UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ANDRÉS FELIPE HERNÁNDEZ PÉREZ

Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar
como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol:
Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana
celular

Lorena – SP
2015

ANDRÉS FELIPE HERNÁNDEZ PÉREZ

Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar
como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol:
Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana
celular

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências do Programa de Pós-
graduação em Biotecnologia Industrial
na área de microbiologia aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Maria das
Graças de Almeida Felipe

Edição reimpressa e corrigida

Lorena – SP
Junho, 2015

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

Hernández Pérez, Andrés Felipe

Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co substratos e permeabilizante de membrana celular / Andrés Felipe Hernández Pérez; orientadorA Maria das Graças de Almeida Felipe - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.

129 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
OrientadorA: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Palha de cana-de-açúcar. 2. Hidrolisado hemicelulósico. 3. Xilitol. 4. Co-substratos. 5. Permeabilizante de membrana celular. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

*Dedico este trabalho a meus pais, Ruth e Hector, meu irmão,
Esteban, que sempre me demonstraram o valor da busca da
excelência, da disciplina e da gratidão, e a minha namorada,
Mayra, que esteve sempre a meu lado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por abrir sempre novas portas em meu caminho e me permitir aproveitar novas oportunidades.

A meus pais, Ruth e Hector, e meu irmão, Esteban, pela confiança e apoio incondicional nos novos desafios que decido tomar. A minha família inteira por sua companhia tantos nos momentos mais difíceis quanto os mais felizes desta aventura.

A minha namorada, Mayra, por andar este caminho junto a mim, por me brindar sempre um sorriso, um conselho, um beijo e nunca permitir que me sinta sozinho, mesmo tendo muitos quilômetros de distância entre nós.

À professora Graça, pela imensa colaboração, confiança desde o primeiro dia, disposição, paciência e orientação que transcenderá além deste mestrado.

A meus colegas e amigos do laboratório: Paulo Marcelo, Isabela, Tainah, Kelly, Débora, Priscila, Katia, Mayara, Bruna, pela companhia, brincadeiras, conselhos e conhecimentos compartilhados.

A meus amigos de outros laboratórios: Angela, Fernanda, Felipe, Omar, Matheus, Paulo, Larissa, Milena, Annie, Diego, Lina, Isabela, Rafael, Ludmila, Leandro, Luiz Gustavo, pelos momentos inesquecíveis e me fazer sentir em família. Ao pessoal da minha república pela companhia e tranquila convivência.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia, pelos ensinamentos, a orientação e reforçar meu interesse em permanecer na pesquisa.

Aos funcionários do Departamento de Biotecnologia, que estiverem sempre prontos a ajudar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro do projeto (Processo No. 2013/27142-0).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

Resumo

HERNÁNDEZ, A. F. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular.** 2015. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

A palha de cana-de-açúcar está se tornando uma biomassa lignocelulósica disponível a partir da progressiva introdução da colheita mecanizada da cana-de-açúcar no Brasil, situação que possibilita a utilização de uma parte desta como matéria-prima em processos de conversão termoquímica ou bioquímica. Além de pesquisas de uso da palha de cana para produção de bioenergia, a conversão bioquímica dos açúcares constituintes de sua fração hemicelulósica, particularmente a xilose, é uma rota potencial para seu aproveitamento na obtenção de produtos de alto valor agregado, como o xilitol. A importância deste poliálcool se deve às suas peculiares propriedades que permitem sua aplicação nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica, aliado ao fato do contínuo e rápido crescimento de seu mercado mundial. No presente trabalho foi estudado o aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol, visando a valorização e incorporação desta biomassa em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. O elevado conteúdo de hemicelulose da palha de cana (27%), similar ao encontrado em outras biomassas lignocelulósicas avaliadas para produção de xilitol, e a maior proporção de xilose no hidrolisado hemicelulósico (71%) em relação aos outros açúcares constituintes, tornam esta biomassa potencial matéria-prima para este bioprocessamento. A utilização do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana concentrado e destoxificado como meio de fermentação para a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 foi avaliada em diferentes fases da pesquisa. Na primeira, foi estudada a necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado e a disponibilidade inicial de oxigênio, sendo realizadas fermentações em batelada em frascos Erlenmeyer de 125mL com 25mL ou 50mL

de meio, 30°C, 200rpm e 48h. Foi demonstrado que a suplementação do hidrolisado com extrato de farelo de arroz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resultou em aumento do valor da produtividade volumétrica de xilitol, enquanto que a menor disponibilidade inicial de oxigênio favoreceu a eficiência de bioconversão. A avaliação do efeito dos co-substratos maltose, sacarose, celobiose e glicerol sobre este bioprocesso revelou que o maior favorecimento foi obtido com sacarose (10gL^{-1}), já que resultou nos máximos valores de concentração final de xilitol ($41,36 \pm 1,69 \text{ gL}^{-1}$), eficiência de bioconversão ($75,70 \pm 0,73\%$) e produtividade volumétrica ($0,61 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), correspondentes a incrementos de 9,04%, 5,01% e 6,56%, respectivamente, em relação à condição ausente de co-substratos. A adição ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana de Dimetil-sulfóxido (DMSO), composto com capacidade de permeabilizante de membrana celular, não resultou no incremento da produção de xilitol, a qual, pelo contrário, foi reduzida em razão da diminuição no consumo de xilose e crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cana suplementado com sacarose pode ser considerada uma rota de conversão bioquímica promissora para a valorização e integração desta biomassa em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: Palha de cana-de-açúcar; Hidrolisado hemicelulósico; Xilitol; Suplementação nutricional; Disponibilidade inicial de oxigênio; Co-substratos; Permeabilizante de membrana celular.

Abstract

HERNÁNDEZ, A. F. **Utilization of sugarcane straw hemicellulosic fraction as feedstock for biotechnological production of xylitol: Study of effect of co-substrates and cell membrane permeabilizer.** 2015. 129p. Dissertation (Master in Sciences) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

Sugarcane straw is becoming an available lignocellulosic biomass from the progressive introduction of non-burning harvest in Brazil, situation that enables the utilization of a portion of this material as feedstock in thermochemical and biochemical conversion processes. Besides the use of sugarcane straw for bioenergy production, biochemical conversion of the constituent sugars of its hemicellulosic fraction, particularly xylose, is a potential route for the use of this biomass to obtain high added value products, such as xylitol. The importance of this product is due to its particular properties that enable its application in food, dental and pharmaceutical industries, coupled with the fact of the continuous and rapid growth of its market. In the present work it was studied the utilization of sugarcane straw hemicellulosic fraction as feedstock for biotechnological production of xylitol, aiming at the valorization and integration of this biomass in a sugarcane biorefinery. The high hemicellulosic content of sugarcane straw (27%), similar to that found in other lignocellulosic biomasses evaluated for xylitol production, and the higher proportion of xylose in the hemicellulosic hydrolysate (71%) in relation to the other constituent sugars, make this biomass potential feedstock for this bioprocess. The utilization of the concentrated and detoxified sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate as fermentation medium for xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii* FTI 20037 was evaluated in different stages. In the first one, it was studied the necessity of nutritional supplementation of the hydrolysate and initial oxygen availability, being carried out batch fermentations in 125mL Erlenmeyer flasks with 25mL or 50mL of medium, 30°C, 200rpm and 48h. It was demonstrated that the supplementation of the hydrolysate with rice bran extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resulted on the increment of the value of xylitol volumetric productivity, whereas the higher initial

oxygen availability favored the bioconversion efficiency. The evaluation of the effect of the co-substrates maltose, sucrose, cellobiose and glycerol on this bioprocess revealed that the higher improvement was obtained with sucrose (10gL^{-1}), since it resulted in the maximum values of final concentration of xylitol ($41.36 \pm 1.69 \text{ gL}^{-1}$), bioconversion efficiency ($75.70 \pm 0.73\%$) and volumetric productivity ($0.61 \pm 0.02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), corresponding to increments of 9.04%, 5.01% and 6.56%, respectively, in relation to the condition absent of co-substrates. The addition to the sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate of Dimethyl-sulfoxide, a cell membrane permeabilizer, did not result in the increasing of the xylitol production, which, in fact, was reduced due to the diminution on xylose consumption and cell growth of *C. guilliermondii* FTI 20037. The results obtained in this study indicate that biotechnological production of xylitol from sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate supplemented with sucrose can be considered a promissory biochemical conversion route for valorization and integration of this biomass in a sugarcane biorefinery.

Keywords: Sugarcane straw; Hemicellulosic hydrolysate; Xylitol; Nutritional supplementation; Initial oxygen availability; Co-substrates; Cell membrane permeabilizer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processamento termoquímico e bioquímico de biomassa lignocelulósica em uma biorrefinaria.	22
Figura 2 – Biorrefinaria conceptual de cana-de-açúcar com participação conjunta de bagaço e palha de cana.	24
Figura 3 – Partes da planta de cana-de-açúcar.	25
Figura 4 – Modelo do metabolismo de xilose em leveduras naturalmente fermentadoras de xilose.	32
Figura 5 – Representação esquemática das fases da presente pesquisa.	46
Figura 6 – Imagens da palha de cana <i>in natura</i> (A) e moída (B).	48
Figura 7 – Hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após hidrólise ácida diluída (A), concentração à vácuo (B) e destoxificação (C).	52
Figura 8 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (✕) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.	66
Figura 9 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.	69
Figura 10 - Produção de etanol (▲) e glicerol (✕) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.	74
Figura 11 - Consumo de ácido acético (■) e perfil de pH (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.	76
Figura 12 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (✕) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose (■) nas concentrações (g L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	78
Figura 13 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (✕) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose (■) nas concentrações (g L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	78
Figura 14 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (✕) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose (■) nas	

concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	79
Figura 15 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (×) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol (■) nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	79
Figura 16 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana... 87	87
Figura 17 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	87
Figura 18 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	88
Figura 19 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	88
Figura 20 - Produção de etanol (▲) e glicerol (×) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	97
Figura 21 - Produção de etanol (▲) e glicerol (×) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	97
Figura 22 - Produção de etanol (▲) e glicerol (×) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	97
Figura 23 - Produção de etanol (▲) e glicerol (×) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	98
Figura 24 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana. ...	101
Figura 25 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (g ^L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	101

Figura 26 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g L ⁻¹) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	102
Figura 27 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (g L ⁻¹) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	102
Figura 28 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (X) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	104
Figura 29 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	106
Figura 30 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas concentrações (% v/v) de 0 (A), 2,5 (B), 5,0 (C) e 10,0 (D) sobre a morfologia celular de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	108
Figura 31 - Produção de etanol (▲) e glicerol (■) por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	110
Figura 32 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Condições avaliadas de suplementação nutricional e disponibilidade inicial de oxigênio.	53
Tabela 2 - Composição química estrutural da palha de cana e de outras biomassas lignocelulósicas.	59
Tabela 3 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo (FC=3) e destoxificação.....	61
Tabela 4 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre o consumo de xilose por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	67
Tabela 5 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre o crescimento celular de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	69
Tabela 6 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre a produção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	71
Tabela 7 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de xilose por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.....	81
Tabela 8 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	89
Tabela 9 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	91
Tabela 10 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de xilose por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	105
Tabela 11 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.....	107
Tabela 12 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.....	109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1 Aproveitamento de biomassa lignocelulósica no contexto de biorrefinaria	21
2.2. Palha de cana-de-açúcar	23
2.3 Xilitol.....	28
2.3.1 Propriedades e mercado.....	28
2.3.2 Produção biotecnológica de xilitol.....	31
2.3.3 Utilização de co-substratos na produção biotecnológica de xilitol.....	36
2.3.4 Uso de compostos com capacidade permeabilizante da membrana celular na produção biotecnológica de xilitol	39
2.3.5 <i>Candida guilliermondii</i>	40
2.3.6 Estado da arte sobre a produção biotecnológica de xilitol.....	42
3. OBJETIVOS.....	45
3.1 Objetivo geral	45
3.2. Objetivos específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 Matéria-prima	47
4.2. Caracterização química estrutural da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	47
4.3. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.	50
4.3.1 Hidrólise ácida diluída.....	50
4.3.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico	51
4.4. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana utilizando em função da necessidade de suplementação nutricional e a disponibilidade inicial de oxigênio.	52
4.4.1 Micro-organismo e preparo de inóculo	52
4.4.2 Meios e condições de fermentação	53
4.5. Estudo do efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	54
4.6. Estudo do efeito da adição do permeabilizante de membrana celular Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.....	55

4.7. Métodos analíticos	55
4.7.1 Concentração e viabilidade celular	55
4.7.2 Concentração de açúcares, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético.....	56
4.7.3 Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural.....	56
4.7.5 Determinação de parâmetros fermentativos.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1 Caracterização química estrutural da palha de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	59
5.2 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.....	61
5.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em função da necessidade de suplementação nutricional e a disponibilidade inicial de oxigênio.....	65
5.4 Estudo do efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	77
5.4.1 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de açúcares.....	77
5.4.2 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular e produção de xilitol.....	86
5.4.3 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de glicerol e etanol.....	96
5.4.4 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre os perfis de ácido acético e pH.....	100
5.5 Estudo do efeito da adição do permeabilizante de membrana celular Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	104
6. CONCLUSÕES.....	113
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	115
REFERÊNCIAS	116
APÊNDICE.....	129

1. INTRODUÇÃO

O uso de biomassa lignocelulósica como matéria-prima para a produção de bioenergia, na forma de biocombustíveis, energia térmica e elétrica, tem sido um tema central de pesquisa interdisciplinar nas últimas décadas, surgido como resposta às necessidades de diversificação da matriz energética e de redução da dependência de fontes fósseis. A partir do desenvolvimento do conceito de biorrefinaria, pesquisas têm sido destinadas ao estudo de processos de obtenção de compostos químicos e/ou biomoléculas de alto valor agregado, os quais poderiam suportar a rentabilidade de usinas que integram estes processos com a produção de bioenergia de baixo custo. Para tanto, é importante o aproveitamento integral das frações constituintes da biomassa lignocelulósica, isto é hemicelulose, celulose e lignina.

Uma ampla variedade de biomassas lignocelulósicas têm sido pesquisadas em função de sua disponibilidade e distribuição a nível mundial, entre as quais se destacam os subprodutos lignocelulósicos gerados durante o processamento da cana-de-açúcar. Estes subprodutos são o bagaço, produzido durante a moenda da cana, e a palha (mistura de pontas, folhas verdes e secas), cuja abundância e disponibilidade estão aumentando a partir da introdução progressiva da colheita sem queima.

Encontra-se em discussão a necessidade de manutenção da palha de cana no campo em função do impactos que pode causar na cultura da cana. Assumindo a possibilidade de retirar do campo uma parte da palha, esta biomassa poderia ser aproveitada como matéria-prima em processos de conversão termoquímica e bioquímica, tornando viável sua incorporação em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. No entanto, poucas ainda são as pesquisas para seu aproveitamento em comparação às de uso do bagaço. Atualmente, as principais rotas sugeridas para o uso da palha de cana são a de produção de etanol de segunda geração e a de obtenção de energia por combustão direta nas caldeiras.

Rotas alternativas de conversão bioquímica dos açúcares constituintes dos polissacarídeos estruturais da biomassa lignocelulósica possibilitam sua valorização e/ou a substituição de processos químicos convencionais que podem

ser custosos e ineficientes. Neste contexto, a fração hemicelulósica da biomassa lignocelulósica é de particular interesse e uma ampla variedade de produtos têm sido estudados como possíveis destinos de seus açúcares constituintes. Dentre estes produtos, destaca-se o xilitol como um composto de alto valor agregado, com importantes aplicações nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica, com crescente demanda no mercado, e considerado um dos químicos derivados da biomassa cuja produção integrada à de biocombustíveis e energia pode suportar a viabilidade técnica e econômica de uma biorrefinaria.

A produção biotecnológica de xilitol tem sido amplamente estudada como alternativa a sua obtenção comercial por via química. O Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBIO) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) vem realizando pesquisas na Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL/USP) com o objetivo de desenvolver tecnologias viáveis para a produção biotecnológica de xilitol a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas dos setores agroindustriais e florestais. Nestas pesquisas já foram atingidos importantes progressos em passos críticos do bioprocessamento, como a hidrólise ácida diluída, preparação do hidrolisado hemicelulósico e fermentação. Apesar dos altos valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol obtidas em várias das pesquisas, não foram conseguidos até o momento incrementos concomitantes destes dois parâmetros, sendo, portanto, possível ainda melhorar este bioprocessamento a partir da introdução de estratégias não exploradas.

Assim, no presente trabalho foi estudado o aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol, visando a valorização e incorporação desta biomassa em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar. Após a caracterização química da palha de cana e a hidrólise ácida diluída desta, a avaliação deste bioprocessamento foi feita quanto à necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado, à disponibilidade inicial de oxigênio, e ao efeito da adição ao hidrolisado de diferentes co-substratos e de um composto permeabilizante de membrana celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aproveitamento de biomassa lignocelulósica no contexto de biorrefinaria

O conceito de biorrefinaria corresponde ao aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica em processos de conversão bioquímica ou termoquímica, para a obtenção de bioenergia, na forma de energia elétrica, térmica e biocombustíveis (de primeira, segunda e/ou terceira geração), e de produtos químicos ou biomoléculas de alto valor agregado (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012). O uso integral do material lignocelulósico se refere ao emprego tanto de subprodutos e coprodutos de processos agroindustriais, quanto das frações estruturais constituintes destas biomassas, principalmente celulose, hemicelulose e lignina (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012).

A produção de bioenergia têm como finalidade diversificar a matriz energética e reduzir a dependência de fontes não renováveis e não amigáveis com o ambiente, bem como assegurar a autonomia energética das unidades de produção (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012). A este respeito, espera-se que, em certos países, o uso de biomassas lignocelulósicas permita reduzir a dependência da importação de petróleo de países produtores (BOZELL, 2008). Além disso, a localização geográfica das matérias-primas estão mais amplamente distribuídas que as fontes fósseis, permitindo maior segurança no fornecimento (MENON; RAO, 2012).

Por outro lado, a obtenção de produtos químicos e biomoléculas de alto valor agregado permitiria tanto valorizar a matéria-prima e favorecer a rentabilidade do sistema, ao suportar o custo de produção de bioenergia de baixo valor, quanto estabelecer bioprocessos inovadores e/ou que pudessem substituir métodos químicos convencionais mais custosos e/ou com maior impacto ambiental (BOZELL, 2008; MENON; RAO, 2012). O esquema da Figura 1 apresenta as potenciais vias de processamento da biomassa lignocelulósica em uma biorrefinaria.

Figura 1 – Processamento termoquímico e bioquímico de biomassa lignocelulósica em uma biorrefinaria.

Fonte: Adaptado de Menon e Rao (2012).

Uma ampla variedade de biomassas lignocelulósicas têm sido pesquisadas em função de sua disponibilidade e distribuição a nível mundial, as quais são principalmente co-produtos e subprodutos florestais ou agroindustriais. Entre estes últimos, destacam-se os subprodutos lignocelulósicos, denominados bagaço e palha, gerados durante o processamento da cana-de-açúcar, a qual é considerada como uma planta altamente eficiente na geração de biomassa e uma das fontes de carbono mais competitivas para biorrefinarias (LAGO et al., 2012).

2.2. Palha de cana-de-açúcar

A produção mundial anual de cana-de-açúcar foi estimada em 1,7 bilhões de toneladas no ano 2012, sendo o Brasil responsável por aproximadamente 38% desta produção e reconhecido como o maior produtor do mundo (FAO, 2012). Para a safra 2014/2015, a produção no Brasil é estimada em 642,1 milhões de toneladas, suportada por uma área cultivada de 9,0 milhões de hectares e uma produtividade média de 73,31 ton/ha (CONAB, 2014). Os dois subprodutos lignocelulósicos gerados na agroindústria da cana-de-açúcar, correspondentes a palha e bagaço, representam dois terços do conteúdo energético da cana e equivalem cada um a aproximadamente 14% (base seca) da massa de cana colhida (PIPPO et al., 2011). Segundo a produção de cana estimada para a safra 2014/15 (CONAB, 2014), aproximadamente 89,9 milhões de toneladas tanto de bagaço quanto de palha seriam potencialmente geradas nesta safra.

Segundo Lago et al. (2012), a participação conjunta do bagaço e a palha de cana seria essencial para o desenvolvimento de uma biorrefinaria de cana com capacidade para produzir açúcar, etanol de primeira e segunda geração, energia elétrica e térmica, e produtos químicos, com sustentabilidade econômica, social e ambiental (Figura 2).

Figura 2 – Biorrefinaria conceptual de cana-de-açúcar com participação conjunta de bagaço e palha de cana.

Fonte: Adaptado de Lago et al. (2012).

O bagaço de cana, subproduto lignocelulósico gerado durante a moenda da cana nas usinas, é amplamente empregado como combustível no processo de cogeração de energia, o qual permite não só a substituição do carvão vegetal, senão também atingir a autossuficiência energética das usinas e gerar um excedente de eletricidade para ser vendido à rede (HOFTSETZ; SILVA, 2012). Considerando a existência de um volume excedente ao utilizado diretamente nas usinas, o bagaço de cana tem sido uma das biomassas lignocelulósicas mais usadas nas pesquisas em bioprocessos como potencial matéria-prima para produção de etanol de segunda geração e químicos (CHANDEL et al., 2012; LAGO et al., 2012). Além disso, o bagaço de cana apresenta outros usos como forragem, alimentação animal, produção de papel, entre outros (COSTA et al., 2012).

Por outro lado, a palha de cana, a qual corresponde às pontas, folhas verdes e secas da planta conforme destacado na Figura 3, constitui um subproduto resultante da colheita mecanizada da cana (SEABRA et al., 2010). Esta biomassa lignocelulósica está se tornando um material abundante e disponível a partir da substituição gradual da colheita com queima pela colheita

mecanizada da cana, o qual tem como finalidade reduzir os prejuízos ambientais, agronômicos e econômicos da colheita com queima, e, portanto, aumentar a sustentabilidade do sistema (PIPPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013). A este respeito, é importante destacar que, segundo Capaz, Carvalho e Nogueira (2013), a substituição das queimas pela colheita mecanizada já contribuiu na redução das emissões de efeito estufa entre 1990 e 2009 durante o ciclo de vida do etanol no estado de São Paulo. Projeções do Centro de Tecnologia Canavieira (PIEROSSE; FAGUNDES, 2012) indicam que a quantidade disponível de palha de cana poderia se triplicar nos próximos 20 anos, em função do aumento na implementação da colheita mecanizada. Na safra 2011/2012 este sistema de colheita já atingia aproximadamente 65% no estado de São Paulo, segundo a União de Indústria da Cana-de-Açúcar - UNICA (2014), sendo esperada a eliminação total da queima até o ano 2018, segundo Leal et al. (2013).

Figura 3 – Partes da planta de cana-de-açúcar.

Fonte: Adaptado de Seabra et al. (2010).

A colheita mecanizada da cana acarreta o depósito de grandes quantidades de palha no solo, entre 7 e 25 toneladas de matéria seca por hectare com uma proporção C:N de aproximadamente 100:1, o que representa uma relação de 9 a 30% entre a palha gerada e o colmo colhido (PIPPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013). Encontra-se em discussão a necessidade de manutenção da

palha de cana no campo, em função dos impactos positivos e negativos que pode causar na cultura da cana, os quais estão associados principalmente à produtividade desta cultura, administração de fertilizantes, controle de doenças, erosão do solo e dinâmica da matéria orgânica, dependendo das características de cada área (PIPPO et al., 2011; LEAL et al., 2013). Neste contexto, estudos vêm sendo realizados para determinar a proporção de palha que deve ser deixada no campo para manter seus benefícios agronômicos (LANDELL et al., 2013), bem como estabelecer tecnologias e logísticas apropriadas para que este material seja disponibilizado na usina de processamento (PIPPO et al., 2011; LEMOS et al., 2014).

Assumindo a possibilidade de retirar do campo uma parte da palha de cana gerada na colheita sem afetar o manejo agrônomo da cultura, esta biomassa poderia ser aproveitada como matéria-prima em processos de conversão termoquímica e bioquímica, tornando viável sua incorporação em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar (LAGO et al., 2012; LEAL et al., 2013). No entanto, poucas ainda são as pesquisas para o aproveitamento da palha de cana em comparação às de uso do bagaço.

Atualmente, as principais rotas que têm sido sugeridas para o uso da palha de cana são a produção de etanol de segunda geração (KRISHNAN et al., 2010; SILVA et al., 2010; SINDHU et al., 2011; JUTAKANOKKE et al., 2012; MOUTTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2014) e a obtenção de energia por combustão direta nas caldeiras (SEABRA et al., 2010; PIPPO et al., 2011; DIAS et al., 2013; LEAL et al., 2013). A este respeito, diferentes estudos têm estimado os aumentos potenciais na produção de etanol e/ou energia elétrica nas usinas com a participação desta biomassa, sem necessidade de incrementar a área plantada de cana (SEABRA et al., 2012; LAGO et al., 2012; LEAL et al., 2013; SANTOS et al., 2014). Além do uso da palha de cana no processo de cogeração, outras opções de conversão termoquímica já foram propostas, tais como a gaseificação (GABRA et al., 2001) e a pirólise (MORAES et al., 2012; CUNHA et al., 2013; MESA-PÉREZ et al., 2013).

Em relação às pesquisas de aproveitamento da palha de cana como matéria-prima na produção de etanol de segunda geração, destaca-se que estas têm sido focadas principalmente na avaliação de métodos de pré-tratamento para

favorecimento da hidrólise enzimática da celulose e fermentação da glicose liberada (SILVA et al., 2010; JUTAKANOKI et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014; SANTOS et al., 2014). É importante salientar a representatividade da fração hemicelulósica da palha de cana, uma vez que esta corresponde a aproximadamente 27% da massa seca da biomassa, sendo constituída principalmente por xilose (75% - 86%) (MOUTTA et al., 2012; SZCZERBOWSKI et al., 2014). Assim, quanto às pesquisas para o aproveitamento desta fração, os estudos têm apontado a hidrólise ácida diluída como uma das tecnologias que permitiriam maior solubilização deste polissacarídeo (MOUTTA et al., 2012), bem como a avaliação de processos de co-fermentação de glicose e xilose para produção de etanol (KRISHNAN et al., 2010; SINDHU et al., 2011). Não foram encontrados estudos sobre o uso da palha de cana como matéria-prima em bioprocessos diferentes do de produção de etanol de segunda geração.

É importante ressaltar que a fermentação alcoólica dos açúcares provenientes da fração hemicelulósica, majoritariamente xilose, da biomassa lignocelulósica continua sendo um importante desafio para a tecnologia de etanol de segunda geração, pelo qual esta fração resulta de particular interesse (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006; LIMAYEM; RICKE, 2012). Uma ampla variedade de produtos têm sido estudados como possíveis destinos dos açúcares constituintes da hemicelulose, conforme as revisões de Menon e Rao (2012) e Canilha et al. (2013), tais como xilitol, butanol, 2,3-butanediol, ácido láctico, gás de síntese, biopolímeros (polihidroxialcanoatos e polilactatos) e proteína unicelular. Dentre estes produtos, o xilitol se destaca como um composto de alto valor agregado por suas particulares propriedades e crescente demanda.

2.3 Xilitol

2.3.1 Propriedades e mercado

O xilitol é um pentitol, com fórmula química $C_5H_{12}O_5$ e massa molecular 152,15g/mol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; MUSSATTO, 2012). O xilitol puro é um pó branco cristalino que tem aparência e sabor similar ao da sacarose, solubilidade em temperatura ambiente similar à da sacarose e maior em temperaturas elevadas, e alta estabilidade química e microbiológica (MUSSATTO, 2012). O interesse científico e comercial neste poliol está baseado nas seguintes propriedades particulares (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; MUSSATTO, 2012) :

- Poder adoçante similar ao da sacarose com um conteúdo calórico 40% menor.
- Metabolismo independente da insulina (por absorção direta no fígado, ou indiretamente através de bactérias intestinais), e não contribui com mudanças grandes e rápidas no nível de glicose e insulina no sangue, comparado com a sacarose ou glicose, motivos pelos quais é altamente recomendado como substituto da sacarose em pessoas diabéticas. Adicionalmente, pode contribuir para evitar problemas como hiperglicemia, distúrbios no metabolismo de lipídeos e sintomas como sede e fome excessiva.
- Propriedades anticariogênicas, correspondentes tanto à capacidade para inibir o crescimento da flora bacteriana oral (principalmente do gênero *Streptococcus*), reduzindo a formação da placa dentária, quanto ao favorecimento da remineralização de lesões de cáries pela estimulação do fluxo de saliva sem diminuição do pH e pela estabilização de íons fosfatos.
- Pode ser usado como agente terapêutico em pacientes com anemia hemolítica causada pela deficiência na enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PDH), já que esta enzima não é necessária para seu

metabolismo, somado a que sua oxidação a xilulose pode suprir NADPH para a célula.

- Pode contribuir no tratamento de infecções respiratórias por inibir o crescimento de bactérias causadoras destas doenças, como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*; bem como usado como adjuvante no tratamento de dermatite atópica, pois já foi demonstrado que pode inibir a formação de glicocalix de *S. aureus*.
- Pode ser útil na prevenção de osteoporose, já que favorece a absorção de cálcio no intestino e seu incremento no ossos.

Com base nessas características, o xilitol já tem importantes aplicações nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica (FELIPE, 2004; MUSSATTO, 2012; SILVA; CHANDEL, 2012). Destaca-se que o xilitol já foi classificado pela “*Food and Drug Administration*” (FDA – EEUU) como “*Generally Recognized as Safe*” (GRAS), bem como indicado como “*Acceptable Daily Intake*” (ADI), correspondente à categoria de maior segurança para um aditivo alimentício, pelo “*Joint Expert Committee on Food Additives*” (JECFA), em representação da “*World Health Organization*” (WHO) (MUSSATTO, 2012; RAVELLA et al., 2012). Além disto, este poliol é considerado um “*platform chemical*” que pode ser usado para sintetizar vários químicos valiosos, como etileno-glicol, propileno-glicol, glicerol, ácido xilárico e polímeros (SILVA; CHANDEL, 2012).

É importante destacar que o xilitol foi definido pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos (US-DOE) como um dos químicos derivados da biomassa de alto valor agregado, cuja produção integrada à obtenção de biocombustíveis e energia pode suportar a viabilidade técnica e econômica de uma biorrefinaria (WERPY; PETERSON, 2004; BOZELL, 2008). A este respeito, alguns autores já indicaram que a produção de xilitol pode melhorar significativamente a rentabilidade de biorrefinarias que integrem a obtenção deste poliol com a de etanol de segunda geração e energia (FEHÉR; MARTA; RÉCSEY, 2012; FRANCESCHIN et al., 2011).

Em relação ao mercado do xilitol, Ravella et al. (2012) reportaram que estava estimado no ano 2012 em 537 milhões USD/ano, com produção estimada

em mais de 125.000 toneladas/ano, participação de 12% no mercado de polióis, e com previsão de continuar experimentando forte demanda e rápido crescimento mundial. Estes autores relataram também que o valor do xilitol era de 4,5 – 5,5 USD/kg para compra por atacado por companhias alimentícias ou farmacêuticas, e de 20 USD/kg para compra em supermercados (RAVELLA et al., 2012). Por sua vez, Rueda et al. (2014) indicaram que o mercado global de xilitol passará de 537 milhões USD em 2013, correspondente a aproximadamente 161.500 toneladas, a 1 bilhão USD, equivalente a 242.000 toneladas, em 2020. Na Ásia a produção de xilitol corresponde a mais de 50% do total mundial a partir de sabugo de milho, enquanto que o restante desta produção corresponde a Europa, Estados Unidos e Austrália, destacando-se a empresa Danisco (atualmente parte de DuPont) como uma das maiores produtoras mundiais de xilitol, usando madeiras duras, como bétula (*“birch”*) (obtido em associação com a indústria de papel e polpa), e milho como matérias-primas (RAVELLA et al., 2012).

Atualmente, a produção comercial de xilitol está baseada na hidrogenação catalítica da xilose purificada de hidrolisados hemicelulósicos oriundos principalmente de sabugo de milho e madeiras duras, como bétula SILVA; CHANDEL, 2012; CANILHA et al., 2013). A produção química do xilitol é fundamentada no processo patenteado por Melaja e Hämäläinen em 1977, o qual consiste em: 1) Hidrólise do material vegetal; 2) Purificação do hidrolisado hemicelulósico por exclusão iônica, remoção de cor e fracionamento cromatográfico, com a finalidade de prover uma solução com alta concentração de xilose; 3) Hidrogenação catalítica da xilose para produzir uma solução rica em xilitol; 4) Recuperação do xilitol por fracionamento cromatográfico usando resinas de intercambio iônico. Atualmente, é usado um catalisador metálico (geralmente níquel tipo Raney), temperatura de 80 – 140°C e pressão de hidrogênio até 50 atm para a redução da xilose, e processos de fracionamento cromatográfico, concentração e cristalização para a recuperação do xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; RAVELLA et al., 2012; CANILHA et al., 2013).

O processo químico de produção comercial de xilitol é considerado ineficiente e custoso devido à complexidade do procedimento de purificação da xilose (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; CANILHA et al., 2013). Segundo Parajó, Domínguez, H. e Domínguez, J. (1998), no processo

convencional aproximadamente 50 – 60% da xilose inicial é convertida em xilitol, sendo as etapas de purificação da xilose e separação do xilitol as mais custosas. A este respeito, Hou-Rui (2012) indicou que enquanto o custo da redução da xilose a xilitol é aproximadamente 350 USD/ton, o custo da obtenção e purificação da xilose é de aproximadamente 2.300 – 2.500 USD/ton, representando 80% do custo do processo. Segundo este mesmo autor, o alto custo da purificação da xilose é devido à complexidade e baixa eficiência dos métodos utilizados em função da composição heterogênea do hidrolisado hemicelulósico (HOU-RUI, 2012).

A produção biotecnológica de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas tem sido amplamente estudada como alternativa ao processo químico comercial (FELIPE, 2004; SILVA; CHANDEL, 2012; CANILHA et al., 2013). Diferente do processo químico, neste bioprocessos não são requeridas etapas de purificação da xilose por ser um processo biologicamente seletivo, nem uso de catalisadores químicos, altas temperaturas e pressões, condições que são custosas, perigosas e prejudiciais para o ambiente (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998; HOU-RUI, 2012; CANILHA et al., 2013).

2.3.2 Produção biotecnológica de xilitol

Na produção biotecnológica de xilitol é aproveitada a capacidade natural de leveduras de metabolizar xilose como fonte de carbono e energia, o que envolve inicialmente a redução de xilose a xilitol pela Xilose Redutase (XR) dependente de NAD(P)H, seguido pela oxidação do xilitol a xilulose pela Xilitol Desidrogenase (XDH) dependente de NAD(P)⁺ (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). A xilulose é o ponto de integração com a fase não oxidativa da via das Pentoses Fosfato (PPP) e a partir desta com o metabolismo central de carbono para regeneração de cofatores, formação de intermediários carbonados, energia e biomassa celular (FLORES et al., 2000; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). O acúmulo de xilitol é induzido mediante a limitação na disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação, a qual reduz a taxa respiratória das células e diminui a regeneração de NAD⁺, causando um desequilíbrio NADH/NAD⁺, isto é

níveis baixos de NAD^+ e altos de NADH , que restringe a atividade da XDH (YABLOCHKOVA et al., 2004; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Na Figura 4 se apresenta um esquema modelo do metabolismo de xilose em leveduras fermentadoras de pentoses.

Figura 4 – Modelo do metabolismo de xilose em leveduras naturalmente fermentadoras de xilose.

Fonte: Adaptado de Hahn-Hägerdal et al. (1994).

XR: Xilose Redutase; XDH: Xilitol desidrogenase; PPP: Via das Pentoses Fosfato

É importante destacar que algumas leveduras conseguem compensar a regeneração diminuída de NAD^+ usando NADH como cofator da XR, enquanto que naquelas com alto potencial de produção de xilitol esta enzima têm sido caracterizada como exclusivamente dependente de NADPH (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; YABLOCHKOVA et al., 2004; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Este é o caso de *Candida guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988), e que tem sido base das pesquisas realizadas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBIO) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) durante mais de duas décadas na Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL/USP). Nestes estudos o principal objetivo é desenvolver tecnologias viáveis para a produção biotecnológica de xilitol a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas dos setores agroindustriais

e florestais. As biomassas que foram já estudadas são bagaços de cana (FELIPE et al., 1997a), de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2008) e de maçã (DALANHOL, 2014), palhas de arroz (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999), de trigo (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA, 2005) e de sorgo (SENE et al., 2011), casca de aveia (TAMANINI et al., 2004) e cavacos de eucalipto (ALMEIDA et al., 2003).

Particularmente para o processo de produção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana já foram estabelecidas condições de hidrólise ácida diluída com H_2SO_4 (PESSOA JR; MANCILHA; SATO, 1997), preparo do hidrolisado hemicelulósico mediante concentração a vácuo (RODRIGUES et al., 2003), destoxificação por ajuste de pH e adsorção com carvão ativado (MARTON et al., 2006) e suplementação nutricional, como a utilização de farelo de arroz (SILVA et al., 2003; RODRIGUES et al., 2005). É importante destacar que estudos já demonstraram que podem ocorrer diferenças nos requerimentos nutricionais dos hidrolisados hemicelulósicos, especificamente quanto aos nutrientes sulfato de amônio, extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio, em função do tipo de biomassa lignocelulósica empregada como matéria-prima e das condições de preparo do hidrolisado hemicelulósico. Almeida et al. (2003) encontraram que a concentração adicionada de extrato de farelo de arroz ao hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto não resultou em um efeito significativo na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, a qual foi maximizada a partir da otimização das concentrações de sulfato de amônio e xilose. Por sua vez, já foi demonstrado que a suplementação nutricional com os compostos mencionados dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (MUSSATTO; ROBERTO, 2005) e bagaço de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2008) resultou em impacto negativo significativo no rendimento e produtividade de xilitol, sendo que os máximos valores destes parâmetros foram obtidos nos hidrolisados não suplementados.

Parâmetros operacionais do processo fermentativo a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana já foram também definidos, tais como a idade e concentração do inóculo (24h, 1gL^{-1}) (FELIPE et al., 1997a), e a fonte de carbono para sua preparação (xilose) (ARRUDA et al., 2011); concentração de xilose no hidrolisado entre 50 e 60gL^{-1} (FELIPE et al., 1997a; RODRIGUES et al., 2003), relação glicose:xilose de 1:5 (SILVA; FELIPE, 2006), pH entre 5,5 e 6,5

(FELIPE et al., 1997b) e temperatura de 30°C (FELIPE et al., 1997a; SENE et al., 2000).

Destaca-se quanto ao fornecimento de oxigênio, considerado um dos parâmetros mais críticos do processo (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; GRANSTRÖM, IZUMORI; LEISOLA, 2007), que nas pesquisas com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana o emprego de valores de coeficiente de transferência de oxigênio (K_La) de 20h⁻¹ (MARTÍNEZ; SILVA; FELIPE, 2000), e 27h⁻¹ (SILVA et al., 1997) permitiram a obtenção de altas produtividades volumétricas de xilitol (0,7gL⁻¹h⁻¹ e 0,87 gL⁻¹h⁻¹, respectivamente), enquanto que o uso de K_La de 10h⁻¹ (MORITA; SILVA; FELIPE, 2000) resultaram em uma alta eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (86,15%).

Ainda com relação aos resultados obtidos na EEL/USP em pesquisas de produção biotecnológica de xilitol com bagaço de cana, pode se destacar o estudo de algumas estratégias para o favorecimento do desempenho fermentativo da levedura, como sua adaptação ao hidrolisado hemicelulósico (SENE et al., 2001); imobilização celular em reatores de tanque agitado (CARVALHO et al., 2004) ou de leito fluidizado (SARROUH; SILVA, 2008); operação do processo em batelada alimentada (RODRIGUES; SILVA; FELIPE, 1999), em semi-contínuo com células imobilizadas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008) ou em contínuo (MARTÍNEZ et al., 2003). É importante salientar também que já foi realizado um estudo de ampliação de escala deste bioprocessos, entre frascos agitados e fermentadores de bancada de 2,4L e 16L (ARRUDA, 2011).

Nessas pesquisas têm sido obtidos valores variáveis de eficiência de bioconversão, geralmente entre 60% e 80%, e de produtividade volumétrica de xilitol, comumente entre 0,4gL⁻¹h⁻¹ e 0,7gL⁻¹h⁻¹. Destaca-se que as máximas eficiências de bioconversão de xilose em xilitol atingida com *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, correspondentes a valores entre 85% e 88%, acompanharam-se de produtividades volumétricas entre 0,4gL⁻¹h⁻¹ e 0,66gL⁻¹h⁻¹ (RODRIGUES et al., 1998; RODRIGUES; SILVA; FELIPE, 1999; MORITA; SILVA; FELIPE, 2000; CARVALHO et al., 2004; ARRUDA et al., 2011) Por sua vez, as máximas produtividades volumétricas de xilitol em estudos com a mesma levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foram entre 0,75gL⁻¹h⁻¹ e 0,87 gL⁻¹h⁻¹, obtidas em estudos nos

quais as eficiências de bioconversão foram entre 69% e 80% (FELIPE et al., 1997a; SILVA et al., 1997; SENE et al., 2000; RODRIGUES et al., 2003).

Nesse contexto, é importante destacar o importante papel da disponibilidade de oxigênio na produção biotecnológica de xilitol. Em diversas pesquisas já foi relatado que o emprego de uma condição de limitação de oxigênio favorece o acúmulo de xilitol, e consequentemente a eficiência de bioconversão de xilose em xilitol, porém também causa a diminuição do fluxo de carbono proveniente da assimilação da xilose para o metabolismo central (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). A este respeito, já foi sugerido que em condições de reduzida disponibilidade de oxigênio o metabolismo de xilose resultaria insuficiente para manter uma adequada regeneração de NADPH, devido à redução no fluxo de carbono na via PPP que é a principal via produtora deste cofator (BRUINENBERG; VAN DIKJEN; SCHEFFERS, 1983; KIM; RYU; SEO, 1999; KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Assim, uma redução na disponibilidade de NADPH prejudicaria a atividade da enzima XR e, portanto, a taxa de bioconversão de xilose em xilitol (KIM; RYU; SEO, 1999; KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007).

A diminuição no fluxo de carbono proveniente da assimilação de xilose devido à limitação de oxigênio pode ser compensada pela estratégia de suplementação do meio de fermentação com um co-substrato (KIM; RYU; SEO, 1999), o qual pode ser outro monossacarídeo, dissacarídeo, álcool, poliol ou ácido orgânico (TAMBURINI et al., 2010). Este composto ao ser metabolizado simultaneamente com a xilose suportaria não só a regeneração de cofatores, particularmente NADPH, favorecendo a contínua assimilação de xilose e produção de xilitol, mas também a formação de intermediários metabólicos e produção de energia (KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010; OH et al., 2013).

Considerando que a maioria dos hidrolisados hemicelulósicos contém glicose em uma baixa concentração em relação à de xilose, esta hexose seria naturalmente um co-substrato, com a vantagem particular de ser o substrato da fase oxidativa da via PPP (BRUINENBERG; VAN DIKJEN; SCHEFFERS, 1983; KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010). Apesar de relatos sobre o favorecimento da produção de xilitol pela presença de glicose em função de sua

proporção em relação à xilose tanto em meio definido (TAVARES et al., 2000) quanto em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (SILVA; FELIPE, 2006), em outras pesquisas foi apresentada evidência da limitação na assimilação de xilose por esta hexose, com consequente prejuízo da produtividade de xilitol, em meio definido (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; WALTHER; HENSIRISAK; AGBLEVOR, 2001). O efeito negativo da presença de glicose no meio de fermentação sobre a produção de xilitol se refere à repressão catabólica exercida por esta hexose sobre a assimilação de xilose (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; TAMBURINI et al., 2010; SU et al., 2013). Este fenômeno tem sido associado a fatores como a concorrência da xilose e da glicose por transportadores não específicos, sendo a hexose preferencial, e a inibição da expressão das enzimas do catabolismo da xilose, XR e XDH, que são não constitutivas a diferença das enzimas glicolíticas (KIM; RYU; SEO, 1999; KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; TAMBURINI et al., 2010; SU et al., 2013).

Estudos já demonstraram a possibilidade de usar compostos diferentes à glicose como co-substratos no processo de produção biotecnológica de xilitol. Considera-se que a utilidade de um composto como co-substrato neste bioprocessos depende de que o metabolismo deste favoreça a regeneração eficiente de NADPH, não interfira na assimilação de xilose nem afete a expressão das enzimas requeridas para o metabolismo desta pentose (KYM; RYU; SEO, 1999; OH et al., 2013).

2.3.3 Utilização de co-substratos na produção biotecnológica de xilitol

Primeiramente, é importante destacar que são poucos os relatos na literatura quanto à estratégia de uso de co-substratos na produção biotecnológica de xilitol, sendo que a maioria deles têm sido desenvolvidos empregando leveduras modificadas geneticamente, tanto por supressão da expressão da enzima XDH em cepas naturalmente assimiladoras de xilose (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006; AHMAD et al., 2012; AHMAD; SHIM; KIM, 2013; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014), quanto por expressão só da XR em *Saccharomyces*

cerevisiae (OH et al., 2013). Em ambos casos esta estratégia visou eliminar a dependência do processo no controle cuidadoso do fornecimento de oxigênio e favorecer a eficiência de bioconversão de xilose em xilitol. Devido à incapacidade das cepas recombinantes metabolizarem o xilitol formado, é necessário a adição de um co-substrato como fonte de carbono, energia e, particularmente, de cofator reduzido para XR. Quanto ao uso de co-substratos em estudos com cepas nativas, foram encontrados dois relatos na literatura (ARRUDA; FELIPE, 2009; TAMBURINI et al., 2010).

Entre os compostos que já foram avaliados como potenciais co-substratos na bioconversão de xilose em xilitol destaca-se o glicerol, para o qual já foi constatado seu efeito benéfico em baixas concentrações na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semidefinido (ARRUDA; FELIPE, 2009). Neste estudo foi evidenciado que a adição de glicerol ($0,7\text{gL}^{-1}$) em um meio contendo xilose (55gL^{-1}) resultou no aumento da eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol de $0,74\text{gg}^{-1}$ e $0,84\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para $0,78\text{gg}^{-1}$ e $1,13\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente (ARRUDA; FELIPE, 2009).

Em outras pesquisas foi evidenciado ser o glicerol um co-substrato mais adequado que a glicose (e inclusive que outros monossacarídeos, dissacarídeos, ácidos orgânicos e etanol) quando utilizado em fermentações em meio definido com cepas recombinantes de *Candida tropicalis* (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006), *Debaryomyces hansenii* (PAL et al., 2013) e *Kluyveromyces marxianus* (ZHANG et al., 2014). Nestes estudos foram atingidos valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol, respectivamente, de 100% e $3,32\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (KO; KIM, J.; KIM, J.H., 2006), 96% e $2,34\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (PAL et al., 2013), e 100% e $1,57\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (ZHANG et al., 2014).

Ainda em relação ao uso de glicerol como co-substrato, é importante destacar que a partir do trabalho de Ko, Kim, J. e Kim, J.H. (2006) com uma cepa recombinante de *C. tropicalis* sem atividade XDH, foram propostas alternativas para aumentar a eficiência de regeneração de NADPH. Primeiramente, Ahmad et al. (2012) propuseram a superexpressão das enzimas Glicose-6-Fosfato desidrogenase (G6PDH) e 6-Fosfogluconato desidrogenase (6-PGDH). Com esta estratégia, os autores conseguiram um aumento na produtividade volumétrica de xilitol de $1,04\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para $1,25\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, porém a taxa de consumo de glicerol não foi modificada (AHMAD et al., 2012). Por sua vez, no trabalho de Ahmad, Shim e

Kim (2013) foi proposta a interrupção da atividade da enzima glicerol quinase, primeira enzima envolvida na assimilação de glicerol, e a expressão de uma glicerol desidrogenase dependente de NADP^+ , com a finalidade de acelerar a regeneração deste cofator, que normalmente incluiria reações gliconeogênicas para formação de glicose e a fase oxidativa da PPP. Com esta estratégia foi possível aumentar a produtividade volumétrica de xilitol de $1,16 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ para $1,41 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, porém não se encontraram diferenças na assimilação de glicerol (AHMAD; SHIM; KIM, 2013).

Outro composto que já foi também sugerido como potencial co-substrato na bioconversão de xilose em xilitol é a maltose, neste caso em um estudo com uma cepa nativa de *C. tropicalis* em meio definido, no qual foi avaliado também o efeito de outros monossacarídeos (glucose, frutose, galactose) e dissacarídeos (lactose e sacarose) (TAMBURINI et al., 2010). Estes autores reportaram que o fornecimento de maltose em uma relação 1:5 de maltose:xilose incrementou o crescimento celular e a formação de xilitol em aproximadamente 30% em comparação com ausência de co-substratos, atingindo-se uma eficiência de bioconversão de 61% e produtividade volumétrica de xilitol de $0,58 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (TAMBURINI et al., 2010). Adicionalmente, estes autores destacaram como resultado importante que a assimilação de maltose não interferiu no consumo de xilose, o qual foi atribuído ao fato de que a maltose não concorreria pelo mesmo transportador da xilose, como ocorre com a glucose, uma vez que seria transportada por um sistema simporte com prótons e hidrolisada a nível intracelular.

Além da maltose, outro dissacarídeo que também foi empregado como co-substrato na produção biotecnológica de xilitol é a celobiose, neste caso com o emprego de uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante com expressão da enzima XR e em meio definido (OH et al., 2013). Neste estudo encontrou-se que a utilização de celobiose levou a um maior incremento na produtividade volumétrica de xilitol quando comparada ao uso de glucose, atingindo valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol de 100% e $1,5 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente (OH et al., 2013). É importante salientar que neste trabalho foi necessária também a inserção dos genes para expressão de um transportador de celodextrina e uma β -glicosidase intracelular, visando a assimilação simultânea de xilose e celobiose pela levedura, em razão à não concorrência por

transportadores, e que a celobiose fosse usada para regeneração do NADPH (OH et al., 2013).

2.3.4 Uso de compostos com capacidade permeabilizante da membrana celular na produção biotecnológica de xilitol

Além da utilização de compostos cuja atuação esteja relacionada ao metabolismo envolvido na bioconversão de xilose em xilitol, a exemplo de co-substratos, outra possibilidade é a utilização de compostos com capacidade permeabilizante da membrana celular que poderiam contribuir para a excreção do xilitol. Segundo Su et al. (2013), o acúmulo intracelular do xilitol, devido a sua menor taxa de excreção em relação à de sua formação, contribuiria para sua oxidação a xilulose e/ou poderia levar a inibição da atividade da enzima XR, prejudicando a eficiência deste bioprocessos. Embora ainda seja pouco conhecido o mecanismo exato da excreção de xilitol (SU et al., 2013), um sistema de difusão facilitada similar ao proposto para o glicerol e outros polióis já foi sugerido (KRALLISH et al., 1997; KARLGREN et al., 2005). De acordo com estes autores, este seria um sistema osmorregulador mediado por aquagliceroporinas, um subgrupo de aquaporinas que são proteínas integrais de membrana que formam poros de água.

Assim, estratégias que interferem na membrana celular podem contribuir para favorecer a excreção do xilitol, com consequente melhoria do bioprocessos. Neste contexto, o Dimetil-sulfóxido (DMSO), composto com comprovada atividade permeabilizante sobre a membrana celular, poderia exercer esta função uma vez que, segundo o estudo de simulação molecular desenvolvido por Gurtovenko e Amwar (2007), este teria capacidade para induzir a formação de poros transitórios de água na bicamada fosfolipídica que constitui a membrana celular quando empregado em concentração de 10 – 20 mol %. O DMSO já foi empregado em estudos de permeabilização de células de leveduras para processos de biocatálise (PASCUAL; HERRERA, 1981; DECLEIRE; DE CAT; VAN HUYNH, 1987) e de células vegetais para extração de produtos armazenados

intracelularmente (BRODELIUS; NILSSON, 1983; PARR; ROBINS; RHODES, 1984).

É importante destacar que, segundo o estudo desenvolvido por Gurtovenko e Amwar (2007), o DMSO em concentrações altas (maiores a 20 mol %) pode gerar perda da integridade da membrana e até destruição de sua estrutura bilipídica. Além disso, já foi indicado que o DMSO pode afetar o transporte de moléculas por causa da alteração ou perda de gradientes iônicos empregados pelos sistemas simporte ou antiporte, como poderia ser o caso do transporte de xilose que ocorre por um sistema simporte com prótons (SANTOS et al., 2003; GURTOVENKO; AMWAR, 2007; HANCOCKS, 2009). De maneira similar, pode afetar a regulação do pH intracelular, a atividade de enzimas de membrana, a resposta ao estresse osmótico, e inclusive a produção de energia (SANTOS et al., 2003; HANCOCKS, 2009; GURTOVENKO; AMWAR, 2007).

Ainda em relação ao DMSO, alguns estudos já demonstraram sua utilização como aceptor final de elétrons na respiração anaeróbia de algumas halobactérias e bactérias púrpuras fototróficas não sulfúricas, e indicaram que as enzimas envolvidas na sua redução são induzidas (KAPPLER; HUSTON; MCEWAN, 2002; MÜLLER; DASSARMA, 2005).

2.3.5 *Candida guilliermondii*

Candida guilliermondii é uma levedura asporógena pertencente à classe taxonômica Ascomycete, corresponde ao estado assexual ou anámorfo da levedura esporógena *Meyerozyma guilliermondii* (anteriormente *Pichia guilliermondii*), e se encontra amplamente distribuída no ambiente natural, bem como é parte da flora saprófita da pele e mucosas humanas (SIBIRNY; BORETSKY, 2009; KURTZMAN; SUZUKI, 2010; PAPON et al., 2013). Segundo Papon et al. (2013) esta levedura tem sido amplamente estudada durante mais de 40 anos devido a sua importância biotecnológica, clínica e potencial em controle biológico. De fato Sibirny e Boretsky (2009) e Papon et al. (2013) indicaram que é considerada o modelo de estudo do grupo denominado “leveduras flavinogênicas”, as quais são capazes de superproduzir riboflavina na ausência de

ferro no meio de cultivo, a qual é uma vitamina amplamente usada em nutrição humana e como suplemento para alimentação animal (KURTZMAN; SUSUKI, 2010).

Quanto a sua importância clínica, *C. guilliermondii* é considerada patógeno oportunista, isto é capaz de causar infecções, denominadas candidíases, em pacientes imunossuprimidos ou infecções nosocomiais, e também patógeno emergente com propensão a desenvolver resistência a agentes antifúngicos (PAPON et al., 2013). No entanto, é considerado que *C. guilliermondii* é raramente observada como agente patogênico, sendo causadora de uma pequena porcentagem entre todas as candidemias (SIBIRNY; BORETSKY, 2009; KURTZMAN; SUZUKI, 2010; PAPON et al., 2013).

Em relação a seu potencial biotecnológico, *C. guilliermondii* tem sido estudada por sua capacidade para produção de riboflavina, para usar hidrocarbonetos como única fonte de carbono e energia para obtenção de proteína unicelular, e para produção de enzimas industrialmente importantes, como inulinase, α -amilase, α -ramnosidase, nitrilase e fitase (SIBIRNY; BORETSKY, 2009; PAPON et al., 2013). Além disto e relacionado com o presente trabalho, *C. guilliermondii* tem sido amplamente destacada como uma das leveduras mais eficientes na bioconversão de xilose em xilitol, com amplo potencial para ser usada como agente de fermentação neste bioprocesso a partir de biomassas lignocelulósicas (SIBIRNY; BORETSKY, 2009; PAPON et al., 2013).

A esse respeito, é importante destacar que no estudo realizado por Guo et al. (2006), que tinha como finalidade identificar cepas de leveduras naturalmente assimiladoras de xilose com potencial para produção de xilitol, foram selecionadas uma cepa de *C. guilliermondii* e uma de *C. maltosa* como as de maior potencial para aplicação industrial. Estes mesmos autores indicaram que, enquanto *C. maltosa* apresentou maior taxa de consumo de xilose, *C. guilliermondii* mostrou maior eficiência de bioconversão e menor formação de subprodutos (GUO et al., 2006). De maneira similar, Barbosa et al. (1988) selecionaram a cepa de *C. guilliermondii* FTI 20037 entre 44 cepas de 5 gêneros diferentes, por sua capacidade natural de assimilação de xilose e produção eficaz de xilitol.

Quanto à morfologia macroscópica de *C. guilliermondii*, segundo Kurtzman e Suzuki (2010), as colônias em ágar Extrato de malte 5%, após 3 dias a 25°C, são brancas, pequenas e entre lisas e rugosas. Em relação a sua morfologia microscópica nas mesmas condições de cultivo, são células esferoidais ou elipsoidais, cujo tamanho é aproximadamente de 1.5-4.8 x 2.0-15 µm, com gemulação multilateral, encontrando-se células individuais, pares, cadeias curtas ou inclusive formação de pseudo-hifas com septos simples (KURTZMAN; SUZUKI, 2010). Esta levedura tem capacidade de usar como fonte de carbono e energia glicose, galactose, xilose, arabinose, sacarose, maltose, celobiose, glicerol, etanol, entre outros (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

2.3.6 Estado da arte sobre a produção biotecnológica de xilitol

Com a finalidade de estabelecer as tendências atuais na pesquisa em produção biotecnológica de xilitol, a seguir são apresentadas os principais destaques de estudos publicados entre o ano 2013 e 2015. É importante salientar que um amplo número de pesquisas tem sido focadas à recombinação genética de micro-organismos, visando a melhoria da capacidade de transporte de xilose ao interior da célula em presença de glicose, o incremento na eficiência enzimática da xilose reductase (XR) e a interrupção da atividade da xilitol desidrogenase (XDH), e inclusive o uso de substratos mais complexos que a xilose, como a xilana.

A exemplo desses estudos e além dos apresentados previamente (AHMAD; SHIM; KIM, 2013; OH et al., 2013; PAL et al., 2013; ZHANG et al., 2014), Jeon et al. (2013) avaliaram a expressão heteróloga de um transportador de alta afinidade de xilose de *Arabidopsis thaliana* em uma cepa recombinante de *C. tropicalis*, modificada previamente pela inserção da XR de *Neurospora crassa* e interrupção da XDH nativa. Estes autores conseguiram uma eficiência de bioconversão de 100% e produtividade volumétrica de xilitol de 1,57 gL⁻¹h⁻¹, porém com a necessidade de adição de glicose por pulsos para manter o fornecimento de NADPH (JEON et al., 2013). Por sua vez, Li et al. (2013) propuseram a produção de xilitol a partir de xilana usando glicose como co-

substrato, mediante expressão de xilanase, β -xilosidase e XR em *S. cerevisiae* e conseguiram um fator de conversão de 0,71 g xilitol por 1g xilana.

O modo de operação do processo fermentativo também tem sido estudado como via para incrementar a eficiência deste bioprocesso, principalmente estratégias de batelada alimentada para manter concentrações constantes de xilose e mínimas de compostos tóxicos. Por exemplo, Pérez-Bibbins et al. (2014) usaram células de *D. hansenii* imobilizadas em alginato de cálcio em um biorreator air-lift operado em batelada alimentada para manter a concentração de xilose em 60 gL^{-1} , conseguindo uma eficiência de bioconversão de 78% e produtividade volumétrica de xilitol de $0,43 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Por sua vez, Ping et al. (2013) usaram a batelada alimentada para manter concentrações mínimas de compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho não destoxificado, atingindo uma eficiência de bioconversão de 76% e produtividade volumétrica de xilitol de $0,46 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ com uma cepa nativa de *C. tropicalis*.

Ainda em relação ao modo de operação deste bioprocesso, Sarrouh e Silva (2013) desenvolveram um sistema de fermentação em batelada repetida com células imobilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037 em alginato de cálcio, em um biorreator de leito fluidizado e com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Após 6 bateladas, estes autores verificaram uma eficiência de bioconversão de 76% e produtividade volumétrica de xilitol de $0,42\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (SARROUH; SILVA, 2013). O modo de operação do bioprocesso foi também tema de estudo por Castañón et al. (2015), mas neste caso usando a estratégia de co-cultivo de *S. cerevisiae* e *C. tropicalis* para co-produção de etanol e xilitol em um meio simulando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Estes autores encontraram que a melhor condição de co-cultivo foi o inóculo de *S. cerevisiae* desde o início da fermentação e de *C. tropicalis* após 24h (CASTAÑÓN et al., 2015). Usando processo contínuo foram obtidos os máximos valores de produtividade volumétrica de etanol e xilitol, porém não com a mesma taxa de diluição, sendo que para xilitol a máxima produtividade foi de $0,26\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ com uma taxa de diluição de $0,26\text{h}^{-1}$ (CASTAÑÓN et al., 2015).

Sirisansaneeyakul et al. (2014) propuseram o estudo da influência de benzoato de sódio em função da taxa de aeração na produção de xilitol por *Candida mogii* em meio definido como alternativa para incrementar a eficiência deste bioprocesso. Esta estratégia foi fundamentada em função de que o ácido

benzoico pode tanto favorecer o fluxo de carbono à via PPP, aumentando a disponibilidade de NADPH, quanto incrementar a demanda de energia, acelerando a assimilação de xilose (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2014). Estes autores encontraram que nos experimentos com altas taxas de aeração a adição de benzoato favoreceu a eficiência de bioconversão (55%) e produtividade volumétrica de xilitol ($2,5 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), em comparação com a condição ausente de benzoato (41,44% e $1,4 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2014).

Por outro lado, Cortez e Roberto (2014) avaliaram a biotransformação de xilose em xilitol, consistente em um sistema de enzimas ativas e estáveis imobilizadas dentro da célula de *C. guilliermondii* FTI 20037 permeabilizada com o surfactante Triton X-100. Em condições otimizadas de adição de Glicose-6-Fosfato e NADP^+ como co-substrato e cofator, respectivamente, foi conseguido uma eficiência de bioconversão de 71% e uma produtividade volumétrica de xilitol de $1,90\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, em um processo de 20h em meio semidefinido e em frascos agitados (CORTEZ; ROBERTO, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia para o aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar na produção biotecnológica de xilitol, visando a valorização e incorporação desta biomassa em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a composição química estrutural da palha de cana-de-açúcar *in natura*.
- Determinar a composição química, em função dos teores dos principais açúcares constituintes e compostos tóxicos, do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida diluída e após as etapas de preparação para ser utilizado como meio de fermentação.
- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* FTI 20037 em função da necessidade de suplementação nutricional e a disponibilidade inicial de oxigênio.
- Estudar o efeito dos co-substratos maltose, sacarose, celobiose e glicerol sobre a bioconversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 ao serem suplementados individualmente e em diferentes concentrações no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar.
- Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de Dimetil-sulfoxido ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana-de-açúcar sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação VI do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP). Na Figura 5 é apresentada uma representação esquemática das fases da presente pesquisa.

Figura 5 – Representação esquemática das fases da presente pesquisa.

Fonte: Arquivo pessoal.

4.1 Matéria-prima

Para os experimentos de caracterização química estrutural da palha de cana-de-açúcar e avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico em função da suplementação nutricional deste e a disponibilidade inicial de oxigênio foi empregada palha de cana cedida pela Usina Santa Adélia, localizada em Jaboticabal/SP – Brasil no final da safra 2011/12. Esta biomassa correspondeu a uma mistura de pontas e folhas verdes e secas, a qual foi estocada nas dependências do Departamento de Biotecnologia da EEL/USP.

Para os experimentos referentes a avaliação do efeito de co-substratos e permeabilizante de membrana celular na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 foi utilizado palha de cana proveniente da Usina Pederneiras, localizada em Tietê/SP – Brasil durante a safra 2014/15, correspondente também a uma mistura de pontas e folhas verdes e secas, e estocada como descrito anteriormente.

Destaca-se que ambos lotes de palha de cana foram submetidos aos mesmos procedimentos para obtenção e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, com exceção da concentração, conforme apresentado posteriormente.

4.2. Caracterização química estrutural da palha de cana-de-açúcar *in natura*.

O teor de umidade da palha de cana *in natura* foi determinado em balança de peso seco rápido, com câmara de UV a 105°C por 30 min, em triplicata. A caracterização da biomassa *in natura*, previamente moída, quanto a seus polímeros estruturais celulose, hemicelulose e lignina, e conteúdo de cinzas, foi feita de acordo com a metodologia fundamentada na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos validada por Gouveia et al. (2009). Na Figura 6 são apresentadas imagens da palha de cana *in natura* e moída.

Figura 6 – Imagens da palha de cana *in natura* (A) e moída (B).

Fonte: Arquivo pessoal.

Em béqueres de 100mL foram colocados 2g da biomassa e adicionado 10mL de H₂SO₄ 72% (m/m) (em triplicata), a mistura foi mantida sob agitação por 7 min a 45°C. Após este tempo, a reação foi interrompida mediante adição de 50mL de água destilada, se transferiu os conteúdos para frascos Erlenmeyer de 500mL e foram agregados mais 225mL de água destilada. Estes frascos foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121°C, 1 atm por 30 min. Após resfriamento, a fração líquida foi separada da sólida por filtração em papel de filtro qualitativo e transferida a balões volumétricos de 500 mL tendo o volume completado com água destilada. A solução líquida obtida foi utilizada para determinação da concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina solúvel. As porcentagens de celulose e hemicelulose foram determinadas segundo as Equações 1 e 2, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{(C_{Gli} \times 0,5 \times F_{Gli}) + (C_{HMF} \times 0,5 \times F_{HMF})}{m_s} \quad (1)$$

Onde:

C_{Gli} e C_{HMF} correspondem às concentrações (gL⁻¹) de glicose e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), respectivamente, enquanto que o valor 0,5 corresponde ao fator de diluição da fração líquida.

F_{Gli} e F_{HMF} correspondem aos fatores de conversão de glicose (0,90) e (1,29), respectivamente. respectivamente, enquanto que m_s corresponde à massa da amostra seca (g).

% *Hemicelulose*

$$= \frac{(C_{Xil} \times 0,5 \times F_{Xil}) + (C_{Ara} \times 0,5 \times F_{Ara}) + (C_{AA} \times 0,5 \times F_{AA}) + (C_{Fur} \times 0,5 \times F_{Fur})}{m_s} \quad (2)$$

Onde:

C_{Xil} , C_{Ara} , C_{AA} e C_{Fur} correspondem às concentrações ($g L^{-1}$) de xilose, arabinose, ácido acético e furfural, respectivamente, enquanto que o valor 0,5 corresponde ao fator de diluição da fração líquida.

F_{Xil} , F_{Ara} , F_{AA} e F_{Fur} correspondem aos fatores de conversão de xilose (0,88), arabinose (0,88), ácido acético (0,72) e furfural (1,37), respectivamente, enquanto que m_s corresponde à massa da amostra seca (g).

Para determinação da lignina solúvel, 5,0mL de fração líquida obtida foram diluídos em balão volumétrico de 100mL e alcalinizada com solução de NaOH 6M até atingirem pH 12,0. A seguir, foi medida a absorbância da solução a 280nm em espectrofotômetro de UV. A lignina solúvel foi calculada mediante as Equações 3 e 4.

$$C_{Lig} = (4,187 \times 10^{-2} \times (A_{t280} - A_{pd280})) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (3)$$

$$A_{pd280} = (C_{Fur} \times \epsilon_{Fur}) + (C_{HMF} \times \epsilon_{HMF}) \quad (4)$$

Onde:

C_{Lig} corresponde à concentração de lignina solúvel ($g L^{-1}$).

A_{t280} corresponde à absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação.

A_{pd280} corresponde à absorbância em 280nm dos produtos de degradação dos açúcares (furfural e 5-HMF), calculado com a Equação 4, na qual C_{Fur} e C_{HMF} corresponde à concentração destes ($g L^{-1}$), respectivamente, determinada por HPLC, e ϵ_{Fur} e ϵ_{HMF} são suas absorvidades ($146,85$ e $114,00 L g^{-1} cm^{-1}$, respectivamente).

Para determinação da lignina insolúvel a fração sólida retida no papel filtro foi lavada com 1500mL de água destilada e transferida a pesa-filtros para secagem a 110°C até massa constante. Este material, juntamente com o papel filtro, foi transferido para um cadinho de porcelana, previamente tarado, e calcinado por 1h a 400°C e mais 2h a 800°C, para determinação da massa de cinzas da lignina. A lignina insolúvel foi calculada segundo Equação 5.

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{M_L - M_C}{m_s} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

M_L , M_C e m_s correspondem à massa (g) de lignina insolúvel seca, de cinzas da lignina e da amostra seca, respectivamente.

Por último, para determinação de cinzas totais da palha de cana *in natura*, 1g de biomassa foi colocado em um cadinho de porcelana, previamente tarado, e calcinado por 2h a 800°C. O teor de cinzas foi calculado segundo Equação 6.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_{CT}}{m_s} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

M_{CT} e m_s correspondem à massa (g) de cinzas totais (diferença entre a massa da amostra antes e após calcinação) e da amostra seca, respectivamente.

4.3. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

4.3.1 Hidrólise ácida diluída

O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por hidrólise ácida diluída da palha de cana, utilizando-se as seguintes condições: 20 minutos, 121°C, 1% (m/v) de

H₂SO₄ e relação matéria seca:solução ácida 1:10 (m/v). O processo foi realizado em reator de aço inoxidável de capacidade total de 40L. A fração líquida, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana foi separada do resíduo sólido (celulignina) por filtração, e foi mantida em câmara fria (4°C) até sua posterior caracterização e utilização. Já a celulignina foi lavada com água em abundância, depois seca em estufa a 60°C e armazenada.

4.3.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico de palha de cana foi concentrado à vácuo a 70°C, segundo a metodologia estabelecida por Rodrigues et al. (2003). Para o hidrolisado hemicelulósico obtido da palha de cana cedida pela Usina Santa Adélia (utilizado na avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado a disponibilidade inicial de oxigênio) foi empregado um fator de concentração correspondente a 3 (FC=3), isto é 3 vezes seu teor inicial de açúcares. Para o hidrolisado hemicelulósico obtido da palha de cana proveniente da Usina Pederneiras (empregado na avaliação do efeito de co-substratos e do permeabilizante de membrana celular) foi utilizado um fator de concentração de 4 (FC=4).

Em seguida, o hidrolisado hemicelulósico foi submetido ao processo de destoxificação estabelecido por Marton et al. (2006), baseado em ajuste de pH combinado com adsorção em carvão ativado. Para tanto, primeiramente o pH do hidrolisado foi ajustado a 7,0 com CaO (grau comercial) e na sequência, a 2,5 com H₃PO₄. Posteriormente, foi adicionado carvão ativado (pó refinado) 1,0% (m/v) ao hidrolisado, e mantida a mistura sob agitação de 100rpm por 30 min a 60°C. Todos os precipitados formados durante o processo foram removidos mediante filtração à vácuo. O hidrolisado hemicelulósico concentrado e destoxificado foi autoclavado a 115°C por 15 min, para ser usado como meio de fermentação. Os hidrolisados hemicelulósicos original, concentrado e destoxificado foram caracterizados quanto ao pH, concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos totais.

Na Figura 7 são apresentadas imagens do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana obtido após os procedimentos de hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo e destoxificação.

Figura 7 – Hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após hidrólise ácida diluída (A), concentração à vácuo (B) e destoxificação (C).

Fonte: Arquivo pessoal.

4.4. Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana utilizando em função da necessidade de suplementação nutricional e a disponibilidade inicial de oxigênio.

4.4.1 Micro-organismo e preparo de inóculo

Foi utilizada a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988) para produção de xilitol, mantida a 4°C em ágar extrato de malte. O meio semidefinido usado para o preparo do inóculo teve a seguinte composição (gL⁻¹): xilose (30,0), extrato de farelo de arroz (20,0), (NH₄)₂SO₄ (2,0) e CaCl₂·2H₂O (0,1) (ARRUDA et al., 2011). No caso particular do extrato de farelo de arroz, foi preparada uma suspensão de 200g de farelo em 1L de água destilada, a qual foi autoclavado por 15 min a 0,5atm. Após o resfriamento desta suspensão, esta foi centrifugada condições assépticas a (2000 x g, 15 min) e a

fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e armazenada a 4°C até a sua utilização.

Para o inóculo foram empregados frascos Erlenmeyer de 125mL com 50mL de meio de cultivo, incubados em shaker rotatório sob agitação de 200 rpm, a 30°C por 24h. Subsequentemente, as células foram recuperadas por centrifugação (2000 x g; 20 min), lavadas duas vezes com água destilada estéril e utilizadas para preparar uma suspensão em água destilada estéril, a qual foi usada como inóculo para atingir uma concentração celular inicial de 1gL^{-1} (FELIPE et al., 1997a), que corresponde a aproximadamente 10^7 células/mL.

4.4.2 Meios e condições de fermentação

Foram avaliadas 3 condições de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, cada uma em duas condições de disponibilidade inicial de oxigênio correspondentes a diferentes volumes de meio de fermentação, como se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1 - Condições avaliadas de suplementação nutricional e disponibilidade inicial de oxigênio.

Suplementação nutricional	H1	Sem suplementação
	H2	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($2,0\text{gL}^{-1}$)
	H3	Extrato de farelo de arroz (20gL^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($2,0\text{gL}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1\text{gL}^{-1}$).
Disponibilidade inicial de oxigênio	Maior	25mL de meio de fermentação
	Menor	50mL de meio de fermentação

Foi empregado como meio de fermentação o hidrolisado hemicelulósico concentrado e destoxificado com a seguinte composição média (gL^{-1}): xilose

(46,04), glicose (9,60), arabinose (9,07), ácido acético (3,15), 5-HMF (0,48), furfural (0,01) e compostos fenólicos totais (2,43). Fermentações em batelada foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125mL, contendo o volume de meio de fermentação estabelecido na Tabela 1. Para todas as condições avaliadas, o pH inicial foi ajustado para 5,5 com micro pérolas de NaOH e não foi controlado durante os experimentos. Os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm, 30°C por 48h. Amostras correspondentes ao volume de cada frasco Erlenmeyer foram retiradas nos tempos inicial e 8, 24 e 48h. Análises de concentração e viabilidade celular foram realizadas imediatamente, em seguida as amostras foram centrifugadas (2000 x g; 15min) e foram separados os sobrenadantes, os quais foram usados para a determinação de pH e concentrações de xilose, arabinose, glicose, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético.

4.5. Estudo do efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

As condições de preparo de inóculo e de fermentação empregadas foram as descritas no item 4.4.1. Foram avaliados individualmente os seguintes co-substratos nas concentrações indicadas, definidas a partir de dados da literatura (ARRUDA; FELIPE, 2009; TAMBURNI et al., 2010):

- **Maltose, Sacarose e Celobiose (gL^{-1}):** 5,0; 10,0 e 15,0.
- **Glicerol (gL^{-1}):** 0,7; 1,0 e 1,5.

Como meio de fermentação foi empregado o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana concentrado e destoxificado com a seguinte composição média (gL^{-1}): xilose (57,50), glicose (7,05), arabinose (9,54), ácido acético (2,38), 5-HMF (0,45), furfural (0,01) e compostos fenólicos totais (2,19). O hidrolisado hemicelulósico foi suplementado com extrato de farelo de arroz (20,0 gL^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,0 gL^{-1}) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 gL^{-1}). Experimento controle foi realizado sem adição dos co-substratos avaliados.

Foram realizadas fermentações em batelada em triplicata em frascos Erlenmeyer de 125mL contendo 50mL de meio de fermentação. Para todas as condições avaliadas, o pH inicial foi ajustado para 5,5 com NaOH e não foi controlado durante os experimentos. Os frascos foram incubados sob agitação de 200 rpm, 30°C por 72h. Amostras correspondentes ao volume de cada frasco Erlenmeyer foram retiradas nos tempos inicial e 8, 24, 48 e 72h. As análises das amostras foram as mesmas descritas no item 4.4.2.

4.6. Estudo do efeito da adição do permeabilizante de membrana celular Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

As condições de preparo de inóculo e de fermentação empregadas foram as descritas no item 4.4.1. Foi avaliado o DMSO nas seguintes concentrações (%v/v): 2,5; 5,0 e 10,0, as quais foram definidas a partir dos dados da literatura (GURTOVENKO; AMWAR, 2007). Como meio de fermentação foi empregado o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana concentrado e destoxificado, com a composição média e suplementação nutricional indicadas no item 4.6. Fermentações em batelada em triplicata foram realizadas segundo relatado no item 4.6.

4.7. Métodos analíticos

4.7.1 Concentração e viabilidade celular

A concentração celular foi quantificada mediante turbidimetria correlacionando a concentração em massa seca das células com a absorbância a 600nm a partir de uma curva padrão. A viabilidade celular foi determinada

mediante visualização em microscópio de lâminas em fresco com azul de metileno 0,01% (m/v), enquanto que para verificar a pureza do cultivo foram utilizadas lâminas fixadas e coradas com fucsina.

4.7.2 Concentração de açúcares, xilitol, etanol, glicerol e ácido acético.

As concentrações de açúcares (xilose, glicose, arabinose), glicerol, xilitol, etanol, ácido acético foram determinadas mediante cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (ARRUDA et al., 2011). Foi usado um cromatógrafo Shimadzu LC-10AD (Kyoto, Japão), com um detector de índice de refração e coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87H, mantida a 45°C, com H₂SO₄ 0,01 N como eluente, e fluxo de 0,6mL/min. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (Millipore).

As concentrações dos dissacarídeos maltose, sacarose e celobiose foram determinadas também por HPLC, usando o mesmo cromatógrafo com detector de índice de refração, porém, com uma coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87C, mantida a 60°C, com água desionizada como eluente, e fluxo de 0,4mL/min. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (Millipore). Em todos os casos, as concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.7.3 Concentração de furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foram quantificadas por HPLC empregando um equipamento Waters, detector de luz ultravioleta e uma coluna Waters Spherisorb C18, a 25°C, com acetonitrila:água (1:9) e ácido acético 1% como eluente, e fluxo de 0,8mL min⁻¹. As amostras foram diluídas com água desionizada e filtradas em membranas com poros de 0,45µm (Millipore). Em

todos os casos, as concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.7.4 Concentrações de compostos fenólicos totais

Alíquotas de 5,0mL das amostras foram diluídas e seus pH ajustados para 12,0 com NaOH 6N. A concentração de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria a 280nm, conforme descrito para quantificação de lignina solúvel no item 4.2.

4.7.5 Determinação de parâmetros fermentativos

a. Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s_{exp}}$)

O fator de conversão de xilose em xilitol experimental, expressado em gg^{-1} , correspondeu ao coeficiente angular na Equação 7, obtida do gráfico da concentração de Xilitol (ΔP) em função da concentração de Xilose (ΔS).

$$\Delta P = Y_{p/s_{exp}} \times (-\Delta S) + b \quad (7)$$

b. Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (η):

A eficiência de fermentação corresponde à relação entre o fator de conversão de xilose em xilitol calculado a partir dos resultados experimentais e aquele definido como teórico, que para a bioconversão de xilose a xilitol corresponde a $0,917 \text{ gg}^{-1}$, segundo Barbosa et al. (1998). Foi calculada com a Equação 8 e expressada em %.

$$\eta = \frac{Y_{p/s_{exp}}}{Y_{p/s_{teo}}} \times 100 \quad (8)$$

Onde:

$Y_{p/s_{exp}}$ e $Y_{p/s_{teo}}$ correspondem aos fatores de conversão de xilose em xilitol experimental e teórico (gg^{-1}), respectivamente.

c. Produtividade volumétrica de xilitol (Q_p):

A produtividade volumétrica de xilitol relaciona a concentração de xilitol produzida em função do tempo, expressada em $gL^{-1}h^{-1}$. Correspondeu ao coeficiente angular na Equação 9, obtida do gráfico da concentração de xilitol (ΔP) em função do tempo (Δt).

$$\Delta P = Q_p \times (\Delta t) + b \quad (9)$$

d. Velocidade volumétrica de consumo de xilose (r_s).

A velocidade volumétrica de crescimento expressa a taxa de consumo de xilose em função do tempo, expressada em $gL^{-1}h^{-1}$. Correspondeu ao coeficiente angular na Equação 10, obtida do gráfico da concentração de xilose (ΔS) em função do tempo (Δt).

$$\Delta S = -r_s \times (\Delta t) + b \quad (10)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química estrutural da palha de cana-de-açúcar *in natura*.

A composição química estrutural da palha de cana-de-açúcar, em termos do teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, determinada no presente trabalho é apresentada na Tabela 2. Nesta tabela são apresentados também valores reportados por outros estudos para palha de cana e para outras biomassas lignocelulósicas.

Tabela 2 - Composição química estrutural da palha de cana e de outras biomassas lignocelulósicas.

Matéria-Prima	Componente (% m/m)				Referências
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	
Palha de cana	31,7	27,0	31,1	1,5	Presente trabalho
Palha de cana	33,8	27,4	21,3	6,2	Szczerbowski et al. (2014)
Palha de cana (Folhas verdes)	39,8	28,6	22,5	2,4	Oliveira et al. (2013)
Palha de cana (Folhas verdes)	40,84	30,79	25,80	2,56	Moutta et al. (2012)
Palha de cana	33,6	28,9	31,8	5,7	Silva et al. (2010)
Bagaço de cana	43,1	28,6	20,8	2,9	Arruda (2011)
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussatto e Roberto (2002)
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1	7,0	Canilha (2006)
Cascas de aveia	29,3	28,4	22,2	4,5	Tamanini et al. (2004)

Constata-se na Tabela 2 que o valor determinado no presente estudo para a fração hemicelulósica da palha de cana (27,0%) foi similar ao encontrado por outros autores para a mesma biomassa. A maior diferença entre o conteúdo de hemicelulose aqui obtido e os relatados por outros autores foi com o valor reportado por Moutta et al. (2012) (30,79%), o qual foi 14,04% maior que no presente estudo. Destaca-se que estes autores empregaram maioritariamente folhas verdes no seu estudo, enquanto que no presente trabalho foi empregada uma mistura de pontas, folhas verdes e secas. Verifica-se ainda na Tabela 2 que o conteúdo de hemicelulose na palha de cana no presente estudo foi similar ao reportado para outras biomassas lignocelulósicas que já foram avaliadas para a produção biotecnológica de xilitol, o qual sugere que a palha de cana pode ser uma matéria-prima adequada para este bioprocessos.

Quanto ao teor de celulose, o valor determinado no presente estudo (31,7%) foi menor ao reportado por outros estudos para palha de cana (Tabela 2). Particularmente, o valor aqui obtido foi aproximadamente 27% menor que o reportado por estudos nos quais foram empregados maioritariamente folhas verdes (MOUTTA et al., 2012; OLIVEIRA et al, 2013). De maneira similar, verifica-se na Tabela 2 que o conteúdo de celulose da palha de cana foi inferior ao determinado para outras biomassas lignocelulósicas, com exceção da casca de aveia. As maiores diferenças foram observadas quanto ao bagaço de cana e palha de arroz, cujos teores de celulose (43,1% e 43,5%, respectivamente) foram aproximadamente 35% maiores que o determinado para palha de cana no presente estudo (Tabela 2). Em relação ao teor de lignina, constata-se nesta tabela que o valor obtido no presente trabalho (31,1%) foi maior ao determinado em outros estudos para palha de cana, sendo apenas similar com o reportado por Silva et al. (2010) (31,8%), e também superior ao reportado para outras biomassas lignocelulósicas.

Por último, constata-se na Tabela 2 que o conteúdo de cinzas determinado para a palha de cana no presente trabalho (1,5%) foi similar aos reportados em outros estudos para esta mesma biomassa, com exceção do encontrado por Szczerbowski et al. (2014) (6,2%), o qual foi 313,3% maior que o obtido no presente trabalho. Quanto ao conteúdo de cinzas em outras biomassas lignocelulósicas, verifica-se uma ampla variação entre os valores reportados, porém destaca-se que o valor aqui determinado foi similar ao reportado para

bagaço de cana (2,9%) por Arruda (2011). A diferença no conteúdo de cinzas entre a palha de cana aqui caracterizada com os valores reportados em outros estudos para a mesma e outras biomassas pode estar associado não só às características de cada material, similar ao caso dos teores de celulose, hemicelulose e lignina (SAKA, 2001), mas também às propriedades do solo, uso de fertilizantes, metodologias de colheita, lavagem e/ou armazenamento para cada caso (BAEZA; FREER, 2001; PIPPO et al., 2011).

5.2 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Após a caracterização química estrutural da palha de cana, foi realizado o processo de hidrólise ácida diluída com a finalidade de solubilizar os monossacarídeos que compõem a fração hemicelulósica desta biomassa. O hidrolisado hemicelulósico obtido foi submetido a concentração à vácuo, empregando metodologia estabelecida por Rodrigues et al. (2003), seguido por destoxificação, usando metodologia definida por Marton et al. (2006), com a finalidade de aumentar a concentração de açúcares, xilose principalmente, e reduzir o teor de compostos tóxicos, respectivamente. Na Tabela 3 é apresentada a composição química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após cada uma das três etapas mencionadas.

Tabela 3 - Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após hidrólise ácida diluída, concentração à vácuo (FC=3) e destoxificação.

Etapa	Componente (gL ⁻¹)						
	Gli.	Xil.	Ara.	Á. A.	Fur.	5-HMF	CFT
Hidrólise ácida diluída	3,70	18,6	3,90	2,23	0,18	0,40	3,00
Concentração à vácuo	11,73	53,89	11,11	3,75	0,05	1,00	5,03
Destoxificação	9,75	50,6	9,6	2,87	0,02	0,59	2,33

Gli.: Glicose; **Xil.:** Xilose; **Ara.:** Arabinose; **Á. A.:** Ácido acético; **Fur.:** Furfural; **5-HMF:** 5-hidroximetilfurfural; **CFT:** Compostos fenólicos totais.

Constata-se na Tabela 3 que a xilose foi encontrada como o principal monossacarídeo no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana após a hidrólise ácida diluída (denominado original), uma vez que esta pentose representou 71% do conteúdo de açúcar, enquanto que glicose e arabinose corresponderam a 14,12% e 14,88%, respectivamente. A este respeito, Szczerbowski et al. (2014) relataram que a xilose representava 75% do teor de hemicelulose da palha de cana, enquanto que Moutta et al. (2012) encontraram que a xilose correspondia a 86,27% da fração hemicelulósica desta biomassa (maioritariamente folhas verdes), fração que foi caracterizada como um arabinoxilano contendo monômeros de arabinose após cada 6 unidades de xilose. A alta proporção de xilose em relação aos outros açúcares no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana reforça o potencial desta biomassa como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol.

Destaca-se que a relação glicose:xilose no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana original foi aproximadamente 1:5 (Tabela 3), a qual corresponde à encontrada por Silva e Felipe (2006) como ótima para produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. A relação arabinose:xilose no hidrolisado hemicelulósico original foi também aproximadamente 1:5 (Tabela 3). No caso desta pentose, sua possível influência na bioconversão de xilose em xilitol é ainda objeto de estudo (SU et al., 2013).

Além da presença dos açúcares mencionados no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana original, verifica-se na Tabela 3 a de compostos tóxicos ao micro-organismos formados durante a hidrólise ácida diluída. Estes compostos são: ácido acético, liberado dos grupos acetila que constituem ramificações na hemicelulose; furanos, como furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), produtos da desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente; compostos fenólicos totais (CFT), correspondentes a uma mistura de compostos derivados da degradação parcial da lignina (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; ALMEIDA et al., 2009). É importante salientar que metais e minerais provenientes do material vegetal, do solo ou dos equipamentos de hidrólise podem ser também inibitórios para a produção de xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1997; CONVERTI; PEREGO; DOMÍNGUEZ, 1999), os quais não foram determinados no presente estudo.

Em relação às concentrações desses compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana original (Tabela 3), destaca-se que as de ácido acético, furfural e 5-HMF foram menores às reportadas como inibitórias para o consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii* em meio semidefinido (SÁNCHEZ; BAUTISTA, 1988; FELIPE et al., 1995; CONVERTI et al., 2000; LIMA et al., 2004; KELLY et al., 2008) e em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (LIMA et al., 2004) e de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005). No caso do efeito inibitório de compostos fenólicos na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, estudos com diferentes cepas desta levedura e em meios definidos já relataram diferentes efeitos destes compostos. Cortez e Roberto (2010) indicaram que, independente do pH do meio, a mistura de vanilina (2gL^{-1}) e siringaldeído (2gL^{-1}) causou completa inibição do crescimento celular e da produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, apresentando o siringaldeído maior poder inibitório quando avaliados individualmente. Por outro lado, os resultados obtidos por Kelly et al. (2008) demonstraram que a vanilina (1gL^{-1}) tinha maior efeito inibitório que o siringaldeído (1gL^{-1}) e a mistura dos dois na mesma concentração.

Como resultado do processo de concentração à vácuo, verifica-se na Tabela 3 que as concentrações de glicose, xilose e arabinose no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana aumentaram aproximadamente 3 vezes, ou seja proporcional ao fator de concentração empregado ($\text{FC}=3$). No caso dos compostos tóxicos, o incremento de sua concentração não foi proporcional ao fator de concentração utilizado, uma vez que os teores de ácido acético e compostos fenólicos totais aumentaram 1,68 vezes e o de 5-HMF 2,5 vezes, enquanto que o de furfural foi reduzido 3,6 vezes (Tabela 3). A diferença no incremento nas concentrações de ácido acético e 5-HMF pode estar relacionada ao fato que o primeiro é um composto volátil na sua forma não dissociada, enquanto que o segundo é não volátil (RODRIGUES et al., 2001). Estes autores relataram também a redução da concentração de furfural, que é volátil, com o emprego de um procedimento de concentração à vácuo similar ao utilizado no presente estudo, porém para hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Após a realização do processo de destoxificação, constata-se na Tabela 3 que as concentrações dos compostos tóxicos foram reduzidas em diferentes proporções em relação ao hidrolisado hemicelulósico concentrado: 23,47% na de

ácido acético, 60% na de furfural, 41% na de 5-HMF e 53,68% na de compostos fenólicos totais. Entretanto, as concentrações de ácido acético e 5-HMF no hidrolisado hemicelulósico destoxificado foram maiores que no original (28,70% e 47,50%, respectivamente) (Tabela 3). A este respeito, destaca-se que o teor do ácido acético ($2,87 \text{ gL}^{-1}$) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana destoxificado se manteve inferior ao reportado como inibitório ($5,0 \text{ gL}^{-1}$) em meio semidefinido e hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (LIMA et al., 2004; FELIPE et al., 1995). A concentração de 5-HMF ($0,57 \text{ gL}^{-1}$) se manteve também inferior à indicada como inibitória (2 gL^{-1}) para *C. guilliermondii* em meio definido (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988).

O fato das concentrações de ácido acético e 5-HMF serem maiores no hidrolisado hemicelulósico de palha destoxificado em relação ao original pode estar associado ao aumento do teor destes durante a concentração à vácuo e à menor remoção durante a destoxificação, em comparação com o furfural e compostos fenólicos totais. Assim, pode ser considerada a possibilidade de avaliar o efeito da realização da destoxificação antes da concentração sobre a remoção dos compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana. Estudos a este respeito já foram feitos para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando procedimentos de concentração à vácuo e destoxificação similares ao utilizados no presente trabalho (RODRIGUES et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003). Rodrigues et al. (2003) encontraram que a destoxificação antes da concentração à vácuo favoreceu a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Por outro lado, Rodrigues et al. (2001) relataram que a realização da destoxificação prévia à concentração favoreceu a remoção de compostos fenólicos, enquanto que o ácido acético foi mais efetivamente removido quando a destoxificação foi feita após a concentração.

Em relação às concentrações dos açúcares no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana destoxificado, nota-se na Tabela 3 a redução destas em comparação com as atingidas após a concentração à vácuo: 6,11%, 16,88% e 13,59% para xilose, glicose e arabinose, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos relatados por Rodrigues et al. (2001) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. No caso particular da xilose, sua concentração no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana destoxificado ($50,6 \text{ gL}^{-1}$) foi similar aos encontrados por Felipe et al. (1997b) e Rodrigues et al. (2003)

como apropriadas ($54,5\text{gL}^{-1}$ e 51 gL^{-1} , respectivamente) para a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Em relação ao conteúdo de glicose, destaca-se que foi mantida a relação glicose:xilose (1:5) a qual já tinha sido encontrada no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana original, conforme discutido previamente.

Por último, é importante salientar que as composições químicas determinadas para o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana podem ser consideradas como parciais, uma vez que não foram quantificados outros compostos como minerais, oligoelementos, vitaminas, proteínas, entre outros, derivados da biomassa empregada. Segundo Mussatto e Roberto (2008) estes compostos poderiam ser úteis como nutrientes para o crescimento e metabolismo microbiano, pelo qual poderiam ter influência nos requerimentos de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico para ser empregado como meio de fermentação para a produção biotecnológica de xilitol.

5.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em função da necessidade de suplementação nutricional e a disponibilidade inicial de oxigênio.

Ensaio sobre a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana foram feitos em função da suplementação nutricional do hidrolisado e a disponibilidade inicial de oxigênio no meio. A Figura 8 apresenta os perfis de consumo de açúcares nas condições de suplementação nutricional avaliadas, ou seja sem suplementação (H1), suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (H2), e com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (H3), em função de maior ou menor disponibilidade inicial de oxigênio, alcançada mediante alteração do volume do meio de fermentação (25mL e 50mL, respectivamente) nos frascos Erlenmeyer (125mL).

Figura 8 - Consumo de xilose (♦), glicose (●) e arabinose (X) por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.

H1. Sem suplementação.

H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 8, destaca-se que na ausência de suplementação nutricional (H1) a levedura consumiu completamente a glicose e parcialmente a xilose, independente da condição de disponibilidade inicial de oxigênio avaliada. Estes resultados sugerem que o hidrolisado hemicelulósico de palha de cana pode suprir um nível basal de nutrientes para suportar o metabolismo microbiano. Uma observação similar foi feita para a mesma levedura crescida em hidrolisados hemicelulósico de outras matérias-primas, como palha de arroz (MUSSATTO; ROBERTO, 2002) e bagaço de malte (MUSSATTO; ROBERTO, 2008). Estes autores sugeriram que este fato estaria associado ao alto conteúdo de cinzas na palha de arroz (11,4%), em função do conteúdo de minerais, oligoelementos e vitaminas nas cinzas (MUSSATTO; ROBERTO, 2005). No caso do bagaço de malte foi atribuído ao elevado conteúdo proteico (15,25%) e ampla variedade de minerais nesta biomassa (MUSSATTO; ROBERTO, 2008). No presente trabalho, o teor de cinzas quantificado para a palha de cana (1,5%) é menor que aquele reportado para as biomassas mencionadas, conforme anteriormente apresentado na Tabela 2, enquanto que o conteúdo de proteína e minerais da palha de cana não foi determinado. Os resultados obtidos no presente trabalho aqui discutidos sugerem

que pode ser necessário a suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana para favorecer o consumo de xilose.

Em relação aos perfis de consumo de xilose nos condições avaliadas apresentados na Figura 8, destaca-se que estes foram similares nos experimentos sem suplementação nutricional independente da condição de disponibilidade inicial de oxigênio empregada (Figura 8 H1). Já para as outras condições de suplementação nutricional foram observadas diferenças nos perfis de consumo de xilose em função da disponibilidade inicial de oxigênio (Figura 8 H2 e H3). Nos experimentos com menor disponibilidade inicial de oxigênio, a xilose começou a ser consumida em uma velocidade constante mais cedo em relação à condição de maior disponibilidade inicial de oxigênio (Figura 8 H2 e H3). Os valores de consumo de xilose nas condições avaliadas de suplementação nutricional e disponibilidade inicial de oxigênio são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre o consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Suplementação nutricional	Disponibilidade inicial de oxigênio	Consumo de xilose (%) 48h
H1. Sem suplementação	Maior	26,12
	Menor	29,29
H2. Suplementação com (NH₄)₂SO₄	Maior	60,58
	Menor	30,95
H3. Suplementação com (NH₄)₂SO₄, extrato de farelo de arroz e CaCl₂·2H₂O	Maior	79,22
	Menor	57,80
Disponibilidade inicial de oxigênio: Maior = 25mL de meio de fermentação. Menor = 50mL de meio de fermentação.		

Verifica-se na Tabela 4 que no hidrolisado hemicelulósico sem suplementação nutricional (H1) o maior consumo de xilose (29,29%) ocorreu na condição de menor disponibilidade inicial de oxigênio. Nesta condição de disponibilidade inicial de oxigênio, a suplementação do hidrolisado somente com (NH₄)₂SO₄ não resultou em incremento no consumo de xilose (30,95%), enquanto

que com a suplementação com extrato de farelo arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) além de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocorreu um aumento de 87% neste consumo (57,80%), em relação à ausência de suplementação (Tabela 4).

Por outro lado, nos experimentos com maior disponibilidade inicial de oxigênio, a suplementação só com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resultou no incremento de 132% no consumo de xilose (H_2 , 60,58%) em relação ao obtido em ausência de suplementação (26,12%). Um aumento adicional de 31% em relação a H_2 foi atingido com a suplementação de extrato de farelo arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ além de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (79,22%), sendo este último valor o máximo obtido entre todos os experimentos realizados e correspondente a um aumento de 200% em relação ao atingido sem suplementação nutricional (Tabela 4). Portanto, pode ser afirmado que a suplementação somente com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi suficiente para aumentar o consumo de xilose apenas na condição de maior disponibilidade inicial de oxigênio.

Os resultados aqui obtidos quanto ao consumo de xilose sugerem uma limitação na capacidade da levedura para assimilar esta pentose nos experimentos com menor disponibilidade inicial de oxigênio, a qual foi compensada parcialmente com o emprego de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como suplemento nutricional do hidrolisado. A este respeito, já foi indicado na literatura que em condições de limitação de oxigênio o fluxo de carbono proveniente da assimilação de xilose pode não ser suficiente para promover a regeneração de NADPH na via PPP, o que restringe a atividade da enzima Xilose Redutase e em consequência a assimilação de xilose (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; KIM; RYU; SEO, 1999; KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007).

Os perfis de crescimento celular e produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas condições de suplementação nutricional e disponibilidade inicial de oxigênio avaliadas são apresentados na Figura 9. Os valores de biomassa celular formada ao final da fermentação nas condições avaliadas se encontram na Tabela 5.

Figura 9 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.

H1. Sem suplementação.

H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 5 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre o crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037.

Suplementação nutricional	Disponibilidade inicial de oxigênio	Biomassa celular formada (g L^{-1})
		48h
H1. Sem suplementação	Maior	12,09
	Menor	6,87
H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Maior	17,30
	Menor	5,69
H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Maior	19,02
	Menor	7,16

Disponibilidade inicial de oxigênio: **Maior** = 25mL de meio de fermentação.

Menor = 50mL de meio de fermentação.

De acordo com os resultados apresentados na Figura 9, destaca-se que foram observadas diferenças nos perfis de crescimento celular em função da disponibilidade inicial de oxigênio, independente de condição de suplementação nutricional empregada. Nos experimentos com maior disponibilidade inicial de oxigênio, o período de maior crescimento celular foi evidenciado após 8h de

fermentação, diferente do ocorrido na condição de menor disponibilidade inicial de oxigênio, na qual se apresentou no período inicial de fermentação (Figura 9).

A partir dos resultados apresentados na Figura 9 e na Tabela 5, constata-se o aumento do crescimento celular em função da suplementação nutricional e do aumento na disponibilidade inicial de oxigênio. O máximo valor de biomassa celular formada ($19,02\text{gL}^{-1}$) foi atingido com a suplementação do hidrolisado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e com maior disponibilidade inicial de oxigênio, correspondente a um incremento de 9% em relação à suplementação só com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($17,30\text{gL}^{-1}$) e de 57% em comparação com o resultado no hidrolisado não suplementado ($12,09\text{gL}^{-1}$), ambos na mesma condição de disponibilidade inicial de oxigênio. Por outro lado, nos experimentos com menor disponibilidade inicial de oxigênio, não foi observado aumento do crescimento celular em função da suplementação nutricional empregada, sendo que o máximo valor atingido nesta condição ($7,16\text{gL}^{-1}$) foi com suplementação com extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ além do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, porém apenas 4,28% maior que no hidrolisado não suplementado ($6,87\text{gL}^{-1}$) (Tabela 5). Portanto, a redução na disponibilidade inicial de oxigênio afetou a capacidade de crescimento da levedura independente da suplementação nutricional, o qual pode estar relacionado com a restrição no metabolismo respiratório e diminuição da produção de energia e formação de biomassa.

Em relação à produção de xilitol, verifica-se na Figura 9 H1 que nos experimentos sem suplementação nutricional a produção de xilitol foi evidente a partir de 8h independente da condição de disponibilidade inicial de oxigênio. Já nas outras duas condições de suplementação nutricional, a produção de xilitol começou a partir de 8h quando se empregou menor disponibilidade inicial de oxigênio e a partir de 24h com maior disponibilidade inicial de oxigênio (Figura 9 H2 e H3). As diferenças nos perfis de produção de xilitol entre os experimentos com maior e menor disponibilidade inicial de oxigênio são coerentes com as discutidos previamente quanto ao consumo de xilose nestas condições.

Os principais parâmetros fermentativos referentes à produção de xilitol nas condições avaliadas são apresentados na Tabela 6. Verifica-se nesta tabela que no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana não suplementando foi observada produção de xilitol. Nesta condição, o emprego de menor disponibilidade inicial de oxigênio permitiu uma maior eficiência de bioconversão e produtividade

volumétrica de xilitol. A suplementação do hidrolisado hemicelulósico só com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ não resultou em incremento no xilitol produzido, e consequentemente na produtividade volumétrica, nas duas condições de disponibilidade inicial de oxigênio (Tabela 6). No caso do experimento com menor disponibilidade inicial de oxigênio, este resultado é coerente com o fato do consumo de xilose não ter aumentado, conforme discutido previamente (Tabela 4). Por outro lado, quando empregada maior disponibilidade inicial de oxigênio verifica-se uma diminuição na eficiência de bioconversão em relação ao experimento sem suplementação nutricional (Tabela 6), o que é devido ao aumento no consumo de xilose com o emprego de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nesta condição (Tabela 4).

Tabela 6 - Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Suplementação nutricional	Disponibilidade inicial de oxigênio	Produção de xilitol (gL^{-1}) 48h	Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (η) (%)	Produtividade volumétrica de xilitol (Q_P) ($\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$)
H1. Sem suplementação	Maior	4,78	45,26	0,10
	Menor	8,69	73,32	0,18
H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Maior	4,75	16,97	0,10
	Menor	9,61	68,95	0,20
H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Maior	16,20	50,91	0,34
	Menor	14,24	60,07	0,30

Disponibilidade inicial de oxigênio: **Maior** = 25mL de meio de fermentação.
Menor = 50mL de meio de fermentação.

De acordo com a Tabela 6, a suplementação do hidrolisado com extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ além do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ resultou em melhoria de 240% e

48% na produtividade volumétrica de xilitol nas condições de maior e menor disponibilidade inicial de oxigênio, respectivamente (Tabela 6). Conforme discutido previamente, nesta condição de suplementação nutricional foram obtidos também incrementos no consumo de xilose e no crescimento celular (Tabela 4 e Tabela 5, respectivamente). De fato, destaca-se que no experimento com maior disponibilidade inicial de oxigênio e suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, no qual foram atingidos os valores máximo de consumo de xilose e crescimento celular, foram obtidos também os máximos valores de xilitol produzido ($16,20 \text{ gL}^{-1}$) e produtividade volumétrica ($0,34 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) entre os experimentos realizados (Tabela 6).

Por outro lado, destaca-se que, em todas as condições de suplementação nutricional avaliadas, os maiores valores de eficiência de bioconversão de xilose em xilitol foram obtidos com o emprego de menor disponibilidade inicial de oxigênio (Tabela 6). Este resultado é coerente com a teoria, segundo a qual uma restrição na disponibilidade de oxigênio propiciaria a produção de xilitol devido ao desequilíbrio NADH/NAD^+ , causado pela restrição no metabolismo respiratório da levedura, e a consequente limitação da atividade da enzima XDH (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Entretanto, diferente do observado quanto à máxima produtividade volumétrica de xilitol atingida com a suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, a máxima eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (73,32%) foi obtida no hidrolisado não suplementado (Tabela 6). É importante salientar ainda que na condição de menor disponibilidade inicial de oxigênio a suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resultou na diminuição de 22,06% neste parâmetro em comparação com o experimento sem suplementação nutricional (Tabela 6)

Baseado nos resultados apresentados de consumo de xilose, crescimento celular e produção de xilitol, pode ser afirmado que, além do importante impacto da suplementação nutricional no desempenho da levedura, este foi dependente da disponibilidade inicial de oxigênio. O emprego de uma menor disponibilidade inicial de oxigênio favoreceu o acúmulo de xilitol, evidenciado nas maiores eficiências de bioconversão, em detrimento do crescimento celular, porém também afetou o consumo de xilose, com consequente diminuição na produtividade volumétrica de xilitol. Por outro lado, apesar do fato da maior

disponibilidade inicial de oxigênio ter reduzido a eficiência de bioconversão e aumentado o crescimento celular, esta condição permitiu um maior consumo de xilose o que favoreceu a produção de xilitol, atingindo maiores produtividades volumétricas. Assim, é possível sugerir que, embora o controle da disponibilidade de oxigênio seja um fator crítico na bioconversão de xilose em xilitol, possíveis alternativas para melhorar este bioprocessos, particularmente a produtividade volumétrica, podem ser focadas no incremento do consumo de xilose em uma condição de limitação de oxigênio.

Além disso, quanto ao impacto da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no desempenho da levedura, pode ser afirmado que o emprego só de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uma fonte inorgânica de nitrogênio, foi suficiente para incrementar a capacidade de consumo de xilose e crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037 na condição de maior disponibilidade inicial de oxigênio. Entretanto, para atingir também uma melhoria na produção de xilitol, tanto em maior quanto em menor disponibilidade inicial de oxigênio, foi necessário a suplementação de uma fonte complexa de nitrogênio como o extrato de farelo de arroz, o qual é um subproduto agroindustrial que pode também fornecer minerais e vitaminas (CHAUD; ARRUDA; FELIPE, 2009). Similar aos resultados aqui obtidos, já foi demonstrado que a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (RODRIGUES et al., 2003) e de palha de trigo (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA, 2005) foi melhorada pela suplementação de extrato de farelo de arroz.

Os melhores resultados de consumo de xilose, crescimento celular e produção de xilitol foram obtidos com a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Nesta condição, a redução da disponibilidade inicial de oxigênio, a partir do aumento no volume do meio de fermentação (50mL), resultou em um aumento de 20% na eficiência de bioconversão de xilose em xilitol, apesar da diminuição de 13,30% na produtividade volumétrica de xilitol. Assim, para o desenvolvimento dos experimentos de efeito da adição de co-substratos e permeabilizante de membrana celular ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 foram estabelecidas as condições de suplementação nutricional com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e de menor disponibilidade inicial de

oxigênio. Destaca-se que estas condições de suplementação nutricional e de disponibilidade inicial de oxigênio correspondem às comumente empregadas em estudos de produção biotecnológica de xilitol com esta mesma levedura cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e em escala de frascos agitados (FELIPE et al., 1997a; MARTON et al., 2006; ARRUDA et al., 2011)

A influência das condições avaliadas de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e da disponibilidade inicial de oxigênio no meio pode ser constatada também na formação dos subprodutos etanol e glicerol (Figura 10).

Figura 10 - Produção de etanol (▲) e glicerol (X) por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.

H1. Sem suplementação.

H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se na Figura 10 diferença nos perfis de produção de etanol e glicerol em função da disponibilidade inicial de oxigênio similares às descritas previamente para o crescimento celular, ou seja, o período de maior formação destes compostos foi nas primeiras 8h ou entre 8h e 24h nos experimentos com menor ou maior disponibilidade inicial de oxigênio, respectivamente. Considerando que a formação de etanol e glicerol são vias alternativas de reoxidação de cofator reduzido (NADH) quando o metabolismo respiratório é restrito pela baixa disponibilidade de oxigênio no meio (FLORES et al., 2000; GRANSTRÖM; LEISOLA, 2002), a formação destes produtos nos experimentos

com maior disponibilidade inicial de oxigênio sugere a diminuição do oxigênio disponível no meio ao longo da fermentação. Tal fato pode ser devido a consumo do oxigênio durante o crescimento celular, conforme já tinha sido sugerido previamente em razão à produção de xilitol na condição de maior disponibilidade inicial de oxigênio.

Conforme apresentado na Figura 10, as máximas concentrações de etanol e glicerol foram obtidas nos experimentos com menor disponibilidade inicial de oxigênio, independente da condição de suplementação nutricional empregada, exceto no caso do glicerol no experimento sem suplementação nutricional. Assim, a máxima concentração de etanol ($7,58\text{gL}^{-1}$) foi obtida com menor disponibilidade inicial de oxigênio e suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. É importante salientar que o valor obtido nestas condições foi 11,47% maior que o conseguido no experimento sem suplementação nutricional e menor disponibilidade inicial de oxigênio ($6,81\text{gL}^{-1}$). Por outro lado, nos experimentos com maior disponibilidade inicial de oxigênio, a suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ resultou em uma redução de 72,31% na produção de etanol ($3,54\text{gL}^{-1}$) em relação ao valor obtido no experimento sem suplementação ($6,10\text{gL}^{-1}$).

Esses resultados estão relacionados aos apresentados previamente quanto à menor eficiência de bioconversão de xilose em xilitol no experimento com suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em relação ao de ausência de suplementação, ambos na condição de menor disponibilidade inicial de oxigênio. Uma possível explicação para estes resultados pode ser em função da restrição no metabolismo respiratório da levedura, causada pela baixa disponibilidade de oxigênio, a qual seria mais intensificada no experimento sem suplementação nutricional, o que resultaria tanto no favorecimento do acúmulo e excreção do xilitol quanto em uma maior necessidade de vias alternativas de reoxidação de cofatores reduzidos, como a fermentação alcoólica e produção de glicerol.

Os perfis de pH e consumo de ácido acético por *C. guilliermondii* FTI 20037 em função das diferentes condições de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana e de disponibilidade inicial de oxigênio são apresentados na Figura 11. Constata-se nesta figura o consumo do ácido acético remanescente no hidrolisado ao longo da fermentação associado com o aumento

do pH do meio, exceto no experimento com suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Figura 11 H3), no qual observou-se uma diminuição progressiva no pH.

Figura 11 - Consumo de ácido acético (■) e perfil de pH (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, empregando-se maior (- - -) ou menor (—) disponibilidade inicial de oxigênio e diferente suplementação nutricional.

H1. Sem suplementação.

H2. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

H3. Suplementação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Fonte: Arquivo pessoal.

Apesar dos perfis de consumo de ácido acético terem sido similares, nos experimentos com maior disponibilidade inicial de oxigênio foi observada uma diminuição mais acelerada na concentração deste ácido, atingindo aproximadamente 100% de consumo ao final da fermentação, associado com aumento do pH do meio de fermentação (Figura 11). Por sua vez, nos experimentos com menor disponibilidade inicial de oxigênio o consumo de ácido acético não foi superior a 50% no final da fermentação independente da suplementação nutricional empregada, coerente com perfis similares de aumento do pH do meio (Figura 11). O consumo de ácido acético nas condições avaliadas foi proporcional ao crescimento celular da levedura, o qual foi discutido previamente.

Em relação ao perfis de pH nas condições avaliadas, destaca-se que os maiores incrementos foram observados nos experimentos sem suplementação nutricional em ambas condições de disponibilidade inicial de oxigênio (Figura 11). Este comportamento pode ser explicado em função do efeito causado pela entrada deste ácido na célula, conforme relatado por Verduyn et al. (1992) e Lima

et al. (2004). É conhecido que o ácido acético se dissocia devido ao maior pH intracelular e que a célula evita a diminuição de seu pH interno mediante a expulsão dos íons H^+ pela ATPase de membrana dependente de ATP (VERDUYN et al., 1992; LIMA et al., 2004). Baseado nisto, pode ser considerado que a suplementação nutricional do hidrolisado com $(NH_4)_2SO_4$, extrato de farelo de arroz e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ propiciou uma manutenção da produção de energia maior do que nas outras condições. Portanto, nesta condição teria sido favorecida a atividade contínua da ATPase e, em consequência, a expulsão dos íons H^+ e manutenção do pH extracelular relativamente constante.

5.4 Estudo do efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

A partir dos resultados obtidos na fase de avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por *C. guilliermondii* FTI 20037, foram estabelecidas as condições de suplementação nutricional do hidrolisado e de disponibilidade inicial de oxigênio no meio para o favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol. Neste sentido, para o estudo do efeito de co-substratos neste bioprocessos foram empregadas as condições de suplementação do hidrolisado com $(NH_4)_2SO_4$, extrato de farelo de arroz e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, e menor disponibilidade inicial de oxigênio, correspondente ao uso de 50mL de meio de fermentação em frascos Erlenmeyer de 125mL de capacidade.

5.4.1 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de açúcares.

O efeito da adição de diferentes co-substratos em concentrações variáveis ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a capacidade de *C. guilliermondii* FTI 20037 de consumir os açúcares e os co-substratos, em

comparação à ausência de co-substratos no meio, é apresentado nas Figuras 12 a 15.

Figura 12 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (×) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose (■) nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 13 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (×) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose (■) nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 14 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (×) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose (■) nas concentrações (gL^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 15 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (×) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol (■) nas concentrações (gL^{-1}) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se nessas figuras que, independente da presença de co-substratos e de suas concentrações no meio, a xilose foi consumida com uma velocidade volumétrica (r_s) relativamente constante até 48h de fermentação, tempo a partir do qual a r_s diminuiu consideravelmente devido possivelmente ao esgotamento de nutrientes e à baixa concentração de xilose no meio. Este rápido consumo de xilose neste período pode ter sido favorecido pelo rápido esgotamento de glicose no meio (próximo de 8h) (Figuras 12 a 15). Os dados apresentados nessas figuras indicam um possível consumo simultâneo destes dois açúcares nas condições empregadas, não se confirmando repressão catabólica exercida pela glicose sobre a assimilação da xilose, o qual já foi reportado em estudos de

produção biotecnológica de xilitol (KIM; RYU; SEO, 1999; KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001; SILVA; FELIPE, 2006; TAMBURINI et al., 2010).

Quanto à arabinose, em todos os casos esta pentose foi pouca e lentamente consumida (Figuras 13 a 16), similar ao já evidenciado em outros estudos com a mesma levedura e empregando hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (SENE et al., 2001; RODRIGUES et al., 2003; SILVA; FELIPE, 2006). No que se refere aos co-substratos, destaca-se que quando se empregou maltose, sacarose e celobiose foi verificado consumo simultâneo da xilose destes dissacarídeos (Figuras 13 a 15), diferente do observado quando o co-substrato foi glicerol, o qual não foi consumido ao longo da fermentação (Figura 15).

Os resultados apresentados indicam que a adição de co-substratos nas concentrações avaliadas não resultou em grandes variações nos perfis de consumo dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, particularmente no de xilose. De fato, em todos os experimentos realizados o consumo desta pentose atingiu valores superiores a 96% após 72h de fermentação, com pequenas diferenças com a condição ausente de co-substratos, na qual o consumo de xilose foi de $98,60 \pm 0,14\%$. No entanto, ao se avaliar os valores de velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose (r_{Smax}), apresentados na Tabela 7, torna-se mais evidente o efeito da adição de co-substratos em diferentes concentrações sobre o consumo de xilose.

Tabela 7 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Co-substrato	Concentração (gL ⁻¹)	Consumo de xilose (%) – 48h	Velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose ($r_{Smáx}$) (gL ⁻¹ h ⁻¹)
Controle	-	83,86 ± 1,90	1,01 ± 0,02 ^a
Maltose	5,0	76,62 ± 0,64	1,00 ± 0,05 ^a
	10,0	76,04 ± 2,13	0,96 ± 0,02 ^a
	15,0	74,67 ± 0,48	0,96 ± 0,04 ^a
Sacarose	5,0	90,16 ± 0,75	1,07 ± 0,02 ^b
	10,0	91,31 ± 1,11	1,15 ± 0,02 ^a
	15,0	90,27 ± 2,56	1,09 ± 0,02 ^a
Celobiose	5,0	89,70 ± 1,44	0,95 ± 0,03 ^b
	10,0	90,18 ± 1,03	0,96 ± 0,01 ^b
	15,0	93,41 ± 1,93	1,00 ± 0,04 ^a
Glicerol	0,7	86,77 ± 1,41	1,09 ± 0,03 ^a
	1,0	83,41 ± 2,33	0,98 ± 0,00 ^a
	1,5	89,65 ± 1,25	1,08 ± 0,02 ^b

a= 8-48h; b = 0-48h

Constata-se na Tabela 7 que o máximo valor de $r_{Smáx}$ ($1,15 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) ocorreu quando se empregou sacarose como co-substrato em uma concentração de $10,0\text{gL}^{-1}$, sendo este valor 13,86% maior ao obtido em ausência de co-substratos ($1,01 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$). Consequentemente, o consumo de xilose em 48h neste experimento ($91,31 \pm 1,11\%$) foi 8,88% maior que no meio ausente de co-substratos ($83,86\% \pm 1,90$) (Tabela 7). Pode se observar ainda na Tabela 7 que nos experimentos em que se adicionou sacarose em concentração de $5,0\text{gL}^{-1}$ e $15,0\text{gL}^{-1}$ a $r_{Smáx}$ superou também o valor atingido no experimento em ausência de co-substratos, com diferenças de 7,92% e 5,94%, respectivamente. Em pesquisas com *C. tropicalis* a adição de sacarose (30gL^{-1}) como co-substrato em um meio definido com xilose como única fonte de carbono (50gL^{-1}) resultou em uma velocidade de consumo de xilose maior que a obtida tanto no meio em ausência de co-substratos, quanto quando se empregou outros co-substratos como maltose ou glicerol (TAMBURINI et al., 2010).

No caso da utilização de glicerol como co-substrato (Tabela 7), também se verificou uma pequena melhoria da r_{Smax} , dependendo da concentração adicionada, já que com o emprego de $0,7\text{gL}^{-1}$ e $1,5\text{gL}^{-1}$ deste composto foram atingidos valores de r_{Smax} similares ($1,09 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $1,08 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) e aproximadamente 7% maiores que na condição ausente de co-substratos. Nestas concentrações de glicerol se constatou um leve favorecimento do consumo de xilose em 48h ($86,77 \pm 1,41\%$ e $89,65 \pm 1,25\%$, respectivamente), o que corresponde a aumentos de 3,44% e 6,88%, respectivamente, em relação ao experimento controle (Tabela 7). O efeito benéfico do glicerol sobre o consumo de xilose *C. guilliermondii* FTI 20037 foi também constatado por Arruda e Felipe (2009) em pesquisas em meio semidefinido contendo xilose (55gL^{-1}) e glicerol ($0,7\text{gL}^{-1}$). Neste estudo os autores encontraram um aumento de 22,4% na r_s ($1,31 \pm 0,15 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) em comparação com o meio sem adição de glicerol ($1,07 \pm 0,07 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) (ARRUDA; FELIPE, 2009).

Por outro lado, a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana com os co-substratos celobiose ou maltose não melhorou a velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose pela levedura em comparação com o experimento em ausência de co-substratos (Tabela 7). No caso dos experimentos com adição de celobiose, observou-se que o consumo de xilose em 48h aumentou em função do incremento da concentração deste (Tabela 7). A utilização da máxima concentração avaliada de celobiose ($15,0\text{gL}^{-1}$) resultou no consumo de $93,41 \pm 1,93\%$ de xilose em 48h, o qual é 11,39% maior ao observado em ausência de co-substratos, apesar da similaridade nos valores de r_{Smax} ($1,00 \pm 0,04 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) nestes dois casos (Tabela 7). Não foram encontrados estudos de aproveitamento deste dissacarídeo como co-substrato ou única fonte de carbono para esta levedura, sendo que, de fato, os estudos nesta área foram conduzidos com cepas modificadas de *S. cerevisiae* para produção de xilitol (OH et al., 2013), de etanol (SAITOH et al., 2010; AELING et al., 2012) ou de ambos (ZHA et al., 2013).

Já no caso dos experimentos com adição de maltose, constata-se na Tabela 7 que o emprego deste dissacarídeo resultou nos menores valores de consumo de xilose em 48h em relação aos demais co-substratos avaliados e ao meio ausente destes, observando-se uma diminuição deste consumo em função

do incremento da concentração de maltose adicionada. O maior consumo de xilose nos experimentos com maltose ($76,62 \pm 0,64\%$) foi obtido quando se empregou a mínima concentração avaliada ($5,0\text{gL}^{-1}$), o qual foi 9,44% menor que no meio ausente de co-substratos, apesar que o valor de r_{Smax} ($1,00 \pm 0,05\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi similar ao da condição ausente de co-substratos (Tabela 7). Este dissacarídeo foi também avaliado como co-substrato por Tamburini et al. (2010) em fermentação com *C. tropicalis* em meio definido contendo xilose (50gL^{-1}). Neste estudo os autores encontraram que quando se empregou maltose em uma concentração de 30gL^{-1} a levedura consumiu xilose mais lentamente que no meio em ausência de co-substratos ou com outros compostos, como glicerol ou sacarose (TAMBURINI et al., 2010). Entretanto, estes autores reportaram que a redução na concentração de maltose adicionada (até 10gL^{-1}) resultou em incrementos leves no consumo de xilose (TAMBURINI et al., 2010), similar ao observado no presente estudo.

Além das variações observadas nos parâmetros de consumo de xilose em 48h por *C. guilliermondii* FTI 20037 em função dos co-substratos empregados e sua concentração, foram constatadas também diferenças nos perfis de consumo dos próprios co-substratos pela levedura nas condições experimentais empregadas.

Quanto aos experimentos com adição de sacarose, verifica-se na Figura 13 que este dissacarídeo foi consumido nas primeiras 24h de fermentação independente de sua concentração. Constata-se ainda que a maior parte da sacarose disponível no meio foi consumida entre 8h e 24h (mais de 70% desta, independente das concentrações avaliadas). Este dissacarídeo foi possivelmente hidrolisado a nível extracelular ou de parede celular, e os produtos resultantes, glicose e frutose, transportados ao interior da celular, conforme já foi indicado para a *S. cerevisiae* e outras leveduras não-*Saccharomyces* (FLORES et al. 2000). Além disso, é possível que durante as primeiras 8h de fermentação, a assimilação de sacarose tenha sido afetada pela presença de glicose no meio, causando a baixa velocidade de consumo nesse período (Figura 13), conforme já foi reportado para *S. cerevisiae* (KLEIN et al., 1996). Após o esgotamento da glicose, o rápido consumo da sacarose simultaneamente com a xilose (Figura 13), sugerem uma coordenada atividade da enzima invertase e do transporte e

metabolismo das hexoses geradas, principalmente glicose, para evitar o acúmulo extracelular ou intracelular desta e a repressão da assimilação de xilose.

Por outro lado, no caso dos experimentos com maltose, observa-se na Figura 12 que quando se empregaram as menores concentrações ($5,0\text{gL}^{-1}$ e $10,0\text{gL}^{-1}$) este dissacarídeo foi esgotado em 24h, enquanto que para a máxima concentração avaliada ($15,0\text{gL}^{-1}$) seu esgotamento foi com maior tempo (48h). Destaca-se que a maior parte da maltose disponível no meio de fermentação (mais de 60%) foi rapidamente consumida nas primeiras 8h de fermentação, simultaneamente com a glicose e a xilose (Figura 12), diferente do evidenciado para a sacarose, a qual foi pouco consumida no mesmo período. Neste caso pode ser sugerido que a maltose possivelmente foi transportada por um sistema simporte com prótons e hidrolisada por uma maltase intracelular, como já foi sugerido para *C. guilliermondii* (ANTUÑA; MARTÍNEZ-ANAYA, 1993), *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. utilis* (FLORES et al., 2000). Uma vez que não há evidência de influência da presença de glicose sobre o consumo de maltose nas primeiras 8h (Figura 12), pode se supor que a maltose foi assimilada rapidamente a favor do gradiente de concentração até que sua concentração extracelular se tornou limitante, que a concentração da glicose formada a nível intracelular atingiu um nível repressivo (KLEIN et al., 1996), e/ou que se apresentou uma afetação do gradiente eletroquímico (SERRANO, 1977).

Ainda em relação ao consumo de sacarose e maltose por *C. guilliermondii* FTI 20037 nas condições empregadas, pode ser afirmado que os perfis foram opostos, o qual é coincidente com o fato de que os valores máximo e mínimo de velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose foram obtidos com adição de sacarose e maltose, respectivamente, conforme discutido previamente. Diferenças entre os perfis de consumo de sacarose e maltose foram também relatadas no trabalho de Tamburini et al. (2010), no qual foi avaliada a influência da suplementação de maltose ou sacarose (30gL^{-1}) na bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis* em um meio definido contendo 50gL^{-1} de xilose. Estes autores constataram consumo simultâneo destes dissacarídeos com a xilose, porém maior tempo para a assimilação total da maltose (72h), enquanto que a sacarose foi rapidamente consumida (24h) (TAMBURINI et al., 2010). Neste estudo os perfis de consumo de maltose e sacarose foram constantes ao longo da fermentação (TAMBURINI et al., 2010), diferente do observado no presente

trabalho, no qual os perfis foram alterados após 8h de fermentação coincidente com o esgotamento da glicose no meio, conforme apresentado previamente (Figura 12 e Figura 13).

Quanto ao emprego de celobiose como co-substrato, observa-se na Figura 14 que este dissacarídeo começou a ser consumido a partir de 8h, sendo que o aumento na concentração adicionada resultou no incremento do tempo para seu esgotamento, correspondente a 48h e 72h com emprego de $5,0\text{gL}^{-1}$ e $10,0\text{gL}^{-1}$, respectivamente. No experimento com a máxima concentração de celobiose avaliada ($15,0\text{gL}^{-1}$), este dissacarídeo não foi completamente consumido (Figura 14 C). Neste caso pode ser suposto que a celobiose poderia ter sido transportada por um sistema simporte com prótons e hidrolisado a nível intracelular por uma β -glicosidase, como já foi sugerido para *Candida wickerhamii* e *C. queiroziae* (FREER; GREENE, 1990; SANTOS et al., 2011). Embora possa haver similaridade entre o mecanismo de transporte da celobiose e da maltose, os resultados sugerem que a nas primeiras 8h de fermentação a presença de glicose influenciou na assimilação de celobiose (Figura 14). Após este tempo, os resultados indicam que a velocidade de consumo foi similar para todas as concentrações avaliadas (Figura 14), sugerindo que este sistema de transporte possivelmente tem uma atividade constante não dependente da concentração de celobiose no meio extracelular e possivelmente fortemente regulada pela presença de glicose a nível intracelular.

Por último, no caso dos experimentos com adição de glicerol, não se pode afirmar sobre seu consumo em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 15). De fato, verifica-se na Figura 15 a produção deste poliol nas primeiras 8h e manutenção da concentração ao longo da fermentação. A não assimilação de glicerol simultaneamente com a xilose já foi também relatada em pesquisas em meios definidos (TAMBURINI et al., 2010) e semidefinido (ARRUDA; FELIPE, 2009). No estudo de Arruda e Felipe (2009) se observou que quando o glicerol foi adicionado em uma concentração de $0,7\text{gL}^{-1}$ no meio semidefinido contendo xilose (55gL^{-1}), este só foi consumido por *C. guilliermondii* FTI 20037 após o esgotamento da xilose (58h). Por sua vez, no trabalho de Tamburini et al. (2010) foi constatado que quando o glicerol foi adicionado em uma concentração de $30,0\text{gL}^{-1}$ no meio definido contendo xilose (50gL^{-1}) não se observou consumo deste por *C. tropicalis* ao longo da fermentação (72h).

A partir dos resultados aqui discutidos quanto ao efeito da adição de co-substratos em diferentes concentrações ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037, pode se afirmar que os co-substratos sacarose, principalmente, e glicerol favoreceram este consumo, enquanto que a suplementação de maltose e celobiose não o influenciou positivamente. Relacionando estes resultados com os discutidos quanto ao consumo dos dissacarídeos, possivelmente a rápida hidrólise extracelular da sacarose e metabolismo dos monómeros resultantes teve um impacto positivo maior que a lenta assimilação de maltose ou celobiose e sua hidrólise intracelular. Considerando que o favorecimento da assimilação de xilose mediante a utilização de co-substratos está associado principalmente ao incremento na regeneração contínua do cofator NADPH como parte do metabolismo do co-substrato, o qual permitiria uma alta atividade da enzima XR (KIM; RYU; SEO, 1999; TAMBURINI et al., 2010, OH et al., 2013), é possível supor que o alto fluxo de carbono proveniente do rápido consumo de sacarose teria permitido uma maior taxa de regeneração do NADPH, em comparação com o fluxo mais lento proveniente da assimilação de maltose ou celobiose.

5.4.2 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular e produção de xilitol.

Os resultados referentes ao efeito da adição de co-substratos em diferentes concentrações ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana no crescimento celular e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, em comparação com a condição ausente de co-substratos (controle), são apresentados nas Figuras 16 a 19. Quanto ao crescimento celular, verifica-se nestas figuras que não houve alterações em seus perfis em função da adição de co-substratos nas concentrações avaliadas quando comparado com a condição ausente destes. Em todos os experimentos se observou rápido crescimento celular nas primeiras 8h de fermentação, associado principalmente ao acelerado consumo de glicose, seguido por uma diminuição na velocidade volumétrica de crescimento até o final da fermentação (Figuras 16 a 19). É importante salientar

que não se verificou perda de viabilidade das células ao longo da fermentação em nenhuma das condições avaliadas.

Figura 16 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (gL^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 17 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (gL^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 18 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 19 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (g L^{-1}) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Tabela 8 são apresentados parâmetros fermentativos relacionados com o crescimento celular, como biomassa celular formada e velocidade volumétrica de crescimento (r_x), em função dos co-substratos e de suas concentrações adicionadas. Constata-se nesta tabela que o máximo valor de biomassa celular formada ao longo da fermentação ($9,38 \pm 0,65 \text{ g L}^{-1}$) foi atingido quando se empregou glicerol na mínima concentração avaliada ($0,7 \text{ g L}^{-1}$), o qual corresponde a um incremento de 12,74% em comparação com o obtido no experimento em ausência de co-substratos ($8,32 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$). Verifica-se também nesta tabela que a biomassa celular formada diminuiu em função do aumento na concentração adicionada de glicerol (Tabela 8). No entanto, os valores atingidos com $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e

1,5gL⁻¹ deste poliol (8,95 ± 0,15 gL⁻¹ e 8,93 ± 0,53 gL⁻¹, respectivamente) foram aproximadamente 7% maiores ao obtido no experimento em ausência de co-substratos.

Tabela 8 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Co-substrato	Concentração (gL ⁻¹)	Biomassa celular formada (gL ⁻¹) – 72h
Controle	-	8,32 ± 0,08
Maltose	5,0	8,21 ± 0,39
	10,0	8,81 ± 0,35
	15,0	8,73 ± 0,29
Sacarose	5,0	8,99 ± 0,73
	10,0	8,15 ± 0,54
	15,0	7,75 ± 0,98
Celobiose	5,0	8,83 ± 0,35
	10,0	8,90 ± 0,69
	15,0	8,99 ± 0,39
Glicerol	0,7	9,38 ± 0,65
	1,0	8,95 ± 0,15
	1,5	8,93 ± 0,53

Valores próximos aos obtidos nos experimentos com adição de glicerol foram atingidos quando se empregou celobiose como co-substrato. Constata-se na Tabela 8 que a biomassa celular formada aumentou em função do incremento na concentração adicionada de celobiose. O maior valor de biomassa celular formada nos experimentos com celobiose (8,99 ± 0,65 gL⁻¹) foi obtido com a máxima concentração avaliada (15,0gL⁻¹), o qual representa um incremento de 8,05% em relação à condição ausente de co-substratos (Tabela 8). Em relação aos experimentos com maltose, o maior valor de biomassa celular formada (8,81 ± 0,35 gL⁻¹) foi atingido com a adição de 10,0gL⁻¹, representando um incremento de 5,89% em relação ao experimento em ausência de co-substratos (Tabela 8). Por outro lado, quanto aos experimentos com sacarose, verifica-se nesta tabela que o maior valor entre os experimentos com este co-substrato (8,99 ± 0,73 gL⁻¹)

foi obtido com $5,0\text{gL}^{-1}$, correspondente a um aumento de 8,05% em relação ao experimento em ausência de co-substratos. Constata-se também a diminuição na biomassa celular formada em função do incremento na concentração de sacarose adicionada, sendo que os valores obtidos nas maiores concentrações avaliadas (10gL^{-1} e 15gL^{-1}) foram 2,08% e 7,35% menores que o controle, respectivamente (Tabela 8).

Em relação aos perfis de produção de xilitol de *C. guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana suplementado com co-substratos em diferentes concentrações, verifica-se nas Figuras 16 a 19 que em todos os experimentos o período de maior produção de xilitol foi entre 8h e 48h. Em todos os casos este período coincide com aquele de maior consumo de xilose, conforme discutido previamente. A menor produção de xilitol nas primeiras 8h estaria relacionada com o consumo rápido de glicose neste período, enquanto que nas últimas 24h estaria associado com a diminuição na concentração de xilose e esgotamento de nutrientes no meio, conforme discutido previamente. Na Tabela 9 são apresentados os principais parâmetros fermentativos relacionados à produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em função dos co-substratos adicionados em diferentes concentrações.

Tabela 9 - Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Co-substrato	Concentração (gL ⁻¹)	Produção de xilitol (gL ⁻¹) - 72h	Produtividade volumétrica de xilitol (Q _P) (gL ⁻¹ h ⁻¹) – 72h	Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (η) (%) - 72h
Controle	-	37,93 ± 0,80	0,57 ± 0,01	76,55 ± 2,14 ^b
Maltose	5,0	39,78 ± 0,88	0,60 ± 0,01	80,33 ± 1,46 ^b
	10,0	37,20 ± 1,61	0,57 ± 0,02	76,21 ± 2,72 ^b
	15,0	36,44 ± 1,34	0,55 ± 0,01	74,15 ± 5,83 ^b
Sacarose	5,0	36,71 ± 0,76	0,52 ± 0,01	65,22 ± 0,59 ^d
	10,0	41,36 ± 1,69	0,61 ± 0,02	75,70 ± 0,73 ^d
	15,0	38,67 ± 1,68	0,57 ± 0,02	70,03 ± 2,91 ^d
Celobiose	5,0	32,72 ± 0,84	0,49 ± 0,01	74,84 ± 6,21 ^a
	10,0	32,83 ± 0,68	0,50 ± 0,00	74,67 ± 3,64 ^a
	15,0	32,61 ± 0,55	0,51 ± 0,00	78,27 ± 2,06 ^a
Glicerol	0,7	35,89 ± 0,96	0,56 ± 0,01	74,49 ± 3,90 ^a
	1,0	35,40 ± 2,11	0,56 ± 0,03	82,39 ± 2,91 ^a
	1,5	35,88 ± 0,78	0,56 ± 0,02	77,93 ± 4,16 ^b

a = 8-48h; b = 8-72h; c = 0-48h; d=0-72

Constata-se na Tabela 9 que o máximo valor de produção de xilitol entre todos os experimentos realizados (41,36 ± 1,69 gL⁻¹) foi obtido quando se empregou sacarose como co-substrato em uma concentração de 10,0gL⁻¹, o qual representa uma melhoria de 9,04% em relação à condição em ausência de co-substratos (37,93 ± 0,80 gL⁻¹). Na condição de máxima produção de xilitol (sacarose 10,0gL⁻¹) foram obtidos também os máximos valores de eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (75,70 ± 0,73%) e produtividade volumétrica de xilitol (0,61 ± 0,02 gL⁻¹h⁻¹), os quais correspondem a um incremento de 5,01% e 6,56%, respectivamente, em comparação com o meio ausente de co-substratos (Tabela 9). É importante destacar também que nesta condição de máxima produção de xilitol foi também observado o máximo valor de velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose, conforme discutido previamente. A

utilização de sacarose em concentrações abaixo ($5,0\text{gL}^{-1}$) e acima ($15,0\text{gL}^{-1}$) de $10,0\text{gL}^{-1}$ resultou em diminuição da produção de xilitol de 12,67% e 6,96%, respectivamente (Tabela 9). Destaca-se que quando a sacarose foi empregada como co-substrato a produção de xilitol foi evidente desde o início da fermentação com uma velocidade de formação relativamente constante até 48h (Figura 17).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram o favorecimento do consumo de xilose e da produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 pela adição de sacarose como co-substrato em uma concentração de $10,0\text{gL}^{-1}$ ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas condições de fermentação empregadas. Este fato possibilita considerar a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana com fontes de sacarose complexas, como as derivadas do setor sucroalcooleiro caldo e melaço de cana, com vistas ao favorecimento deste bioprocessos. Além disto, destaca-se a possibilidade de integrar as tecnologias de produção de açúcar, etanol de primeira e segunda geração e de produção biotecnológica de xilitol no contexto de uma biorrefinaria baseada na biomassa de cana-de-açúcar.

Embora no presente estudo a sacarose tenha se apresentado como o co-substrato mais adequado entre os estudados para a bioconversão de xilose em xilitol, pode ser destacado que com a utilização de maltose na mínima concentração avaliada ($5,0\text{gL}^{-1}$) a produção de xilitol ($39,78 \pm 0,88 \text{ gL}^{-1}$) foi 4,88% maior que o obtido no experimento em ausência de co-substratos (Tabela 9). Consequentemente, nesta condição (maltose $5,0\text{gL}^{-1}$) se obtiveram valores eficiência de bioconversão de xilose em xilitol ($74,15 \pm 1,46\%$) e produtividade volumétrica de xilitol ($0,60 \pm 0,01 \text{ gL}^{-1}$) 2,86% e 5,26% maiores que no experimento controle, respectivamente (Tabela 9). Verifica-se ainda na Tabela 9 a diminuição na produção de xilitol em função do aumento na concentração de maltose adicionada.

Em pesquisas também com maltose como co-substrato realizadas em meio definido contendo xilose (50 gL^{-1}), o emprego deste dissacarídeo em uma concentração de 10gL^{-1} resultou em incremento de 31,01% na produção de xilitol ($28,01 \pm 0,35 \text{ gL}^{-1}$) e 25% na eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (56%) por *C. tropicalis* em relação ao meio ausente de maltose ($21,38 \pm 0,35 \text{ gL}^{-1}$ e 42%, respectivamente) (TAMBURINI et al., 2010). Estes autores sugeriram este dissacarídeo como um co-substrato promissório neste bioprocessos.

Adicionalmente, nesta pesquisa foi constatado que o aumento na concentração de maltose adicionada (até $30,0\text{gL}^{-1}$) diminuiu a produção de xilitol por *C. tropicalis* (TAMBURINI et al., 2010), semelhante ao encontrado no presente trabalho quando a maltose foi utilizada em concentrações maiores a $5,0\text{gL}^{-1}$ ($10,0\text{gL}^{-1}$ e $15,0\text{gL}^{-1}$).

O emprego de maltose na menor concentração avaliada ($5,0\text{gL}^{-1}$) como co-substrato não resultou no favorecimento do consumo de xilose de *C. guilliermondii* FTI 20037, conforme discutido previamente, porém também não prejudicou a produção de xilitol, ao se comparar com o meio ausente deste dissacarídeo. Estes resultados permitem sugerir a realização de trabalhos mais aprofundados quanto ao potencial da maltose como co-substrato neste bioprocesso, mediante o estudo do emprego de concentrações menores às aqui avaliadas, de formas diferentes de adição e inclusive da suplementação de fontes complexas de maltose. Em relação a esta última alternativa, opções de utilização deste dissacarídeo como suplemento poderia ser na forma de xaropes com alta concentração de maltose, como os produzidos a partir de biomassas ricas em amido, ou mediante tratamento enzimático de resíduos amiláceos, por exemplo o proveniente do processamento da batata doce ou da fabricação de farinha de mandioca (YOKOI et al., 2002).

Em relação à utilização de glicerol como co-substrato, verifica-se na Tabela 9 que, independente da concentração adicionada deste poliol, a produção de xilitol foi similar nos experimentos com este co-substrato (aproximadamente $35,72\text{gL}^{-1}$) e aproximadamente 6% menor à obtida na condição em ausência de co-substratos (Tabela 9). Consequentemente, a produtividade volumétrica de xilitol nestes experimentos foi similar ($0,56 \pm 0,03 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e também semelhante à atingida no experimento em ausência de co-substratos (Tabela 9). Quanto à eficiência de bioconversão, o maior valor entre os experimentos com glicerol foi obtido com uma concentração de $1,0\text{gL}^{-1}$ deste poliol ($71,06 \pm 5,83\%$), sendo este valor similar ao obtido no meio ausente de co-substratos (Tabela 9).

De acordo aos resultados discutidos em relação aos experimentos com glicerol, pode ser afirmado que a suplementação deste poliol no meio de fermentação resultou em pequena diminuição dos valores de concentração de xilitol obtidos. Diferente do obtido com a produção de xilitol, foi observado para o consumo de xilose e crescimento celular um pequeno aumento nos valores

destes parâmetros com a adição de glicerol. Salienta-se que o emprego deste poliol não prejudicou e inclusive favoreceu levemente o consumo de xilose, conforme discutido previamente. Além disto, pode ser destacado também que já foi verificado o efeito benéfico do glicerol na produção de xilitol pela mesma levedura aqui avaliada quanto esta foi cultivada em meio semidefinido contendo xilose (53gL^{-1}) e glicerol ($0,7\text{gL}^{-1}$) (ARRUDA; FELIPE, 2009). Segundo estes autores, o emprego deste poliol resultou em valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol ($85,06\%$ e $1,13\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) $5,1\%$ e $25,7\%$ maiores que em ausência deste ($80,70\%$ e $0,84\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) (ARRUDA; FELIPE, 2009). Não foram encontrados relatos de uso de glicerol como co-substrato na produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Assim, podem ser sugeridos estudos adicionais de estratégias alternativas para o emprego deste poliol como suplemento do meio de fermentação, considerando principalmente o progressivo incremento da disponibilidade deste como subproduto da indústria de produção de biodiesel (SILVA; MACK; CONTIERO, 2009).

Em relação ao efeito da adição de celobiose ao meio sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, verifica-se na Tabela 9 que as concentrações obtidas nestes experimentos (aproximadamente $32,70\text{gL}^{-1}$, independente da concentração de celobiose) foram as menores em comparação com os demais co-substratos e ainda 16% inferiores à atingida na condição ausente de co-substratos. Por outro lado, destaca-se que os valores de eficiência de bioconversão e produtividade volumétrica de xilitol aumentaram em função do incremento na concentração de celobiose empregada (Tabela 9). Os maiores valores destes parâmetros ($74,49 \pm 0,59\%$ e $0,51 \pm 0,00\text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente), obtidos com a máxima concentração de celobiose avaliada ($15,0\text{gL}^{-1}$), foram $3,39\%$ maior e $11,76\%$ menor, respectivamente, que os atingidos na condição ausente de co-substratos (Tabela 9). É importante salientar ainda que nos experimentos com adição de celobiose foram observados também os menores valores de velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose, conforme discutido previamente. Desta forma, os resultados aqui apresentados indicam que a suplementação de celobiose ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas concentrações avaliadas não favoreceu a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 nas condições de fermentação empregadas.

5.4.2.1 Comparação entre os melhores resultados de produção de xilitol obtidos na avaliação de co-substratos e relatos da literatura.

Considerando que, entre os diferentes co-substratos avaliados, a sacarose em concentração de $10,0\text{gL}^{-1}$ resultou nos máximos valores de eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (η) ($75,70 \pm 0,73\%$) e produtividade volumétrica de xilitol (Q_P) ($0,61 \pm 0,02 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) durante as fermentações do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana por *C. guilliermondii* FTI 20037, estes resultados serão comparados com dados da literatura para a mesma levedura e outras matérias-primas.

Arruda e Felipe (2009) empregaram condições de fermentação similares às utilizadas no presente estudo e meio semidefinido contendo xilose, ou seja com a mesma suplementação nutricional e similar concentração de xilose, porém ausente de compostos tóxicos. Nesta pesquisa foram obtidos valores de η e Q_P ($80,70\%$ e $0,84\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente) $6,60\%$ e $37,70\%$ maiores que os máximos obtidos no presente trabalho. Por outro lado, ao se comparar os melhores resultados do presente estudo com os obtidos em condições de fermentação similares porém com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, tem-se que os valores de η e Q_P aqui obtidos foram $5,16\%$ e $1,67\%$ menores que os reportados por Arruda et al. (2011) ($79,61\%$ e $0,60\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente), enquanto que $4,92\%$ e $18,03\%$ maiores ao conseguidos por Marton et al. (2006) ($71,97\%$ e $0,50 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente).

Os máximos valores de η e Q_P obtidos no presente estudo com hidrolisado hemicelulósico de palha de cana podem ser comparados com os máximos valores relatados na literatura consultada quanto ao uso do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como meio de fermentação neste bioprocessos. O valor de η obtido no presente trabalho foi $16,69\%$ menor que máximo valor deste parâmetro entre os estudos consultados ($88,33\%$), o qual foi conseguido no trabalho de Carvalho et al. (2004), usando células imobilizadas em alginato de cálcio, fermentador de tanque agitado e parâmetros de fermentação otimizados, tais como concentração de xilose inicial, aeração, agitação, inóculo e pH inicial. No entanto, no estudo destes autores o valor de Q_P ($0,35 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi $74,29\%$ menor que o conseguido no presente trabalho. Por outro lado, o valor de Q_P atingido no

presente trabalho foi 42,62% menor que o máximo valor deste parâmetro entre os estudos consultados ($0,87 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), o qual foi obtido no trabalho de Silva et al. (1997) a partir da otimização dos parâmetros de aeração e agitação em reator de tanque agitado e operação em batelada. Entretanto, o valor de η no estudo destes autores (73,06%) foi 3,48% menor que o conseguido no presente trabalho.

Ao se comparar os melhores resultados do presente estudo com os obtidos com a mesma levedura, em condições de fermentação similares e matérias-primas diferentes às derivadas da cana-de-açúcar, destaca-se que os valores de η e Q_P obtidos no presente trabalho foram 57,70% e 215,79% maiores, respectivamente, que aos atingidos por Sene et al. (2011) usando hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo (48% e $0,19\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente). No estudo de Mussatto e Roberto (2008) foi empregado hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte e foram atingidos valores de η (73,06%) e Q_P ($0,51\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) 3,61% e 17,65% menores, respectivamente, que no presente trabalho. Por outro lado, os valores de η e Q_P obtidos no presente trabalho foram 4,36% e 1,64% menores que os reportados por Mussatto e Roberto (2005) utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não suplementado (79% e $0,62\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente).

5.4.3 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de glicerol e etanol.

O efeito da adição de co-substratos em diferentes concentrações ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 é também avaliado quanto à formação dos subprodutos etanol e glicerol, conforme apresentado nas Figuras 20 a 23.

Figura 20 - Produção de etanol ($\blacktriangle$) e glicerol ($\times$) por *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 21 - Produção de etanol ($\blacktriangle$) e glicerol ($\times$) por *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 22 - Produção de etanol ($\blacktriangle$) e glicerol ($\times$) por *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23 - Produção de etanol ($\blacktriangle$) e glicerol ($\times$) por *C. guilliermondii* FTI 20037, na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (gL^{-1}) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à produção de glicerol, verifica-se nestas figuras que não houve alteração nos perfis de formação deste subproduto independente da adição de co-substratos e suas concentrações ao ser comparado com a condição ausente destes. Em todos os experimentos se observou uma rápida produção de glicerol nas primeiras 8h de fermentação, tempo a partir do qual a concentração permaneceu invariável até o final da fermentação (Figuras 20 a 23).

Em relação à produção de etanol, destaca-se que a maior formação deste subproduto foi evidenciada quando se empregou o co-substrato sacarose, encontrando-se um aumento na sua produção em função do incremento da concentração de sacarose adicionada (Figura 21). O máximo valor de etanol entre todos os co-substratos avaliados ($9,42 \pm 0,39 \text{ gL}^{-1}$) ocorreu em 24h com a máxima concentração de sacarose ($15,0 \text{ gL}^{-1}$), sendo este valor 97,48% maior que o atingido na condição ausente de co-substratos neste mesmo tempo ($4,77 \pm 0,60 \text{ gL}^{-1}$). A utilização de maltose resultou em valores de etanol próximos aos obtidos nos experimentos com sacarose, porém em um tempo maior (48h). Similar ao relatado para os experimentos com sacarose, verifica-se na Figura 20 um aumento na produção de etanol em função do incremento na concentração de maltose adicionada, sendo que o maior valor neste caso ($7,66 \pm 0,51 \text{ gL}^{-1}$) foi obtido com a máxima concentração avaliada ($15,0 \text{ gL}^{-1}$) em 48h e foi 60,59% maior que o conseguido em ausência de co-substratos em 24h.

Considerando que nos experimentos com emprego de sacarose ou maltose como co-substratos a glicose foi esgotada nas primeiras 8h de fermentação e a maior proporção do fluxo de carbono proveniente da assimilação de xilose estava ficando acumulado como xilitol, conforme discutido previamente, é possível considerar que a produção de etanol a partir de 8h nestes casos foi suportada principalmente pelo consumo destes dissacarídeos e proporcional à velocidade com a qual estes estavam sendo assimilados. Aliado a este fato, pode ser destacado que a utilização de maltose e sacarose como co-substratos resultou em incrementos da produção de etanol superiores aos observados para o consumo de xilose em relação ao experimento em ausência de co-substratos. Por exemplo, no caso da condição com o melhor desempenho da levedura (sacarose 10gL^{-1}), o aumento na produção de etanol foi de 55% (ao se comparar as concentrações atingidas em 24h, Figura 21), enquanto que o incremento do consumo de xilose foi de 13,86% em relação ao meio ausente de co-substratos, conforme discutido previamente.

Essas considerações permitem sugerir a possibilidade de aprofundar na avaliação da influência do metabolismo de sacarose ou maltose sobre o de xilose. Para tanto podem ser estudadas as atividades de enzimas chaves deste bioprocessos, como Xilose Redutase, Xilitol Desidrogenase e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, bem como empregadas ferramentas de análise de fluxos metabólicos, com a finalidade de estabelecer principalmente a distribuição do fluxo de carbono proveniente da assimilação destes dissacarídeos entre as vias glicolíticas e PPP, e, conseqüentemente, seu impacto na regeneração do cofator NADPH e na assimilação de xilose. Além disto, estudos poderiam ser sugeridos visando a melhoria da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir do direcionamento do fluxo de carbono para a via PPP por modificação da composição do meio de fermentação, particularmente da fonte de nitrogênio empregada (FLORES et al., 2000), ou por ferramentas de engenharia metabólica, como superexpressão dos genes que codificam as enzimas Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e 6-Fosfogluconato Desidrogenase (AHMAD et al., 2012).

Por outro lado, é necessário salientar que nos experimentos com adição de maltose e sacarose após ser atingida a máxima concentração de etanol, esta diminuiu nas seguintes 24h, o que poderia corresponder ao consumo deste pela

levedura (Figura 20 e Figura 21). Já foi relatado por Hahn-Hägerdal et al. (1994) que durante a fermentação de xilose, o etanol pode ser concomitante produzido e reassimilado mediante sua oxidação a acetaldeído e posteriormente a acetato, o qual pode ser excretado, acumulado ou oxidado via ciclo de Krebs. Destaca-se que a oxidação do etanol durante sua assimilação causa um incremento no nível de NADH, podendo aumentar o desequilíbrio NADH/NAD⁺ e favorecer a produção de xilitol (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Por outro lado, já foi sugerido também que a oxidação de acetaldeído a acetato em leveduras poderia ser catalisada por uma acetaldeído desidrogenase dependente de NADP⁺ (GRANSTRÖM; LEISOLA, 2002), o qual contribuiria para a continua regeneração de NADPH e a atividade da XR.

Por último, em relação à produção de etanol nos experimentos com a utilização dos co-substratos celobiose e glicerol, verifica-se nas Figura 22 e Figura 23 que a formação deste produto foi similar à observada no experimento em ausência de co-substratos. Pode ser constatado também nestas figuras que a concentração de etanol se manteve relativamente estável desde 24h, diferente do observado no experimento controle e com os outros co-substratos avaliados (Figura 20 e Figura 21).

5.4.4 Efeito da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre os perfis de ácido acético e pH.

A influência da suplementação com diferentes co-substratos e concentrações ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o perfil de pH e consumo de ácido acético de *C. guilliermondii* FTI 20037, em comparação com a condição ausente de co-substratos é apresentada nas Figuras 24 a 27. Verifica-se nestas figuras que em todos os experimentos realizados a concentração do ácido acético remanescente no hidrolisado hemicelulósico após sua destoxificação diminuiu ao longo do tempo de fermentação. A redução no teor deste ácido esteve relacionada em todos os casos com um aumento no pH do meio de fermentação. Perfis de redução da concentração de ácido acético e aumento do pH já foram registrados por outros autores durante cultivo da mesma

levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, os quais indicaram que este ácido seria assimilado e metabolizado pela levedura (LIMA et al., 2004; SILVA et al., 2004). Além deste ácido ser fonte de carbono e energia ao se integrar no ciclo de Krebs, poderia ter favorecido a regeneração de NADPH, de maneira similar ao discutido previamente para o consumo de etanol (BRUINENBERG; VAN DIKJEN; SCHEFFERS, 1983; FLORES et al., 2000).

Figura 24 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato maltose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 25 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato sacarose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal

Figura 26 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato celobiose nas concentrações (g L^{-1}) de 5,0 (A), 10,0 (B) e 15,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 27 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do co-substrato glicerol nas concentrações (g L^{-1}) de 0,7 (A), 1,0 (B) e 1,5 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Destaca-se que o máximo consumo de ácido acético entre todos os co-substratos avaliados ($88,51 \pm 0,85\%$) foi observado com o emprego de celobiose em sua menor concentração ($5,0gL^{-1}$), conforme Figura 26 A, sendo este valor 11,23% maior que na condição ausente de co-substratos ($79,57 \pm 1,53\%$). O aumento da concentração de celobiose para $10,0gL^{-1}$ e $15,0gL^{-1}$ reduziu o consumo de ácido acético (Figura 26 A e C). Nestes experimentos não foram observadas mudanças nos perfis de pH quando comparado com a condição ausente de co-substratos (Figura 26).

Valores de consumo de ácido acético próximos aos obtidos com a adição de celobiose foram encontrados com a utilização de maltose, observando-se também uma diminuição no consumo deste ácido em função do incremento na concentração de maltose adicionada (Figura 24). Assim, o maior consumo de

ácido acético nos experimentos com maltose ($85,58 \pm 0,85\%$) foi obtido em sua menor concentração avaliada ($5,0\text{gL}^{-1}$), sendo este valor 7,55% maior que o conseguido em ausência de co-substratos. Constata-se neste caso que a redução no consumo de ácido acético com o aumento na concentração de maltose adicionada foi coerente com um menor incremento no pH do meio ao longo da fermentação (Figura 24).

No caso dos outros co-substratos avaliados, sacarose e glicerol, independente da concentração empregada observa-se que o consumo de ácido acético foi menor em comparação ao observado no experimento em ausência de co-substratos (Figura 25 e Figura 27). No caso dos experimentos com adição de sacarose, verifica-se na Figura 25 que o aumento na concentração adicionada desta resultou na redução do consumo de ácido acético e, coerentemente, no menor incremento do pH do meio. O maior consumo de ácido acético entre estes experimentos ($78,57 \pm 0,95\%$) ocorreu na menor concentração de sacarose empregada ($5,0\text{gL}^{-1}$), sendo este valor semelhante ao conseguido em ausência de co-substratos.

Por outro lado, quanto aos experimentos com adição de glicerol, o maior consumo de ácido acético ($77,14 \pm 2,89\%$) foi obtido com a menor concentração deste co-substrato ($0,7\text{gL}^{-1}$), conforme Figura 27 A, sendo este valor 3,15% menor que na condição ausente de co-substratos. O aumento nas concentrações de glicerol para $1,0\text{gL}^{-1}$ e $1,5\text{gL}^{-1}$ reduziu o consumo de ácido acético, entretanto, não se observou uma relação entre a diminuição deste consumo e o aumento da concentração deste poliol (Figura 27). Apesar das variações mencionadas no consumo de ácido acético, não houve diferenças nos perfis de pH em função da adição de glicerol em diferentes concentrações quando comparados com o experimento em ausência de co-substratos (Figura 27).

5.5 Estudo do efeito da adição do permeabilizante de membrana celular Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a bioconversão de xilose em xitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Foi estudado o efeito de um composto com capacidade de permeabilizante de membrana celular, o Dimetil-sulfóxido (DMSO), durante o cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, com o intuito de melhorar a bioconversão de xilose em xitol a partir do possível favorecimento da excreção de xitol. Na Figura 28 são apresentados os perfis de consumo de açúcares em função da concentração de DMSO adicionado ao meio de fermentação. Parâmetros fermentativos referentes ao consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037 nas condições avaliadas são apresentados na Tabela 10.

Figura 28 - Consumo de xilose (◆), glicose (●) e arabinose (X) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 10 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o consumo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Experimento	Concentração (% v/v)	Consumo de xilose (%) – 72h	Velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose ($r_{Smáx}$) (gL ⁻¹ h ⁻¹)
Controle	-	98,60 ± 0,14	1,01 ± 0,02 ^a
DMSO	2,5	94,82 ± 0,64	0,78 ± 0,01 ^a
	5,0	64,87 ± 2,70	0,52 ± 0,02 ^a
	10,0	15,90 ± 0,77	0,11 ± 0,04 ^b

a: 8-48h; b: 8-72h.

Como apresentado na Figura 28, a adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana resultou na redução do consumo de açúcares por *C. guilliermondii* FTI 20037 em comparação com a condição ausente deste permeabilizante, verificando-se o decréscimo deste consumo em função do incremento na concentração de DMSO adicionada. Como se observa na Tabela 10, o máximo consumo de xilose (94,82 ± 0,64%) ocorreu no meio com a menor concentração de DMSO (2,5% v/v), sendo este valor 3,99% inferior ao obtido na condição ausente deste (98,60 ± 0,14%). Destaca-se que nesta condição a velocidade volumétrica máxima de consumo de xilose ($r_{Smáx}$) foi atingida entre 8h e 48h, similar ao experimento ausente de DMSO, porém o valor obtido (0,78 ± 0,01 gL⁻¹h⁻¹) foi 29,49% menor que o atingido em ausência deste (1,01 ± 0,02 gL⁻¹h⁻¹) (Tabela 10). Por outro lado, constata-se nesta tabela que o aumento da concentração de DMSO adicionado de 2,5% (v/v) para 10,0% (v/v) causou uma diminuição 307,99% no consumo de xilose, uma vez que este foi de apenas 15,90 ± 0,77%, valor que foi 496,35% menor que o obtido em ausência de DMSO.

Quanto ao consumo de glicose, verifica-se o aumento do tempo de consumo desta hexose em função do incremento na concentração de DMSO adicionada, sendo que com a máxima concentração (10,0% v/v) esta foi esgotada em 72h (Figura 28). No caso da arabinose, nos experimentos com adição de 2,5% (v/v) e 5,0% (v/v) de DMSO não se verificou mudanças nos perfis de consumo desta pentose em relação com o experimento em ausência de DMSO (Figura 28 A e B). Por outro lado, quando se empregou DMSO na máxima concentração

avaliada (10,0% v/v) foi observado um aumento progressivo do teor de arabinose ao longo da fermentação (Figura 28 C).

Assim, de acordo com os resultados apresentados, a adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas concentrações avaliadas teve um impacto negativo no consumo de açúcares por *C. guilliermondii* FTI 20037. A este respeito, já foi reportado que a capacidade permeabilizante de membrana celular do DMSO pode gerar alterações ou perda de gradientes iônicos, o qual afeta sistemas de transporte de solutos dependente de gradientes eletroquímicos (SANTOS et al., 2003; GURTOVENKO; AMWAR, 2007), como é o caso do transporte da xilose mediante um sistema simporte com prótons (FLORES et al., 2000).

O efeito da adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, em comparação com a condição ausente deste permeabilizante, é apresentado na Figura 29. A Tabela 11 apresenta os principais parâmetros fermentativos calculados em relação ao crescimento celular.

Figura 29 - Produção de xilitol (■) e crescimento celular (◆) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 11 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre o crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037.

Experimento	Concentração (% v/v)	Biomassa celular formada (gL ⁻¹) – 72h
Controle	-	8,32 ± 0,08
DMSO	2,5	8,76 ± 1,23
	5,0	5,82 ± 0,81
	10,0	2,76 ± 0,29

De acordo com o apresentado na Figura 29, verifica-se que o crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi prejudicado em função da adição de DMSO ao meio de fermentação, observando-se uma redução na formação de biomassa celular com o incremento na concentração empregada deste permeabilizante. Este fato é coerente com a redução no consumo de açúcares em função do aumento da concentração de DMSO adicionada, conforme discutido previamente. Entretanto, verifica-se na Tabela 11 que na condição de menor concentração de DMSO (2,5% v/v) a biomassa celular formada (8,76 ± 1,23 gL⁻¹) foi 5,29% maior que na condição ausente deste (8,32 ± 0,08 gL⁻¹). Com o aumento na concentração de DMSO 2,5% (v/v) para 10,0% (v/v) a biomassa celular formada diminuiu 217,39% (2,76 ± 0,81 gL⁻¹), sendo este valor 201,45% menor que o obtido em ausência deste (Tabela 11).

A adição de DMSO em diferentes concentrações ao hidrolisado hemicelulósico resultou em alterações na morfologia celular da levedura, conforme apresentado na Figura 30. Verifica-se nesta figura o aumento no tamanho celular em função do incremento na concentração de DMSO adicionada. Este fato poderia ser devido à alteração de gradientes eletroquímicos na membrana em razão da capacidade permeabilizante de DMSO, conforme relatado por Santos et al. (2003) e Gurtovenko e Amwar (2007), o qual poderia afetar a capacidade da célula para manter a pressão de turgor, bem como facilitar o ingresso de água nas células. É importante salientar que não foi observada redução na viabilidade celular ao longo da fermentação em nenhuma das condições avaliadas (dados não apresentados), apesar da diminuição no

crescimento celular e alteração na morfologia celular em função do aumento na concentração de DMSO.

Figura 30 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas concentrações (% v/v) de 0 (A), 2,5 (B), 5,0 (C) e 10,0 (D) sobre a morfologia celular de *C. guilliermondii* FTI 20037.

Fonte: Arquivo pessoal (Aumento 10000X).

Em relação ao efeito da adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em diferentes concentrações sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, verifica-se na Figura 30 uma redução na capacidade de formação deste produto em função do aumento na concentração deste permeabilizante, sendo que não foi evidenciada produção de xilitol com a maior concentração avaliada (10,0% v/v). Na Tabela 12 são apresentados os principais parâmetros fermentativos referentes à produção de xilitol.

Tabela 12 - Efeito da adição de Dimetil-sulfóxido (DMSO) ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

	Concentração (%v/v)	Produção de xilitol (gL ⁻¹) - 72h	Produtividade volumétrica de xilitol (Q _P) (gL ⁻¹ h ⁻¹) – 72h	Eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (η) (%) – 72h
Controle	-	37,93 ± 0,80	0,57 ± 0,01	72,09 ± 1,03
	2,5	29,86 ± 1,39	0,46 ± 0,01	70,82 ± 1,46
DMSO	5,0	19,88 ± 0,20	0,30 ± 0,00	67,56 ± 0,64
	10,0	0,00	-	-

A partir dos dados apresentados na Tabela 12, verifica-se que a máxima de produção de xilitol ($29,86 \pm 1,39 \text{ gL}^{-1}$) foi obtida com a menor concentração de DMSO (2,5% v/v), sendo este valor 27,72% menor ao atingido na condição ausente deste ($37,93 \pm 0,80 \text{ gL}^{-1}$). Consequentemente, a produtividade volumétrica de xilitol (Q_P) neste experimento ($0,46 \pm 0,01 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi 23,91% menor à obtida no experimento ausente de DMSO ($0,57 \pm 0,01 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$). Entretanto, destaca-se que o perfil de produção de xilitol no meio contendo 2,5% (v/v) de DMSO foi similar ao observado na ausência deste permeabilizante (Figura 29). O aumento na concentração de DMSO de 2,5% (v/v) para 5,0% (v/v) resultou na redução de 50,20% na produção de xilitol ($19,88 \pm 0,20 \text{ gL}^{-1}$), sendo este valor 90,79% menor ao obtido em ausência de DMSO (Tabela 12). Consequentemente, a Q_P neste experimento ($0,30 \pm 0,00 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) foi 90% menor que o obtido em ausência de DMSO (Tabela 12).

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana nas concentrações avaliadas teve um impacto negativo na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Ao se associar este fato com os resultados obtidos quanto ao consumo de açúcares, particularmente xilose, pode ser afirmado que a principal causa para a redução na formação do xilitol foi a restrição no consumo do substrato, uma vez que a eficiência com a qual a xilose era convertida neste produto foi mantida em valores similares aos obtidos na condição ausente de DMSO (Tabela 12). Considerando

as pequenas diferenças na eficiência de bioconversão entre os experimentos com adição de DMSO e em ausência deste, estudos adicionais podem ser propostos para determinar se o emprego de concentrações menores de DMSO poderia acarretar em uma melhoria na produção de xilitol com menor interferência no consumo de xilose. Também estratégias de suplementação deste composto no hidrolisado em diferentes tempos de cultivo podem ser avaliadas.

O efeito da adição DMSO sobre o metabolismo de *C. guilliermondii* FTI 20037 cultivado em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana foi avaliado também quando à formação dos subprodutos etanol e glicerol, conforme apresentado na Figura 31.

Figura 31 - Produção de etanol (▲) e glicerol (■) por *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (- - -) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Quanto à produção de etanol, constata-se na Figura 31 A que não houve modificações no perfil de formação deste subproduto quando empregada a menor concentração de DMSO (2,5% v/v) em relação ao experimento em ausência deste. Com o incremento da concentração de DMSO para 5,0% (v/v), observa-se uma redução na concentração do etanol formado a partir de 24h até o final da fermentação, diferente do evidenciado em ausência deste permeabilizante (Figura 31 B). Este comportamento possivelmente foi devido a que o efeito permeabilizante do DMSO sobre a membrana celular favoreceu o ingresso de etanol na célula a favor do gradiente de concentração. Por outro lado, verifica-se na Figura 31 C que com a máxima concentração de DMSO (10,0% v/v), a produção de etanol foi consideravelmente reduzida, sendo atingida apenas uma

concentração máxima de $0,46\text{gL}^{-1}$ em 24h, a qual é aproximadamente 10 vezes menor à obtida em ausência deste permeabilizante ($4,77 \pm 0,60\text{ gL}^{-1}$).

Em relação à produção de glicerol, salienta-se que nas menores concentrações de DMSO avaliadas, 2,5% e 5,0% (v/v), o perfil foi similar ao observado no experimento em ausência deste permeabilizante (Figura 31 A e B), porém as concentrações atingidas em 8h em ambos casos ($0,85 \pm 0,02\text{ gL}^{-1}$) foram 28,23% menores à atingida no meio ausente deste ($1,09 \pm 0,04\text{ gL}^{-1}$). A utilização da máxima concentração de DMSO avaliada (10,0% v/v) resultou no aumento progressivo na concentração de glicerol no meio ao longo da fermentação, correspondente a um perfil diferente ao observado nos experimentos com menores concentrações e ausência deste composto (Figura 31 C). A redução na produção de glicerol nos experimentos com adição de DMSO pode ser associada com o menor consumo de substrato pela levedura, conforme discutido previamente. Também poderia ser devido ao comprometimento da capacidade de resposta ao estresse osmótico da levedura, efeito com o qual já foi relacionado a capacidade permeabilizante do DMSO (SANTOS et al., 2003; GURTOVENKO; AMWAR, 2007).

Na Figura 32 são apresentados os perfis de pH e consumo de ácido acético por *C. guilliermondii* FTI 20037 em função da presença de DMSO em diferentes concentrações no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Figura 32 - Consumo de ácido acético (◆) e perfil de pH (■) de *C. guilliermondii* FTI 20037 na presença (—) ou ausência (---) do permeabilizante de membrana celular DMSO nas concentrações (% v/v) de 2,5 (A), 5,0 (B) e 10,0 (C) no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Fonte: Arquivo pessoal.

Verifica-se nesta figura que o aumento da concentração de DMSO adicionada resultou na redução do consumo de ácido acético. Com o emprego da menor concentração de DMSO (2,5% v/v) o consumo deste ácido ($75,68 \pm 1,53\%$) foi 5,14% menor que na condição ausente deste permeabilizante ($79,57 \pm 1,53\%$), observando-se que os perfis deste consumo e de variação do pH foram similares nestes experimentos (Figura 32 A). O aumento da concentração de DMSO de 2,5% (v/v) para 5,0% (v/v) resultou na redução de 77,74% no consumo deste ácido ($42,58 \pm 7,64\%$), valor que foi 86,87% menor ao obtido em ausência deste permeabilizante. Destaca-se que no experimento com 5,0% (v/v) de DMSO o consumo de ácido acético foi evidente até 48h, sendo coerente com um leve incremento no pH do meio até esse tempo, seguido por sua diminuição (Figura 32 B). Por outro lado, no experimento com a máxima concentração de DMSO avaliada (10,0% v/v) o consumo de ácido acético foi observado apenas nas últimas 24h de fermentação, sendo coerente com a manutenção do pH constante até 48h, seguido por seu incremento (Figura 32 C). Nesta condição, o consumo de ácido acético (34,32%) foi 131,87% menor que no meio ausente de DMSO.

6. CONCLUSÕES

O estudo do aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol, visando a valorização e incorporação desta biomassa em uma biorrefinaria de cana-de-açúcar, permitiu as seguintes conclusões:

- O elevado conteúdo de hemicelulose da palha de cana, aliado à maior proporção de xilose no hidrolisado hemicelulósico em relação aos outros açúcares constituintes, tornam esta biomassa potencial matéria-prima para este bioprocessos.
- *C. guilliermondii* FTI 20037 foi capaz de produzir xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana não suplementado, entretanto, uma melhoria deste bioprocessos foi verificada pelo efeito da suplementação nutricional e do controle da disponibilidade inicial de oxigênio.
- A suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ favoreceu o consumo de xilose e produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em comparação com a adição só de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e sem suplementação nutricional. Por sua vez, a redução na disponibilidade inicial de oxigênio, mediante aumento no volume do meio de fermentação de 25mL para 50mL, resultou no incremento da eficiência de bioconversão de xilose em xilitol, porém diminuiu o consumo de xilose, afetando consequentemente a produtividade volumétrica de xilitol.
- O emprego de sacarose como co-substrato resultou no favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em comparação com a utilização dos outros co-substratos estudados (maltose, celobiose e glicerol) e da condição ausente destes, sendo que na concentração intermediária deste dissacarídeo (10gL^{-1}) foram obtidos os

máximos valores nos parâmetros referentes ao consumo de xilose e produção de xilitol.

- A adição ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana de Dimetil-sulfóxido (DMSO), composto com comprovada capacidade permeabilizante de membrana celular, não resultou no incremento da produção de xilitol, como era esperado, mas sim na diminuição no consumo de xilose e crescimento celular de *C. guilliermondii* FTI 20037.

Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana pode ser considerada uma rota de conversão bioquímica promissora para a valorização e integração desta biomassa em uma biorrefinaria. Além disto, no que se refere ao emprego de co-substratos neste bioprocessos, pode ser considerada a utilização de fontes complexas ricas em sacarose, como caldo ou melaço de cana, como suplementação nutricional do meio em adição ou substituição de outros compostos comumente empregados. Este fato possibilitaria a integração da produção biotecnológica de xilitol no setor sucroalcooleiro no contexto de biorrefinaria.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e visando dar continuidade aos estudos para a valorização e incorporação da palha de cana em uma biorrefinaria a partir da produção biotecnológica de xilitol, sugere-se:

- Aprofundar os estudos sobre a influência do metabolismo da sacarose sobre o da xilose em *C. guilliermondii* FTI 20037, mediante a avaliação da atividade de enzimas chaves, como a Xilose Redutase, Xilitol Desidrogenase e Glicose-6-Fosfato Desidrogenase, e a análise de fluxos metabólicos.
- Avaliar a ampliação de escala da produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico suplementado com sacarose, com particular interesse no controle da disponibilidade de oxigênio e na utilização de diversos modos de operação.
- Avaliar o aproveitamento de fontes complexas ricas em sacarose, como as derivadas do setor sucroalcooleiro (caldo e melaço de cana), como suplemento nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana para a produção biotecnológica de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.
- Estudar o efeito da adição de DMSO ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana em diferentes tempos de fermentação e em concentrações menores às avaliadas no presente trabalho sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

REFERÊNCIAS

AELING, K. A. et al. Co-fermentation of xylose and cellobiose by an engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, p. 1597 – 1604, 2012.

AHMAD, I. et al. Enhancement of xylitol production in *Candida tropicalis* by co-expression of two genes involved in pentose phosphate pathway. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 1 -2, p. 199 – 204, 2012.

AHMAD, I.; SHIM, W. Y.; KIM, J. H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 9, p. 1279 – 1284, 2013.

ALMEIDA, J. B. S. et al. Use of response surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the bioconversion of xylose into eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 78, p. 945 – 948, 2003.

ALMEIDA, J. R. M. et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.82, p.625 – 638, 2009.

ANTUÑA. B.; MARTÍNEZ-ANAYA, M. A. Sugar uptake and involved enzymatic activities by yeasts and lactic acid bacteria: their relationship with breadmaking quality. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, p. 191 – 200, 1993.

ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 58, n. 3, p. 274–278, 2009.

ARRUDA, P.V. et al. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, p. 815 – 822, 2011.

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

BAEZA, J.; FREER, J. Chemical characterization of wood and its components. Chapter 7. In: HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. (Eds.) **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2nd Edition. New York. Marcel Dekker Inc., 2001. p. 367.

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

BOZELL, J. Feedstocks for the future: biorefinery production of chemicals from renewable carbon. **Clean**, v. 36, n. 8, p. 641 – 647, 2008.

BRODELIUS, P.; NILSSON, K. Permeabilization of immobilized cell plants, resulting in release of intracellularly stored products with preserved cell viability. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 275 – 280, 1983.

BRUINENBERG, P.; VAN DIKJEN, J.; SCHEFFERS, A. A theoretical analysis of NADPH production and consumption in yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 129, p. 953 – 964, 1983.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA, J. B. S. Influence of medium composition on xylitol bioproduction from wheat Straw hemicellulosic hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 1087–1093, 2005.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. 2006.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass into Sustainable Products. Em: CHANDEL, A. (Ed). **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. Intech Open Access. 2013. p. 15 – 45. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/sustainable-degradation-of-lignocellulosic-biomass-techniques-applications-and-commercialization/bioconversion-of-hemicellulose-from-sugarcane-biomass-into-sustainable-products>. Acesso em: 14 fev 2014.

CAPAZ, R.; CARVALHO, V.; NOGUEIRA, L. Impact of mechanization and previous burning reduction on GHG emissions of sugarcane harvesting operations in Brazil. **Applied Energy**, v. 102, p. 220 – 288, 2013.

CARVALHO, W. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2135 – 2141, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Operational stability of the semi-continuous xylitol production from sugarcane bagasse in stirred reactor by Ca-alginate entrapped cells. **Journal of Biotechnology**, v. 136, p. S378, 2008.

CASTAÑÓN, J. F. et al. Continuous multistep versus fed-batch production of ethanol in a simulated medium of sugarcane bagasse hydrolysates. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, p. 96 – 107, 2015.

CHANDEL, A. et al. Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 11 – 20, 2012.

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

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-Açúcar**. Safra 2014/2015. Terceiro Levantamento. Brasília. 2014. 32p.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 82, p. 141 – 151, 1999.

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

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v.101, p.1858 – 1865, 2010.

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

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L. M. Aplicações do bagaço de cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, p. 1 – 13, 2012.

CUNHA, M. A. et al. Analysis of fractions and bio-oil of sugar cane straw by one-dimensional and two-dimensional gas chromatography with quadrupole mass spectrometry (GC × GC/qMS). **Microchemical Journal**, v. 110, p. 113 – 119, 2013.

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã**. 2014. 73p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

DECLÉIRE, M.; DE CAT, W.; VAN HUYNH, N. Comparison of various permeabilization treatments on *Kluyveromyces* by determining in situ β -galactosidase activity. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 9, p. 300 – 302. 1987.

DIAS, M.O.S. et al. Evaluation of process configurations for second generation integrated with first generation bioethanol production from sugarcane. **Fuel Processing Technology**, v. 109, p. 84 – 89, 2013.

FEHÉR, C.; MARTA, Z.; RÉCSEY, K. Process considerations of a biorefinery producing value-added products from corn fibre. **Periodica polytechnica Chemical Engineering**, v. 56, n. 1, p. 9 – 19, 2012.

FELIPE, M. G. A. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n.3, p. 171-177, 1995.

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

FELIPE, M. G. A. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1, p. 11–14, 1997b.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. Em: SAHA, B.; HAYASHI, K. (Eds.). **Lignocellulose biodegradation**. Washington D.C., American Chemical Society, 2004. p. 300 – 315.

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

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Yearbook. World Food and Agriculture. Part 3 – Feeding the world. Trends in crop sector**. Rome. Economic and Social Development Department, 2012. p. 182 – 197.

FRANCESCHIN, G. et al. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 631 – 640, 2011.

FREER, S. N.; GREENE, R. V. Transport of glucose and cellobiose by *Candida wickerhamii* and *Clavispora lusitaniae*. **The Journal of Biochemical Chemistry**, v. 265, n. 22, p. 12864 – 12868, 1990.

GABRA, M. et al. Evaluation of cyclone gasifier performance for gasification of sugar cane residue: part 2: gasification of cane trash. **Biomass and Bioenergy**, v. 21, p. 317 – 380, 2001.

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500 – 1503, 2009.

GRANSTRÖM, T.; LEISOLA, M. Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 511 – 516, 2002.

GRANSTRÖM, J.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.74, p.227 – 281, 2007.

GUO, C. et al. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 1096 – 1104, 2006.

GURTOVENKO, A. A.; AMWAR, J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 35, p. 10453 – 10460, 2007.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933 – 943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **TRENDS in Biotechnology**, v. 24, n. 12, p. 549 – 556, 2006.

HANCOCKS, N. H. **Optimisation of the preservation of microbial cell banks for enhanced fermentation process performance**. 2009. 231p. Thesis (Doctor on Chemical Engineering) - College of Engineering and Physical Sciences. University of Birmingham, 2009.

HOFTSETZ, K.; SILVA, M. Brazilian sugarcane bagasse: energy and non-energy consumption. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 564 – 573. 2012.

HOU-RUI, Z. Key drivers influencing the large scale production of xylitol. Chapter 12. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Ed). **D-Xylitol**. Fermentative production, application and commercialization. Berlin. Springer-Verlag, 2012, p. 267 – 290.

JEON, W. Y. et al. Effect of heterologous xylose transporter expression in *Candida tropicalis* on xylitol production rate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 6, p. 809 – 817, 2013.

JUTAKANOE, R. et al. Sugarcane leaves: pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 283-289, 2012.

KAPPLER, U.; HUSTON, W. M.; MCEWAN, A. G. Control of dimethylsulfoxide reductase expression in *Rhodobacter capsulatus*: the role of carbon metabolites and the response regulators DorR and RegA. **Microbiology**, v. 148, p. 605 – 614, 2002.

KARLGREN, S. et al. Conditional osmotic stress in yeast: a system to study transport through aquaglyceroporins and osmotic stress signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 8, p. 7186 – 7193, 2005.

KASTNER, J.; EITEMAN, M.; LEE, S. Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1663 – 1667, 2001.

KELLY, C. et al. Effect of furfural, vanillin and syringaldehydes on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, p. 97 – 108, 2008.

KIM, J.; RYU, Y.; SEO, J. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.181–186, 1999.

KLEIN, C. J. L. et al. Alleviation of glucose repression of maltose metabolism by *MIG1* disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4441 – 4449. 1996.

KO, B. S.; KIM, J.; KIM, J. H. Production of xylitol from D-xylose by a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 6, p. 4207 – 4213, 2006.

KRALLISH, I. et al. Effect of xylitol and trehalose on dry resistance of yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 47, p. 447 – 451, 1997.

KRISHNAN, C. et al. Alkali-based AFEX pretreatment for the conversion of sugarcane bagasse and cane leaf residues to ethanol. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 107, n. 3. p. 441 – 450, 2010.

KURTZMAN, C.; SUZUKI, M. *Meyerozyma guilliermondii* (Wickerham). In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study**. 5th Edition. Amsterdam. Elsevier B.V, 2011. p. 622 – 624.

LAGO, A. et al. Sugarcane as a carbon source: the Brazilian case. **Biomass and Bioenergy**, v. 46. p. 5 – 12, 2012.

LANDELL, M. G. A. et al. Residual biomass potential of commercial and pre-commercial sugarcane cultivars. **Scentia Agricola**, v. 70, n. 5, p. 299 – 304, 2013.

LEAL, M. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 11 – 19, 2013.

LEMOES, S.V. et al. Economic efficiency of two baling systems for sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 55, p. 97 – 101, 2014.

LI, Z. et al. Direct and efficient xylitol production from xylan by *Saccharomyces cerevisiae* through transcriptional level and fermentation processing optimizations. **Bioresource Technology**, v. 149. p. 413 – 419, 2013.

LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, p. 734-738, 2004.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449 – 467, 2012.

MARTÍNEZ, E. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by CSTR fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 633-641, 2000.

MARTÍNEZ, E. A. et al. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1677 – 1683, 2003.

MARTON, J.M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.9 - 21, 2006.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 522 – 550, 2012.

MESA-PÉREZ, J. M. et al. Fast oxidative pyrolysis of sugar cane straw in a fluidized bed reactor. **Applied Thermal Engineering**, v. 56, p. 167 – 175, 2013.

MORAES, M. S. A. et al. Analysis of products from pyrolysis of Brazilian sugar cane straw. **Fuel Processing Technology**, v. 101, p. 35 – 43, 2012.

MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 751 – 759, 2000

MOUTTA, R. O. et al. Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar Tech**, v. 14, p. 53-60, 2012.

MÜLLER, J. A.; DASSARMA, S. Genomic analysis of anaerobic respiration in the archaeon *Halobacterium* sp. strain nrc-1: dimethyl sulfoxide and trimethylamine *n*-oxide as terminal electron acceptors. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 5, p. 1659 – 1667, 2005.

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

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

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 497 – 502. 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 540-546, 2008.

MUSSATTO, S. I. Application of xylitol on food formulations and benefits for health. Chapter 14. Em: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Ed). **D-Xylitol**. Fermentative production, application and commercialization. Berlin. Springer-Verlag, 2012. p. 309 – 324.

OH, E. et al. Enhanced xylitol production through simultaneous co-utilization of cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 15, p. 226 – 234, 2013.

OLIVEIRA, F.M.V. et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130. p. 168 – 173, 2013.

OLIVEIRA, L.R.M. et al. Combined process system for the production of bioethanol from sugarcane straw. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 1 – 7, 2014.

PAL, S. et al. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 147, p. 449 – 455, 2013.

PAPON, N. et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 73 – 90, 2013.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 7, p. 599 – 604, 1997.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191 – 201, 1998.

PARR, A.J.; ROBINS, R.J.; RHODES, M.J.C. Permeabilization of *Cinchona ledgeriana* cells by dimethylsulphoxide. Effects on alkaloid release and long-term membrane integrity. **Plant Cell Reports**, v. 3, p. 262 – 265, 1984.

PASCUAL, C.; HERRERA, L. Use of permeabilized yeast cells as a system of enzyme immobilization. Its use for the preparation of Mannose 6-Phosphate. **Folia microbiológica**, v. 26, p. 103 – 106, 1981.

PÉREZ-BIBBINS, B. et al. Study of the potential of the air lift bioreactor for xylitol production in batelada alimentada cultures by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 1, p. 151 – 161, 2014.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, p. 291 – 297, 1997.

PIEROSSI, M.; FAGUNDES, S. **Tecnologias para aproveitamento da palha**. Centro de Tecnologia Canavieira. 2012. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Acucar_e_alcool/22RO/Append_Tecnologia_aproveitamento_Palha.pdf. Acesso em: 23 fev 2014.

PING, Y. et al. Xylitol production from non-detoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 86 – 91, 2013.

PIPPO, W. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: current situation and Environmental Aspects. **Waste Biomass Valor**, v. 2, p. 1 – 16, 2011.

RAVELLA, S. R. et al. Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends. Chapter 12. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. (Ed). **D-Xylitol**. Fermentative production, application and commercialization. Berlin. Springer-Verlag, 2012. p. 267 – 290.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Kinetics of xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* grown in rice straw hemicellulose hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77 - 79, p. 205 – 210 1999.

RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues: evaluation of bioprocesses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 869-875, 1998.

RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production for sugar cane bagasse hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 6, p. 359 – 363, 1999.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 299 – 311, 2001.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1231-1237, 2003.

SAITOH, S. et al. Co-fermentation of cellobiose and xylose using beta-glucosidase displaying diploid industrial yeast strain OC-2. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1975 – 1982, 2010.

SAKA, S. Chemical composition and distribution. Chapter 2. In: HON, D.N.S.; SHIRAISHI, N. (Eds.) **Wood and Cellulosic Chemistry**. 2nd Edition. New York. Marcel Dekker Inc., 2001. p. 72.

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

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p. 1035 – 1041, 2003.

SANTOS, R. O. et al. *Candida queiroziae* sp. nov., a cellobiose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Atlantic Rain Forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 635-642, 2011.

SANTOS, F. A. et al. Otimização do pré-tratamento hidrotérmico da palha de cana-de-açúcar visando à produção de etanol celulósico. **Química Nova**, v. 37, n. 1, p. 56 - 62, 2014.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Evaluation of the performance of a three-phase fluidized bed reactor with immobilized yeast cells for biotechnological production of xylitol. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, p. 1 – 15, 2008.

SARROUH, B.; SILVA, S. S. Reated batelada cell-immobilized system for the biotechnological production of xylitol as a renewable green sweetener. **Applied Biochemical and Biotechnology**, v. 169, p. 2101 – 2110, 2013.

SEABRA, J. et al. A techno-economic evaluation of the effects of centralized cellulosic ethanol and co-products refinery options with sugarcane mill clustering. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1065 – 1078, 2010.

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

SENE, L. et al. Metabolic study of the adaptation of the yeast *Candida guilliermondii* to sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnolgy**, v.57. p. 738 – 743, 2001.

SENE, L. et al. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 1142-1146, 2011.

SERRANO, R. Energy requirements for maltose transport in yeast. **European Journal of Biochemistry**, v. 80, p. 97 – 102, 1977.

SIBIRNY, A. A.; BORETSKY, Y. R. *Pichia guilliermondii*. Chapter 6. Em: SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. (Eds.). **Yeast Biotechnology: diversity and applications**. Springer Science + Bussiness Media B. V. 2009. p. 113 – 134.

SILVA, S. S. et al. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-69, p. 557-564, 1997.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis ox xylitol by xylose-fermenting yeasts. A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70 – 72, p. 331 – 339, 1998.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of the conditions used in the preparation of sugarcane bagasse hydrolysate for improvement of the xylitol production by fermentative process.. Em: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 2003, Florianópolis/ SC. **Anais do XIV SINAFERM**, 2003.

SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid in bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248 – 254, 2004.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n.7, p.1294–1300, 2006.

SILVA, G. P.; MACK, M.; CONTIERO, J. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 30 – 39, 2009.

SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7402 – 7409, 2010.

SILVA, S.S.; CHANDEL, A.K. **D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization**. Berlin. Springer-Verlag, 2012. 345p.

SINDHU, R. et al. Dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of sugarcane tops for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 10915 – 10921, 2011.

SIRISANSANEEYAKUL, S. et al. Sodium benzoate stimulates xylitol production by *Candida mogii*. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 3, p. 734 – 743, 2014.

SU, B. et al. Metabolic engineering strategies for improving xylitol production from hemicellulosic sugars. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 11, p. 1781 – 1789, 2013.

TAVARES, J. M. et al. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 743 – 747, 2000.

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

TAMBURINI, E. et al. Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p.352 – 359, 2010.

VERDUYN, C. et al. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**, v. 8, p. 501 – 517, 1992.

WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 213 – 220.

WERPY, T.; PETERSON, G. **Top value added chemicals from biomass. Volume I – Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas**. U.S. Department of Energy. Energy Efficiency and Renewable Energy. 2004.

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

YOKOI, H.; MAKI, R.; HIROSE, J.; HAYASHI, S. Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes. **Biomass and Bioenergy**, v. 22, p. 389 – 395, 2002.

ZHA, J. et al. Optimization of *CDT-1* and *XYL1* expression for balanced co-production of ethanol and xylitol from cellobiose and xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **PLOS one**, v. 8, n. 7, p. 1 – 8, 2013.

ZHANG, Y. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 367 – 375, 2008.

ZHANG, J. et al. Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 192 – 201, 2014.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Parâmetros adicionais referentes à produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI – 20037 em função da adição de co-substratos em diferentes concentrações ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Nesta seção se encontram os valores dos parâmetros velocidade volumétrica máxima de produção de xilitol e eficiência máxima de bioconversão de xilose em xilitol, calculados em função da adição em diferentes concentrações dos co-substratos maltose, sacarose, celobiose e glicerol no hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Tabela A – Velocidade volumétrica máxima de produção de xilitol e eficiência máxima de bioconversão de xilose em xilitol em função da adição de co-substratos ao hidrolisado hemicelulósico de palha de cana.

Co-substrato	Concentração (gL ⁻¹)	Velocidade volumétrica máxima de produção de xilitol ($Q_{Pmáx}$) (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Eficiência máxima de bioconversão de xilose em xilitol ($\eta_{máx}$) (%)
Controle	-	0,75 ± 0,01 ^a	76,55 ± 2,14 ^b
Maltose	5,0	0,74 ± 0,02 ^a	80,33 ± 1,46 ^b
	10,0	0,71 ± 0,03 ^a	76,21 ± 2,72 ^b
	15,0	0,66 ± 0,02 ^a	74,15 ± 5,83 ^b
Sacarose	5,0	0,67 ± 0,04 ^c	65,22 ± 0,59 ^d
	10,0	0,78 ± 0,01 ^a	75,70 ± 0,73 ^d
	15,0	0,69 ± 0,01 ^a	70,03 ± 2,91 ^d
Celobiose	5,0	0,67 ± 0,02 ^a	74,84 ± 6,21 ^a
	10,0	0,70 ± 0,03 ^a	74,67 ± 3,64 ^a
	15,0	0,75 ± 0,03 ^a	78,27 ± 2,06 ^a
Glicerol	0,7	0,79 ± 0,02 ^a	74,49 ± 3,90 ^a
	1,0	0,80 ± 0,02 ^a	82,39 ± 2,91 ^a
	1,5	0,83 ± 0,09 ^a	77,93 ± 4,16 ^b

a = 8-48h; b = 8-72h; c = 0-48h; d=0-72