0	3	3
8	+1	+1	+1	20	3	3
9/10/11	0	0	0	10	1,5	1,5

4.3.2 Efeito da concentração do extrato de levedura e do cultivo de *Pichia stipitis* em HHBM sobre a produção de etanol

A partir dos resultados obtidos nos ensaios do planejamento fatorial 2³, foram realizados ensaios fermentativos visando avaliar a influência de diferentes concentrações de extrato de levedura sobre a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*. Nesta etapa, o inóculo foi preparado em MSS conforme descrito no item 4.2. O meio de fermentação foi preparado em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte concentrado (Item 4.3) e os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers, avaliando-se as concentrações de 1g/L, 2g/L, 3g/L, 4g/L e 5 g/L do nutriente.

Visando avaliar o efeito do cultivo da levedura em hidrolisado de bagaço de malte, células de *P. stipitis* previamente cultivadas em MSS por 24 horas, foram transferidas para o hidrolisado contendo 30 g/L de xilose. Estes ensaios foram realizados em duplicatas.

4.3.3 Otimização do pH e da concentração inicial de células sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* em HHBM não destoxificado

Para avaliação das condições ótimas de pH e concentração inicial de células sobre a produção de etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado de bagaço de malte não destoxificado, foi empregada a metodologia de planejamento experimental 2² com face centrada. Considerando os resultados obtidos nos ensaios anteriores, este planejamento foi realizado com o inóculo cultivado em meio à base de hidrolisado conforme descrito no item 4.2, eliminando-se a etapa de cultivo em MSS. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers conforme descrito item 4.3, variando-se pH e concentração inicial de células conforme a matriz experimental apresentada na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Planejamento fatorial do tipo 2^2 com face centrada, com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células na produção de etanol a partir de *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

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

4.3.4 Otimização do pH e da concentração inicial de células sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* em HHBM destoxificado

Para avaliação das condições ótimas de pH e concentração inicial de células sobre a produção de etanol por *P. stipitis*, foi empregada a metodologia de planejamento experimental 2^2 com face centrada, em hidrolisado de bagaço de malte destoxificado. Para a destoxificação do hidrolisado foi utilizado o procedimento descrito por Mussatto, Santos e Roberto (2004) que consiste na alteração do pH em combinação com o método de adsorção com carvão ativado. Inicialmente, o pH do hidrolisado concentrado foi elevado para 8,0 pela adição de NaOH (10N) sendo em seguida ajustado para 2,0 com H₂SO₄ (98%). Nesta etapa, foi então realizado o processo de adsorção adicionando-se ao HHBM o carvão ativado (CA) na proporção de 3 g de CA para cada 100 g de HHBM (3%). Os ensaios de adsorção foram realizados em agitador rotatório a 45 °C, sob agitação de 150 rpm, por 60 minutos. Ao término do tratamento, o hidrolisado foi centrifugado a 1200 x g por 30 minutos para remoção do carvão e filtrado em papel filtro. Após cada alteração de pH, o precipitado resultante foi removido por centrifugação a 1200 x g por 30 minutos.

Nesta etapa, os ensaios foram realizados empregando-se as mesmas variáveis (pH e concentração inicial de células) avaliadas nos ensaios com

hidrolisado não destoxificado (item 4.3.3). O inóculo foi preparado em hidrolisado conforme item 4.2 e as fermentações foram conduzidas conforme condições descritas no item 4.3. A matriz experimental do planejamento contendo os níveis das variáveis empregados nos diferentes ensaios está apresentada na Tabela 4.2.

4.3.5 Efeito do ácido acético sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio semissintético

Com o objetivo de se avaliar o efeito do ácido acético sobre os parâmetros fermentativos de *P. stipitis* foram realizados ensaios fermentativos em meio semissintético, empregando-se as condições de pH e concentração inicial de células previamente otimizadas para o hidrolisado não destoxificado (pH 6,4 e $X_0 = 5$ g/L) e para o hidrolisado destoxificado (pH 6,14 e $X_0 = 1,36$ g/L). O cultivo do inóculo foi realizado em MSS conforme descrito no item 4.2, com exceção da uréia, que foi substituída por $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ na concentração de 3,0 g/L.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação do teor de umidade

Amostras do material (cerca de 1 g) foram colocadas em uma balança de secagem por ação de raios infravermelhos (IV 2000 Gehaka). As amostras foram mantidas a 105 °C até alcançar peso constante, sendo a umidade do bagaço de malte determinada pela diferença de massa obtida antes e após a secagem.

4.4.2 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina

O bagaço de malte foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina, de acordo com as metodologias descritas por Browning (1967) e Rocha (2000). Estes ensaios foram realizados em triplicatas, portanto

amostras de aproximadamente 2 gramas de bagaço (10% de umidade) foram transferidas um bquer de 50 ml, adicionando em seguida, 10 ml de H₂SO₄ 72% p/p (pr-aquecido a 45 C). A reao foi mantida em banho termostatzado (Micronal modelo B.15) a 50 C, por 7 minutos, sob agitao constante com basto de vidro. Aps esse tempo, a reao foi interrompida pela adio de 50 ml de gua destilada e o contedo do bquer foi transferido quantitativamente para um Erlenmeyer de 500 ml, onde o volume total de gua foi elevado para 275 ml. Em seguida, o Erlenmeyer foi fechado com papel alumnio e autoclavado a 1 atm, 120 C, por 45 minutos, visando hidrolisar completamente os oligmeros restantes. A etapa seguinte consistiu em resfriar os frascos at temperatura ambiente e separar o material slido da frao lquida utilizando-se papel de filtro previamente tarado. O hidrolisado foi ento recolhido em um balo volumtrico de 500 ml e o slido contido no papel de filtro foi lavado com cerca de 1,5 L de gua destilada, sendo levado para secar em estufa 105 C at atingir peso constante e em seguida o material foi calcinado para determinao de cinzas (Item 4.43). A relao entre a massa do resduo seco e o peso inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina insolvel (lignina Klasson) presente no bagao de malte (equao 4.1). Aproximadamente 1 mL da frao lquida obtida foi filtrada em filtro Sep Pak C₁₈ e analisada por Cromatografia Lquida de Alta Eficincia (CLAE) para determinao das concentraes de glicose, xilose, arabinose e cido actico, sendo estas utilizadas para o clculo da porcentagem de celulose, hemicelulose e grupos acetil (IRICK et al., 1988) presentes na amostra de acordo com as equaes 4.2, 4.3 e 4.4.

$$\% \text{Lignina insolvel} = \frac{R_{AC}}{M_A} \times 100 \quad \text{Equao 4.1}$$

$$\% \text{Celulose} = \frac{C_{gli} \times 5 \times x_C \times x_{PH}}{M_A} \times 100 \quad \text{Equao 4.2}$$

$$\% \text{Hemicelulose} = \frac{C_{(xil + ara)} \times 5 \times x_C \times x_{PH}}{M_A} \times 100 \quad \text{Equao 4.3}$$

$$\% \text{ Grupos acetil} = \frac{\text{acet} \times C}{M_A} 100 \quad \text{Equação 4.4}$$

onde:

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

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

C_{Gli} , C_{Xil} , C_{Ara} , C_{Acet} = concentração de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente (g/L);

M_A = peso da amostra seca (g);

M_R = peso do resíduo de lignina (g);

M_{AC} = peso da amostra após calcinação (g)

Para determinação da lignina solúvel, 5 ml do hidrolisado foi alcalinizado com 1 ml de NaOH 6M até atingir pH 12 e diluída em balão volumétrico de 50 mL, sendo analisada por espectroscopia de UV (espectrofotômetro Hitachi 1800) em comprimento de onda de 280 nm. Foram realizadas análises do hidrolisado quanto à concentrações de furfural e hidroximetilfurfural através de CLAE, as quais juntamente com o resultado da absorbância, foi utilizada para calcular a porcentagem de lignina solúvel na amostra, de acordo com as equações 4.5, 4.6 e 4.7 a seguir:

$$PD_{280} = C(FURF \times FURF) + C(HMF \times HMF) \quad \text{Equação 4.5}$$

$$C_{\text{Lignina solúvel}} = [4,187 \times 10^{-2} \times (A_{HID280} - A_{PD280})] - 3,279 \times 10^{-4} \quad \text{Equação 4.6}$$

$$\% \text{ Lignina solúvel} = \frac{C_{\text{Lignina solúvel}} \times 5}{M_A} 100 \quad \text{Equação 4.7}$$

onde:

A_{HID280} = absorbância do hidrolisado alcalinizado a 280 nm (incluindo a correção da diluição);

C_{FURF} e C_{HMF} = concentração de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, no hidrolisado (g/L);

ϵ_{FURF} = absortividade do furfural (146,85 L/g.cm);

ϵ_{HMF} = absortividade do hidroximetilfurfural (114 L/g.cm);

$C_{\text{Lignina solúvel}}$ = concentração de lignina solúvel (g/L);

M_A = massa da amostra seca

4.4.3 Determinação do teor de cinzas

Primeiramente o bagaço de malte foi colocado em dissecador por 50 minutos e em seguida pesou-se 1 grama do mesmo. O teor de cinzas foi determinado colocando-se o material pesado em um cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em mufla elétrica a 800 °C por 2 h. As cinzas foram determinadas pela diferença de peso das amostras, antes e após a incineração (equação 4.8).

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_{CT}}{M_A} \times 100 \quad \text{Equação 4.8}$$

onde:

M_{CT} = peso de cinzas totais (g), obtida pela diferença de peso das amostras;

M_A = peso seco da amostra (g)

4.4.4 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas do bagaço de malte foi determinado como o conteúdo total de nitrogênio pelo método Kjeldahl, utilizando o fator de correção $N \times 6,25$.

O teor de proteínas do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte foi determinado pelo método de Bradford. Para tal, empregou-se 100 µL de hidrolisado (diluído ou não), 5,0 mL do reagente de Bradford, agitando-se a mistura e, em seguida deixou-se incubando por 5 minutos. Após este tempo foi realizada a leitura a 595 nm, em espectrofotômetro Hitachi 1800. Para o branco, utilizou-se água deionizada em substituição do padrão.

4.4.5 Determinação da concentração celular

A concentração celular da levedura *P. stipitis* foi determinada pela medida da absorbância em espectro (Hitachi 1800) a 600 nm utilizando água como branco. Para isso, a levedura foi cultivada em MSS conforme descrito no item 4.2 e a cada 6 horas foram retiradas amostras para acompanhamento até o final de 24 horas. O volume do meio foi centrifugado para recuperação da massa celular que, posteriormente foi lavada com água destilada. A massa celular foi então, devidamente diluída para uma faixa de leitura entre 0,05 e 0,5 unidades de DO. A concentração celular foi determinada utilizando-se a equação obtida por regressão linear dos dados de uma curva de calibração entre peso seco e absorbância.

4.4.6 Determinação dos teores dos açúcares, de ácido acético e de etanol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), 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 da coluna de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo de 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para serem analisadas, as amostras foram diluídas com água deionizadas e passadas por filtros C18 Sep-Pack Cartridge (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.4.7 Determinação dos teores de furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural e compostos fenólicos (ácidos, ferúlicos, cumárico, siríngico, vanílico, p-hidroxibenzóico e vanilina) foram determinadas por CLAE, em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna Waters Resolve C₁₈ 5 µm (3,9 x 300 mm); temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético) degaseificado; fluxo de 0,8 mLmin; volume de amostra: 20 µL e detector UV a 276 nm. As amostras foram

diluídas com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 μm (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.4.8 Determinação dos Teores de Compostos Fenólicos Totais

A concentração total dos compostos fenólicos foi quantificada colorimetricamente pelo método modificado de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999) usando o ácido ferúlico como padrão de calibração. Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 1300x g por 20 min para a remoção de sólidos. O sobrenadante foi então filtrado em membrana de 0,45 μm e devidamente diluído com água deionizada. A reação foi realizada em tubo de ensaio adicionado de 3,0 mL da amostra e 0,2 mL de reagente Folin. O sistema foi homogeneizado por meio de vórtice e mantido em repouso por um período de 5 min. Após este tempo, foi adicionada à mistura reacional, 0,8 mL de solução de $(\text{Na})_2\text{CO}_3$ na concentração de 150 g/L. Em seguida a mistura foi novamente agitada em vórtice e mantida em repouso à temperatura ambiente, na ausência de luz por 30 min. Fez-se então a leitura em espectrofotômetro (Hitachi High Technologies Corporation, Tóquio, Japan) a 760 nm. Para composição do branco, água deionizada foi adicionada em substituição à amostra, seguindo-se o mesmo procedimento.

4.4.9 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho HANNA HI221, com correção de temperatura.

4.4.10 Determinação da Densidade

Os valores de densidade dos hidrolisados foram determinados em temperatura ambiente, através do uso de um picnômetro de 50 ml.

4.4.11 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi estimado com base no método estático, descrito inicialmente por Wise (1951). Primeramente a sonda polarográfica de oxigênio foi calibrada à pressão atmosférica pela injeção de nitrogênio ao meio de fermentação à base de hidrolisado, sem a adição de inóculo. Numa segunda etapa, definiu-se o 100% pela saturação do meio de fermentação com a injeção de ar atmosférico sob agitação de 400 rpm.

Após este procedimento, o oxigênio é removido por introdução de nitrogênio e a variação da porcentagem de oxigênio dissolvido em função do tempo foi monitorada nas condições de aeração (0,25 vvm) e agitação (320 rpm). Estes valores de K_La foram determinados através da equação 4.9, a qual foi proposta por Stanbury, Whitaker e Hall (1995).

$$\ln (C_S - C_L) = K_La * t \quad \text{Equação 4.9}$$

onde:

C_S = concentração de O_2 dissolvido na saturação

C_L = concentração de O_2 dissolvido no meio

t = tempo

4.5 PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Para a análise dos resultados das fermentações foram determinados os seguintes parâmetros: fatores de conversão de substrato a etanol; produtividades volumétricas e eficiência da fermentação. Para os ensaios em biorreator de bancada foram também avaliadas as velocidades instantâneas e específicas do bioprocessos.

4.5.1 Fator de Conversão (rendimento) de Substrato em Células: $Y_{x/s}$ (g/g):

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 4.10}$$

onde:

X_i e X_f = Concentração inicial e final de células (g/L)

S_i e S_f = Concentração inicial e final de açúcares (glicose e xilose) (g/L)

4.5.2 Fator de Conversão de Substrato (rendimento) em Etanol: $Y_{p/s}$ (g/g):

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad \text{Equação 4.11}$$

onde:

P_i e P_f = Concentração inicial e final de células (g/L)

S_i e S_f = Concentração inicial e final de açúcares (glicose e xilose) (g/L)

4.5.3 Produtividade Volumétrica em Etanol: Q_p (g/L.h):

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad \text{Equação 4.12}$$

onde:

P_i e P_f = Concentração inicial e final de células (g/L)

t_i e t_f = Concentração inicial e final de açúcares (glicose e xilose) (g/L)

4.5.4 Eficiência de Fermentação

$$\eta\% = \frac{Y_{p/s} \text{ calculado}}{Y_{p/s} \text{ teórico}} \times 100 \quad \text{Equação 4.13}$$

onde:

$$Y_{P/S} \text{ (teórico)} = 0,511 \text{ g/g.}$$

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos ensaios realizados com base nos planejamentos fatoriais foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa STATSTICA versão 7.0, para a verificação dos efeitos individuais e de interação das variáveis sobre a resposta, definição das variáveis importantes para o processo, avaliação dos erros experimentais e para a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas. Para otimização dos modelos obtidos, foi utilizado o programa Design-Expert 6.0.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do bagaço de malte e do hidrolisado hemicelulósico

O bagaço de malte (BM) utilizado neste trabalho foi analisado quanto aos teores dos seus principais componentes, conforme apresentado na Tabela 5.1. O BM foi obtido a partir de 100% de malte de cevada, ou seja, sem adjuntos e, como pode ser observado é um material lignocelulósico composto principalmente por (% p/p): hemicelulose (35,60), lignina (21,79), celulose (20,18) e proteínas (15,30). Nota-se ainda que a fração hemicelulósica apresenta teores de xilana e arabinana numa de relação aproximada de 2:1. O teor de hemicelulose observado no bagaço de malte mostra-se consideravelmente maior quando comparado a outros resíduos agrícolas como palha de arroz (22% p/p) (MUSSATTO, 2002), bagaço de cana (25% p/p) (PANDEY et al., 2000) e palha de cevada (23% p/p) (SAHA; COTA, 2010) evidenciando seu potencial como substrato rico em pentoses, para sua utilização em processos biotecnológicos.

Tabela 5.1. Composição química do bagaço de malte obtido no processo cervejeiro.

Componentes	(% p/p)
<i>Celulose</i>	20,18
<i>Hemicelulose</i>	35,60
<i>Xilana</i>	24,56
<i>Arabinana</i>	11,04
<i>Lignina total</i>	21,79
<i>Lignina solúvel em meio ácido</i>	4,64
<i>Lignina insolúvel (Klasson)</i>	17,15
<i>Grupos acetil</i>	3,02
<i>Cinzas</i>	2,99
<i>Proteínas</i>	15,30
<i>Extrativos*</i>	1,12

* obtido por diferença

Os teores de celulose e lignina do bagaço de malte situam-se em torno de 20% p/p e são comparáveis aos valores encontrados por Duarte et al. (2008), que observaram valores de 21 e 22% p/p, respectivamente. Além dos componentes estruturais, o BM contém elevado teor de proteínas (15,3% p/p) e cinzas (2,99%). Contudo, o teor de proteínas encontrado no presente trabalho foi discretamente inferior aos valores observados por Kanauchi et al. (2001), Russ et al. (2005) e Duarte et al. (2008), que encontraram teores de 24, 19 e 24,6% p/p, respectivamente. O teor de proteínas está relacionado à presença de aminoácidos, os quais são importantes para o crescimento e metabolismo de leveduras, do mesmo modo que a presença de cinzas relaciona-se à presença de minerais no material.

Quanto ao teor de extrativos, nota-se um valor de 1,12%. Os extrativos correspondem a ceras, gorduras, gomas, amidos, alcalóides, resinas, óleos essenciais e vários constituintes citoplasmáticos e são responsáveis pela cor, cheiro, resistência ao ataque de deterioradores, diminuição da permeabilidade e higroscopicidade e estabilidade dimensional do material (KLOCK et al., 2005). É importante ressaltar que a composição química do bagaço de malte pode variar de acordo com fatores como tipo do grão, tempo de colheita, condições de malteação e mosturação, além da adição ou não de adjuntos durante o processo cervejeiro (HUIGE, 1994; SANTOS et al., 2003).

Posterior à sua caracterização, o bagaço de malte foi submetido a um processo de hidrólise ácida, conforme descrito no item 6.4.1, visando recuperar os açúcares provenientes da hemicelulose (xilose e arabinose). A eficiência de conversão da hidrólise da hemicelulose (xilose e arabinose) em açúcares monoméricos foi de 82%, sendo cerca de 63% dos açúcares hemicelulósicos, composto por xilose. Adicionalmente, o hidrolisado obtido foi caracterizado quanto ao pH, densidade, açúcares (glicose, xilose e arabinose), proteínas, ácido acético e compostos provenientes da degradação de açúcares (furanos) e da lignina (fenólicos totais), antes e após ser submetido a um processo de concentração (Tabela 5.2).

Observa-se que os teores de açúcares, proteínas e fenólicos totais apresentaram um aumento proporcional ao fator de concentração, ou seja, um aumento de cerca de três vezes. Entretanto o ácido acético e os furanos apresentaram um aumento inferior ao fator de concentração empregado,

resultando na remoção parcial destes compostos. Isto se deve à volatilidade destes compostos sob as condições de temperatura e pressão utilizadas durante o processo de concentração, ou seja, 70 °C, sob vácuo.

Tabela 5.2. Composição do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de malte original e concentrado três vezes.

	<i>Hidrolisado original</i>	<i>Hidrolisado concentrado</i>	<i>Fator de concentração</i>
<i>Açúcares</i>			
Glicose	2,25	6,85	3,0
Xilose	25,56	77,66	3,0
Arabinose	11,81	37,98	3,0
<i>Proteínas Totais^a</i>	0,45	1,49	3,0
<i>Ácido acético</i>	2,92	3,07	1,0
<i>Furanos</i>			
Furfural	0,22	0,17	1,3
5-Hidroximetilfurfural	0,07	0,06	1,1
<i>Produtos de degradação da lignina</i>			
Ácido siríngico	nd	0,06	-
Siringaldeído	nd	0,02	-
Vanilina	nd	0,11	-
Ácido ferúlico	nd	0,16	-
Compostos fenólicos totais ^b	2,22	6,00	2,7
<i>pH</i>	1,27	0,8	-
<i>Densidade (g/cm³)</i>	1,02	1,06	-

^a Bradford (1976); ^b Singleton et al. (1999); nd: não detectado

Ainda em relação à Tabela 5.2, observa-se que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte apresenta em sua composição, compostos originados a partir da degradação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) e da lignina (ácidos siríngico e ferúlico, bem como vanilina, siringaldeído). Além destes, nota-se a presença do ácido acético, derivado de grupos acetil presentes na hemicelulose do bagaço de malte. Tais compostos são liberados durante o

processo de hidrólise e, dependendo da sua concentração podem inibir tanto o crescimento da levedura quanto a produção de etanol (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Entretanto, é difícil se estabelecer a partir de qual concentração, tal composto torna-se tóxico no meio de fermentação, visto que esta toxicidade é dependente de fatores como espécie e grau de adaptação do microrganismo ao meio.

Verifica-se na Tabela 5.2 que a concentração de furfural no hidrolisado de bagaço de malte foi cerca de três vezes superior a de hidroximetilfurfural. Esta diferença pode ser justificada pela elevada concentração de pentoses no hidrolisado, visto que o furfural é derivado da degradação destes açúcares durante o processo de hidrólise. Além disso, a hemicelulose é degradada mais facilmente do que a celulose, contribuindo assim, para a presença de concentrações elevadas deste inibidor no hidrolisado. As concentrações de furfural (0,17 g/L) e hidroximetilfurfural (0,06 g/L) presentes no hidrolisado de bagaço de malte são relativamente baixas quando comparadas às encontradas em outros hidrolisados. Por exemplo, no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, obtido por hidrólise com ácido diluído, Huang et al. (2009) verificaram que as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram de 0,74 g/L e 0,08 g/L, respectivamente. Estes valores são aproximadamente 4,0 e 1,5 vezes maiores do que os valores observados em hidrolisado de bagaço de malte.

Em um estudo sobre a produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo por *P. stipitis*, Nigam (2001a) observou que a concentração de furfural (0,25 g/L) presente no hidrolisado, não foi suficiente para reduzir os parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ e Q_P). Por outro lado, a adição de 1,5 g/L deste composto ao hidrolisado foi capaz de reduzir os valores destes parâmetros em 90 e 85%, respectivamente. Adicionalmente, Delgenes; Molleta; Navarro (1996), estudando a formação de biomassa na fermentação por *P. stipitis* em meio semissintético, verificaram que a concentração mínima inibitória de hidroximetilfurfural foi de 0,5 g/L. Nestas condições os autores observaram uma redução de 43% sobre a conversão do substrato em células. Desse modo, pode-se sugerir que as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural presentes no hidrolisado de bagaço de malte são baixas e provavelmente são inferiores às concentrações inibitórias mínimas para a levedura *P. stipitis*.

No presente estudo, o ácido acético apresentou uma concentração de cerca de 3,0 g/L no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, mostrando-se inferior às concentrações observadas em hidrolisados hemicelulósicos produzidos a partir de outros materiais. Por exemplo, no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, Kumar et al., (2007) observou uma concentração de 5,45 g/L de ácido acético, enquanto que Ferrari et al. (1992) obteve 10 g/L deste ácido em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. O ácido acético é reportado na literatura como um dos maiores inibidores da bioconversão a etanol por *P. stipitis*, sendo esta inibição fortemente dependente da sua concentração e do pH do meio (van ZYL et al., 1991). Segundo Lawford e Rousseau, (1998) quando o pH do meio de fermentação é ácido, o ácido acético ($pK_a = 4,75$) que apresenta-se na forma não-dissociada, consegue atravessar a membrana plasmática, pois é lipossolúvel nesta condição. Dentro da célula (pH = 7,4), o ácido se dissocia acumulando-se no citoplasma comprometendo a atividade intracelular, podendo levar à morte celular. Assim, tanto a presença do ácido acético, quanto a sua concentração no hidrolisado são fatores importantes e devem ser considerados durante o processo fermentativo. No entanto, a presença de outros compostos inibidores no hidrolisado, como os liberados pela degradação da lignina, pode potencializar o efeito não somente do ácido acético como também dos furanos. Conforme descrito por Mussatto e Roberto, 2004, a presença do furfural e do hidroximetilfurfural juntamente com compostos derivados de degradação da lignina e vários tipos de ácidos, pode resultar em um efeito sinérgico sobre a bioconversão por leveduras.

5.2 Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*

Diversas estratégias nutricionais vêm sendo cuidadosamente estudadas visando alcançar melhores resultados na bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a etanol. Contudo, estes hidrolisados podem ou não necessitar de suplementação nutricional, sendo este fator dependente não somente do tipo de material, mas também do microrganismo empregado. De acordo com Slininger, Gorsich e Liu, (2009), a suplementação nutricional pode ainda aumentar

a tolerância da levedura a compostos inibidores como furfural e hidroximetilfurfural, presentes em meios à base de hidrolisados.

Com o objetivo de verificar a necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte para a produção de etanol, pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 , onde se avaliou o efeito da adição de extrato de farelo de arroz (EFA), extrato de levedura (EL) e uréia (U). A escolha destes nutrientes foi baseada principalmente na necessidade mínima de nitrogênio e micronutrientes para o crescimento e produção de etanol pela levedura. Além de fonte de nitrogênio na forma de aminoácidos, o extrato de levedura é uma fonte de vitaminas e minerais, que são constituintes essenciais para o crescimento e metabolismo de leveduras, favorecendo tanto a produção de etanol quanto a taxa de fermentação (BÁFRNCOVÁ et al. 1999). Por outro lado, o extrato de farelo de arroz foi escolhido visando à possível substituição do extrato de levedura, por ser uma opção menos dispendiosa. O extrato de farelo de arroz apresenta em sua composição cerca de 12% de proteínas, 11% de lipídeos, 43% de carboidratos e 10% de cinzas (DAL MORO et al., 2004). De acordo com a literatura, a utilização da uréia como única fonte de nitrogênio não apresenta influência positiva sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124, entretanto quando associada a fontes de aminoácidos, é capaz de elevar a conversão de açúcares a etanol, bem como a velocidade do processo (SLININGER et al. 2006).

No presente trabalho, os ensaios foram realizados de acordo com a matriz experimental apresentada na Tabela 5.3, onde estão mostrados os níveis das variáveis e as concentrações utilizadas de cada nutriente, bem como o pH, o consumo de açúcares (glicose e xilose) e a produção de etanol pela levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, após 72 horas de fermentação. Observa-se que somente nos ensaios 1 e 3 (sem adição de nutrientes e suplementado com uréia, respectivamente), o consumo de açúcares pela levedura *P. stipitis* ficou abaixo de 90%. Nota-se ainda que a adição de uréia ao meio de fermentação melhorou o consumo do substrato pela levedura, quando comparado ao meio sem suplementação. Com relação à produção de etanol, verifica-se que no meio sem suplementação (ensaio 1), a concentração de etanol produzida pela levedura (10,7 g/L) foi cerca de 2 vezes menor do que a máxima

produção observada, 23,56 g/L no ensaio 5 (suplementado apenas com extrato de levedura).

Ainda na Tabela 5.3, nota-se que quando o hidrolisado foi suplementado com todos os nutrientes (ensaio 8), a produção de etanol (18,94 g/L) foi cerca de 20% menor do que a obtida apenas com a adição de extrato de levedura (ensaio 5). Este resultado mostra que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte com o extrato de farelo de arroz, uréia e extrato de levedura foi prejudicial à produção de etanol pela levedura *P. stipitis*, podendo-se ainda sugerir um efeito negativo do extrato de farelo de arroz e da uréia sobre o bioprocessamento, quando na presença do extrato de levedura.

Quanto ao pH final da fermentação, nota-se uma variação entre os ensaios do planejamento (5,86 a 6,20), não sendo possível relacioná-la à adição de um nutriente especificamente ou da associação deste com outros.

Tabela 5.3. Planejamento fatorial do tipo 2³, com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de BM sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol, pela levedura *P. stipitis*

Ensaio	Nível das Variáveis			Consumo de açúcares (%)	Produção máxima de etanol (g/L)	pH final
	EFA (%v/v)	U (g/L)	EL (g/L)			
1	0	0	0	71,63	10,70	5,86
2	20	0	0	92,43	16,05	5,86
3	0	3	0	82,04	14,24	5,86
4	20	3	0	97,11	16,72	5,86
5	0	0	3	98,08	23,56	6,15
6	20	0	3	95,95	21,86	5,81
7	0	3	3	98,50	19,38	6,20
8	20	3	3	98,18	18,94	6,18
9/10/11	10	1,5	1,5	98,63	16,50	6,11

açúcares: glicose+xilose; EFA: extrato de farelo de arroz; U: uréia; EL: extrato de levedura.

Nas Figuras 5.1a e 5.1b são mostrados os perfis de consumo de açúcares e ácido acético, produção de etanol e formação de biomassa em cada ensaio do planejamento. Com relação ao consumo de açúcares (Figura 5.1a), nota-se que

para todos os meios avaliados, glicose e xilose foram assimilados simultaneamente pela levedura. Além disso, não foi observado o consumo de arabinose, independente do meio de fermentação utilizado (dados não mostrados). Duarte et al. (2008) estudando a produção de biomassa por *Pichia stipitis* a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura, aminoácidos e minerais, observaram que a levedura *P. stipitis* apresentou o mesmo comportamento observado no presente trabalho, ou seja, glicose e xilose foram assimiladas simultaneamente e arabinose não foi consumida pela levedura. Do mesmo modo, White, Yohannan e Walker (2008), estudando a produção de etanol por *P. stipitis* em hidrolisado celulósico de bagaço de malte não suplementado, observaram que a levedura não utilizou arabinose durante a fermentação. De fato, a literatura reporta um discreto consumo de arabinose pela levedura *P. stipitis* após a exaustão de xilose, entretanto este consumo é direcionado para a produção de biomassa, mas não para etanol (NIGAM, 2002). Nota-se que, tanto para o ensaio 1 (meio não suplementado) quanto para o ensaio 3 (meio suplementado com uréia) a xilose não foi totalmente assimilada após 72 horas de fermentação. Nestes ensaios observa-se que as concentrações residuais de xilose no meio de fermentação, foram superiores a 4,0 g/L (16,55 e 10,34 g/L, respectivamente), diferentemente do observado para os demais ensaios. Embora a adição de uréia ao hidrolisado (ensaio 3) tenha melhorado o consumo de xilose pela levedura, quando comparado ao meio não suplementado (ensaio 1), nos meios suplementados com extrato de levedura e/ou extrato de farelo de arroz, o consumo de xilose foi superior a 90%.

Estes resultados estão de acordo com dados reportados por Silva et al. (2012) que estudaram o efeito da suplementação nutricional em meio semissintético composto por xilose sobre a produção de etanol. Os autores observaram que a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura e 2,3 g/L de uréia favoreceu o consumo do açúcar pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124, entretanto quando somente uréia foi adicionada ao meio, a xilose foi pobremente consumida (<10%), mostrando a que a levedura necessita de outros nutrientes além do nitrogênio, para uma eficiente conversão de açúcares a etanol.

Figura 5.1. Consumo de açúcares (glicose e xilose) (a) e ácido acético (b) pela levedura *P. stipitis* sob diferentes condições nutricionais, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^3 , em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

Na Figura 5.1b nota-se que o ácido acético presente (cerca de 2,0 g/L) foi totalmente consumido após 72 horas de fermentação, em todas as condições nutricionais avaliadas, com exceção do ensaio 3 (hidrolisado suplementado apenas com uréia), onde o consumo total deste ácido pela levedura foi observado após 96 horas. De fato, a literatura reporta a capacidade de *P. stipitis* em utilizar o ácido acético como fonte de carbono para o seu metabolismo, realizando consequentemente uma destoxificação *in situ*. Contudo, a capacidade da levedura em destoxificar o próprio meio de fermentação enquanto produz etanol, possivelmente só ocorre quando o pH do meio é favorável ao seu crescimento, conforme relatado anteriormente e reportado por van Zyl et al. (1991).

Com relação à produção de etanol (Figura 5.2a), nota-se uma grande variação nos valores obtidos em função da suplementação do meio de fermentação. Verifica-se que a menor produção de etanol (14,33 g/L) foi observada no ensaio 1 (não suplementado) após 96 horas e, a maior (23,56 g/L) no ensaio 5 (suplementado com extrato de levedura) após 72 horas de fermentação. Observa-se ainda que no ensaio 6 (suplementado com extrato de farelo de arroz e extrato de levedura) a concentração de etanol produzida pela levedura foi similar (21,86 g/L) à observada no ensaio 5 (suplementado apenas com extrato de levedura), podendo-se concluir que somente o extrato de levedura apresentou influência sobre a produção de etanol, visto que a concentração do produto não aumentou quando este nutriente foi adicionado ao meio. De fato, a suplementação de hidrolisados hemicelulósicos com extrato de levedura tem sido reportada na literatura como sendo necessária para se alcançar uma bioconversão eficiente, mostrando que este nutriente apresenta em sua composição nutrientes essenciais ao metabolismo da levedura *P. stipitis* (SILVA, et al. 2012; FERREIRA et al., 2011).

Os resultados observados a partir deste estudo reforçam a importância da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte com o extrato de levedura para uma eficiente conversão por *P. stipitis*. Como reportado por Slininger et al. (2006), para se alcançar melhores valores de fator de conversão e produtividade em etanol pela levedura *P. stipitis*, a composição do meio de fermentação deve apresentar não somente fontes de nitrogênio, mas também aminoácidos, vitaminas, purinas e pirimidinas.

Figura 5.2. Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) pela levedura *P. stipitis* sob diferentes condições nutricionais, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^3 , em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

Na Figura 5.2b são mostrados os perfis de crescimento da levedura *P. stipitis* nos diferentes ensaios do planejamento. Nota-se que a formação de biomassa variou de acordo com o meio de fermentação utilizado e que a menor concentração (7,27 g/L) foi obtida no ensaio 6 (suplementado com extrato de farelo de arroz e extrato de levedura), enquanto que a maior (8,97 g/L) no ensaio 5 (suplementado com extrato de levedura).

É importante ressaltar que mesmo quando nenhum nutriente foi adicionado ao hidrolisado (ensaio 1) a levedura foi capaz de crescer, alcançando-se uma concentração de 8,67 g/L, após 96 horas de fermentação. Desse modo, pode-se inferir que o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte possui nutrientes essenciais para o crescimento e metabolismo da levedura *P. stipitis*, possibilitando seu crescimento mesmo sem suplementação.

Com base nos dados apresentados, pode-se concluir que a produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, pela levedura *P. stipitis* requer a adição do extrato de levedura para que se obtenha uma conversão eficiente. Isto provavelmente se deve ao fato do hidrolisado empregado neste estudo não apresentar as fontes nutricionais essenciais ao metabolismo da levedura, ou apresentá-las em concentrações inferiores.

A Tabela 5.4 apresenta a matriz do planejamento 2^3 com os níveis reais das variáveis em estudo, assim como o fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$), a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e a velocidade de consumo de substrato (Q_S). Com relação ao $Y_{P/S}$, nota-se que quando o hidrolisado foi suplementado com extrato de farelo de arroz (ensaio 2) ou uréia (ensaio 3), este parâmetro aumentou apenas cerca de 14% em relação ao meio sem suplementação (ensaio 1). Entretanto, a adição de extrato de levedura (ensaio 5) resultou em um valor (0,44 g/g) cerca de 40% maior do que ao observado para o meio sem suplementação (0,25 g/g).

Analisando os valores de Q_P observa-se um comportamento similar ao obtido para $Y_{P/S}$, isto é, que a adição de extrato de farelo de arroz ou uréia ao hidrolisado aumentou a velocidade do processo em relação ao hidrolisado não suplementado, contudo a suplementação com extrato de levedura (ensaio 5) resultou no maior valor observado dentre todos os ensaios do planejamento, atingindo um valor de 0,33 g/L.h.

A velocidade de consumo de substrato (Q_S) também foi elevada a partir da suplementação do meio de fermentação com EFA, U ou EL. Observa-se que somente no ensaio 1 e no ensaio 3, este parâmetro apresentou valor abaixo de 0,7 g/L.h. Com relação ao $Y_{X/S}$, não foi possível observar nenhuma correlação desta resposta com a adição de extrato de farelo de arroz, uréia e/ou extrato de levedura ao hidrolisado.

Neste trabalho, a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura ao hidrolisado (ensaio 5) resultou em um aumento de 76% (0,25 para 0,44 g/g) e 120% (0,15 para 0,33 g/L.h) nos valores de $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente, quando comparado ao ensaio 1 (hidrolisado não suplementado). Vale ressaltar que o estudo de suplementação nutricional do hidrolisado de bagaço de malte proporcionou não somente um aumento nos parâmetros fermentativos de *P. stipitis*, como também possibilitou a redução de nutrientes adicionados ao meio simplificando a sua composição e consequentemente, diminuindo os custos do processo.

Tabela 5.4. Planejamento fatorial do tipo 2³, com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito da suplementação nutricional do HHBM sobre a conversão do substrato em etanol e em células, a produtividade em etanol e a velocidade de consumo de substrato, por *P. stipitis*.

Ensaio	Nível das Variáveis			Parâmetros Fermentativos			
	EFA (%v/v)	U (g/L)	EL (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Q_S (g/L.h)
1	0	0	0	0,25	0,13	0,15	0,59
2	20	0	0	0,29	0,09	0,22	0,73
3	0	3	0	0,29	0,11	0,20	0,66
4	20	3	0	0,30	0,07	0,23	0,77
5	0	0	3	0,44	0,13	0,33	0,74
6	20	0	3	0,40	0,07	0,30	0,76
7	0	3	3	0,33	0,07	0,27	0,82
8	20	3	3	0,34	0,10	0,26	0,77
9/10/11	10	1,5	1,5	0,33	0,10	0,23	0,74

EFA: extrato de farelo de arroz; EL: extrato de levedura; $Y_{P/S}$: rendimento em etanol; $Y_{X/S}$: rendimento em células; Q_P : produtividade volumétrica em etanol; Q_S : velocidade de consumo de substrato.

5.2.1 Análise estatística dos resultados

O efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte sobre o fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$), a produtividade volumétrica em etanol (Q_P) e a velocidade de consumo de substrato (Q_S), foi estudado de maneira mais detalhada através das análises estatísticas. A Figura 5.3 apresenta os gráficos de Pareto onde são mostradas as estimativas dos valores padronizados dos efeitos sobre cada resposta estudada. Os valores dos efeitos (t calculado) são comparados ao t de Student tabelado (linha pontilhada) para o número de graus de liberdade do experimento e o nível de confiança desejado, que neste caso foi de 95%. Efeitos com valores maiores que o t tabelado são considerados significativos e são representados pelas barras dos gráficos.

Com relação ao $Y_{P/S}$ (Figura 5.3a) e Q_S (Figura 5.3d), observa-se que dentre os nutrientes avaliados, somente o extrato de levedura apresentou efeito significativo e positivo sobre a conversão do substrato em etanol (+4,07) e a velocidade de consumo de substrato (+3,61). Quanto ao $Y_{X/S}$ (Figura 5.3b) nenhuma das variáveis apresentam significância estatística sobre este parâmetro. Analisando Q_P (Figura 5.3c) nota-se que além do efeito positivo do extrato de levedura (+10,56), foi observada uma interação negativa entre as variáveis 2 extrato de farelo de arroz e uréia (-3,84) e extrato de farelo de arroz e extrato de levedura (-3,36), evidenciando o efeito negativo do extrato de farelo de arroz e da uréia, quando adicionados juntamente com o EL. Com base na análise estatística, verifica-se uma concordância entre esta e a análise direta dos resultados, sendo o extrato de levedura o único, dentre os nutrientes avaliados, a apresentar efeito positivo sobre a conversão de açúcares a etanol pela levedura *P. stipitis*.

Foram realizadas análises de variância para as respostas $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, Q_P , Q_S (anexo) e foram observados coeficientes de correlação (R^2) de 0,89, 0,63, 0,98 e 0,87, respectivamente, o que demonstra a relevância dos fatores experimentais sobre tais respostas.

Figura 5.3. Gráficos de Pareto representando as estimativas dos efeitos a 95% de confiança e erro puro com 3 graus de liberdade ($t = 3,18$) para as variáveis resposta: $Y_{P/S}$ (a), $Y_{X/S}$ (b), Q_P (c), Q_S (d).

A suplementação nutricional de hidrolisados hemicelulósicos tem sido amplamente estudada visando melhorar o desempenho da levedura durante o processo fermentativo, entretanto deve-se considerar a espécie e/ou linhagem da levedura utilizada e consequentemente suas necessidades nutricionais. Adicionalmente, a composição química dos hidrolisados, bem como os métodos de pré-tratamento utilizados influenciam na constituição final do hidrolisado e na necessidade ou não de suplementação nutricional do mesmo. Vários trabalhos da literatura relatam estudos de suplementação nutricional de hidrolisados objetivando um melhor desempenho da levedura durante o processo fermentativo. Eken-Saraçoglu e Arslan (2000) utilizando o hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho (35 g/L de açúcares totais) suplementado com uréia (6,4 g/L), KH_2PO_4 (1,2 g/L), Na_2HPO_4 (0,18 g/L), extrato de levedura (10 g/L) e diversas fontes minerais, obtiveram valores para $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,34 g/g e de 0,11 g/L.h, respectivamente, durante a fermentação de *P. stipitis* NRRL Y-7124. Empregando o hidrolisado hemicelulósico de madeira (39 g/L de açúcares totais), suplementado com extrato de levedura (3 g/L), peptona (5 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L) e traços de minerais, Nigam (2001b) obteve um fator de conversão de 0,25 g/g e produtividade volumétrica em etanol de 0,10 g/L.h, a partir da mesma levedura. Verifica-se que os resultados obtidos a partir da suplementação do hidrolisado de bagaço de malte com 3 g/L de extrato de levedura são promissores quando comparados aos dados acima reportados, visto que apesar de empregar uma suplementação relativamente complexa, os autores alcançaram valores de $Y_{P/S}$ e Q_P consideravelmente inferiores aos reportados no presente estudo (0,44 g/g e 0,33 g/L.h, respectivamente).

5.3 Efeito da concentração do extrato de levedura e do pré-cultivo de *Pichia stipitis* em HHBM sobre a produção de etanol.

Tendo em vista que dentre os nutrientes avaliados, somente o extrato de levedura apresentou efeito significativo positivo sobre a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*, foram realizados ensaios visando avaliar a influência de diferentes concentrações deste nutriente sobre a bioconversão. Adicionalmente, foram realizados ensaios onde a levedura foi cultivada no próprio hidrolisado, após 24 horas de cultivo em meio semissintético. Este estudo teve como objetivo,

a aclimação da levedura ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte e consequentemente, a redução dos possíveis efeitos inibitórios conferidos pela presença de compostos de degradação de açúcares e lignina, bem como de ácido acético neste meio.

O efeito da adição de extrato de levedura sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol, foi avaliado empregando-se concentrações de 0 a 5,0 g/L deste nutriente ao HHBM e os resultados são apresentados na Figura 5.4. Os resultados mostram que a adição deste nutriente em concentrações abaixo de 3,0 g/L ao hidrolisado resultam em um consumo mais lento de açúcares pela levedura *P. stipitis*. Nota-se na Figura 5.4a que a levedura consumiu a xilose mais rapidamente à medida que se elevou a concentração do extrato de levedura até 3,0 g/L, sendo observada uma assimilação quase que total (90%) após 72 horas de fermentação. Entretanto, quando foram adicionados 4,0 e 5,0 g/L deste nutriente, o consumo de açúcares não foi favorecido. Comportamento similar foi observado para a produção de etanol, cerca de 20,0 g/L em todos os ensaios, independente da concentração de extrato de levedura utilizada. Contudo, esta produção foi observada em 72 horas quando utilizou-se 3 e 4 g/L do nutriente. Desse modo, conclui-se que a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura, dentre as concentrações avaliadas neste estudo, possibilitou alcançar resultados superiores em relação ao consumo de substrato e produção de etanol.

A Figura 5.5 apresenta os parâmetros fermentativos de *P. stipitis* obtidos a partir das diferentes concentrações de extrato de levedura avaliadas. É possível observar que os maiores valores para o fator de conversão de substrato (0,40 g/g) e para a produtividade volumétrica em etanol (0,30 g/L.h) foram obtidos a partir da adição de 3,0 g/L de extrato de levedura ao HHBM. A velocidade de consumo de substrato foi cerca de 17% maior (comparado aos valores obtidos pela adição de 1 e 2 g/L) utilizando-se as concentrações de 3 e 4 g/L de extrato de levedura, 0,7 g/L.h. Por outro lado, o fator de conversão do substrato em células mostrou uma redução até a concentração de 3,0 g/L de extrato de levedura e manteve-se praticamente constante nas concentrações de 4,0 e 5,0 g/L. Assim, os resultados obtidos a partir deste estudo confirmam que a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura ao hidrolisado de bagaço de malte favoreceu a bioconversão por *P. stipitis*, resultando valores superiores de $Y_{P/S}$ e Q_P , se comparados às outras concentrações avaliadas.

Figura 5.4. Consumo de açúcares (glicose e xilose) (a) e produção de etanol (b) por *P. stipitis*, a partir da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte com diferentes concentrações de extrato de levedura.

Figura 5.5. Influência de diferentes concentrações de extrato de levedura na bioconversão do HHBM por *Pichia stipitis*, sob os parâmetros fermentativos. (a): conversão do substrato em etanol; (b): conversão do substrato em células; (c): produtividade em etanol; (d): velocidade de consumo de substrato. EL: extrato de levedura.

Posterior ao estabelecimento da concentração de extrato de levedura a ser adicionada ao hidrolisado de bagaço de malte, foram realizados ensaios onde a levedura *P. stipitis* foi cultivada em hidrolisado após o cultivo em meio semissintético. Nestes ensaios foram avaliados o consumo de açúcares e a produção de etanol, bem como os parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$, Q_P , Q/S), sendo que tais resultados foram comparados aos obtidos a partir do cultivo da levedura em meio semissintético (Figura 5.6).

Com relação ao consumo de açúcares, observa-se que a levedura pré-cultivada em hidrolisado de bagaço de malte foi capaz de consumir cerca de 80% dos açúcares presentes (glicose e xilose), após 48 horas de fermentação, enquanto que a partir do pré-cultivo em meio semissintético, apenas 38% dos açúcares foram consumidos. Similar ao observado para o consumo de xilose, a velocidade de produção de etanol foi maior quando a levedura foi cultivada em hidrolisado. Nestas condições nota-se uma concentração de etanol de 18,14 g/L, ou seja, 132% maior do que a observada a partir do cultivo da levedura em meio semissintético (7,8 g/L). Entretanto, o consumo total de açúcares e a máxima produção de etanol foram alcançados após 72 horas para a levedura cultivada em hidrolisado, e neste tempo, os valores observados a partir do cultivo da levedura em meio semissintético foram similares.

A partir destes resultados pode-se concluir que o cultivo da levedura em hidrolisado aumentou a velocidade de consumo de substrato, do mesmo modo que a produção de etanol foi mais rápida. Contudo, a concentração máxima de etanol não foi favorecida.

A Tabela 5.5 apresenta os parâmetros fermentativos da levedura *P. stipitis* pré-cultivada em meio semissintético (MSS) e em hidrolisado. Verifica-se que o cultivo da levedura em HHBM favoreceu as velocidades do processo, isto é, aumentou a produtividade volumétrica em etanol e a velocidade de consumo de substrato em 23% (0,26 para 0,32 g/L.h) e 10% (0,71 para 0,78 g/L.h) respectivamente. Vale ressaltar que, provavelmente o final da fermentação pela levedura cultivada em hidrolisado foi anterior a 72 horas e desse modo, os valores para os parâmetros obtidos sob esta condição seriam superiores aos observados.

Figura 5.6. Consumo de xilose (a) e produção de etanol (b) por *P. stipitis*, a partir do cultivo da levedura em meio semissintético (●) e do cultivo em duas etapas: meio semissintético pelo cultivo em hidrolisado de bagaço de malte (●).

Tabela 5.5. Parâmetros da fermentação por *P. stipitis* cultivada em meio semissintético e em hidrolisado de bagaço de malte, após 72 horas de fermentação.

Parâmetros	Meio de cultivo	
	Meio semissintético	MSS + Hidrolisado Hemicelulósico de BM
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,40	0,40
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,14	0,16
Q_P (g/L.h)	0,26	0,30
Q_S (g/L.h)	0,71	0,78

MSS: meio semissintético

Assim, verificou-se que o cultivo as células em hidrolisado favoreceu a fermentação de *P. stipitis* em HHBM, possivelmente por diminuir o efeito inibitório dos furanos, compostos de degradação da lignina e principalmente do ácido acético, presentes no meio. Conforme reportado por Nigam (2001b), a adaptação de leveduras aos meios de fermentação contendo compostos inibidores pode melhorar os parâmetros fermentativos.

5.4 Otimização das condições de pH e concentração de células sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*, em HHBM não destoxificado

Diversos fatores podem influenciar a produção de etanol por leveduras, entre eles o pH e a concentração inicial de células. O pH é um importante fator para este processo, especialmente quando são empregados hidrolisados hemicelulósicos como meio de fermentação, os quais apresentam em sua composição, uma gama de compostos potencialmente inibidores ao metabolismo microbiano. Du Preez et al. (1994) reportou que na fermentação de xilose em meio semissintético por *P. stipitis*, o pH ótimo ficou entre 4,0 e 5,5, sendo o pH 4,5 mais recomendável, por minimizar a possibilidade de contaminação. Contudo, para o estabelecimento destas condições deve-se considerar não somente a fisiologia do microrganismo, mas também a composição do hidrolisado empregado no processo. De acordo com van Zyl et al. (1991), o ácido acético presente nos hidrolisados obtidos a partir da hidrólise com ácido diluído pode ter seu efeito minimizado, utilizando-se valores mais elevados de pH. Do mesmo modo, a concentração inicial de células favorece não somente a velocidade de fermentação, como também pode ser utilizada como estratégia para contornar os efeitos inibitórios do ácido acético e dos produtos de degradação presentes no hidrolisado, sobre *P. stipitis* (OLSSON; HAHN-HAGERDAL, 1996; AGBOGBO et al. 2007).

Desse modo, visando otimizar as condições para a produção de etanol em hidrolisado de bagaço de malte pela levedura *P. stipitis*, foi empregado um planejamento fatorial 2^2 composto com face centrada, onde avaliou-se o efeito da variação de pH e da concentração inicial de células (X_0). A fim de identificar e quantificar o efeito individual de cada variável experimental e de suas interações sobre o processo, a fermentação foi realizada sob pH 4,5, 5,5 ou 6,5 e as

concentrações iniciais de células de 1,0, 3,0 e 5,0 g/L foram empregadas. Vale ressaltar que foram empregadas neste estudo as condições estabelecidas nos ensaios anteriores, portanto o inóculo foi preparado diretamente em hidrolisado de bagaço de malte contendo 30,0 g/L de xilose, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, eliminando-se portanto, a etapa de pré-cultivo em meio semissintético.

A Tabela 5.6 apresenta a matriz experimental com os níveis reais de cada variável, assim como o consumo de açúcares, a produção de etanol e a variação de pH nos diferentes ensaios do planejamento, após 36 horas de fermentação. Verifica-se que independente da concentração celular empregada, quando utilizou-se hidrolisado com pH de 4,5, não houve consumo de açúcares (glicose e xilose) e produção de etanol pela levedura, indicando que o aumento da concentração inicial de células não foi suficiente para superar o efeito inibitório causado pelo pH ácido do meio. De fato como já reportado por Verduyn et al. (1990), fermentações realizadas em pH ácido inibem o metabolismo da levedura, mesmo na ausência de ácidos fracos. Isto se deve ao aumento do gradiente de prótons através da membrana plasmática, resultando na absorção passiva de prótons pela célula, acidificando assim, o pH intracelular.

Nota-se ainda que em pH 6,5, a levedura foi capaz de consumir acima de 80% dos açúcares presentes no hidrolisado e produzir a máxima concentração de etanol observada, que ficou em torno de 23,0 g/L, sugerindo portanto, que o aumento da concentração inicial de células neste valor de pH não mostrou grande diferença sobre estes resultados. Porém, grandes variações foram observadas a partir do aumento da concentração celular em pH 5,5. Os resultados mostram claramente que neste pH o aumento da concentração inicial de células resultou em um aumento aproximadamente 145% a mais de substrato consumido em 36 horas e 67% na concentração máxima de etanol, quando comparados os ensaios 5 ($X_0 = 1,0$ g/L) e 6 ($X_0 = 5,0$ g/L). Tais resultados estão de acordo com o observado por Agbogbo et al. (2007) ao estudar o efeito da concentração inicial de células sobre a fermentação de xilose por *P. stipitis*, em meio semissintético (pH 6,3). Estes autores relataram que o aumento da concentração celular de 1,82 g/L para 6,45 g/L, elevou a produtividade volumétrica em etanol em 50%, contudo o fator de conversão de substrato em etanol não sofreu alteração. Além disso, o aumento do pH do meio de fermentação resulta na forma dissociada de diversos

compostos inibidores, tornando-os assim menos tóxicos para a célula. Desse modo, o aumento de 1 unidade de pH foi suficiente para que as células presentes conseguissem superar o efeito dos inibidores presentes no hidrolisado.

Com relação à variação do pH do meio durante as fermentações, verifica-se que os valores não sofreram alteração durante o processo, com exceção do ensaio 1 (pH 4,5 e $X_0 = 1,0$ g/L) em que foi verificado uma discreta queda, cerca de 0,25 unidades.

Tabela 5.6. Planejamento fatorial do tipo 2^2 , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito do pH e da concentração inicial de células (X_0) sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol pela levedura *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de BM após 36 horas de fermentação.

Ensaio	Níveis das Variáveis		Parâmetros		
	pH	X_0 (g/L)	Consumo de açúcares (g/L)	Produção de etanol (g/L)	pH
1	4,5	1,0	0,00	0,00	4,25
2	6,5	1,0	83,42	22,05	6,40
3	4,5	5,0	0,00	0,00	4,44
4	6,5	5,0	100,00	23,42	6,41
5	5,5	1,0	27,16	8,10	5,49
6	5,5	5,0	66,68	13,57	5,49
7	4,5	3,0	0,00	0,00	4,44
8	6,5	3,0	100,00	22,83	6,49
9/10/11	5,5	3,0	38,02	9,63	5,62

açúcares: glicose e xilose; X_0 : concentração inicial de células

A Figura 5.7 mostra o perfil da levedura *P. stipitis* nos ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Verifica-se que nas fermentações realizadas em pH 4,5, tanto o consumo de açúcares quanto o de ácido acético pela levedura foram fortemente afetados, visto que esta não foi capaz de consumir tais compostos nesta condição, independente da concentração celular empregada. Contudo, até mesmo para o consumo de glicose, que é dependente de enzimas constitutivas, foi observada inibição neste pH, verificando-se apenas um consumo de cerca de 30% quando a concentração inicial de células foi de 5,0 g/L (Figura 5.7a).

Figura 5.7. Consumo de glicose (a), xilose (b) e de ácido acético (c) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células.

Na Figura 5.7b nota-se que o consumo de xilose pela levedura foi favorecido pelo aumento do pH do meio mostrando uma assimilação mais rápida em pH 6,5, que por sua vez, não foi influenciado pela concentração inicial de células, como relatado anteriormente. Por outro lado, em pH 5,5 observa-se que o consumo foi mais rapidamente consumida à medida que a concentração inicial de células foi aumentada.

Com relação ao consumo de ácido acético, verifica-se que a levedura foi capaz de destoxificar o hidrolisado em pH 5,5 e 6,5, e que tanto pH quanto a concentração inicial de células favoreceram o consumo mais rápido deste ácido. Isto fica claro quando analisa-se este consumo em pH 6,5, pois a utilização de níveis maiores de X_0 (3,0 ou 5,0 g/L) resultaram num consumo mais rápido (12 horas antes) quando comparado à 1 g/L de células (ensaio 2).

Tais resultados mostram que a levedura assimilou mais rapidamente o ácido acético quando foram empregados os níveis máximos de pH e concentração inicial de células. Estes dados estão de acordo com os relatos de van Zyl et al. (1991), ou seja, que a utilização de pH 6,5 pode ser uma estratégia eficiente para minimizar o efeito inibidor ácido acético e dos compostos de degradação da lignina sobre a bioconversão por *P. stipitis*. Além disso, vale ressaltar que o efeito inibidor do ácido acético foi altamente intensificado quando associado ao pH ácido do meio de fermentação.

A Figura 5.8 apresenta a produção de etanol e a formação de biomassa pela levedura *P. stipitis* sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, em hidrolisado de bagaço de malte. Do mesmo modo que observado para o consumo de açúcares e ácido acético, para a produção de etanol (Figura 5.8a), nota-se que, o pH 6,5 favoreceu a formação do produto pela levedura, quando comparado ao pH 5,5. Adicionalmente nos ensaios em pH 6,5 a máxima concentração de etanol foi observada 12 horas antes (cerca de 23,0 g/L), quando empregou-se concentrações celulares mais altas (3 ou 5 g/L), mostrando que o aumento da concentração inicial de células acelerou o processo de bioconversão por *P. stipitis*.

Os perfis de crescimento da levedura *P. stipitis* nas diferentes condições do planejamento 2², são mostrados na Figura 5.8b.

Figura 5.8. Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células.

Observa-se que nos ensaios realizados em pH 4,5, houve um discreto crescimento da levedura nas primeiras 12 horas de fermentação, entretanto a concentração celular manteve-se estável após este tempo. Por outro lado, nos ensaios realizados em pH 5,5 e 6,5 nota-se crescimento celular até o tempo final da fermentação (72 horas), com exceção do ensaio 8 (pH 6,5 e $X_0 = 3,0$ g/L) que apresentou um decréscimo na concentração celular após 36 horas de fermentação. Adicionalmente, a menor formação de biomassa (diferença entre concentração de células inicial de final) foi observada no ensaio 8 (pH 5,5 e $X_0=3,0$ g/L) e a maior no ensaio 5 (pH 5,5 e $X_0=1,0$ g/L). Silva (2001) estudando o efeito do ácido acético sobre a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em meio semissintético, observou que o potencial inibitório do ácido acético não está relacionado somente à sua concentração no meio, mas também à fase de crescimento da levedura. Portanto, a sua adição na fase inicial do processo fermentativo teve maior impacto sobre a formação de biomassa.

Na Tabela 5.7 é mostrada a matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, assim como o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$), a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), a velocidade de consumo de substrato (Q_S) e a eficiência de conversão (%) nos diferentes ensaios. Quanto ao $Y_{P/S}$ e Q_P , nota-se que os maiores valores (em torno de 0,40 g/g e 0,64 g/L.h, respectivamente) foram observados nos ensaios realizados sob pH 6,5, entretanto somente para a produtividade volumétrica em etanol o aumento da concentração inicial de células foi favorável, resultando em um valor de Q_P 27% maior, quando comparado ao ensaio 2 ($X_0 = 1,0$ g/L). Comportamento similar foi observado para a velocidade de consumo de substrato, sendo os maiores valores obtidos a partir da fermentação em pH 6,5 (cerca de 1,7 g/L). Desse modo, as variáveis testadas neste estudo (pH e X_0) favoreceram o processo de conversão dos açúcares a etanol em HHBM, à medida em que seus níveis foram elevados.

Considerando a conversão do substrato em células ($Y_{X/S}$), observa-se que em pH 4,5 a levedura apresentou um discreto crescimento nas primeiras horas, resultando em um valor de $Y_{X/S}$ em torno de 0,10 g/g.

Tabela 5.7. Matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células sobre a fermentação do HHBM pela levedura *P. stipitis*.

Ensaio	Níveis Reais das Variáveis		Parâmetros fermentativos			
	pH	X_0 (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Q_S (g/L.h)
1	4,5	1,0	Nd	0,10	nd	nd
2	6,5	1,0	0,42	0,15	0,51	1,27
3	4,5	5,0	Nd	0,10	nd	nd
4	6,5	5,0	0,40	0,14	0,65	1,60
5	5,5	1,0	0,39	0,14	0,32	0,84
6	5,5	5,0	0,35	0,11	0,38	1,05
7	4,5	3,0	Nd	0,09	nd	nd
8	6,5	3,0	0,41	0,14	0,63	1,75
9/10/11	5,5	3,0	0,37	0,12	0,38	0,84

X_0 : concentração inicial de células; nd: não determinado

Tais resultados relacionam-se provavelmente à tentativa de adaptação da levedura a um meio hostil, causado não somente pelo pH ácido como também pela presença de compostos inibidores presentes no hidrolisado. Entretanto, nos meios com pH 5,5 e 6,5 nota-se que tais condições foram favoráveis ao crescimento da levedura, independente da concentração inicial de células empregada.

Os resultados mostram a grande influência do pH sobre estes parâmetros e, além disso, evidencia que o aumento da concentração inicial de células favorece a produtividade volumétrica em etanol, conforme reportado por Olsson e Hahn-Hägerdal (1996); Agbogbo et al. (2007); Ferreira et al. (2011). De fato, o aumento da concentração celular resulta em maior número de células viáveis, disponíveis para a formação de produto e, portanto uma concentração de produto maior pode ser vista num período de fermentação mais curto.

A partir dos resultados alcançados pode-se concluir que a utilização de pH 6,5 juntamente com a concentração inicial de células de 5,0 g/L na fermentação por *P. stipitis*, foi uma estratégia eficiente para minimizar o efeito inibidor ácido acético e dos compostos de degradação da lignina presentes no HHBM.

5.4.1 Análise estatística do Planejamento Fatorial Composto 2^2 com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células.

A Tabela 5.8 apresenta a análise de variância (ANOVA) realizada para as respostas avaliadas neste estudo (pH e concentração inicial de células), onde são apresentados os efeitos estatisticamente significativos (em negrito), bem como a contribuição de cada variável para o processo.

Os resultados da análise estatística confirmaram os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, ou seja, o aumento do valor do pH exerceu um efeito positivo sobre todos os parâmetros fermentativos avaliados, enquanto que o aumento da concentração inicial de células apresentou efeito positivo somente sobre a produtividade volumétrica em etanol, ao nível de 95% de confiança. Não foram observados efeitos de interação entre pH e concentração inicial de células para todas as respostas.

Verifica-se que o coeficiente de correlação (R^2) para $Y_{P/S}$, $Y_{X/S}$, Q_P e Q_S foi superior a 0,80 demonstrando a relevância estatística dos fatores experimentais sobre as respostas avaliadas. Nota-se ainda que o pH (linear) foi o fator que apresentou maior contribuição para todas as respostas. O efeito quadrático do pH foi significativo para todas as respostas, exceto para a conversão do substrato em células, sendo que para $Y_{P/S}$, esta variável apresentou uma contribuição de cerca de 20%. Adicionalmente, com relação à produtividade volumétrica em etanol, foi observado um efeito positivo da concentração inicial de células sobre esta resposta (contribuição de 1,17%).

Tabela 5.8. Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de BM por *P. stipitis*, sob diferentes condições de pH (1) concentração inicial de células (2).

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	1 (L)	0,2521	1	0,25215	334,09	0,0000	76,62
	1 (Q)	0,0676	1	0,06765	89,64	0,0002	20,54
	2 (L)	0,0006	1	0,00060	0,79	0,4134	0,18
	2 (Q)	0,0000	1	0,00006	0,01	0,9306	0,00
	1*2	0,0001	1	0,00010	0,13	0,7307	0,03
	Erro	0,0037	5	0,00075			
$R^2 = 0,98$	Total	0,3290	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	1 (L)	0,0032	1	0,00326	38,83	0,0015	80,00
	1 (Q)	0,0000	1	0,00003	0,41	0,5507	0,75
	2 (L)	0,0002	1	0,00026	3,17	0,1351	5,00
	2 (Q)	0,0001	1	0,00010	1,20	0,3230	2,50
	1*2	0,0000	1	0,00002	0,29	0,6090	0,50
	Erro	0,0004	5	0,00008			
$R^2 = 0,89$	Total	0,0040	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
Q_P (g/L.h)	1 (L)	0,5340	1	0,53401	645,71	0,0000	94,71
	1 (Q)	0,0093	1	0,00936	11,31	0,0200	1,64
	2 (L)	0,0066	1	0,00666	8,06	0,0362	1,17
	2 (Q)	0,0016	1	0,00168	2,03	0,2128	0,28
	1*2	0,0049	1	0,00490	5,92	0,0590	0,86
	Erro	0,0041	5	0,00082			
$R^2 = 0,99$	Total	0,5638	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
Q_S (g/L.h)	1 (L)	3,5574	1	3,55740	355,84	0,0000	93,22
	1 (Q)	0,0741	1	0,07412	7,41	0,0416	1,94
	2 (L)	0,0486	1	0,04860	4,86	0,0786	1,27
	2 (Q)	0,0258	1	0,02586	2,58	0,1686	0,67
	1*2	0,0272	1	0,02722	2,72	0,1598	0,71
	Erro	0,0499	5	0,00999			
$R^2 = 0,98$	Total	3,8160	10				

1 (L): pH linear; 2 (L): concentração inicial do células linear; 1 (Q): pH quadrático; 2 (Q): concentração inicial do células quadrático; SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática.

Foram realizadas então, análises de variância de regressão onde se observa que os coeficientes de correlação (R^2) para as principais respostas relacionadas a produção de etanol, isto é, $Y_{P/S}$ e Q_P (Tabela 5.9).

Todavia, visando à otimização das condições utilizadas, as respostas foram maximizadas em conjunto, selecionando convenientemente os critérios de forma que as variáveis independentes fossem mantidas na faixa em estudo e os valores estimados para as respostas, dentro de uma faixa que permitisse a sobreposição dos modelos. Portanto, considerando-se o fator de conversão de substrato e a produtividade volumétrica em etanol, os valores encontrados foram pH 6,4 (nível codificado +0,92) e concentração inicial de células de 5,0 g/L (valor codificado +1,0).

Foram excluídos termos sem significância para o modelo visando a melhora do mesmo. Desse modo, para $Y_{P/S}$ foram excluídas a concentração inicial de células linear e quadrática, assim como a interação entre esta e a variável pH. Por outro lado, para a variável resposta Q_P , somente a concentração inicial de células quadrática foi excluída do modelo. Assim, com base nos resultados obtidos a partir desta análise, foi possível determinar modelos empíricos para descrever o efeito do pH (A) e da concentração inicial de células (B) sobre a conversão do substrato em etanol (Y_1) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_1), na região estudada, sendo mostrados na Tabela 5.10.

Os modelos matemáticos obtidos mostraram-se significativos ($p < 0,001$) e não apresentaram falta de ajuste ao nível de 95% de confiança, o que significa que a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação pode ser explicada pelo erro experimental.

As superfícies de resposta descritas pelas equações do modelo para a conversão do substrato (a) e a produtividade em etanol (b) (Figura 5.9) mostram claramente que a utilização dos níveis máximos de pH (5,5) e X_0 (6,5) contribuíram para o aumento da velocidade de produção de etanol. Além disso, o aumento do pH também favoreceu a conversão do substrato em etanol.

Tabela 5.9. Análise de variância de regressão para os modelos representativos da conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P).

Variáveis Dependentes	Variáveis Independentes	Coeficientes	t (5)	p
$Y_{P/S}$ (g/g)	Média	0,367	26,06	0,000*
	A	0,205	18,27	0,000*
	B	-0,010	-0,89	0,413
	A*B	-0,005	-0,36	0,730
	A ²	-0,163	-9,46	0,000*
	B ²	0,001	0,09	0,930
Q_P (g/L.h)	Média	0,376	25,50	0,000*
	A	0,298	25,41	0,000*
	B	0,033	2,83	0,003
	A*B	0,035	2,43	0,059
	A ²	-0,060	-3,36	0,002
	B ²	-0,002	-1,42	0,212

A: pH linear; A²: pH quadrático; B: concentração inicial de células; B²: concentração inicial de células; 99% de significância.

Tabela 5.10. Equações do modelo para otimização de pH e concentração inicial de células na fermentação do HHBM por *P. stipitis*, ajustados aos dados experimentais para o fator de conversão (Y_1) e produtividade volumétrica em etanol (Q_1).

Resposta	Equações do modelo	R ²
$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y = 0,370 + 0,205A - 0,165B + 0,035AB$	0,98
Q_P (g/L.h)	$Q = 0,366 + 0,298A + 0,033B - 0,067A^2 - 0,002B^2$	0,99

A: pH linear; A²: pH quadrático; B: concentração inicial de células; B²: concentração inicial de células.

(a)

(b)

Figura 5.9. Superfície de resposta relacionando a conversão do substrato em etanol (a) e a produtividade volumétrica em etanol (b) com a concentração inicial de células e pH em níveis codificados.

5.4.2 Confirmação experimental das condições otimizadas

A partir da escolha do ponto determinado como ótimo, foram realizados ensaios para a confirmação do modelo obtido, ou seja, empregando-se o hidrolisado de bagaço de malte contendo cerca de 55 g/L de xilose e suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura. As fermentações foram realizadas em pH 6,4 e com 5,0 g/L de células de *P. stipitis* previamente cultivadas em hidrolisado contendo 30 g/L de xilose.

A Figura 5.10 mostra a cinética obtida a partir das médias das duplicatas usando as condições otimizadas de pH (6,4) e de concentração inicial de células (5,0 g/L). Observa-se que os açúcares foram completamente assimilados após 36 horas de fermentação e que a máxima produção de etanol (23,40 g/L) foi alcançada neste tempo. Tais resultados são similares aos encontrados no planejamento fatorial, validando experimentalmente os resultados obtidos.

A Tabela 5.11 apresenta os resultados do processo fermentativo nas condições otimizadas após 36 horas de fermentação. Observa-se que o modelo obtido descreveu bem a região em estudo, visto que os resultados apresentados estão dentro da faixa de variação (0,38 - 0,45 g/g para $Y_{P/S}$) (0,59 - 0,72 g/L.h para Q_P) prevista por este mesmo modelo.

A partir do presente estudo foi possível otimizar as condições para produção de etanol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte por *P. stipitis*. Entretanto, torna-se restrita a comparação com outros trabalhos da literatura, visto que existem poucos relatos de fermentações utilizando hidrolisados de bagaço de malte para a produção de etanol, empregando a levedura *P. stipitis*. A partir do hidrolisado celulósico de bagaço de malte, White, Yohannan e Walker (2008) estudando a produção de etanol por *P. stipitis*, observaram uma eficiência de conversão inferior a 70% (62,7%). Além disso, os valores observados para $Y_{P/S}$ (0,32 g/g) e Q_P (0,17 g/L.h) foram consideravelmente inferiores aos observados no presente trabalho, isto é, 0,41 g/g e 0,65 g/L.h, respectivamente.

Figura 5.10. Comportamento cinético da levedura *P. stipitis*, observado nas condições otimizadas pelo modelo, visando à produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

Tabela 5.11. Parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios visando à confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de açúcares (glicose e xilose) em etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

Parâmetros	Resultados
Tempo de fermentação (h)	36
Consumo de açúcares (%)	99,51
Concentração celular (g/L)	11,70
Concentração de etanol (g/L)	23,40
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,41 (0,42 $\pm$ 0,01)
Q_P (g/L.h)	0,65 (0,65 $\pm$ 0,02)
η (% do teórico)	80

(): valores previstos pelo modelo otimizado; açúcares: glicose e xilose; η : eficiência de conversão

Adicionalmente, deve-se considerar que os resultados foram alcançados a partir do hidrolisado hemicelulósico não destoxificado e que, como relatado anteriormente, a presença de inibidores pode ter reduzido o potencial deste hidrolisado durante o processo fermentativo. Dessa forma, a avaliação da produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado é um importante aspecto a ser considerado.

5.5 Otimização das condições de pH e concentração inicial de células visando à produção de etanol por *Pichia stipitis*, em HHBM destoxificado

Os métodos de destoxificação são necessários quando os hidrolisados apresentam um alto teor de compostos inibidores e/ou quando um microrganismo apresentando baixa tolerância a tais compostos é empregado no processo fermentativo. Além disso, o método de destoxificação deve remover seletivamente os compostos inibidores, ser economicamente viável e facilmente integrado ao processo. De acordo com Eva Palmqvist e Hahn-Hägerdal, (2000) os hidrolisados hemicelulósicos variam quanto ao seu grau de inibição, e diferentes microrganismos apresentam tolerância a diferentes inibidores.

Embora o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte não destoxificado tenha apresentado resultados promissores para a produção de etanol, é importante ressaltar que o ácido acético foi determinante em condições onde se empregou pH 4,5, mostrando seu grande potencial inibitório sobre a levedura *P. stipitis*, quando associado ao pH ácido. Desse modo, visando reduzir a toxicidade do hidrolisado pela redução das concentrações dos compostos inibidores, especialmente o ácido acético, e promover a conversão dos açúcares a etanol pela levedura *P. stipitis* em pH 4,5, o hidrolisado de bagaço de malte foi submetido a um processo de destoxificação utilizando-se a metodologia descrita por Mussatto, Santos e Roberto (2004) que consiste na alteração de pH em combinação com o método de adsorção utilizando carvão ativado.

A Tabela 5.12 apresenta as concentrações de açúcares e dos principais compostos inibidores resultantes deste processo. Observa-se que, após o processo de destoxificação, houve uma redução nas concentrações de todos os componentes do hidrolisado e ao final do processo, uma perda de cerca de 22% em volume de hidrolisado. Quanto à concentração de açúcares, houve uma

redução de cerca de 19, 14 e 16% para glicose, xilose e arabinose, respectivamente. Redução similar foi observada para o ácido acético (17,72%), entretanto as concentrações de furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos totais foram reduzidas em aproximadamente 86, 66 e 79%, respectivamente.

Tabela 5.12. Açúcares e principais compostos inibidores, dados em g/L, detectados durante o processo de destoxificação do HHBM.

Componentes	Etapas da destoxificação do HHBM concentrado						
	pH 0,8 (original)	1	2	3	4	4*	4**
Glicose	8,32	7,33	7,06	7,35	6,93	6,09	7,17
Xilose	77,45	70,99	68,72	70,51	66,18	65,39	68,33
Arabinose	38,25	33,26	32,68	33,5	31,53	31,87	32,55
Ácido acético	3,61	3,50	3,19	3,05	2,98	2,84	3,11
Furfural	0,07	0,03	0,03	0,02	0,01	0,01	0,01
5-HMF	0,22	0,14	0,10	0,09	0,08	0,08	0,07
Fenólicos Totais^a	6,00	5,10	4,74	1,51	1,27	1,26	1,26

HC: hidrolisado concentrado; 5-HMF: hidroximetilfurfural; pós CA: após a etapa de adsorção com carvão ativado; ^a Singleton et al. (1999).

1: etapa após a elevação do pH para 8,0, a partir da adição de NaOH;

2: etapa após a redução do pH para 2,0, a partir da adição de H₂SO₄;

3: etapa após a adsorção com carvão ativado;

4, 4*, 4**: elevação do pH para 4,5, 5,5 e 6,5, respectivamente, a partir da adição de NaOH.

Verifica-se, portanto que com relação aos compostos inibidores, somente as concentrações de 5-HMF, furfural e compostos fenólicos totais foram reduzidas consideravelmente. Os resultados aqui apresentados estão de acordo com relatos da literatura. Carvalheiro et al. (2005) também observou que não houve remoção do ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte através da adsorção com 10% carvão ativado, após “overliming”. Por outro lado, estes autores observaram uma redução de 68 e 92% nas concentrações de furfural e 5-HMF, respectivamente, após este tratamento.

Resultados similares foram observados por Canilha et al. (2010) e Chandel et al. (2007) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, mostrando que a

destoxificação a partir da adsorção com carvão ativado resultou em uma redução de 90 e 46% na concentração de compostos derivados da lignina (CANILHA et al., 2010; CHANDEL et al., 2007). Por outro lado, tais autores reportaram que somente a utilização de resinas de troca iônica levou a redução de cerca de 80% na concentração de ácido acético.

A Figura 5.11 apresenta os espectros de varredura da região do ultravioleta (UV) do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, antes e após o processo de destoxificação. O espectro de varredura na região do UV é uma técnica analítica utilizada para caracterizar hidrolisados oriundos de materiais lignocelulósicos, fornecendo informações sobre a presença de compostos fenólicos derivados da lignina e também compostos resultantes da degradação de carboidratos (MARTINEZ et al., 2000). Nota-se na Figura 5.11, que o hidrolisado original (não destoxificado) apresenta duas regiões de máxima absorbância, uma próxima de 280 nm e outra em 210 nm. De acordo com Martinez et al. (2000) o comprimento de onda de 280 nm é característico da presença de furanos e compostos fenólicos derivados de lignina.

Figura 5.11. Espectros de varredura na região do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte concentrado antes (—) e após (—) o processo de destoxificação.

Verifica-se que no comprimento de onda de 280 nm ocorreu uma redução de cerca de 80% nos valores de absorbância, após o processo de destoxificação, evidenciando a redução dos inibidores e confirmando os resultados obtidos a partir da metodologia de Folin modificada (Tabela 5.12).

Para otimização das condições de pH e concentração inicial de células durante a fermentação por *P. stipitis*, do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado, foi realizado um planejamento 2^2 composto com face centrada. Foram utilizadas as mesmas condições empregadas para a otimização da fermentação em hidrolisado não destoxificado (Item 5.4), sendo o inóculo preparado em hidrolisado não destoxificado.

A Tabela 5.13 apresenta a matriz experimental com os níveis reais das variáveis, assim como o consumo de açúcares, a produção de etanol e a variação de pH nos diferentes ensaios do planejamento, ao final de 48 horas de fermentação. De modo geral, verifica-se que a levedura apresentou o mesmo comportamento observado nos ensaios fermentativos em hidrolisado não destoxificado. Assim, nota-se que independente da concentração inicial de células, o pH 4,5 empregado em alguns ensaios do planejamento, inibiu completamente o metabolismo de *P. stipitis*, não havendo consumo de açúcares e formação de etanol. Por outro lado, em pH 6,5, a levedura foi capaz de consumir mais de 80% dos açúcares presentes no hidrolisado e produzir a máxima concentração de etanol (19,21 g/L). Com estes dados, pode-se inferir que o aumento do pH foi capaz de reduzir a toxicidade do hidrolisado de bagaço de malte. Além disso, neste pH, o aumento da concentração inicial de células não influenciou os resultados. No entanto, sob pH 5,5 observa-se que à medida em que a concentração celular aumenta, os açúcares são consumidos mais rapidamente, ocorrendo também aumento na produção máxima de etanol (cerca de 12%). A partir destes resultados, fica claro que o aumento de apenas 1 unidade de pH (4,5 para 5,5) foi suficiente para melhorar a capacidade de assimilação das fontes de carbono presentes, pela levedura, para a produção de biomassa e etanol.

Com relação ao pH do meio, verifica-se que os valores não sofreram grandes alterações durante o processo, contudo os ensaios realizados em pH 5,5 apresentaram uma elevação de cerca de 0,60 unidades após 48 horas de fermentação.

Tabela 5.13. Planejamento fatorial do tipo 2^2 , com três repetições no ponto central (média apresentada), visando avaliar o efeito do pH e da concentração inicial de células (X_0) sobre o consumo de açúcares e a produção de etanol, pela levedura *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, após 48 horas de fermentação.

Ensaio	Níveis das Variáveis		Parâmetros		
	pH	X_0 (g/L)	Consumo de açúcares (g/L)	Produção de etanol (g/L)	pH
1	4,5	1,0	0,00	0,00	4,60
2	6,5	1,0	86,12	18,48	6,55
3	4,5	5,0	0,00	0,00	4,60
4	6,5	5,0	95,68	17,91	6,64
5	5,5	1,0	67,03	14,64	6,06
6	5,5	5,0	78,45	16,38	6,12
7	4,5	3,0	0,00	0,00	4,61
8	6,5	3,0	93,22	19,21	6,50
9/10/11	5,5	3,0	71,23	15,40	5,99

açúcares: glicose+xilose; X_0 : concentração inicial de células

A Figura 5.12 apresenta os perfis de consumo de glicose, xilose e ácido acético pela levedura *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado. Considerando as fermentações realizadas em pH 4,5 (ensaios 1, 3 e 7) não foi observado consumo de xilose e ácido acético, independente da concentração celular empregada (Figuras 5.12a e 5.12b, respectivamente). Entretanto, nota-se que com o aumento da concentração inicial de células, ocorreu consumo, embora parcial, de glicose, isto é, cerca de 32% e 52% nos ensaios 7 ($X_0 = 3,0$ g/L) e 3 ($X_0 = 5,0$ g/L), respectivamente. Tais resultados sugerem que o aumento da concentração inicial de células favoreceu o consumo de glicose neste valor de pH. Conforme observado para o hidrolisado não destoxificado, o pH 4,5 também inibiu o consumo de açúcares e ácido acético em hidrolisado destoxificado, especialmente a xilose e, ácido acético, já que a levedura não foi capaz de consumi-los, mesmo com o aumento da concentração inicial de células.

Figura 5.12. Consumo de glicose (a), xilose (b) e de ácido acético (c) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células.

Quando o pH foi elevado para 5,5 ou 6,5 nota-se que a levedura foi capaz de consumir totalmente a glicose em 12 horas de fermentação (Figura 5.12a). Além disso, na Figura 5.12b observa-se que o consumo de xilose foi favorecido tanto pelo aumento do pH, quanto pelo aumento da concentração inicial de células. Contudo, isto fica mais evidente nos ensaios realizados em pH 5,5, onde é possível notar claramente que o consumo desta pentose se torna mais rápido à medida em que a concentração celular é aumentada.

Com relação ao consumo de ácido acético (Figura 5.12c), verifica-se que a levedura foi capaz de realizar uma destoxificação *in situ*, em pH 5,5 e 6,5. Como relatado anteriormente, a levedura *P. stipitis* apresenta esta capacidade, entretanto, como observado para o hidrolisado não destoxificado, o consumo do ácido acético não ocorreu em pH ácido.

Na Figura 5.13 estão mostrados os perfis de produção de etanol e a formação de biomassa da levedura *P. stipitis* sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, em hidrolisado de bagaço de malte destoxificado. Similar ao observado para o consumo de açúcares e ácido acético nota-se que, em pH 6,5 a formação do produto pela levedura foi favorecida (Figura 5.13a), quando comparado ao pH 5,5. Entretanto, nos ensaios realizados em pH 5,5 verifica-se que a máxima concentração de etanol foi alcançada entre 60 e 72 horas (cerca de 20,0 g/L), enquanto que em pH 6,5 a concentração máxima de etanol ocorreu após 48 horas. A partir destes resultados pode-se constatar que o aumento do pH do hidrolisado para 6,5 resulta em uma diminuição de 12 horas para se obter a máxima concentração de etanol.

Os perfis de crescimento da levedura *P. stipitis* nas diferentes condições do planejamento 2², são mostrados na Figura 5.8b. Observa-se que nos ensaios realizados em pH 4,5, houve um discreto crescimento da levedura nas primeiras 12 horas de fermentação, entretanto a concentração celular manteve-se estável após este tempo. Por outro lado, nos ensaios realizados em pH 5,5 e 6,5 nota-se crescimento celular até o tempo final da fermentação (72 horas), com exceção dos ensaios 5 (pH 5,5 e $X_0 = 1,0$ g/L) e 8 (pH 6,5 e $X_0 = 3,0$ g/L) que apresentaram um decréscimo na concentração celular após 60 e 48 horas de fermentação, respectivamente.

Figura 5.13. Produção de etanol (a) e formação de biomassa (b) por *P. stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, sob diferentes condições de pH e concentração inicial de células, conforme ensaios do planejamento fatorial 2^2 . Ponto central: média dos ensaios realizados sob pH 5,5 e 3 g/L de células.

Como já relatado anteriormente, um pH na faixa da neutralidade é necessário para que as células continuem viáveis, pois como reportado por (IMAI; OHONO, 1995), a atividade replicativa da célula diminui linearmente com a redução do pH intracelular.

A partir da análise direta dos dados, percebe-se que de um modo geral, o pH teve grande influência sobre o processo, mostrando que mesmo após o hidrolisado ser submetido a um processo de destoxificação, a levedura não foi capaz de crescer, assimilar grande parte das fontes de carbono disponíveis ou produzir etanol em pH 4,5. Tais resultados sugerem que mesmo com a retirada de parte dos compostos inibidores, o hidrolisado ainda apresentou toxicidade suficiente para influenciar negativamente a bioconversão pela levedura *P. stipitis*. De fato, a levedura *P. stipitis* é capaz de crescer e produzir etanol em pH 4,5, desde que na ausência de compostos inibidores, conforme observado por Cabral; Silva; Roberto, (2010) ao avaliar a influência do pH na produção de etanol pela levedura em meio semissintético. Estes autores verificaram que os melhores resultados ($Y_{P/S} = 0,40$ g/g e $Q_P = 0,50$ g/L.h) foram obtidos empregando-se valores de pH entre 4,0 e 6,0.

Os resultados observados no presente estudo mostram que em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado, as fermentações devem ser conduzidas sob valores de pH mais elevados (pH 5,5 e 6,5), por minimizar o efeito tóxico dos inibidores presentes. Adicionalmente, tanto o pH 5,5 quanto o pH 6,5 favorecem a bioconversão por *P. stipitis*, mostrando resultados similares, ao contrário do observado em hidrolisado não destoxificado, onde os resultados de $Y_{P/S}$ e Q_P em pH 6,5 foram superiores aos obtidos em pH 5,5.

Na Tabela 5.14 é mostrada a matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, assim como o fator de conversão de substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e em células ($Y_{X/S}$), a produtividade volumétrica em etanol (Q_P), a velocidade de consumo de substrato (Q_S) e a eficiência de conversão (%) nos diferentes ensaios. Nota-se que os valores obtidos para $Y_{P/S}$ foram similares, quando comparados os ensaios realizados em pH 5,5 e 6,5 (cerca de 0,33 g/g) e o maior fator de conversão de substrato em etanol (0,34 g/g) foi observado em quatro (ensaios 2, 5, 6 e 8) dos seis ensaios do planejamento.

Tabela 5.14. Matriz do planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada, para avaliação do efeito do pH e da concentração inicial de células em HHBM destoxificado sobre a conversão do substrato em etanol e em células, a produtividade volumétrica em etanol e a velocidade de consumo de substrato, por *P. stipitis*.

Ensaio	Níveis Reais das Variáveis		Parâmetros fermentativos			
	pH	X_0 (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Q_S (g/L.h)
1	4,5	1,0	nd	0,06	nd	nd
2	6,5	1,0	0,34	0,12	0,34	1,06
3	4,5	5,0	nd	0,06	nd	nd
4	6,5	5,0	0,31	0,12	0,37	1,34
5	5,5	1,0	0,34	0,14	0,35	0,96
6	5,5	5,0	0,34	0,13	0,34	1,03
7	4,5	3,0	nd	0,06	nd	nd
8	6,5	3,0	0,33	0,15	0,40	1,22
9/10/11	5,5	3,0	0,34	0,13	0,34	1,01

X_0 : concentração inicial de células; nd: não determinado

Com relação às velocidades do processo (Q_P e Q_S) nota-se que os maiores valores (0,40 g/g e 1,34 g/L.h) foram alcançados em pH 6,5 (ensaios 8 e 4, respectivamente), não mostrando influência da concentração inicial de células quando analisados estes parâmetros.

Considerando a conversão do substrato em células ($Y_{X/S}$) nota-se variação de 0,06 a 0,15 g/g. Em pH 4,5 os valores deste parâmetro situam-se em torno de 0,06 g/g, em todos os ensaios. Já nos meios de fermentação com pH 5,5 e 6,5, os valores situam-se em torno de 0,13 g/g (0,12 g/g a 0,15 g/g).

A Figura 5.14 apresenta uma comparação entre os resultados obtidos nos ensaios do planejamento 2^2 , realizados em hidrolisado não destoxificado e após o processo de destoxificação, em pH 5,5 e 6,5. Em pH 5,5 (Figuras 5.14a; c) nota-se que os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P foram muito próximos para ambos os hidrolisados (destoxificado ou não), mostrando uma variação em torno de 10%, independente da concentração celular utilizada. Por outro lado, quando foi empregado o pH 6,5, verificou-se uma redução de aproximadamente 20% nos valores de $Y_{P/S}$, para o HHBM destoxificado e que, do mesmo modo independeu da concentração celular (Figura 5.14b).

Figura 5.14. Fator de conversão do substrato e produtividade volumétrica em etanol, obtidos nos ensaios do planejamento 2^2 , realizados em HHBM não destoxificado (●) e após destoxificação (●). Ensaios realizados em pH 5,5 à direita e em pH 6,5 à esquerda.

Com relação à produtividade volumétrica em etanol verifica-se que o valor deste parâmetro foi reduzido após a destoxificação do HHBM (Figura 5.14d), sendo dependente da concentração inicial de células empregada. Nota-se uma redução de aproximadamente 30, 50 e 43% quando as concentrações celulares foram 1,0, 3,0 e 5,0 g/L, respectivamente. Apesar do processo de destoxificação ter eliminado cerca de 66% de furfural, 86% de 5-HMF e 79% dos compostos fenólicos totais presentes no HHBM, de modo geral, o processo de destoxificação afetou a bioconversão por *P. stipitis*, especialmente quando foram empregados valores de pH de 6,5.

Quando comparado a outros estudos reportados na literatura, os resultados do presente trabalho, empregando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado são relevantes. Por exemplo, no estudo realizado por Canilha et al. (2009), o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (pH 5,8) foi submetido à alteração de pH e adsorção em carvão ativado e em seguida suplementado com extrato de levedura, extrato de malte e peptona, visando à produção de etanol por *P. stipitis* DSM 3651. Estes autores observaram um fator de conversão de substrato e produtividade volumétrica em etanol de 0,30 g/g e 0,13 g/L.h, respectivamente, isto é, cerca de 12 e 68% inferiores aos valores observados no presente trabalho.

5.5.1 Análise estatística do planejamento fatorial 2^2 composto com face centrada, para otimização do pH e da concentração inicial de células, a partir do HHBM destoxificado.

A Tabela 5.15 apresenta a análise de variância (ANOVA) realizada para as respostas avaliadas neste estudo (pH e concentração inicial de células), onde são apresentados os efeitos estatisticamente significativos (em negrito), bem como a contribuição de cada variável para o processo. De acordo com esta análise, o aumento do valor do pH exerceu um efeito positivo (linear e quadrático) sobre todos os parâmetros fermentativos avaliados, enquanto que a elevação da concentração inicial de células apresentou efeito positivo (+0,76) somente sobre a velocidade de consumo de substrato, onde também foi observado uma interação positiva entre as duas variáveis ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5.15. Análise de variância com erro total para os principais efeitos e suas interações, durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de BM destoxificado, empregando a levedura *P. stipitis*, sob diferentes condições de pH (1) concentração inicial de células (2).

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	1(L)	0,1600	1	0,16006	5320,00	0,0000	64,62
	1(Q)	0,0801	1	0,08017	2664,58	0,0000	32,35
	2 (L)	0,0001	1	0,00015	4,98	0,0758	0,04
	2 (Q)	0,0000	1	0,00002	0,70	0,4392	0,01
	1*2	0,0002	1	0,00022	7,47	0,0410	0,08
	Erro	0,0000	5	0,16006			
$R^2 = 0,99$	Total	0,2476	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	1(L)	0,0073	1	0,00735	49,40	0,0009	64,03
	1(Q)	0,0029	1	0,00291	19,62	0,0068	25,43
	2 (L)	0,0000	1	0,00001	0,11	0,7514	0,01
	2 (Q)	0,0000	1	0,00003	0,26	0,6284	0,26
	1*2	0,0000	1	0,00000	0,00	1,0000	
	Erro	0,0007	5	0,00014			
$R^2 = 0,93$	Total	0,0114	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
Q_P (g/L.h)	1(L)	0,2053	1	0,20535	526,42	0,0000	75,14
	1(Q)	0,0592	1	0,05922	151,81	0,0000	21,66
	2 (L)	0,0000	1	0,00006	0,17	0,6964	0,02
	2 (Q)	0,0001	1	0,00015	0,40	0,5526	0,03
	1*2	0,0002	1	0,00022	0,57	0,4818	0,07
	Erro	0,0019	5	0,00039			
$R^2 = 0,99$	Total	0,2732	10				
Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	P	Contribuição (%)
Q_S (g/L.h)	1(L)	2,1840	1	2,18406	1479,22	0,0000	81,81
	1(Q)	0,4000	1	0,40001	270,92	0,0000	14,98
	2 (L)	0,0204	1	0,02041	13,82	0,0137	0,76
	2 (Q)	0,0003	1	0,00038	0,26	0,6302	0,01
	1*2	0,0196	1	0,01960	13,27	0,0148	0,73
	Erro	0,0073	5	0,00147			
$R^2 = 0,99$	Total	2,6696	10				

1 (L): pH linear; 1 (Q): pH quadrático; 2 (L): concentração inicial do células linear; 2 (Q): concentração de células quadrática; SQ: soma quadrática; GL: grau de liberdade; MQ: média quadrática.

Os valores dos coeficientes de correlação obtidos ficaram acima de 0,90 para todas as respostas avaliadas, mostrando que o modelo obtido foi capaz de explicar mais de 90% da variação observada em cada resposta.

Para todas as respostas avaliadas, as variáveis que apresentaram maior contribuição para o processo foram o pH (efeito linear), seguido pelo efeito quadrático desta variável, sendo capazes de explicar 90% ou mais da variação observada nestas respostas. Foram realizadas então, análises de variância de regressão onde se observa que os coeficientes de correlação (R^2) para as principais respostas relacionadas a produção de etanol, isto é, $Y_{P/S}$ e Q_P (Tabela 5.16).

Com objetivo de se otimizar as condições utilizadas, as respostas foram maximizadas em conjunto, sendo os critérios convenientemente selecionados de forma que as variáveis independentes fossem mantidas na faixa em estudo e os valores estimados para as respostas, foram avaliadas dentro de uma faixa que permitisse a sobreposição dos modelos. Desse modo, considerando-se $Y_{P/S}$ e Q_P , os valores encontrados foram pH 6,0 (nível codificado +0,54) e concentração inicial de células de 1,36 g/L (valor codificado +0,82). Adicionalmente, foram excluídos termos sem significância para o modelo visando melhorar o mesmo. Assim, para $Y_{P/S}$ foram excluídas a concentração inicial de células quadrática e para a variável Q_P , foram excluídas a concentração inicial de células linear e quadrática, bem como a interação entre pH e concentração inicial de células. Portanto, com base nos resultados obtidos a partir desta análise, foi possível determinar modelos empíricos para descrever o efeito do pH (A) e da concentração inicial de células (B) sobre a conversão do substrato em etanol (Y_2) e a produtividade volumétrica em etanol (Q_2), na região estudada, sendo mostrados na Tabela 5.17. Os modelos matemáticos foram significativos ($p < 0,001$) e não apresentaram falta de ajuste ao nível de 95% de confiança, o que significa que a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação pode ser explicada pelo erro experimental.

As superfícies de resposta descritas pelas equações do modelo para a conversão do substrato e a produtividade em etanol (Figura 5.16) mostram claramente que o aumento no valor da variável pH favoreceu linearmente e quadraticamente não só o aumento do etanol produzido, mas principalmente aumentou a velocidade do processo.

Tabela 5.16. Análise de variância de regressão para os modelos representativos da conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) em hidrolisado de bagaço de malte destoxificado.

Variável de Resposta	Variáveis	Coefficientes	$t(5)$	P
$Y_{P/S}$ (g/g)	Média	0,343	121,95	0,000*
	A	0,163	72,93	0,000*
	B	-0,005	-2,23	0,075
	A*B	-0,007	-2,73	0,041**
	A ²	-0,177	-51,61	0,000*
	B ²	-0,002	-0,84	0,439
Q_P (g/L.h)	Média	0,343	33,86	0,000*
	A	0,185	22,94	0,000*
	B	0,003	0,41	0,696
	A*B	0,007	0,75	0,481
	A ²	-0,152	-12,32	0,00*
	B ²	-0,007	-0,63	0,552

A: pH linear; B: concentração inicial de células linear; A²: pH quadrático; B²: concentração inicial de células quadrática; * 99% de significância; ** 95% de significância; R²=0,99.

Tabela 5.17. Equações do modelo para otimização de pH e concentração inicial de células na fermentação do HHBM destoxificado, por *P. stipitis* ajustados aos dados experimentais para o fator de conversão do substrato (Y_2) e produtividade volumétrica em etanol (Q_2).

Resposta	Equações do modelo	R ²
$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y = 0,342 + 0,165A - 0,006B - 0,177A^2 + 0,01AB$	0,99
Q_P (g/L.h)	$Q = 0,34 + 0,193A - 0,146B + A^2$	0,99

A: pH linear; A²: pH quadrático; B: concentração inicial de células; B²: concentração inicial de células.

(a)

(b)

Figura 5.16. Superfície de resposta relacionando a conversão do substrato em etanol (a) e a produtividade volumétrica em etanol (b) com a concentração inicial de células e pH, em níveis codificados.

5.5.2 Confirmação dos Modelos Obtidos

A partir da escolha do ponto determinado como ótimo, foram realizados ensaios para a confirmação do modelo obtido, ou seja, empregou-se o hidrolisado de bagaço de malte destoxificado contendo cerca de 55,0 g/L de xilose suplementado com 3,0 g/L de extrato de levedura. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em pH 6,0 e com 1,36 g/L de células de *P. stipitis* previamente cultivada em hidrolisado contendo 30 g/L de xilose. Deste modo, a cinética obtida durante a bioconversão de açúcares a etanol nas condições otimizadas é mostrada na Figura 5.17, assim como os resultados do processo fermentativo, obtidos com 48 horas de cultivo são apresentados na Tabela 5.17. Vale ressaltar que tais resultados foram determinados a partir da média obtida em dois ensaios (duplicatas).

A Figura 5.17 apresenta a cinética obtida a partir das médias das duplicatas usando as concentrações otimizadas de pH (6,0) e de concentração inicial de células (1,36 g/L). Nota-se que os açúcares foram completamente assimilados após 48 horas de fermentação. Estes resultados estão de acordo com os observados no planejamento fatorial e, portanto validam experimentalmente os resultados obtidos.

A Tabela 5.18 mostra os resultados do processo fermentativo nas condições otimizadas após 48 horas de fermentação. Nota-se que o modelo obtido descreveu bem a região em estudo, visto que os resultados apresentados estão dentro da faixa de variação (0,39 - 0,45 g/g para $Y_{P/S}$) (0,37 - 0,46 g/L.h para Q_P) prevista. Contudo, para efeito de comparação, percebe-se que os resultados obtidos a partir do hidrolisado destoxificado foram inferiores aos observados em hidrolisado não destoxificado. Apesar do fator de rendimento em etanol ter sido similar, a produtividade foi cerca de 30% menor quando utilizou-se o hidrolisado destoxificado.

Figura 5.17. Comportamento cinético da levedura *P. stipitis*, observado nas condições otimizadas pelo modelo, visando à produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado.

Tabela 5.18. Parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios visando à confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de açúcares (glicose e xilose) em etanol por *P. stipitis*, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte destoxificado.

Parâmetros	Resultados
Tempo de fermentação (h)	48
Consumo de açúcares (%)	89,23
Concentração celular (g/L)	8,27
Concentração de etanol (g/L)	22,11
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,40 (0,39 $\pm$ 0,00)
Q_P (g/L.h)	0,46 (0,40 $\pm$ 0,01)
η (% do teórico)	78

(): valores previstos pelo modelo otimizado; açúcares: glicose e xilose; η : eficiência de conversão

A partir dos resultados aqui apresentados, é possível sugerir que o ácido acético foi o fator mais influente sobre a conversão do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte a etanol, pela levedura *P. stipitis*. De fato, este ácido tem sido reportado como sendo um potente inibidor desta levedura, de modo que concentrações acima de 2,0 g/L foram reportadas como sendo suficientes para inibir a conversão de açúcares a etanol em hidrolisado de grama-de-prata (GUO et al., 2008) e que concentrações acima de 6,0 g/L reduziram em 82% a formação de biomassa em hidrolisado de poda de oliveira (DÍAZ et al., 2009).

Alguns métodos descritos na literatura são capazes de remover eficientemente o ácido acético presente nos hidrolisados. Entre eles estão a utilização de resinas de troca iônica (CARVALHO et al., 2004; NILVEBRANT et al., 2001) e membranas adsorptivas, membranas de filtração e eletrodialise (CHENG et al., 2008; STOUTENBURG et al., 2008). Entretanto, tais métodos são economicamente inviáveis. Por outro lado, mais recentemente, Cho et al. (2010) empregaram um novo método de pré-tratamento alcalino em hidrolisado de madeira e alcançaram uma redução de 90% na concentração de ácido acético, evidenciando a eficiência deste método.

Tendo em vista que após a destoxificação do hidrolisado de bagaço de malte com carvão ativado, foi alcançada uma redução de cerca de 18% na concentração de ácido acético, faz-se necessário o emprego de uma metodologia que remova eficientemente este ácido, para que sejam alcançados parâmetros mais elevados na bioconversão do HHBM pela levedura *P. stipitis*, especialmente em pH 4,5. Entretanto, é importante ressaltar que mesmo em concentrações reduzidas, compostos fenólicos totais, furfural e 5-HMF, podem ter influenciado negativamente o processo de bioconversão. Considerando-se que as técnicas que reduzem as concentrações de ácido acético presente nos hidrolisados apresentam custo elevado e desta forma, torna seu emprego industrialmente inviável, uma alternativa seria a realização de fermentações sob valores de pH elevados, associado à otimização de outros fatores e/ou condições influentes sobre o processo, como reportado por van Zyl et al. (1991) e anteriormente relatado neste trabalho. Esta estratégia também foi utilizada por Cheng et al., (2009) com o objetivo de amenizar o efeito dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, na fermentação por *Candida tropicalis* visando à produção de xilitol. Os autores alcançaram um aumento de 48 e 52%

na conversão do substrato e produtividade em xilitol, apenas com a variação do pH de 4,5 para 6,0.

Os resultados apresentados no presente estudo mostraram que a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte não foi vantajosa, considerando tanto a perda de açúcares e volume, quanto os resultados alcançados. De fato, foram alcançados valores superiores de $Y_{P/S}$ e Q_P quando o hidrolisado não foi submetido a este processo, mostrando que a destoxificação tornou o processo mais lento, embora a produção de etanol tenha sido similar. É possível que paralelamente à adsorção dos compostos inibidores, possa ter ocorrido a retirada completa ou parcial de alguns nutrientes essenciais ao crescimento da levedura como vitaminas e minerais. Contudo, há necessidade de estudos adicionais a fim de se avaliar mais profundamente este processo.

5.6 Efeito do ácido acético sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis*, em meio semissintético

Tendo em vista a grande influência do ácido acético sobre a bioconversão do hidrolisado de bagaço de malte por *P. stipitis*, foram realizados ensaios fermentativos em meio semissintético, empregando-se as condições de pH e concentração inicial de células previamente otimizadas para o hidrolisado não destoxificado (modelo 1: pH 6,4 e $X_0 = 5,0$ g/L) e para o hidrolisado destoxificado (modelo 2: pH 6,14 e $X_0 = 1,36$ g/L). Para tal propósito foram simuladas as concentrações de açúcares e ácido acético presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte.

A Figura 5.18 apresenta os perfis cinéticos da fermentação em meio semissintético, realizadas a partir dos modelos obtidos (1 e 2), com e sem adição de ácido acético, respectivamente. Verifica-se na Figura 5.18a que os açúcares (glicose e xilose) foram totalmente assimilados após 24 horas para todas as condições, exceto para modelo 2, na presença de ácido acético, que ocorreu 12 horas mais tarde. Vale ressaltar que nos ensaios em meio semissintético, diferentemente do observado em hidrolisado, a arabinose foi assimilada pela levedura e variou com a condição empregada (Figura 5.18b).

Figura 5.18. Comportamento cinético observado na bioconversão de açúcares pela levedura *P. stipitis* em meio semissintético, simulando as condições otimizadas em HHBM: consumo de glicose e xilose (a) e arabinose (b); formação de etanol (c) e biomassa (d).

Nota-se que a arabinose foi pobremente consumida enquanto ainda havia xilose. Verifica-se ainda que após 72 horas de fermentação, cerca de 21% da arabinose foi consumido nos meios onde o ácido acético foi adicionado e 41% nos meios onde este ácido não esteve presente. De fato, o consumo de arabinose, pode ter sido responsável pelo crescimento intermitente da levedura (Figura 5.18d) após o esgotamento dos outros açúcares, o que estaria de acordo com relatos da literatura sobre a capacidade da levedura *P. stipitis* de produzir biomassa a partir de arabinose (Nigam, 2002), visto que após o consumo total de xilose não houve formação de produto.

Com relação à produção de etanol (Figura 5.18c), nota-se que as maiores concentrações (26,0 e 24,0 g/L) foram obtidas a partir das condições de pH e concentração inicial de células otimizadas em HHBM não destoxificado (modelo 1: pH 6,4 e $X_0 = 5,0$ g/L), sugerindo que em meio semissintético, ausente de furanos e fenólicos totais, o ácido acético não afetou a bioconversão por *P. stipitis*. A partir destes resultados é possível constatar que o desempenho da levedura em meio semissintético foi superior ao observado nos ensaios em hidrolisado (destoxificado ou não), o que já era esperado devido à ausência de parte dos compostos inibidores. Como já reportado por Telli-Okur e Eken-Saracoglu, (2008), as fermentações em hidrolisados são caracterizadas por uma cinética lenta com fatores de conversão e produtividade em etanol, inferiores ao observado em meio semissintético, mesmo após a destoxificação.

A Tabela 5.19 apresenta os resultados obtidos nestes ensaios, bem como os parâmetros fermentativos obtidos em cada condição avaliada. Considerando o modelo 1 (hidrolisado não destoxificado), o fator de conversão e a produtividade volumétrica em etanol foram superiores quando comparados aos ensaios de otimização em HHBM, cerca de 13% (0,47 para 0,41 g/g) e 66% (1,08 para 0,65 g/g), respectivamente. Por outro lado, para o modelo 2 (hidrolisado não destoxificado) os valores de $Y_{P/S}$ foram similares (0,38 para 0,40 g/g), enquanto que para Q_P os valores foram aproximadamente 40% (0,64 para 0,46 g/L.h) superiores aos obtidos nos ensaios de otimização em HHBM destoxificado. Adicionalmente, verifica-se que os melhores resultados de $Y_{P/S}$ (0,47 g/g) e Q_P (1,08 g/L.h), assim como também a eficiência de conversão do processo (92%) foram alcançados a partir do modelo 1, ou seja, hidrolisado não destoxificado (pH 6,4 e $X_0 = 5,0$ g/L) em pH adicionado de ácido acético.

Com base nos resultados apresentados, sugere-se que nas condições empregadas em hidrolisado de bagaço de malte, o ácido acético pode ter sido utilizado pela levedura como fonte de carbono extra, contribuindo para o processo. Tais resultados estão de acordo com os dados reportados por Cho et al., (2010), que estudaram a influência do ácido acético na fermentação em meio semissintético, por *P. stipitis*. Estes autores adicionaram 0,70 g/L de ácido acético ao meio de fermentação composto por 58 g/L de xilose, 3,0 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L de K_2HPO_4 e observaram que a adição do ácido contribuiu para o aumento de alguns parâmetros fermentativos ($Y_{P/S}$ de 0,42 para 0,45 g/g e Q_P 0,34 para 0,37 g/L.h).

Tabela 5.19. Parâmetros fermentativos obtidos na fermentação em meio semissintético pela levedura *P. stipitis*, empregando-se as condições dos modelos obtidos em hidrolisado não destoxificado (modelo 1) e destoxificado (modelo 2), na presença ou não de ácido acético.

Parâmetros	Resultados			
	Modelo 1		Modelo 2	
	+ AA	sem AA	+ AA	sem AA
Tempo de fermentação (h)	24	24	36	24
pH inicial	6,40	6,45	6,00	6,10
X_0 (g/L)	5,00	5,00	1,36	1,36
Concentração de ácido acético (g/L)	2,80	0	2,30	0
Consumo de açúcares (%)	99,85	100	99,94	98,36
Consumo de arabinose (%)	nd	9,80	3,96	1,50
Concentração celular (g/L)	13,85	13,41	12,81	9,80
Concentração de etanol (g/L)	26,02	24,39	23,02	23,50
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,47	0,42	0,38	0,40
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,17	0,14	0,19	0,15
Q_P (g/L.h)	1,08	1,02	0,64	0,98
Q_S (g/L.h)	2,36	2,53	1,73	2,39
η (% do teórico)	92	82	74	78

X_0 :concentração inicial de células; consumo de açúcares: glicose e xilose; η : eficiência de conversão

É importante ressaltar, que a composição dos meios utilizados para avaliação do ácido acético seria exatamente igual não fosse pela variação de pH, concentração inicial de células e concentração de ácido. Consequentemente, o desempenho superior da levedura nesta condição, provavelmente está relacionado à maior concentração celular empregada nesta condição (5,0 g/L).

Como mostrado anteriormente, o aumento da concentração celular favoreceu principalmente as velocidades do processo fermentativo (Q_P e Q_S), concordando com a literatura, como já relatado neste trabalho. O estudo realizado por Agbogbo et al., (2007) mostrou claramente o efeito positivo do aumento da concentração celular sobre a produtividade em etanol, na fermentação por *P. stipitis* CBS 6054 em meio semissintético. Quando avaliou-se o efeito do ácido acético no presente trabalho, verificou-se que mesmo na presença deste importante inibidor para a levedura *P. stipitis*, ocorreu um aumento de cerca de 68% na produtividade em etanol, além de um fator de conversão de substrato em etanol, 24% superior.

Nota-se que em meio semissintético, livre de furanos e compostos derivados da lignina, a fermentação apresentou parâmetros mais elevados tanto em relação à conversão do substrato, quanto à velocidade de formação de produto. Silva (2001) estudou o efeito do ácido acético sobre a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Para efeito de comparação, a autora realizou ensaios utilizando meio semissintético simulando as concentrações de açúcares e compostos inibidores do hidrolisado e observou que a toxicidade do ácido acético se deve a uma possível interação do ácido com outros compostos como 5-HMF, furfural e compostos fenólicos totais, uma vez que foram alcançados maiores valores de rendimento e produtividade em xilitol na fermentação onde somente o ácido acético foi adicionado.

Outro fator importante, a ser considerado é a composição do meio semissintético utilizado, visto que foram adicionados não somente o extrato de levedura, mas também alguns sais conhecidamente importantes para a levedura. Armaty e Jeffries, (1994) avaliaram a produção de etanol por *P. stipis* CBS 6054 em meio sintético e observaram que peptona, extrato de levedura, sulfato de magnésio e KH_2PO_4 contribuíram para o aumento produtividade e concentração final de etanol. De fato, o uso de meio semissintético para a produção de etanol

proporciona maiores fatores de conversão de substrato e produtividade em etanol, contudo torna-se inviável industrialmente devido ao seu custo elevado. Por outro lado, representa uma ferramenta importante para se estabelecer condições e comparações em processos que utilizam hidrolisados provenientes de resíduos agrícolas.

5.7 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte pela levedura *Pichia stipitis* em biorreator

Visando avaliar a cinética da fermentação pela levedura *P. stipitis* nas condições de pH e concentração inicial de células previamente otimizadas em frascos Erlenmeyers, foram realizadas fermentações em biorreator utilizando-se o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte não destoxificado em pH 6,4 e concentração inicial de células de 5,0 g/L.

Na Figura 5.19 é mostrada a cinética da fermentação realizada em biorreator e em frascos, onde são apresentados o consumo de glicose, xilose e ácido acético e a formação de etanol e biomassa pela levedura *P. stipitis*. Verifica-se que em biorreator, tanto o consumo total de açúcares quanto a máxima produção de etanol foram alcançados em 52 horas de fermentação, isto é, cerca de 16 horas após a máxima concentração de etanol observada na fermentação em frascos (36 horas). No entanto, as concentrações máximas de etanol foram similares nas duas fermentações (22,62 g/L em biorreator e 23,40 g/L em frascos), ocorrendo após este período uma discreta e gradual redução nestas concentrações.

Com relação ao ácido acético, nota-se que na fermentação em biorreator este foi lentamente consumido durante as 72 horas, podendo ser a causa do consumo mais lento de xilose. Vale ressaltar que após 36 horas, cerca de 60 e 90% deste ácido foi consumido nas fermentações em biorreator e em frascos, respectivamente. devido à presença do ácido durante todo o período de fermentação. Quanto à formação de biomassa, nota-se que nas primeiras 12 horas de fermentação em biorreator, ocorreu uma fase de adaptação da levedura, que possivelmente ocorreu devido às diferenças de oxigenação entre os dois sistemas operacionais empregados.

Figura 5.19. Comportamento cinético apresentado pela levedura *P. stipitis*, na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte, em biorreator e em frascos agitados, empregando-se as condições otimizadas de pH e concentração inicial de células (modelo 1).

Na Tabela 5.20 são apresentados os parâmetros obtidos nas fermentações em biorreator e em frascos Erlenmeyers. Verifica-se que os valores dos parâmetros da fermentação em biorreator são inferiores ao observado na fermentação em frascos, sendo os valores de produtividade volumétrica em etanol (0,44 g/L.h) e velocidade de consumo de substrato (1,11 g/L.h) cerca de 30% mais baixos. Além disso, observa-se também uma redução de 16% na eficiência de conversão do processo, em relação ao observado em frascos, contudo este índice ficou acima de 70%.

Tabela 5.20. Parâmetros fermentativos obtidos na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte não destoxificado pela levedura *P. stipitis*, sob as condições otimizadas de pH e concentração inicial de células em biorreator e em frascos agitados.

Parâmetros	Resultados	
	Biorreator	Frascos
Tempo de fermentação (h)	52	36
pH inicial	6,49	6,45
Concentração inicial de células (g/L)	4,85	4,80
Concentração inicial de ácido acético (g/L)	2,58	2,90
Concentração inicial de açúcares (g/L)	60,10	58,00
Consumo de açúcares (%)	95,61	99,51
Concentração celular (g/L)	12,85	11,70
Concentração de etanol (g/L)	22,62	23,40
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,37	0,41
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,14	0,11
Q_P (g/L.h)	0,44	0,65
Q_S (g/L.h)	1,11	1,60
η (% do teórico)	72	80

açúcares: glicose e xilose; η : eficiência de conversão

Apesar da bioconversão do HHBM por *P. stipitis*, em biorreator ter sido mais lenta, os resultados obtidos neste estudo são comparáveis aos resultados observados em outros trabalhos. van Zyl, Prior e du Preez, (1988) estudaram a

fermentação do hidrolisado de bagaço de cana (45,0 g/L de açúcares) em biorreator, submetendo este hidrolisado a diversos tratamentos. Os autores alcançaram os melhores resultados após neutralização do hidrolisado com $\text{Ca}(\text{OH})_2$, mostrando valores de 0,38 g/g e 0,25 g/L.h para fator de conversão e produtividade volumétrica em etanol, respectivamente. No presente trabalho, os valores observados para $Y_{P/S}$ e Q_P foram de 0,37 g/g e 0,44 g/L.h, respectivamente, como mostrado na Tabela 5.20. Nota-se que a conversão do substrato em etanol foi similar ao observado pelos autores, entretanto a velocidade de produção do etanol foi aproximadamente 76% maior, a partir do hidrolisado de bagaço de malte, não submetido a qualquer processo de tratamento.

A Figura 5.20 apresenta uma comparação entre os parâmetros fermentativos obtidos nas fermentações em frascos, em meio semissintético (MSS) e em HHBM não destoxificado, em frascos e em biorreator. São apresentadas a conversão de substrato e a produtividade volumétrica em etanol, por serem considerados os principais parâmetros a serem avaliados na fermentação de açúcares a etanol.

Figura 5.20. Fator de conversão do substrato ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica em etanol (Q_P) obtidos nas fermentações em frascos (meio semissintético e HHBM) e em biorreator (HHBM), por *P. stipitis*. Foram empregadas as condições de pH (6,4) e concentração inicial de células (5,0 g/L) otimizadas em HHBM.

Nota-se que com relação ao fator de conversão do substrato em etanol ($Y_{P/S}$), a diferença observada entre os ensaios foi relativamente pequena, sendo 12,76% entre a fermentação realizada em meio semissintético e frascos agitados e 9,75% entre este último e a fermentação em biorreator. Por outro lado, a análise da produtividade volumétrica em etanol mostrou uma variação consideravelmente maior entre os diferentes ensaios fermentativos.

Em meio semissintético, a produtividade em etanol foi de 1,08 g/L.h, isto é, cerca de 66% maior que a obtida em frascos (0,65 g/L.h) e 145% maior que a obtida em biorreator (0,44 g/L.h).

Ainda assim, os parâmetros relacionados à produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte podem ser considerados promissores, mesmo sendo observada uma redução dos mesmos quando se transferiu as condições otimizadas em frascos para o biorreator. De fato, há necessidade de estudos adicionais visando melhorar o desempenho da levedura nas fermentações em biorreator, como a avaliação de diferentes condições de aeração e agitação. Silva, Mussatto e Roberto, (2011) estudaram a influência de aeração e agitação sobre a fermentação do meio semissintético pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124, em biorreator. Estes autores observaram pequenas variações a partir de valores de k_{La} entre 0,7 a 12,1 h⁻¹, alcançando os melhores resultados a partir de um k_{La} de 4,9 h⁻¹ (0,32 g/g e 0,32 g/L.h para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente).

No presente trabalho, foi utilizado um k_{La} de 11,0 h⁻¹ obtido a partir de uma aeração de 0,25 vvm e 320 rpm de agitação, entretanto, como observa-se na literatura, tais condições variam de acordo com vários fatores empregados no processo de bioconversão como microrganismo, meio de fermentação, pH, entre outros, daí a necessidade de estudos adicionais.

A Tabela 5.21 apresenta o desempenho da levedura *P. stipitis* em diferentes hidrolisados hemicelulósicos reportados na literatura e neste estudo.

Tabela 5.21. Produção de etanol pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124 em biorreator, a partir de hidrolisados hemicelulósicos obtidos de diferentes resíduos agrícolas.

Hidrolisado	Microrganismo	Substrato (g/L)	Etanol (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Referência
Palha de trigo	<i>P. stipitis</i>	60,0	12,90	0,36	0,30	1
Bagaço de cana	<i>P. stipitis</i>	48,5	15,00	0,38	0,25	2
Jacinto de água	<i>P. stipitis</i>	67,5	18,00	0,35	0,18	3
Casca de semente de girassol	<i>P. stipitis</i>	35,0	9,66	0,41	0,18	4
Bagaço de malte	<i>P. stipitis</i>	60,2	22,62	0,37	0,44	5

1: Nigam (2001); 2: van Zyl et al. (1988); 3: Nigam (2002); 4: Telli Okur e Eken Saraçoglu, (2006); 5: este estudo

Verifica-se que o hidrolisado de bagaço de malte empregado neste trabalho apresentou um desempenho similar aos outros trabalhos, quando avaliada a conversão do substrato em etanol (0,37 g/g). Entretanto, quando se considera a produtividade volumétrica em etanol, o valor obtido neste estudo (0,44 g/L.h) foi consideravelmente superior, evidenciando seu potencial para a produção de etanol, visto que este parâmetro é considerado o mais importante quando considera-se a produção industrial de etanol.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte obtido por hidrólise com ácido diluído, apresenta nutrientes essenciais ao metabolismo de *P. stipitis*, visto que a levedura foi capaz de crescer e produzir etanol sem suplementação nutricional. Contudo, a adição de 3,0 g/L de extrato de levedura hidrolisado favoreceu a bioconversão por *P. stipitis*, elevando os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P em 76 e 120%, respectivamente.

O cultivo da levedura *P. stipitis* em HHBM, após o crescimento prévio em meio semissintético, elevou as velocidades do bioprocessamento em cerca de 15% para Q_P e 10% para Q_S , provavelmente por promover a aclimação da levedura ao hidrolisado, o qual contém compostos potencialmente inibidores. Adicionalmente, esta estratégia tornou o processo de produção de etanol mais viável economicamente por eliminar a etapa realizada em meio semissintético.

Valores elevados de pH e concentração inicial de células podem ser utilizados como estratégia para contornar a toxicidade dos compostos inibidores presentes no HHBM, entretanto os valores destas variáveis são dependentes do hidrolisado empregado (destoxificado ou não) no processo fermentativo. Em HHBM não destoxificado os valores ótimos de pH (6,4) e X_0 (5,0 g/L) resultaram em valores de Q_P e Q_S , cerca de 100% e 120% superiores às condições não otimizadas. Por outro lado, apesar da destoxificação do HHBM com carvão ativado ter reduzido a concentração de furanos e compostos fenólicos totais, as condições ótimas de pH (6,0) e X_0 (1,36 g/L) resultaram em valores de $Y_{P/S}$, Q_P e Q_S em torno de 29, 85 e 43% inferiores, respectivamente, quando comparados ao hidrolisado não destoxificado. Assim, o processo de destoxificação parece ter alterado a composição nutricional do hidrolisado, retirando ou reduzindo o teor de nutrientes essenciais ao processo de bioconversão por *P. stipitis*.

Em meio semissintético, a presença do ácido acético nas concentrações empregadas neste estudo, favorece o processo fermentativo, mostrando que seu efeito inibitório pode ser contornado pelo emprego de valores superiores de pH (6,4) e concentração inicial de células (5,0 g/L), como observado nas fermentações realizadas sob as condições do modelo 1. A partir de tais condições

foi obtida uma eficiência de conversão do processo de 92%, isto é, superior à observada em HHBM (80%). Já nas condições de pH e concentração inicial de células do modelo 2, foram obtidos valores inferiores para $Y_{P/S}$ e Q_P quando comparados aos obtidos com o modelo 1, devido provavelmente ao emprego de 1,36 g/L de células.

As fermentações em biorreator, realizadas sob as condições de pH e concentração inicial de células otimizadas em HHBM não destoxificado (pH 6,4 e $X_0 = 5,0$ g/L), resultaram em uma cinética mais lenta quando comparada às fermentações em frascos (Q_P 32% menor), contudo a conversão do substrato em etanol foi apenas 10% inferior. Provavelmente as condições de oxigenação nos diferentes sistemas empregados (frascos e biorreator) resultou neste decréscimo, sendo necessária a otimização de tais condições.

As condições de fermentação para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte estabelecidas neste estudo fornecem uma importante contribuição quanto à sua utilização em processos biotecnológicos para a produção de etanol por *P. stipitis*. Considerando-se a produção de cerveja no Brasil, é possível estimar que cerca de 650 milhões de litros de etanol poderiam ser produzidos anualmente, a partir do bagaço de malte gerado no país, levando em conta a conversão alcançada no presente estudo.

REFERÊNCIAS

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

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

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

AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolyses hemicelluloses achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 281-283, 1994.

AZZAM, A.M. Pretreatment of cane bagasse with alkaline hydrogen peroxide for enzymatic hydrolysis of cellulose and ethanol fermentation. **Journal Environmental Science Health B.**, v. 24, n. 4, p. 421-433, 1989.

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

BAFRNCOVÁ, P.; SMOGROVICOVÁ, D.; SLÁVIKOVÁ, I. PÁTKOVÁ, J. DÖMENY, Z. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 21, n. 4, p. 337-341, 1999.

BIOCANA – Associação de Produtores de Açúcar, Etanol e Energia. Disponível em: <http://www.biocana.com.br/>. Acesso em: 14 jan. 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL, Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Resolução ANP nº 36, de 06 de dezembro de 2005 – Publicada no Diário Oficial da União em 07 de dezembro de 2005. ANP. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>. Acesso em: 07 nov. 2009.

BRASIL, Lei nº 8.723 de 28 de outubro de 1993. Dispõe sobre a redução de emissão de poluentes por veículos automotores e outras providências. Publicada no Diário Oficial da União em 29 de outubro de 1993. Disponível em: <http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/leis/1993/lei%208.723%20-%201993.xml>. Acesso em: 12 nov. 2009.

BRASIL, Portaria nº 143 de 27 de junho de 2007. Dispõe sobre a adição de álcool etílico anidro combustível à gasolina. Disponível em: <http://www.fecombustiveis.org.br/juridico-portarias/ministerio-da-agricultura/portaria-n-143-de-27.06.2007-dou-29.06.2007.html>. Publicada no Diário Oficial da União em 29 de junho de 2007. Acesso em: 12 nov. 2009.

BARTOLOMÉ, B.; SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J.J.; del NOZAL, M.J.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Pentoses and Hydroxycinnamic Acids in Brewer's Spent Grain. **Journal of Cereal Science**, v. 36, p. 51-58, 2002.

BRÁYINK, T.; VICENTE, A.; CRUZ, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Continuous Primary Beer Fermentation with Brewing Yeast Immobilized on Spent Grains. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, p. 410-415, 2002.

BRÁYINK, T.; VICENTE, A.; CRUZ, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Spent grains – A New Support for Brewing Yeast Immobilisation. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1073-1078, 2001.

BROWNING, B.L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: Wiley, 1967. 882 p.

CABRAL, J.C.A.; SILVA, J.P.A.; ROBERTO, I.C. Influência do pH na produção de etanol por *Pichia stipitis*. In: Anais do XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade Vale do Paraíba, 13., 2010, São José dos Campos, 2010, p.

CADOCHÉ, L.; LÓPEZ, G.D. Assessment of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes. **Biological Wastes**, v. 30, p. 153-157, 1989.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M. Ethanol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate Using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84-92, 2010.

CARVALHEIRO, F.; ESTEVES, M.P.; PARAJO, J.C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M. Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 93-100, 2004.

CHENG, K.K.; CAI, B.Y.; ZHANG, J.A.; LING, H.Z.; ZHOU, Y.J.; GE, J.P.; XU, J.M. Sugarcane bagasse hemicelluloses hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 105-109, 2008.

CHENG, K-K.; ZHANG, J-A; LING, H-Z.; PING, W-X.; HUANG, W.; GE, J-P.; XU, J-M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicelluloses from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 203-207, 2009.

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

CUZENS, J.C.; MILLER, J.R. Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 10,n. 2/3, p. 285-290, 1997.

DAL MORO, J. ROSA, C.S.; HOELZEL, S.C.S.M. Composição centesimal e ação antioxidante do farelo de arroz e seus benefícios à saúde. **Disciplinarum cientia, Série: Ciências da Saúde**, Santa Maria, v. 4, n. 1, p. 33-44, 2004.

DERMIBAS A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-333, 2005.

DERMIBAS, A. Producing and using bioethanol as an automotive fuel. **Energy Sources Part B**, v. 2, p. 391-401, 2007.

DEBUS, D.; METHNER, H.; SHULZE, D.; DELLWEG, H. Fermentation of xylose with the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Eur J Appl Microbiol Biotechnol**, v.17, p. 287-291, 1983.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis*, and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 220-225, 1996.

DUARTE, L.C.; CARVALHEIRO, F.; LOPES, S.; NEVES, I.; GÍRIO, F.M. Yeast Biomass Production in Brewery's Spent Grains Hemicellulosic Hydrolyzate. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 148, p. 119-129, 2008.

DUFEY A. **Biofuels production, trade and sustainable development: emerging issues**. Sustainable markets discussion, paper n. 2, London: International Institute for Environment and Development; nov. 1, 2006.

DUMSDAY, G.J.; JONES, K. STANLEY, G.A. PAMMENT, N.B. Recombinant organisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolysates – A Review of Recent Progress. **Australian Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 285-295, 1997.

DU PREZZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 8, p. 521-525, 1987.

DU PREZZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 53-58, 1989.

DU PREZZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 16, p. 944-952, 1994.

EKEN-SARAÇOĞLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*, **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 855-858, 2000.

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

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

GOSH, P.; GHOSE, T.K. Bioethanol in India: recent past and emerging future. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 85, p. 1-27, 2003.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; LINDÉN, T.; SENAC, T.; SKOOG, K. Ethanol fermentation of Pentoses in Lignocellulosic Hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, p. 131-144, 1991.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 933-943, 1994.

HUIGE, H.J. Brewery by-products and effluents. In: HARDWICK, W.A. (ed.). **Handbook of Brewing**. New York: Marcel Dekker, 1994. p. 501-550.

HUANG, C.; LIN, T.; GUO, G.; HWANG, W. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 17, p. 3914-3920, 2009.

IMAI, T.; OHNO, T. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3604-3608, 1995.

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. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.17, p.137-149, 1988.

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

JEFFRIES, T.M.; GRIGORIEV, I.V.; LAPLAZA, J.M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.; PASSOT, 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.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K. ARAKI, Y. Development of a functional germinated barley foodstuff from brewer's spent grain for the treatment of ulcerative colitis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, p. 59-62, 2001.

KHIYAMI, M.A.; POMETTO III, A.L.; BROWN, R.C. Detoxification of corn stover and corn starch pyrolysis liquors by *Pseudomonas putida* and *Streptomyces setonii* suspended cells and plastic compost support biofilms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2978-2987, 2005.

KIM, S.; DALE, B.E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.

KLINE, K.L.; OLADOSU, G.A.; WOLFE, A.K.; PERLACK, R.D.; DALE, V.H.; McMAHON, M. Biofuel feedstock assessment for selected countries. Tennessee: February, 2008, Oak Ridge National Laboratory Report, ORNL/TM-2007/224.

KLINNER, U.; FLUTHGRAF, S.; FREESE, S.; PASSOT, V. Aerobic induction of respire-fermentative growth by decreasing oxygen tensions in the respiratory yeast *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 67, p. 247-253, 2005.

KLOCK, U.; MUNIZ, G.I.B.; HERNANDEZ, J.A.; ANDRADE, A.S. **Química da Madeira**. 3rd edição revisada. Curitiba: Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2005.

KO, J.K.; BAK, J.S.; JUNG, M.W.; LEE, H.J.; CHOI, I.; KIM, T.H. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4374-4380, 2009.

KOPSAHELIS, N.; KANELAKI, M.; BEKATOROU, A. Low temperature using cells immobilized on brewer's spent grains. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 480-488, 2007.

KUMAR, L.; DHAVALA, P.; GOSWAMI, A.; MAITHEL, S. Liquid biofuels in South Ásia: resources and Technologies. **Asian Biotechnology**, v. 63, p. 258-266, 2006.

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.

KURTZMAN, C.P. *Candida shehatae* – genetic diversity and phylogenetic relationships with other xylose-fermenting yeasts. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 57, p. 215-222, 1990.

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

LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Improving fermentation performance of *Recombinant Zymomonas* in acetic acid-containing media. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 70-72, p. 161-172, 1998.

LIN, Y.; TANAKA, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 627-645, 2006.

LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; van ZYL, W.H.; PRETORIOUS, IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 3, p. 506-577, 2002

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

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

LOHMEIER-VOGEL, W.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.

MALESKA, R.; JAMES, A.P.; SCHNEIDER, H. Ethanol Production from Various Sugars by Strains *Pachysolen tannophilus* Bearing Different Numbers of Chromosomes. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 2495-2500, 1983., v. 21, p. 91-96, 2006.

MARTINEZ, A., RODRIGUEZ, M.E., YORK, S.W., PRESTON, J.F., INGRAM, L.O. Effects of Ca(OH)_2 treatment ("Overliming") on the composition and toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.69, n.5, p.526-536, 2000.

MARTINES-FILHO, J.; BURNQUIST, H.L.; VIAN, C.E.F. Bioenergy and the rise of sugarcane based ethanol in Brazil. **Choices**, v. 21, p. 91-96, 2006.

MAURICIO, J.C.; VALERO, E. MILLAN, C.; ORTEGA, J.M. Changes in nitrogen compounds in must and wine during fermentation and biological aging by flor yeasts. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 49, p. 3310-3315, 2001.

McMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic Biomass. In: Himmel, M.E., BAKER, J.O., OVEREND, R.P. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Copyright American Chemical Society. Colorado, USA: 07 oct. 1994. Chapter 15, p. 292-324.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA – MME. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/mme>. Acesso em: 14 jan. 2012.

MOHAN, S.V.; BABU, V.L.; SARMA, P.N. Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 59-67, 2008.

MUSSATTO, S.I. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. 2001. 173p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Brewer's spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, p. 1-14, 2006.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1352-1356, 2005.

MUSSATTO, S.I.; FERNANDES, M.; DRAGONE, G.; MANCILHA, I.M. ROBERTO, I.C. Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p.1973-1976, 2007.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.85, p. 2453-2460, 2005a.

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

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 2005b.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Ferulic and p-cumaric acids extration by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. **Industrial Crops and Products**, v. 25, p. 231-237, 2007.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1433-1439, 2004.

MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C., ROBERTO, I.C., Effect of pH and activated charcoal adsoption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 79, p. 590-596, 2004.

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

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

NIGAM, J.N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. **Journal of Biotechnology**, v. 97, p. 107-116, 2002.

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

NILVEBRANT, N.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JÖNSSON, L. Detoxification lignocellulosic hydrolysate with ion-exchange resins. **Applied of Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 35-49, 2001.

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

ÖZTÜRK, S.; ÖZBOY, O.; CAVIDOGLU, I.; KÖKSET, H. Effects of Brewer's Spent Grain on the Quality and Dietary Fibre Content of Cookies. **Journal of the Institute of Brewing**, v.108, n. 1, p. 23-27, 2002.

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

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

PASSOT, V.; COHN, M.; SCHAFER, B.; HAHN-HÄGERDAL, B.; KLINNER, U. Analysis of the hypoxia-induced *ADH2* promoter of the respiratory yeast *Pichia stipitis* reveals a new mechanism for sensing of oxygen limitation in yeast. **Yeast**, v. 20, p. 39-51, 2003.

PERSSON, T.; REN, J.L.; JOELSSON, E.; JÖNSSON, A. Fractionation of wheat and barley straw to access high-molecular-mass hemicelluloses prior to ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3906-3913, 2009.

PROÁLCOOL - Programa Brasileiro de Álcool. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/proalcool/pro-alcool.htm>. Acesso em: 07 de novembro de 2009.

PURWADI, R.; TAHERZADEH, M.J. The performance of serial bioreactors in rapid continuous production of ethanol from dilute-acid hydrolyzates using immobilized cells. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2226-2233, 2008.

REINOLD, M.R. **Manual Prático de Cervejaria**. 1rd ed. São Paulo: ADEN Editora e Comunicações Ltda, 1997. 214p.

RFA – RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol Industry Outlook. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/>, 2008. Acesso em: 10 nov. 2009.

RFA – RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol Industry Outlook. Disponível em: <http://www.ethanolrfa.org/>, 2011. Acesso em: 13 jan. 2012.

ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de Bagaço de Cana-de-Açúcar Assistida por Oxigênio**. 2000. 136 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.S.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. **Process Biochemistry**, v.26, p. 15-21, 1991.

RUBIN, E.M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, p. 841-845, 2008.

RUSS, W., MÖRTEL, H., MEYER-PITTOF, R. Application of spent grains to increase porosity in bricks. **Construction and Building Materials**, v. 19, 117-126, 2005.

SAHA, B.C.; COTTA, M.A. Comparison of pretreatment strategies for enzymatic saccharification and fermentation of barley straw to ethanol. **New Biotechnology**, v. 27, n.1, p. 10-16, 2008.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 816-822, 2005a.

SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of wheat straw to ethanol. **Progress Biochemistry**, v. 40, p. 3693-3700, 2005b.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Producción biotecnológica de alcohol carburante I: obtención a partir de diferentes materias primas. **Interciencia**, v. 30, n. 11, p. 671-678, 2005.

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

SANTOS, M.; JIMÉNEZ, J.J.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-COROVÉS, C.; del NOZAL, M.J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, v. 80, p. 17-21, 2003.

SAKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SINGLETON, V., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenol and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

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.; BOTHAST, R.J. Optimum pH and Temperature Conditions for Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p.727-731, 1990.

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.

SLININGER, P.J.; GORSICH, S.W.; LIU, Z.L. Culture Nutrition and Physiology Impact the Inhibitor Tolerance of the Yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p.778-790, 2009.

SHAHBAZI, A.; LI, Y.; MIMS, M.R. Application of sequential aqueous steam treatments to the fractionation of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 973-987, 2005.

SHAFIZADEH, F.; BRADBURY, A.G.W. Thermal degradation of cellulose in air and nitrogen at low temperatures. **Journal of Applied Poly. Science**, v.23, p.1431-1442, 1979.

SILVA, D.D.V. **Efeito do ácido acético na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

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

SILVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 43-52, 1995.

STOUTENBURG, R.M.; PERROTA, J.A.; AMIDON, T.E.; NAKAS, J.P. Ethanol production from a membrane purified hemicellulosic hydrolysate derived from sugar maple by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *BioResources*, v. 3, n. 4, p. 1349-1358, 2008.

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

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

TELLI OKUR, M.; EKEN SARAÇOĞLU, N. Ethanol Production from Sunflower Seed Hull Hydrolysate by *Pichia stipitis* under Uncontrolled pH Conditions in a Bioreactor. **Turkish Journal Engineering Environmental Science**, v. 30, p.317-322, 2006.

UNICA – União da Indústria de Cana-de Açúcar. Disponível em: <http://www.unica.com.br/>. Acesso em: 14 jan. 2012.

USDA – United States Department of Agriculture. (2009). Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/wap/circular/2009/09-04/productionfull04-09.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2009.

VAUGHAN MARTINI, A.E. Comparazione dei genomi del lievito *Pichia stipitis* e de alcune specie imperfette affini. **Ann. Fac. Agr. Univ. Perugia**, v. 38B, p. 331-335, 1984.

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

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.

VERDUYN, C.; VAN KLEEF, R., FRANK, J., SCHREUDER, H., van DIJIKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Properties of the NAD(P)H-dependent xylose reductase from the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Biochem. J.**, v. 226, n. 3, p. 669-677, 1985.

VERDUYN, C.; POSTMA, E.; SCHEFFERS, W.A.; van DIJIKEN, J.P. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 405-412, 1990.

van ZYL, C.; PRIOR, A. B.; du-PREEZ, J. C. Acetic acid inhiition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 13, p. 82-86, 1991.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological and Nutritional Value of *Pleurotus ostreatus* Cultivated on Spent Beer Grain. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 293-300, 2001.

WANG, S.; THOMAS, K.C.; SOSULSKI, K.; INGLEDEW, W.M. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and tricale. **Process Biochemical**, v. 34, p. 421-428, 1999.

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 bioetanol. **FEMS Yeast Research**, v. 8, p. 1175-1184, 2008.

WILDEBORG, T.; LOKHORST, A. Introduction on CO₂ Geological storage-classification of storage options. **Oil Gas. Sci. Technol. Rev. IFP**, v. 60, p. 513-515, 2005.

XIROS, C.; CHRISTAKOPOULOS, P. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. **Biotechnology for Biofuels**, v. 2, p. 1-12, 2009.

XIROS, C.; TOPAKAS, E.; KATAPODIS, P.; CHRISTAKOPOULOS, P. Evaluation of *Fusarium oxysporum* as na enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 213-224, 2008.