UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

KELLY JOHANA DUSSÁN MEDINA

Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces* (*Pichia*) stipitis NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético

> Lorena-SP-Brasil 2013

KELLY JOHANA DUSSÁN MEDINA

Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva Co-Orientador: Prof. Dr. Víctor Haber Pérez

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP-Brasil Agosto, 2013 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

> Catalogação na Publicação Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite" Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Dussán, Kelly Johana

Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético / Kelly Johana Dussán. –ed. reimpr., corr. – 2013.

171 p.: il.

Tese (Doutora em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2013.

Orientador: Silvio Silvério da Silva Co-orientador: Victor Haber Pérez

1. Etanol 2. *Scheffersomyces stipitis* 3. *Candida shehatae* 4. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 5. Fermentação 6. Campo eletromagnético. I. Título. II. Silva, Silvio Silvério da, orient. III. Pérez, Victor Haber, co-orient.

CDU 662.636

662.636 - CDU

A toda mi familia que aunque estén lejos siempre están presentes en mi corazón.

A mi mamá y mi hermano como ejemplo de fuerza, amor, responsabilidad y por el apoyo y estímulo en todos los momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, por ter me dado à oportunidade de cursar o doutorado no Brasil sob sua orientação e pela confiança e apoio que contribuíram profundamente para minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. Dr. Victor Haber Perez por ter sugerido para mim o Brasil como uma oportunidade de fazer o doutorado e pelo apoio e confiança que contribuíram para minha formação profissional.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo N° 2011/01226-7), à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado de Rio Janeiro – FAPERJ e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia (LOT), em especial à Dr^a. Maria das Graças de Almeida Felipe, Dr^a. Inês Conceição Roberto e Dr. Arnaldo Marcio Prata pela dedicação, amizade e apoio.

Aos técnicos do laboratório por sempre estarem presentes para me auxiliar no meu trabalho.

Às queridas e atenciosas Sandra, Cida e Bia pelo apoio e auxílio.

A minhas queridas amigas Raquel, Ellen, Débora e em especial a Adriana por toda a compreensão, paciência, apoio e carinho. Porque graças a elas tenho minha segunda família no Brasil.

Marly, Deize, Andreia, Lilian, Beto, Aron, Alec e meu quase irmãozinho Felipe, em fim a todos os Dilon, que me acolheram com muito carinho em sua família.

Aos colegas e amigos com os quais compartilhei meus dias de trabalho: Eduardo Machado, Bruna Karadi, Samira, Rafael, Sabrina, Danielle, Juliana, Mauricio, Otavio, Paulo, Bruna Caroline, Ivy, Patricia Miléo, Luciana Chaud, Priscila Vaz, Bruno Guedes, Rafael Cunha, Flavio, Juan Daniel, Brunosideo e a minha amiga equatoriana Cris.

A meus novos amigos da UENF: Geraldo, Patrícia Rodrigues, Diana Catalina, Wanessa e Renê Lemos.

Ao Departamento de Biotecnologia – DEBIQ – EEL da Universidade de São Paulo - USP, pela oportunidade da realização do Doutorado.

BIOGRAFIA

Kelly Johana Dussán Medina nasceu em 20 de maio de 1983, em Neiva/Huila Colômbia, onde viveu até 1999.

Em 2000 ingressou no curso de Engenharia Química da Universidade Nacional de Colômbia sede Manizales obtendo o título em 2005. Neste período, durante um ano, desenvolveu atividades em nível de iniciação científica.

Em 2005 iniciou seus estudos de pós-graduação, em nível de mestrado, na mesma universidade, na área de nanotecnologia e produção de biocombustíveis, obtendo o título de Mestre em Engenharia Química em 2008. No período de 2008 a 2009 teve a oportunidade de trabalhar como pesquisadora na Universidade Católica de Manizales, Universidade Nacional de Colômbia e na Empresa Soluciones Microbianos Del Tropico.

Em 2010, deu continuidade aos estudos de pós-graduação, em nível de doutorado, ingressando no programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena – EEL/USP. Neste, focou seus estudos na área de Microbiologia Industrial e Fermentações, estudando os parâmetros fermentativos envolvidos no processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos em biorreatores.

"Tenha sempre em mente que a sua resolução de atingir o sucesso é mais importante do que qualquer coisa"

(Abraham Lincoln)

RESUMO

DUSSÁN, K. J. Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético. 2013. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Atualmente é grande o interesse pelo aproveitamento da biomassa vegetal visando à obtenção de bioetanol de segunda geração. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-acúcar pelas leveduras Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124 e Candida shehatae UFMG HM 52.2 visando à aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético. Salienta-se ainda que a importância do presente trabalho se dá, não apenas pelo caráter inovador desta pesquisa, mas também pelo fato do bioeletromagnetismo e particularmente biorreatores assistidos por campos eletromagnéticos constituírem uma recente e promissora área de pesquisa na biotecnologia onde é possível estudar alternativas que resultem no aumento do rendimento e/ou da produtividade do processo de fermentação. Numa primeira etapa, foram realizados experimentos em bateladas simples em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-acúcar previamente destoxificado e suplementado com extrato de levedura para a avaliação da influência das variáveis pH_{inicial}, agitação e vazão de ar no fator de conversão de açúcares em etanol para cada uma das leveduras, de acordo com um planejamento fatorial completo 2³ com três repetições no ponto central. As melhores condições operacionais obtidas para a levedura S. stipitis NRRL Y-7124 foram 100 rpm, 0,7 vvm e pH_{inicial} de 6,50 com um k_La_{inicial} de 3 h⁻¹ as quais exerceram uma influência positiva sobre o processo fermentativo, obtendo-se valores de $Y_{P/S}$ de 0,16 g/g e Q_P de 0,10 g L¹ h¹. Para a levedura *C. shehatae* UFMG HM 52.2 as condições foram 100 rpm, 0,1 vvm e pH_{inicial} de 6,50 com um k_La_{inicial} de 0,2 h⁻¹ obtendo-se valores de Y_{P/S} de 0,44 g/g e Q_P de 0,25 g L⁻¹ h⁻¹. Segundo os resultados obtidos, observou-se que a levedura C. shehatae apresentou maiores valores de fator de rendimento e produtividade em etanol guando comparados à levedura S. stipitis. Posteriormente, foi avaliada a influência da configuração do campo eletromagnético no processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando a levedura C. shehatae imobilizada em polímero com propriedades magnéticas. Os resultados da influência das configurações do campo eletromagnético (axial e transveral) foram positivos observando-se aumento de 47 % na produção de etanol (configuração axial) em relação ao experimento controle (sem campo). Este estudo demonstrou que a levedura C. shehatae UFMG HM 52.2 apresentou-se com melhor performance fermentativa no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar quando comparada à levedura S. stipitis e que os campos eletromagnéticos são uma tecnologia promissora no processo de obtenção de bietanol.

Palavras-chave: Etanol. *Scheffersomyces stipitis. Candida shehatae*. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Fermentação. Campos eletromagnéticos.

ABSTRACT

DUSSÁN, K. J. Bioethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by Scheffersomyces (Pichia) stipitis NRRL Y-7124 and Candida shehatae UFMG HM 52.2 yeasts aiming at application in bioprocesses with electromagnetic field. 2013. 171 p. Thesis (Doctor of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Currently the use of biomass is of huge interest into the second generation bioethanol process. Into this field, fermentation is a key process with numerous opportunities for innovation. Electromagnetic fields bioreactors stand for a new and promising research area for the yield and/or productivity improvement of fermentation process. This study focused on the utilization of hemicellulose hydrolysate from sugarcane bagasse for ethanol production by *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 and *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 strains intended to be applied in the electromagnetic-based bioprocesses.

A 2³ full factorial Central Composite Design (CCD), including three replications at the center point was applied to evaluate the effect of initial pH, agitation and airflow rate on sugars to ethanol conversion for both strains. The experiments were carried out using stirred tank batch fermentor with medium supplemented with yeast extract and containing hemicellulose hydrolysate previously detoxified. S. stipitis showed the best ethanol production operating conditions obtained at 100 rpm, 0.7 vvm and initial pH 6.50 with $k_{L}a_{inicial}$ of 3 h⁻¹ obtaining $Y_{P/S}$ of 0.16 g/g and Q_P of 0.10 g L⁻¹ h⁻¹. For C. shehatae, the best conditions of 100 rpm, 0.1 vvm and $pH_{initial}$ of 6.50 with $k_{L}a_{inicial}$ of 0.2 h^{-1} obtained $Y_{P/S}$ of 0.44 g/g and Q_{P} of 0.25 g L⁻¹ h⁻¹. The results showed that yield and ethanol productivity for C. shehatae strain was higher comparing to S. stipitis. Subsequently, the influence of electromagnetic field configuration in the fermentation process of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate was evaluated using immobilized C. shehatae in a polymer with magnetic properties. The application of electromagnetic field configuration (axial and transversal) favored the ethanol production, observing at increase of 47 % in ethanol production (axial configuration) compared to the control experiment (no electromagnetic field). The present study demonstrated that C. shehatae yeast shows high fermentative potential for sugarcane hemicellulose hydrolyzate when compared to S. stipitis strain, and that electromagnetic fields are a promising technology tool to be used into the bioethanol process.

Keywords: Ethanol. *Scheffersomyces stipitis. Candida shehatae.* Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolyzate. Fermentation. Electromagnetic fields.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Fluxograma simplificado do processo para a obtenção de bioetanol de 1ª e 2ª
geração. Adaptado de Quintero et al. (2011)35
Figura 2.2 Processos para a obtenção de etanol com diferentes matérias-primas.
Adaptado de Quintero et al. (2011)
Figura 2.3 Representação esquemática do suporte principal da hemicelulose das plantas.
Adaptado de Harmsen et al. (2009)
Figura 2.4 Estrutura de uma molécula de celulose. Adaptado de Harmsen et al. (2009) 40
Figura 2.5 Demonstração das pontes de hidrogênio que permitem o arranjo paralelo das
cadeias do polímero da celulose. Adaptado de Harmsen et al. (2009)
Figura 2.6 Formação de micro e macrofibrilias (fibras) da celulose e sua posição na
parede celular. Adaptado de Harmsen et al. (2009)41
Figura 2.7 Álcoois p-cumaril (1), coniferil (2) e sinapil (3): blocos dominantes na lignina
tridimensional. Adaptado de Quintero et al. (2011)43
Figura 2.8 Estrutura da lignina. Adaptado de Quintero et al. (2011)
Figura 2.9 (a) Opções de processos de hidrólise do material lignocelulósico (b)
Composição típica dos sólidos poliméricos depois do pré-tratamento em função do pH.
Adaptado de Carvalheiro et al. (2008)52
Figura 2.10 Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos.
Adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b)53
Figura 2.11 Esquema do metabolismo de D-xilose e L-arabinose a etanol. Os números
destacados representam as enzimas da via metabólica. 1- aldose/xilose redutase; 2- L-
arabinitol 4-desidrogenase; 3- L-xilulose redutase; 4- xilitol desidrogenase; 5- xilose
isomerase; 6-xiluloquinase; 7- L-rabinose isomerase; 8- L-ribulocibase; 9- L-rubulose-5-
fosfato 4-epimerase; G-3-P-gliceraldeído-3-fosfato; PPP – via das fosfopentoses.
Adaptado de van Maris et al. (2006)66

Figura 2.12 Esquema do tubo do reator de fermentação com 10 imãs fixados opostos
diametralmente. Adaptado de Muniz et al. (2007) 76
Figura 2.13 Classificação geral dos biorreatores. Adaptado de Schmidell et al. (2001) 78
Figura 4.1 Biorreator agitado - STR empregado no processo de obtenção de etanol a
partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras S.
stipitis e C. shehatae
Figura 4.2 Fotografia do equipamento utilizado para a imobilização das células em gel de
alginato de cálcio-Fe ₃ O ₄ 89
Figura 4.3 Biorreator de leito fluidizado com campo eletromagnético. (a) Sistema
transversal (b) Sistema axial
Figura 4.4 Fluxograma da metodologia empregada no trabalho. BS: Bagaço seco, EL:
Extrato de levedura, FBR: Bioreator de leito fluidizado e FBR/M: Biorreator de leito
fluidizado com campo eletromagnético 97
Figura 5.1 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a
fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S. stipitis para os
experimentos 1 ao 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2 ³ (Tabela 4.2) para
o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH _{inicial}
Figura 5.2 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a
fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S. stipitis para os
experimentos 5 ao 8 de acordo com o planejamento fatorial completo 2 ³ (Tabela 4.2) para
o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH _{inicial}
Figura 5.3 Concentração de de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲)
durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S.
stipitis para os experimentos 9 ao 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2 ³
(Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH _{inicial}

Figura 5.5 Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: fator de conversão de acúcares em etanol (a) e produtividade em etanol (b) de acordo o planejamento fatorial 2³ completo com 3 Figura 5.6 Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona o fator de conversão de açúcares em etanol com a agitação e pH_{inicial}, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável aeração (vvm) foi fixada no nível zero (0,4 vvm)....... 119 **Figura 5.7** Diagrama de cubo que mostra a produtividade em etanol (Q_P) estimada para Figura 5.8 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 1 ao 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) Figura 5.9 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 5 ao 8 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) Figura 5.10 Concentração de acúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 9 ao 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial} 127 Figura 5.11 Produção de xilitol no processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por C. shehatae de acordo com o planejamento

Figura 5.17 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pelas levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propriedades magnéticas para os experimentos 1 ao 3 (Tabela 5.23).

Figura 5.20 Concentração de açúcares (•), células (•) e produção de etanol (\blacktriangle) durante a fermentação em biorreator de leito fluidizado sob efeitos de campo eletromagnético do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propriedades magnéticas para os experimentos 1 ao 4 (Tabela 5.24) 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Composição lignocelulósica em várias fontes em base seca (Sun e Cheng,
2002)
Tabela 2.2 Pré-tratamentos que podem ser aplicados aos materiais lignocelulósicos 48
Tabela 2.3 Métodos de destoxificação para hidrolisados hemicelulósicos
Tabela 2.4 Micro-organismos produtores de etanol 63
Tabela 2.5 Diferentes processos biotecnológicos conduzidos sob o efeito de campos
magnéticos. Adaptado de David (2012)73
Tabela 4.1 Codificação dos níveis para as variáveis agitação, aeração e p H_{inicial} na
produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
Tabela 4.2 Matriz do planejamento fatorial 2 ³ com três retições no ponto central para o
estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH _{inicial} na produção de etanol a
partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar
Tabela 5.1 Caracterização química do bagaço de cana de açúcar "in natura" e celulignina
Tabela 5.2 Comparação química percentual do bagaço de cana-de-açúcar
Tabela 5.3 Características do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.
Tabela 5.4 Matriz do planejamento fatorial 2 ³ com três repetições no ponto central para
estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH _{inicial} na produção de etanol a
partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S. stipitis
Tabela 5.5 Estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH _{inicial} na
fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura
S. stipitis sob os parâmetros fermentativos

Tabela 5.6 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a
conversão de xilose em etanol (Y _{P/S}) 114
Tabela 5.7 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a
produtividade em etanol (Q_P)
Tabela 5.8 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o
fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), desprezando a curvatura 116
Tabela 5.9 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a
produtividade em etanol (Q_P), desprezando a curvatura
Tabela 5.10 Análise de variância da regressão para o modelo representativo do fator de
conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), obtido com base nos termos significativos 117
Tabela 5.11 Análise de variância da regressão para o modelo representativo da
produtividade em etanol (Q_P), obtido com base nos termos significativos 118
Tabela 5.12 Resultados da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos obtidos de
diferentes materiais lignocelulósicos por <i>S. stipitis</i> 122
Tabela 5.13 Matriz do planejamento fatorial 2 ³ com três repetições no ponto central para
estudo da influência das variáveis: agitação, vazão de ar e pH _{inicial} na produção de etanol
a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C.
shehatae
Tabela 5.14 Estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH _{inicial} na
fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura
C. shehatae sob os parâmetros fermentativos
Tabela 5.15 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre
o fator de conversão de açúcares em etanol (Y _{P/S}) 134
Tabela 5.16 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre
a produtividade em etanol (Q_P)
Tabela 5.17 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre
o fator de conversão de açúcares em etanol (Y _{P/S}), desprezando a curvatura

Tabela 5.18 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre Tabela 5.19 Análise de variância da regressão para o modelo representativo do fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}), obtido com base nos termos significativos. ... 137 Tabela 5.20 Análise de variância da regressão para o modelo representativo da Tabela 5.21 Resultados da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos obtidos de Tabela 5.22 Análise comparativa da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras S. stipitis e C. shehatae. Condições: 100 rpm, **Tabela 5.23** Estudo da influência do conteúdo de partículas magnéticas (Fe₃O₄) nos parâmetros fermentativos na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura C. shehatae imobilizada em polímero com propriedades magnéticas. Tempo de fermentação 96 h, Temperatura: 30°C e 150 rpm. **Tabela 5.24** Estudo da influência das linhas de campo eletromagnético nos parâmetros fermentativos na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando a levedura C. shehatae imobilizada em polímero com

SUMARIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	34
2.1 BIOETANOL	34
2.1.1 MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL	34
2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	36
2.2.1 COMPOSIÇÃO DOS MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS	36
2.2.1.1 HEMICELULOSE	38
2.2.1.2 CELULOSE	39
2.2.1.3 LIGNINA	42
2.3 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOETANOL: BAGAÇO DE CANA	44
2.4 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR DO BAGAÇO DE CANA	46
2.4.1 Pré-tratamento do bagaço de cana	46
2.4.2 COMPOSTOS INIBIDORES PRESENTES NO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	53
2.4.3 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	55
2.4.4 MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL	60
2.4.5 METABOLISMO DE XILOSE EM LEVEDURAS	65
2.4.6 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOCONVERSÃO DE PENTOSES EM ETANOL	68
2.4.7 INFLUÊNCIA DOS CAMPOS ELETROMAGNÉTICOS EM CÉLULAS MICROBIANAS	70
2.4.8 BIORREATORES UTILIZADOS NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	77
3. OBJETIVOS	79
4. MATERIAL E MÉTODOS	80

4.1	MATÉRIA-PRIMA E PREPARO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	80
4.1.1	Matéria-prima	80
4.1.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	80
4.1.3	Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar	83
4.1.4	Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	83
4.1.5	DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR CONCENTRADO	83
4.2	PROCESSO FERMENTATIVO PARA AVALIAR E COMPARAR A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO	כ
PELAS	LEVEDURAS EM ESTUDO	84
4.2.1	Micro-organismos	84
4.2.2	MANUTENÇÃO DAS LEVEDURAS	84
4.2.3	Preparo do inóculo	85
4.2.4	EFEITO DA AGITAÇÃO, VAZÃO DE AR E PH _{inicial} na produção de etanol em biorreator agitado —	
	STR	85
4.2.5	Síntese das partículas magnéticas	88
4.2.6	ÎMOBILIZAÇÃO DAS CÉLULAS EM ALGINATO DE SÓDIO	88
4.2.7	TESTES DE FERMENTAÇÃO PARA AVALIAR A INFLUÊNCIA DAS PARTÍCULAS MAGNÉTICAS NO PROCESSO DE	
IMOBI	LIZAÇÃO	90
4.2.8	Fermentação do hidrolisado hemicelulósico em biorreator de leito fluidizado assistido po	R
CAMP	O ELETROMAGNÉTICO	90
4.3	Métodos Analíticos	92
4.3.1	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR	92
4.3.2	DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES, ÁCIDO ACÉTICO, ETANOL, FURFURAL E 5-	
HIDRO	XIMETILFURFURAL	92
4.3.3	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS	93
4.3.4	CÁLCULO DO COEFICIENTE VOLUMÉTRICO DE TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO (K _L A)	93
4.3.5	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS CINÉTICOS	94

4.4 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS	95
4.5 ANÁLISE DA ESTATÍSTICA	96
5. <u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	98
5.1 PRÉ-TRATAMENTO DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	98
5.1.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR	98
5.1.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇU	jcar 100
5.2 PROCESSO FERMENTATIVO PARA AVALIAR E COMPARAR A PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUND	A GERAÇÃO
PELAS LEVEDURAS EM ESTUDO	103
5.2.1 EFEITO DA AERAÇÃO, PH _{INICIAL} E AGITAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL EM BIORREATOR AGITAL	do – STR
USANDO A LEVEDURA SCHEFFERSOMYCES STIPITIS NRRL Y-7124	103
5.2.2 EFEITO DA AGITAÇÃO, AERAÇÃO E PH _{INICIAL} NA PRODUÇÃO DE ETANOL EM BIORREATOR AGITAL	do – STR
USANDO A LEVEDURA <i>CANDIDA SHEHATAE</i> UFMG HM 52.2	123
5.2.3 ANÁLISE COMPARATIVA DA FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO D	E CANA-DE-
AÇÚCAR PELAS LEVEDURAS <i>S. STIPITIS</i> E <i>C. SHEHATAE</i>	144
5.2.4 IMOBILIZAÇÃO DA LEVEDURA CANDIDA SHEHATAE UFMG HM 52.2	146
5.2.1 EFEITO DA CONFIGURAÇÃO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO NA PRODUÇÃO DE ETANOL EM BIO	ORREATOR DE
LEITO FLUIDIZADO USANDO A LEVEDURA IMOBILIZADA CANDIDA SHEHATAE UFMG HM 52.2	149
<u>6.</u> <u>CONCLUSÕES</u>	155
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	<u> </u>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	157

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O uso indiscriminado dos combustíveis fósseis é reconhecido como o principal responsável por alterações globais nos sistemas de sustentação da vida, principalmente devido ao aumento das emissões de CO₂ na atmosfera, que estão sendo vistas como a causa dos problemas relacionados às mudanças climáticas. Conscientizado da gravidade destes fatos, na década de 1970, o Brasil iniciou um programa para substituir a gasolina pelo etanol. Neste programa, a cana-deescolhida matéria-prima acúcar foi como para produzir etanol, е consequentemente, os estudos tanto nas áreas tecnológica como agrícola foram intensificados. No entanto, deve-se notar que apenas uma parte da biomassa produzida de cana é utilizada na produção de bioenergia, uma vez que, um terço da planta é utilizada para a produção de açúcar, um terço corresponde ao bagaço, que é queimado para produção de eletricidade e o terço restante é normalmente utilizado em diversas aplicações, como forragem, na utilização de ração animal, especialmente para ruminantes, e ainda assim há um excedente de bagaço disponível. Portanto, um aumento significativo na produção de etanol só seria possível com o desenvolvimento de novas tecnologias para converter os polissacarídeos das folhas, palha e bagaço de cana, que representam dois terços dessa biomassa.

Com a crescente instabilidade dos preços do petróleo e de sua oferta a partir do Oriente Médio, muitos países decidiram dirigir suas políticas energéticas para a utilização dos biocombustíveis. Isto impõe uma pressão sobre a produção de culturas que possam fornecer substratos para a produção de bioetanol. A principal vantagem da produção de bioetanol a partir do bagaço de cana-de-açúcar é a utilização de um resíduo que constitui cerca de 10 % da produção total (a previsão do total de cana moída na safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas).

Neste contexto, vários trabalhos de pesquisa têm sido realizados objetivando a viabilização de processos fermentativos para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos usando várias linhagens de leveduras como Scheffersomyces stipitis, Candida shehatae e Spathaspora arborariae para produção de etanol. Entretanto, segundo a literatura científica, o processo fermentativo necessita estar bem estabelecido para aplicações em grande escala e diversos fatores, como a concentração inicial de substrato e células, a influência da suplementação nutricional, a aeração, o pH e a agitação devem ser avaliados para se obter melhores valores de rendimento e produtividade em etanol. Estudos em meios sintéticos e hidrolisados têm apresentado resultados promissores frente à otimização destes fatores, mas poucos trabalhos ainda são encontrados na literatura sobre o tema "produção de etanol de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator agitado - STR". Além disso, o processo de fermentação apresenta ainda problemas quanto ao ajuste do metabolismo microbiano, levando a baixos valores de rendimento e produtividade em etanol e longos tempos de fermentação. Desta forma, novas abordagens estão sendo desenvolvidas para a obtenção de melhores resultados nos processos fermentativos.

Na última década, evidências têm se acumulado sobre a aplicação de campos magnéticos ou eletromagnéticos de baixa e alta frequência (micro-ondas) no desenvolvimento de bioprocessos. Particularmente no Brasil, o Biomagnetismo aplicado à Engenharia de Processos é um assunto relativamente recente e biorreatores (fermentadores) assistidos por campos eletromagnéticos de baixa frequência e intensidade têm sido desenvolvidos, e podem operar sob diversas configurações. Entretanto, dado o caráter inovador desta tecnologia, estudos em nível de pesquisa básica devem ser realizados para avaliar seus benefícios técnico-econômicos para a implantação destes biorreatores em escala maior para a produção de bioetanol, o que resultaria em maior eficiência, além de facilitar a recuperação das células, o que permitiria o uso de sistemas em bateladas repetidas ou sistemas contínuos, permitindo-se o uso de elevadas vazões específicas de alimentação sem que ocorra a "lavagem do biorreator" - "washout".

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho é comparar o desempenho da produção de etanol em bateladas simples com hidrolisado hemicelulósico de bagaco de cana-de-acúcar em biorreator utilizando as leveduras Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124 e Candida shehatae UFMG HM 52.2 avaliando o efeito das variáveis: agitação, aeração e pHinicial visando a aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético. O presente trabalho está inserido no programa de pesquisa do Grupo GMBIO – Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena/ Universidade de São Paulo (EEL/USP), que tem como objetivo o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de matérias-primas lignocelulósicas, especialmente os resíduos agroindustriais, visando à produção de materiais de alto valor agregado por via biotecnológica. Contou-se com a parceria do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Setor de Engenharia de Processos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, para a etapa de avaliação da influência da configuração dos campos eletromagnéticos no processo de produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico usando a levedura imobilizada em alginato de sodio com propriedades magnéticas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Bioetanol

O bioetanol é produzido pela fermentação dos açúcares contidos na matéria orgânica das plantas. O bioetanol misturado com gasolina produz um biocombustível de alta energia com características muito semelhantes à gasolina, mas com uma redução significativa das emissões poluentes dos motores de combustão tradicional (CARDONA; SÁNCHEZ, 2007).

2.1.1 Métodos de produção de etanol

O bioetanol produzido a partir da fermentação de carboidratos como, por exemplo, sacarose e amido é chamado de etanol de primeira geração enquanto que o álcool produzido a partir de materiais lignocelulósicos é chamado de etanol de segunda geração. Em geral, usam-se três famílias de produtos para a obtenção de álcool (QUINTERO et al., 2011):

- Açúcares, a partir da cana ou beterraba.
- Cereais, pela fermentação de açúcares a partir de amido.
- Os resíduos florestais, a partir da fermentação dos açúcares contidos em celulose e hemicelulose.

A Figura 2.1 apresenta um fluxograma simplificado de produção de etanol, indicando as fases de pré-tratamento, diluição do mosto, fermentação, destilação e desidratação.



Figura 2.1 Fluxograma simplificado do processo para a obtenção de bioetanol de 1^ª e 2^ª geração. Adaptado de Quintero et al. (2011)

Outra alternativa são os materiais lignocelulósicos que oferecem maior potencial para produção de bioetanol, por exemplo resíduos agro-florestais como palha de trigo, de arroz, bagaço de cana, entre outros. Estes resíduos têm como vantagem o baixo custo, já que não são necessariamente parte de outros produtos ou processos. Os resíduos sólidos urbanos também são ricos em matéria orgânica, tais como papel ou madeira, o que os torna uma fonte potencial de matérias-primas, mas, devido à suas diferentes origens muitas vezes podem conter outros materiais, o que torna necessário um pré-processo de separação, aumentando o custo de produção do bioetanol (QUINTERO et al., 2011).

A produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica oferece benefícios ambientais e em longo prazo será economicamente viável em comparação com os combustíveis fósseis. A Figura 2.2 mostra as diferenças entre os processos de obtenção de etanol de diferentes fontes de matéria-prima.



Figura 2.2 Processos para a obtenção de etanol com diferentes matérias-primas. Adaptado de Quintero et al. (2011)

2.2 Materiais Lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são a biomassa mais abundante, com uma produção anual no Brasil de 350 milhões de toneladas (SÁNCHEZ; CARDONA, 2008). A biomassa lignocelulósica é composta por celulose, hemicelulose e lignina, bem como outros componentes em menor quantidade. As frações de celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos e uma fonte potencial de açúcares fermentáveis.

2.2.1 Composição dos materiais lignocelulósicos

O termo "biomassa lignocelulósica" é usado quando se refere às plantas superiores, madeira mole (*softwood*) ou dura (*hardwood*) e gramínea. A celulose é um dos principais componentes estruturais da parede celular, e fornece resistência mecânica e estabilidade química às plantas (RAVEN et al., 1992). Estima-se que cerca de 7,5 milhões de toneladas de celulose são consumidas e regeneradas a cada ano (KIRK-OTHMER, 2001). É, portanto, o composto orgânico mais abundante na bioesfera. A hemicelulose é um heteropolissacarídeo (polissacarídeo que compreende mais de um tipo de monômero) de diferentes
açúcares C₅ e C₆, que também faz parte da estrutura da parede celular vegetal. A lignina é uma estrutura formada de compostos aromáticos e forma uma camada protetora para a parede celular da planta. Além dos três compostos químicos básicos que contêm os materiais lignocelulósicos, a água também está presente no complexo. Além disso, pequenas quantidades de proteínas, sais minerais e outros componentes podem ser encontrados na composição dos materiais lignocelulósicos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; QUINTERO et al., 2011).

A composição dos materiais lignocelulósicos depende de sua origem. Há uma variação significativa do teor de hemicelulose, celulose e lignina, dependendo se este é derivado de madeira dura, de madeira mole, ou gramíneas. Na Tabela 2.1 se resume a composição dos materiais lignocelulósicos encontrados nas fontes mais comuns de biomassa.

Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Madeira dura	40–55	24–40	18–25
Madeira mole	45–50	25–35	25–35
Casca de nozes	25–30	25–30	30–40
Sabugo de milho	45	35	15
Gramíneas	25–40	35–50	10–30
Papel	85–99	0	0–15
Palha de Trigo	30	50	15
Lixo	60	20	20
Folhas	15–20	80–85	0
Sementes de algodão	80–95	5–20	0
Jornal	40–55	25–40	18–30
Papéis residuais de polpas químicas	60–70	10–20	5–10

Tabela 2.1 Composição lignocelulósica em várias fontes em base seca (Sun e Cheng, 2002)

continua

CUTICIUSAU			
Materiais Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Sólidos primários do esgoto	8–15	NA	24–29
Esterco suíno	6.0	28	NA
Esterco bovino	1,6–4,7	1,4–3,3	2,7–5,7
Grama Bermuda Coastal	25	35.7	6.4
Grama americana	45	31,4	12.0

2.2.1.1 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, composto principalmente, por arabino-xilanas, gluco-mananas, galactanas e outros, que são encontrados na parede celular de plantas e com a composição e estrutura diferentes dependendo de sua origem e do método de pré-tratamento (GÍRIO et al., 2010).

As hemiceluloses são classificadas de acordo com o açúcar presente em sua molécula. A xilana é a principal hemicelulose de madeiras provenientes de angiospermas (15 – 30 % do peso seco total), mas é menos abundante em madeiras de gimnospermas (7 – 12 %). A Figura 2.3 apresenta a molécula de uma xilana que envolve ligações 1→4 de unidades xilopiranosil com unidades α- (4-O)-metil-D-glucuronopiranosil anexadas a unidades de anidroxilose. O resultado é uma cadeia de polímero ramificado que é principalmente composto de monômeros de açúcar de cinco carbonos, xilose, e em menor grau, monômeros de açúcar de seis carbonos como a glicose (SAHA, 2003; CARVALHEIRO et al., 2008; GÍRIO et al., 2010).

Entre os aspectos mais relevantes da estrutura e composição da hemicelulose, destacam-se a falta de estrutura cristalina, principalmente devido à

analuaãa

estrutura altamente ramificada, e a presença de grupos acetil ligados à cadeia polimérica (KIRK-OTHMER, 2001).



Figura 2.3 Representação esquemática do suporte principal da hemicelulose das plantas. Adaptado de Harmsen et al. (2009)

Os extratos de hemicelulose das plantas possuem um alto grau de polidiversidade, polidispersão e polimolecularidade (uma ampla gama de características de tamanho, forma e massa) (CARVALHEIRO et al., 2008). Além disso, a hemicelulose é insolúvel em água a baixa temperatura, no entanto, sua hidrólise inicia-se em uma temperatura mais baixa do que a da celulose, o que a torna solúvel em temperaturas elevadas (FTA, 2003) e a presença de ácido melhora significativamente a solubilidade em água.

2.2.1.2 Celulose

A celulose é um homopolímero formado por ligações glicosídicas β -1,4 de repetidas unidades de D-glicose. A fórmula química da celulose é (C₆H₁₀O₅)_n e a sua estrutura se apresenta na Figura 2.4.



Figura 2.4 Estrutura de uma molécula de celulose. Adaptado de Harmsen et al. (2009)

A natureza da ligação entre as moléculas de glicose (β-1,4 glicosídicas) permite que o polímero seja disposto em longas cadeias retas. O último arranjo da molécula, juntamente com o fato de que as hidroxilas são uniformemente distribuídas em ambos os lados dos monômeros, permite a formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose. As pontes de hidrogênio, por sua vez resultam na formação de compostos que são formados por várias cadeias paralelas ligadas umas às outras (FAULON et al., 1994). Uma ilustração do arranjo das moléculas de celulose em cadeias paralelas e as pontes de hidrogênio é apresentada na Figura 2.5.



Figura 2.5 Demonstração das pontes de hidrogênio que permitem o arranjo paralelo das cadeias do polímero da celulose. Adaptado de Harmsen et al. (2009)

A celulose é encontrada tanto em estrutura cristalina como não-cristalina. A coalescência de várias cadeias de polímero leva à formação de microfibrilas, que por sua vez estão unidas para formar fibras. A Figura 2.6 ilustra a estrutura, bem como a colocação da celulose na parede celular.



Figura 2.6 Formação de micro e macrofibrilias (fibras) da celulose e sua posição na parede celular. Adaptado de Harmsen et al. (2009)

A celulose é um material relativamente higroscópico que absorve 8 – 14 % de água sob condições atmosféricas normais (20 °C e 60 % de umidade relativa), no entanto é insolúvel em água e também é insolúvel em soluções de ácido diluído a baixa temperatura. A solubilidade do polímero é fortemente relacionada com o grau de hidrólise alcançada. Como resultado, fatores que afetam a taxa de hidrólise da celulose também afetam sua solubilidade. Em altas temperaturas, torna-se solúvel, uma vez que a energia fornecida é suficiente para quebrar as pontes de hidrogênio que prendem a estrutura cristalina da molécula. A celulose também é solúvel em ácidos concentrados, mas tal condição causa uma degradação severa do polímero pela hidrólise. Em soluções alcalinas concentradas, as fibras de celulose incham e ocorre a dissolução de frações de baixo peso molecular do polímero (DP < 200) (KRÄSSIG et al., 2004). A celulose não se funde com a temperatura, mas sua decomposição inicia em 180 °C (FTA, 2003).

2.2.1.3 Lignina

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular, sendo responsável pela coesão entre as fibras, pela dureza dos compostos lignocelulósicos, atuando como barreira de proteção contra a degradação microbiana. A lignina é constituída por ligações poliméricas tridimensionais entre unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações entre os monômeros, resultando em uma estrutura polifenólica complexa a qual não pode ser convertida em açúcar fermentável. Mais especificamente, são mais comumente encontrados os álcoois p-cumaríl, coniferil e sinapil (Figura 2.7)



Figura 2.7 Álcoois p-cumaril (1), coniferil (2) e sinapil (3): blocos dominantes na lignina tridimensional. Adaptado de Quintero et al. (2011)

A lignina se comporta como uma rede tridimensional insolúvel, onde desempenha um papel importante na resistência e desenvolvimento da célula, afetando o transporte de água, nutrientes e metabólitos na célula vegetal. Atua como ligante entre as células, criando um material composto que tem uma notável resistência ao impacto, compressão e flexão (HARMSEN et al., 2009). A Figura 2.8 apresenta uma estrutura-modelo de lignina.

Os solventes que foram identificados para dissolver a lignina incluem álcoois de baixa massa molar, dioxano, acetona, piridina, e dimetilsulfóxido. Além disso, sob temperaturas elevadas, ocorrem reações de polimerização de natureza ácida ou alcalina (O'CONNOR et al., 2009).



Figura 2.8 Estrutura da lignina. Adaptado de Quintero et al. (2011)

2.3 Matérias-primas para a produção de bioetanol: bagaço de cana

Nos últimos 15 anos, um crescente esforço tem sido feito no sentido de uma utilização mais eficiente dos resíduos agroindustriais renováveis, incluindo o bagaço de cana (PANDEY et al., 2000; BAUDEL et al., 2005). A disponibilidade das matérias-primas para a produção de bioetanol pode variar consideravelmente e dependendo até da localização geográfica, pode também representar dificuldade para a sua disponibilidade. As alterações no preço das matérias-primas podem afetar muito os custos de produção de bioetanol (YOOSIN; SORAPIPATANA, 2007).

Dois terços da produção mundial de açúcar são provenientes de cana e um terço é de beterraba (LINOJ et al., 2006). Estes dois são produzidos em regiões geograficamente distintas. A cana-de-açúcar é cultivada em países tropicais e subtropicais, enquanto a beterraba é cultivada apenas em países de clima temperado (BALAT et al., 2008). Ambas as matérias-primas parecem ser as fontes mais promissoras para a produção de bioetanol (UNCTAD, 2006).

O bagaço de cana (ou "bagaço", como é geralmente chamado) é um resíduo da cana gerado após o esmagamento e extração do suco (PANDEY et al., 2000). O bagaço apresenta uma grande heterogeneidade morfológica e consiste de fibras e outros elementos estruturais (SANJUAN et al., 2001) sendo composto por 19 a 24 % de lignina, 27 a 32 % de hemicelulose, 32 a 44 % de celulose e 4,5 a 9,0 % de cinzas. O restante refere-se principalmente a quantidades menores de minerais, ceras e outros compostos (JACOBSEN; WYMAN, 2002). As indústrias de açúcar geram cerca de 270 a 280 kg de bagaço (50 % de umidade) por tonelada de cana (RODRIGUES et al., 2003).

A implantação da tecnologia de etanol de bagaço de cana é favorecida, uma vez que o processo de produção pode ser anexado às unidades açúcar/etanol já existentes, exigindo menores investimentos, infraestrutura, logística e fornecimento de energia. Além disso, o bagaço é gerado nas unidades industriais, e, como tal, livre de custos de transporte. Este é um cenário promissor, uma vez que de cada dez milhões de toneladas de biomassa seca, 600 milhões de galões de etanol podem ser produzidos, considerando o uso só da sua parte celulósica (SOCCOL et al., 2010).

2.4 Processo de produção de bioetanol a partir do bagaço de cana

A produção de etanol combustível a partir da biomassa lignocelulósica inclui o pré-tratamento, a hidrólise de celulose/hemicelulose, fermentação de hexoses/pentoses, separação, destilação e tratamento de efluentes (OJEDA; KAFAROV, 2009). Intensos esforços têm sido feitos nos últimos anos para desenvolver tecnologias eficientes para o pré-tratamento do bagaço, enzimas para sacarificação da celulose/hemicelulose e tecnologias adequadas para a fermentação de açúcares tanto C₆ quanto C₅.

2.4.1 Pré-tratamento do bagaço de cana

O pré-tratamento é uma das operações unitárias fundamentais para a conversão de materiais lignocelulósicos em etanol. Devido à estreita associação que existe entre os três principais componentes da parede celular vegetal (celulose, hemicelulose e lignina), o pré-tratamento é uma etapa importante nos processos de valorização destes resíduos lignocelulósicos visando à produção de energia, combustível ou produtos químicos, por meio dos processos de hidrólise enzimática, fermentação e gaseificação (GÁMEZ et al., 2006). Portanto, o papel principal de um método de pré-tratamento é diminuir a interação entre os principais componentes da parede celular e torná-los susceptíveis aos processos de sacarificação e fermentação (GÁMEZ et al., 2006). Da mesma forma, as melhores condições de pré-tratamento devem ser definidas como aquelas em que a recuperação máxima dos açúcares da hemicelulose solúvel em água é obtida, juntamente com a produção do melhor substrato possível para a hidrólise enzimática e fermentação.

Do ponto de vista econômico, o pré-tratamento é um passo fundamental no processo de bioconversão porque deve melhorar a separação entre os componentes da parede celular, evitando a formação de compostos que inibem a hidrólise e posteriores processos de fermentação. Muitos métodos foram utilizados para o pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Entre estes se destacam: explosão a vapor (RAMOS et al., 1992; GLASSER; WRIGHT, 1997; RAMOS et al., 2000; BALAT et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), lavagem alcalina (BALAT et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), cal, peróxido de hidrogênio alcalino, hidrólise com ácido diluído (ZHANG et al., 2007; BALAT et al., 2008; HERNÁNDEZ-SALAS et al., 2009), explosão por amônio (BALAT et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), água quente e oxidação úmida (MARTÍN et al., 2008; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009), entre outros. Cada um destes métodos têm vantagens e desvantagens, e nenhum parece ser ideal para todas as aplicações práticas que envolvem diferentes tipos de materiais lignocelulósicos (Tabela 2.2).

PRÉ- TRATAMENTOS		OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
		FÍSICOS E FÍSICO-QUÍMICOS	
Mecânico	• • • • •	Promove a redução do grau de polimerização. O rendimento total de hidrólise incrementa de 5 – 25 %. Reduz o tempo de digestão em 23 – 59 %. Não produz inibidores. Requer alto consumo de energia.	Cowling e Kirk (1976), Chang e Holtzapple (2000) e Ramos (2003)
Térmico	• • • • •	Temperaturas acima de 180°C. Reação exotérmica. Solubilização da hemicelulose e da lignina. Produz compostos fenólicos Temperaturas acima de 250°C devem ser evitadas para impedir reações de ^N i pirólise.	Domansky e Rendos (1962), Lora e Wayman (1978), Bobleter e Concin 979), Gossett et al. (1982), Brownell et al. (1986), Bobleter (1994), Gregg e Saddler (1996), Garrote et al. (1999), igro et al. (2003), Liu e Wyman (2004), Zhu et al. (2004) e Zhu et al. (2005)
Vapor/explosão a vapor (ST/SE)	• • •	Requer alta temperatura (até 240ºC) e pressão. Parte da hemicelulose é hidrolisada e forma ácidos. Produz inibidores como furfural, HMF, e compostos fenólicos solúveis.	rownell et al. (1986), Grohmann et al. 1986), Converse et al. (1989), Mok e ital (1992), Lawther et al. (1996), Laser : al. (2002), Söderström et al. (2002) e Shahbazi et al. (2005)
Água líquida quente (LHW)	•••	pH deve ser mantido entre 4 e 7 para evitar a formação de inibidores. Ocorre a degradação catalítica de açúcares em uma série de reações que são ^B difíceis de controlar e resultam em produtos secundários indesejáveis. Alta quantidade de produtos solubilizados.	bbleter (1994), Weil et al. (1998a), Weil et al. (1998b), Laser et al. (2002) e Mosier et al. (2005)

bala 3 3 Drá tratamantos auto podom sor policados aos matoria

(continua)

PRÉ- TRATAMENTOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
	QUÍMICOS	
Ácido	 A solubilização da hemicelulose e a precipitação da lignina solubilizada são mais pronunciadas com ácido forte em comparação com ácido diluído. Ocorre solubilização da hemicelulose. Produz produtos de degradação voláteis. O uso de ácido forte não é atraente para a produção de etanol, porque há um risco na formação de compostos de inibição e desgaste dos equipamentos. O uso de ácido diluído é considerado como um dos métodos mais promissores, porque podem ser evitadas as reações secundárias que acontecem durante a etapa de pré-tratamento. 	Xiao e Clarkson (1997), Shevchenko et al. (1999) e Ramos (2003)
Alcalino	 As primeiras reações que ocorrem são solvatação e saponificação. A temperatura é mantida baixa durante a extração (temperatura ambiente ou inferior). São formados compostos de menor peso molecular e existe o risco de degradação e perda de carbono. O estado cristalino da celulose pode ser modificado e pode diminuir os efeitos positivos da remoção de lignina e celulose. 	Gossett et al. (1982), Gregg e Saddler (1996), Laser et al. (2002) e Hendriks e Zeeman (2009)
Oxidativo	 Usa compostos oxidantes como peróxido de hidrogênio ou ácido peracético. Em muitos casos, não é oxidante-seletivo e, portanto, existem perdas de hemicelulose e celulose. O ácido peracético é muito seletivo em relação à lignina e não apresenta perdas significativas de carboidratos. 	Teixeira et al. (1999) e Hendriks e Zeeman (2009)
		(continua)

50 (continuação)		
PRÉ- TRATAMENTOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Líquidos iônicos	 Solubilização completa da biomassa lignocelulósica pela quebra nos polissacarídeos das ligações de H pelos ânions dos líquidos iônicos. O processo não pode ser aplicado em nível industrial devido ao alto custo dos líquidos iônicos. 	Dallinger e Kappe (2007), Li et al. (2008), Sievers et al. (2009), Wang et al. (2011) e Wu et al. (2012)
	COMBINAÇÕES	
Térmico-ácido	 O ácido externo catalisa a solubilização da hemicelulose. O ácido externo reduz a temperatura ótima e dá um melhor substrato enzimático hidrolisável. A hemicelulose e a lignina podem desencadear reorientação da celulose para uma forma mais cristalina. Ocorre produção apreciável de furfural. 	Grohmann et al. (1985), Brownell et al. (1986), Gregg e Saddler (1996) e Tengborg et al. (1998)
Térmico/alcalino	 Temperaturas de 100-150 °C com adição de Ca(OH)₂. É suficiente para aumentar a digestibilidade da biomassa contendo baixa lignina. 	Gandi et al. (1997), Chang et al. (1998) e Chang et al. (2001)
Térmico/ oxidativo	 Utiliza ácido peracético e vapor tratado a 231ºC por 10 min. Os açúcares solúveis produzidos são principalmente polímeros. Não são produtos finais monômeros fenólicos durante a oxidação úmida, mas são ainda mais degradados a ácidos carboxílicos. A produção de furfural e HMF é baixa durante oxidação úmida. Parte da hemicelulose é perdida por reação com o dióxido de carbono e água. 	Ando et al. (1988) e Klinke et al. (2002)
		(continua)

(conclusão)		-0
PRÉ- TRATAMENTOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Térmico, alcalino e oxidativo	 Baixa degradação dos açúcares como resultado do uso da temperatura relativamente baixa de 150°C. A digestibilidade da biomassa tratada é 13 vezes maior do que a biomassa não tratada. 	Chang et al. (2001)
Líquidos iônicos assistido com micro-ondas	 O material lignocelulósico é diretamente solubilizado em um liquido iônico em presença de micro-ondas. A celulose precipita em presença de água. A lignina permanece na solução. Resultados semelhantes aos obtidos em pré-tratamentos de explosão a vapor e químicos. 	allinger e Kappe (2007), Li et al. (2008), ievers et al. (2009), Wang et al. (2011) e Wu et al. (2012)
Amônio e dióxido de carbono (AFEX)	 Cargas de amônio em torno de 1:1 (kg de amônio / kg de biomassa seca) a temperatura ambiente durante 10-60 dias, ou a temperaturas de até 120 °C por alguns minutos. O dióxido de carbono pode ser aplicado como dióxido de carbono supercrítico (35°C, 73 bar), aumentando o rendimento. 	Kim e Hong (2001) e Alizadeh et al. (2005)

Diversos grupos de pesquisa estudam o desenvolvimento ou a avaliação de diferentes métodos de pré-tratamento, tais como organosolv, auto-hidrólise, explosão a vapor, a hidrólise ácida, alcalina de peróxido de hidrogênio e extração alcalina, principalmente (LORA; WAYMAN, 1978; ANDO et al., 1988; KAAR et al., 1998; MESA et al., 2010). A lavagem alcalina de bagaço foi o método mais indicado para extrair a maior parte da lignina da matriz e tornar a celulose e a hemicelulose mais disponíveis para hidrólise enzimática (PANDEY et al., 2000). Tratamentos semelhantes também foram úteis para aumentar a eficiência da hidrólise enzimática de folhas de cana (HARI-KRISHNA et al., 1998; BHAT, 2000).

A Figura 2.9a apresenta uma representação simples dos processos mais comumente utilizados e seus principais efeitos sobre o material lignocelulósico. A Figura 2.9b apresenta uma representação da composição polimérica típica após pré-tratamento da biomassa em função do pH (CARVALHEIRO et al., 2008). Geralmente, os pré-tratamentos a pH baixo tendem a solubilizar a hemicelulose e a torná-la em forma oligomérica, por outro lado os pré-tratamentos alcalinos, seletivamente, solubilizam a lignina.



Figura 2.9 (a) Opções de processos de hidrólise do material lignocelulósico (b) Composição típica dos sólidos poliméricos depois do pré-tratamento em função do pH. Adaptado de Carvalheiro et al. (2008)

2.4.2 Compostos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico

Durante o processo de hidrólise ácida pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação, tais como ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose; ácidos fórmico e levulínico, produtos da degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina; e furaldeídos ou aldeídos furanos, principalmente furfural e 5- hidroximetilfurfural, formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (MARTÍN et al., 2007). Todos estes compostos, bem como metais liberados do equipamento de hidrólise são potentes inibidores do metabolismo microbiano (Figura 2.10)



Figura 2.10 Reações que ocorrem durante a hidrólise de materiais lignocelulósicos. Adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b)

Concentrações da ordem de 0,05 g/L de furfural podem, em uma fermentação, afetar sensivelmente a viabilidade das células, a taxa de crescimento específico e a produtividade volumétrica do processo (MODIG et al., 2002; TAHERZADEH; NIKLASSON, 2004; ALLEN et al., 2010). Tal efeito inibitório pode ser justificado pela sensibilidade de determinadas enzimas glicolíticas à presença do furfural (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; HRISTOZOVA et al., 2006). Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b) propõem ainda duas suposições para o efeito tóxico do furfural: uma possibilidade é a redução de furfural para álcool furfurílico por uma desidrogenase dependente de NADH que possui maior afinidade em realizar a redução da replicação celular. O 5-hidroximetilfurfural também promove a inibição dos processos fermentativos, possivelmente por mecanismo similar ao furfural, sendo que o hidroximetilfurfural é reduzido a álcool 5-hidroximetilfurfurílico (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Além dos compostos de degradação dos açúcares, também são liberados no hidrolisado radicais acetil, provenientes das ramificações da hemicelulose, e também compostos fenólicos, procedentes da degradação parcial da lignina, como, por exemplo, hidroquinona, siringaldeído e 4-metilcatecol (OLIVA et al., 2006). A toxicidade dos compostos fenólicos consiste na ação destes sobre as membranas biológicas. A presença destes compostos afeta a integridade da membrana plasmática e interfere na sua seletividade (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; DUARTE et al., 2005). Existe efeito tóxico do ácido acético quando este se encontram a uma concentração de 5,0 g/L, além de ter efeito sinérgico quando presente junto de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos (SILVA et al., 2004). O ácido acético e outros ácidos orgânicos

presentes no hidrolisado inibem o metabolismo das leveduras enquanto o pH do hidrolisado se encontra abaixo dos respectivos pKa (pKa = 4,75 para o ácido acético), devido a que se encontram na forma protonada (não dissociada). Dessa forma, atravessam a membrana celular, alcançando o citoplasma da célula. Dentro da célula encontra um pH mais alto que seu pKa, sendo então desprotonados e promovendo a acidificação do citoplasma do micro-organismo. Um dos problemas derivados da queda do pH intracelular é a interferência na replicação celular, que decresce linearmente com a redução gradual do pH citosólico (IMAI; OHNO, 1995).

Quando comparado com processos fermentativos envolvendo meios de cultura sintéticos ou formulados com açúcares e nutrientes comerciais, a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, sem prévio tratamento de destoxificação, se caracteriza por cinética lenta, com rendimento e produtividade limitados (MUSSATTO; ROBERTO, 2004), evidenciando a atuação individual e sinérgica dos compostos inibidores presentes nos hidrolisados. Para amenizar, ou mesmo eliminar os efeitos dos inibidores, faz-se necessário o tratamento dos hidrolisados para sua utilização em processos biotecnológicos.

2.4.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

A presença das substâncias inibidoras nos hidrolisados hemicelulósicos muitas vezes impõe a necessidade de purificação dos hidrolisados antes da utilização e/ou adaptação dos micro-organismos ao açúcar a ser utilizado (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Diferentes métodos de destoxificação podem ser aplicados, e na maioria dos casos estes inibidores são parcialmente removidos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996) ou transformados em compostos

inativos (PARAJO et al., 1998). A escolha do método de destoxificação vai depender do tipo de hidrolisado a ser destoxificado (quanto à eficiência do método de destoxificação em relação ao hidrolisado) e do micro-organismo fermentador empregado (em relação a quais inibidores devem ser removidos) (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Na etapa de destoxificação, uma variedade de tratamentos físico-químicos e também tratamentos biológicos pode ser utilizada (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a). Já foram propostas como estratégias de destoxificação, conduzidas tanto de forma individual quanto combinadas, os métodos de neutralização, adsorção por resinas de troca iônica, adsorção por carvão ativado e "overliming" com hidróxido de cálcio (CHANG et al., 1998; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; CHANG, V. et al., 2001; CARVALHEIRO et al., 2005; CHANDEL et al., 2007; CANILHA et al., 2010) (Tabela 2.3).

Dentre as metodologias apresentadas, a técnica de "overliming" é considerada a técnica mais amplamente utilizada (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; ALVES, 1997; ALVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2000) e tem sido efetiva como um processo de destoxificação devido à remoção parcial de inibidores tóxicos, como furfural e hidroximetilfurfural, ainda que este mecanismo não seja ainda completamente bem compreendido (CARDONA et al., 2010). Durante o "overliming", o ácido sulfúrico é removido do hidrolisado pela adição de hidróxido de cálcio (ou outro hidróxido), resultando em um ajuste do pH, condição sob a qual um precipitado é formado. Este precipitado consiste principalmente de sais de cálcio de baixa solubilidade, como o sulfato de cálcio, que é capaz de precipitar compostos ácidos (DU PREEZ, 1994; ROBERTO et al., 1994). Além disso, a técnica de "overliming" causa outros efeitos benéficos, incluindo a

remoção de compostos fenólicos, precipitação de íons de metais pesados e conversão do furfural em ácido furfurílico (PARAJÓ et al., 1998). Entretanto, já foi observado que as concentrações de ácido acético antes e depois deste tratamento não foram alteradas significativamente (KARIMI et al., 2006).

MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
	FÍSICOS	
Evaporação	Separação de compostos voláteis e não voláteis.	Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a)
Extração	Solventes orgânicos, 3:1 fase orgânica: fase aquosa (v/v).	Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a)
Adsorção	 Solventes supercríticos em contracorrente com hidrolisado, 20 MPa, 40°C; depois depressurização. Carvão ativado. Adição de 2,5 - 10 % (m/v). Remoção de furanos, fenóis e ácido acético. 	Alves (1997), Alves et al. (1998), Lee et al. (1999), Persson et al. (2002) e Marton et al. (2006)
	QUÍMICOS	
Alcalino ("Overliming" e "liming")	 Adição de Ca(OH)₂ ou CaO até pH 7 – 10,5 depois é ajustado o pH ate 5,5 – 6,5 com ácido. Remoção de furfural, HMF e compostos fenólicos. 	Alves (1997), Alves et al. (1998), Martinez et al. (2000), Cardona e Sánchez (2007) e Chandel et al. (2007)
Alcalino Combinada	 Adição de KOH até pH 10, depois o pH é ajustado até 6,5 com HCI e adição de 1 % de sulfito de sódio a 90°C. Remoção de cetonas, aldeídos e compostos voláteis. 	Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a)
		(continua)

(conclusão)		AC .
MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Resinas de troca iônica	 Kelação de resina/hidrolisado de 1:10. Agitação por 1 hora a temperatura ambiente. Remoção de furanos, fenóis e ácido acético. 	Chandel et al. (2007) e Canilha et al. (2010)
	BIOLÓGICOS	
Microbiológico	 Trichoderma reesei, Pseudomonas putida ou Streptomyces setonii. Issatchenkia occidentalis Remove compostos fenólicos, furfural e ácido acético. Perda de açúcar de 5 % 	Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a), Cheng et al. (2008) e Fonseca et al. (2011)
Enzimático	 Lacase de Cyathus stercoreus. Lacase e lignina peroxidase de Trametes versicolor Agitação rotatória a 100 rpm por 4 - 12 horas a 30°C. Remoção quase total de fenóis. Não apresenta remoção de furanos e ácido acético. Perda mínima de açúcares. 	Jönsson et al. (1998), Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a) e Chandel et al. (2007)

Outro potencial inconveniente do "overliming" é a perda de açúcares devido a reações de degradação catalisadas pelo hidróxido e conversão dos açúcares a compostos não fermentáveis (CARVALHO et al., 2005). Um método que pode ser utilizado em conjunto com a técnica de "overliming" para a diminuição da concentração de ácido acético em hidrolisados é a adsorção por carvão ativado, capaz de contribuir também para a diminuição das concentrações de derivados fenólicos (PARAJÓ et al., 1998; CARDONA et al., 2010).

2.4.4 Micro-organismos produtores de etanol

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais frequentemente utilizado na produção industrial de etanol, a partir do caldo de cana, devido à sua capacidade de crescimento em meio com alta concentração de açúcar e ao seu alto rendimento de etanol (MILLATI et al., 2004). Entretanto, esta levedura é capaz de fermentar apenas hexoses, sendo incapaz de produzir etanol a partir de pentoses, como a xilose, que é um dos principais constituintes da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos (NAKAMURA et al., 2001; HAMACHER et al., 2002).

Com o interesse na utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de matéria-prima surge a necessidade do estudo de micro-organismos que sejam capazes de converter pentoses em etanol, como as leveduras dos gêneros *Candida, Scheffersomyces, Schizosaccharomyces, Kluyveromyces e Pachysolen,* os fungos filamentosos dos gêneros *Fusarium, Mucor, Monilia e Paecilomyces e* as bactérias dos gêneros *Clostridium, Bacillus, Bacteróides, Thermoanaerobacter* e *Erwinia* (Tabela 2.4). Dentre estes micro-organismos destacam-se as leveduras *Candida shehatae, Scheffersomyces stipitis* e o fungo *Fusarium oxysporum*, que

resultam em altos rendimentos em etanol (> 0,45 g de etanol/g xilose) e produtividades satisfatórias (> 0,17 g L^{-1} h^{-1}) (HAHN-HAGERDAL et al., 1994; MILLATI et al., 2004).

Outra alternativa para a produção de etanol a partir de pentoses é o emprego de micro-organismos recombinantes, os quais vêm sendo muito estudados (ELIASSON et al., 2000; JIN et al., 2004; DAVIS et al., 2005). Existem duas linhas principais de pesquisa de micro-organismos recombinantes, a primeira visa à modificação do metabolismo dos tradicionais micro-organismos produtores de etanol (*Saccharomyces cerevisiae e Zymomonas mobilis*) para permitir que estes fermentem xilose e arabinose. A segunda visa introduzir genes para a produção de etanol em micro-organismos que têm a capacidade de metabolizar pentoses, como a *Escherichia coli, Klebsiella oxytoca* e *Erwinia* (DUMSDAY et al., 1997; SAHA, 2003).

Embora a eficiência dos micro-organismos recombinantes seja grande, muitas vezes seu uso em processos industriais não é viável visto que, estes geralmente não são suficientemente estáveis e em muitos casos dependem de meios de cultura complexos, o que pode inviabilizar o processo em nível industrial (DUMSDAY et al., 1997). Desta maneira, leveduras como a *Scheffersomyces stipitis* e *Candida shehatae* mostram-se mais interessantes industrialmente por fermentar a xilose rapidamente com alto rendimento na produção de etanol e aparentemente não produzindo xilitol como subproduto (NIGAM, 2001b; 2002; SANCHES et al., 2004). Além destes fatores, a levedura *Scheffersomyces stipitis* praticamente não requer a adição de vitaminas para a fermentação de xilose e é capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo celobiose (EKEN-SARAÇOGLU; ARSLAN, 2000; NAKAMURA et al., 2001; NIGAM, 2001b).

Em diversos trabalhos realizados em frascos Erlenmeyer, as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Candida shehatae* têm apresentado resultados promissores na conversão de xilose em etanol a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica, por exemplo, hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, entre outros (ROBERTO et al., 1991; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; NIGAM, 2001b; 2002; CHANDEL et al., 2007; FERREIRA; DUSSÁN; et al., 2011; CADETE et al., 2012; LIN et al., 2012; SILVA et al., 2012; BELLIDO et al., 2013; HICKERT et al., 2013).

Tabela 2.4 Micro-organismos prc	odutores de etanol	
MICRO-ORGANISMOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
LEVEDURA		
Saccharomyces cerevisiae	 Limitada a subtratos de glicose, frutose e sacarose. Tolera, ao nível industrial, a inibição pelo substrato. 	Olsson et al. (1992), Olsson e Hahn-Hägerdal (1993) e Dien et al. (2003)
S. cerevisiae Recombinante	Genes introduzidos para a assimilação da xilose.	Jin e Jeffries (2004)
Scheffersomyces stipitis, Pachysolen tannophilus e Candida shehatae	 Fermentadoras de xilose. Precisa de uma oxigenação bem regulada para a produção máxima de etanol. Requer processo de destoxificação do hidrolisado. A taxa de produção de etanol a partir da glicose é de pelo menos cinco vezes menor do que a observada para S. <i>cerevisiae</i>. 	Ligthelm et al. (1988) e Skoog et al. (1992)
Kluyveromyces marxianus e K. fragilis	 Usa a celulose diretamente para a produção de etanol. Tem alta produtividade de etanol a partir da celulose (0,5 g de etanol/g de celulose em 78 h). 	Ballesteros et al. (1991)
Candida acidothermophilum	 Termotolerante. Atinge 80 % da produção de etanol teórico. 	Kadam e Schmidt (1997)
FUNGO		
Fusarium oxysporum	Produz etanol da celulose, mas além disso produz grandes quantidades de ácido acético.	Panagiotou et al. (2005)
Neurospora sp., Monilia sp, Paecilomyces sp. e Fusarium sp	Habilidade de fermentar à celulose diretamente a etanol.	Singh et al. (1992)
		(continua)

MICRO-ORGANISMOS OBSERVAÇÕES Neocalimastix sp. Produz etanol, mas o maior produto da fermentação é o ácido acético. Dij Trichoderma reesei Usa a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação simultáneas (SSF). Di Mucor indicus Usa a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação simultáneas (SSF). Di Mucor indicus Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. Di Mucor indicus Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. Di Mucor indicus Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. Di BACTÉRIA Capaz de fermentar e é usada de cabolidados. Sk Symononas mobilis Ata taxa de crescimento e é sepecifico para a produção de etanol. Di Zymononas mobilis Usa uma and a gama de carbolidratos. Di Zymobacter palmae Usa uma alendos Sk Di Zymobacter palmae Usa uma de carbolidratos como substratos (hexoses, criligados dr. e ola trissocritidum Di E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentios. Di Di Produtividade sem	64 (conclusão)		
Neocalimastix sp. Produz etanol, mas o maior produto da fermentação é o ácido acético. Diji Trichoderma reesei Usa a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Diana a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Mucor indicus - Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. H Bacriferta - Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. H Bacriferta - Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. H Bacriferta - Capaz de fermentar uma grande serecimento e é específico para a produção de etanol. O Zymomoras mobilis - Alta taleráncia ao etanol. - Alta taleráncia ao etanol. O Zymobacter palmae - Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, α-ligados dr- e O E. colí Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses O Hermologradition - Produtividade semelhante à de Z. mobilis. O E. colí Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses O Hermologradition - Produtividade semelhante à de Z. mobilis. O Hermologradition - Produtividade semelhante à de Z. mobilis.	MICRO-ORGANISMOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Trichoderma reesei Usa a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Nucor indicus • Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. • H Mucor indicus • Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. • H Chalara parvispora Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. • H BACTÉRIA • Assimila os inbidores presentes nos hidrolisados. • H BACTÉRIA • Alta taxa de crescimento e é específico para a produção de etanol. • H Zymomonas mobilis • Alta taxa de crescimento e é específico para a produção de etanol. • H Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboldratos como substratos. • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	Neocallimastix sp.	Produz etanol, mas o maior produto da fermentação é o ácido acético.	Dijkerman et al. (1997)
Mucor indicus Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. Assimila os inibidores presentes nos hidrolisados. Chalara parvispora Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. BACTÉRIA Chalara parvispora Capaz de fermentar pentoses. BACTÉRIA Chalara parvispora Capaz de fermentar pentoses. BACTÉRIA Chalara parvispora Capaz de fermentar pentoses. Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. Usa a glicose, frutose e sacarose como substratos. Alta tolerância ao etanol. Alta tolerância ao etanol. Alta tolerância ao etanol. Produtividade semelhante à de Z. mobifis. Produtividade semelhante à de Z. mobifis. Produtividade semelhante à de Z. mobifis. Cofi Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses Costridium Annohydrosuffurieum, Annohydrosuffuria ao etanol. Annohydrosu	<i>Trichoderma reesei</i>	Jsa a celulose diretamente e é usada nos processos de sacarificação e fermentação imultâneas (SSF).	Sun e Cheng (2002)
Chalara parvispora Capaz de fermentar pentoses. H BACTÉRIA BACTÉRIA Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. Ski Zymomonas mobilis e. Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. Ski Zymomonas mobilis e. Usa a glicose, frutose e sacarose como substratos. O) Zymobacter palmae b. Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, d-ilgados di- e rissacarídeos). O) Zymobacter palmae e. Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, d-ilgados di- e rissacarídeos). O) Zymobacter palmae e. Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, d-ilgados di- e rissacarídeos). O) Zymobacter palmae e. Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, d-ilgados di- e rissacarídeos). O) E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses O) Terestorarderosulturicum, thermosacharolyticum F. ransforma pentoses e aminoácidos em etanol. O) Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. Antendo O) Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. Antendo O) Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. Antendo O) Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. A	Mucor indicus	 Capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo hexoses e pentoses. Assimila os inibidores presentes nos hidrolisados. 	Sues et al. (2005)
BACTÉRIA BACTÉRIA Zymomonas mobilis • Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. • Usa a glicose, frutose e sacarose como substratos. Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, a-ligados di- e trissacarídeos). • O Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, a-ligados di- e trissacarídeos). • O E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses • O fremohydrosufturicum, thermosocher of thermoses e aminoácidos em etanol. • Anasforma pentoses e aminoácidos em etanol. Infermosaccharolyticum • Anoticipal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol.	Chalara parvispora (Capaz de fermentar pentoses.	Holmgren e Sellstedt (2006)
Zymonoras mobilis • Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. Sko Zymobaca • Usa a glicose, frutose e sacarose como substratos. • O Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, α-ligados di- e tissacarídeos). • O Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, α-ligados di- e tissacarídeos). • O E. coli Recombinante • Cadade semelhante à de Z. mobilis. • O E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses • O Thermosactarolyticum • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. • O Otimentosocratorolyticum • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. • O	BACTÉRIA		
Zymobacter palmae • Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, α-ligados di- e trissacarídeos). • Produtividade semelhante à de Z. mobilis. E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses • Produtividade semelhante à de Z. mobilis. E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses • Produtividade semelhante à de Z. mobilis. F. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses • Produtividade semelhante à de Z. mobilis. Thermohydrosulfuricum, thermosacrharolyticum • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. • Aprincipal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol.	Zymomonas mobilis	 Alta taxa de crescimento e é especifico para a produção de etanol. Usa a glicose, frutose e sacarose como substratos. Alta tolerância ao etanol. 	Skotnicki et al. (1983) e Okamoto et al. (1993)
 E. coli Recombinante Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses Clostridium Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. A principal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol. Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. 	Zymobacter palmae	 Usa uma ampla gama de carboidratos como substratos (hexoses, α-ligados di- e trissacarídeos). Produtividade semelhante à de Z. mobilis. 	Okamoto et al. (1993)
Clostridium • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. thermohydrosulfuricum, • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. Thermoanaerobacter • A principal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol. thermosaccharolyticum • Transforma pentoses e aminoácidos em etanol.	<i>E. coli</i> Recombinante (Capaz de assimilar tanto hexoses e pentoses	Park et al. (2001)
 Transforma pentoses e aminoácidos em etanol 	Clostridium thermohydrosulfuricum, Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum	 Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. A principal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol. 	James (1997)
 Clostridium thermocellum Converte diretamente materiais lignocelulósicos em etanol. A principal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol. 	Clostridium thermocellum	 Transforma pentoses e aminoácidos em etanol. Converte diretamente materiais lignocelulósicos em etanol. A principal desvantagem é sua baixa tolerância ao etanol. 	James (1997)

2.4.5 Metabolismo de xilose em leveduras

As leveduras produtoras de etanol a partir de D-xilose têm sido isoladas de vários habitat, tais como exudatos de árvores (NIGAM et al., 1985), insetos habitantes de madeira (TOIVOLA et al., 1984; SUH et al., 2003), madeira em decomposição (TOIVOLA et al., 1984; CADETE et al., 2009), frutas em decomposição e cascas de árvores (RAO et al., 2008). Essas leveduras naturalmente fermentadoras de xilose incluem principalmente as espécies *Scheffersomyces stipitis, Candida shehatae*, C. *lignosa*, C. *insectosa*, C. *tenuis, Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008; FERREIRA; MUSSATTO; et al., 2011; WOHLBACH et al., 2011), *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN et al., 2006) e S. *arborariae* (CADETE et al., 2009; DA CUNHA-PEREIRA et al., 2011).

A produção anaeróbia de etanol a partir de D-xilose foi primeiramente relatada por Karczewska (1959) e as primeiras observações acerca da fermentação de xilose por leveduras são do início de 1980. Em outra sinopse taxonômica (BARNETT, 1976), entretanto, algumas espécies de leveduras – *S. stipitis, C. shehatae, P. tannophilus* e *Brettanomyces naardenendis* – são relatadas como capazes de fermentar D-xilose a etanol em diferentes taxas. No tratado taxonômico de leveduras editado por Kurtzman e Fell (1998), 64 % das espécies listadas eram citadas como capazes de assimilar D-xilose aerobiamente, mas nenhuma foi citada como capaz de fermentar esse açúcar.

Dentre as leveduras que assimilam D-xilose, um pequeno número é capaz de fermentar esse açúcar a etanol (VAN MARIS et al., 2006). Essa aparente discrepância é intrínseca à via metabólica da xilose. Essa via, descrita pela primeira vez por Gunsalus et al. (1955), relaciona o metabolismo da xilose à via

das fosfopentoses por meio da conversão da xilose em xilulose 5-fosfato (Figura 2.11). A primeira etapa no metabolismo da D-xilose é o transporte dessa pentose através da membrana celular, mediada por transportadores de glicose na ausência de um transportador específico de xilose (JEFFRIES; JIN, 2004). Sistemas de transporte próton-simporte de baixa e alta afinidade por xilose operam simultaneamente na levedura S. *stipitis*. A glicose compete com a xilose pelo transporte mediado pelo sistema de baixa afinidade e inibe o transporte de xilose pelo sistema de alta atividade (KILIAN; UDEN, 1988).



Figura 2.11 Esquema do metabolismo de D-xilose e L-arabinose a etanol. Os números destacados representam as enzimas da via metabólica. 1- aldose/xilose redutase; 2- L-arabinitol 4- desidrogenase; 3- L-xilulose redutase; 4- xilitol desidrogenase; 5- xilose isomerase; 6- xiluloquinase; 7- L-rabinose isomerase; 8- L-ribulocibase; 9- L-rubulose-5-fosfato 4-epimerase; G- 3-P-gliceraldeído-3-fosfato; PPP – via das fosfopentoses. Adaptado de van Maris et al. (2006)

Posteriormente a esta primeira etapa, a xilose internalizada é metabolizada a etanol por uma série inicial de três enzimas, D-xilose redutase, (XR - EC 1.1.1.21), xilitol desidrogenase (XDH - EC 1.1.1.9) e xiluloquinase (XK - EC 2.7.1.17). XR reduz a xilose a xilitol, XDH oxida o xilitol a D-xilulose, que é então fosforilado a D-xilulose 5-fosfato pela XK. A D-xilulose 5-fosfato é metabolizada pela via das fosfopentoses em etanol (GRANSTRÖM; LEISOLA, 2002). A conversão de pentoses em xilulose 5- fosfato é um pré-requisito para sua utilização por vias catabólicas centrais (SLININGER et al., 1987). A via das fosfopentoses consiste de uma fase oxidativa que converte hexoses fosfato em pentoses fosfato, suprindo o NADPH necessário na via biossintética, e uma fase não-oxidativa, na qual as pentoses fosfato são convertidas em hexoses fosfato e trioses fosfato (JEFFRIES, 1983). O gliceraldeído 3-fosfato e a frutose 6-fosfato são produzidos na fase não oxidativa. Ambos podem ser convertidos a piruvato na via Embden-Meyerhof-Parnas. O piruvato pode tanto ser descarboxilado e reduzido a etanol quanto entrar no ciclo do ácido cítrico. A via das fosfopentoses também é responsável pela geração de ribose 5-fosfato, utilizada na síntese de ácidos nucléicos, e histidina e eritrose 4-fosfato, necessários na síntese de aminoácidos aromáticos (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

As principais oxido-redutases do metabolismo de D-xilose, xilose redutase e xilitol desidrogenase, apresentam diferentes especificidades pelos co-fatores necessários a esta conversão: XR é dependente de NADPH ou NADH como co-fator, apresentando, em geral, uma maior preferência por NADPH; XDH é dependente de NAD+ ou NADP+, com maior preferência por NAD+. Dessa forma, na maioria dos micro-organismos fermentadores de xilose até então estudados, a conversão da xilose em xilulose implica na produção de um NADP+ e um NADH,

sendo que NADPH e NAD+ necessitam ser regenerados a fim de se manter o balanço redox. Para o NADPH, isso pode ser obtido pelo desvio de parte da frutose 6-fosfato produzida na etapa oxidativa para a via da pentose fosfato. Sob condições aeróbias, o NADH pode ser re-oxidado via cadeia respiratória com o oxigênio molecular. Contudo, sob condições anaeróbias, outro aceptor de elétron é necessário para re-oxidar o NADH (JEFFRIES; JIN, 2004).

2.4.6 Fatores que influenciam a bioconversão de pentoses em etanol

A bioconversão de pentoses em etanol é um processo complexo influenciado por vários fatores como condições de cultivo (temperatura, pH_{inicial}, aeração e agitação), tipo de meio de fermentação (concentração inicial de açúcares iniciais, nutrientes), cepa utilizada (concentração inicial de células, tipo de cepa), entre outros. Diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de pentoses, por meio da compreensão e da otimização das condições de processo empregadas e dos diferentes micro-organismos utilizados.

Segundo du Preez (1994) e Silva et al. (2012) a aeração é um fator que exerce grande importância na fermentação de xilose por leveduras, visto que o nível de aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre o crescimento e a formação de produto, sendo, portanto, capaz de afetar drasticamente a conversão em produto, em células e a produtividade. Taniguchi et al. (1997) reportaram que a fermentação de xilose é muito dependente do nível de oxigenação empregado ao meio, sendo que em cultivo anaeróbio, *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 consumiu uma quantidade insignificante de xilose, não sendo capaz de produzir etanol nestas condições. Segundo Nigam

(2001a) e Lin et al. (2012) níveis insuficientes de aeração na produção de etanol pela levedura Scheffersomyces stipitis NRRL Y-7124 levaram a um consumo lento de xilose, por outro lado, níveis excessivos de aeração reduziram o rendimento devido à oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado, sendo um nível de aeração adequado um parâmetro importante para atingir elevados valores de conversão. Grootjen et al. (1991) observaram no cultivo da levedura Scheffersomyces stipitis CBS 5773 em meio contendo xilose, a existência de uma relação linear entre o fornecimento de oxigênio e as conversões em células e em etanol, sendo que a conversão em células elevou-se com o aumento do fornecimento de oxigênio, e a conversão em produto mostrou uma correlação negativa. Resultados semelhantes foram reportados por Roberto et al. (1991) onde se avaliou o efeito na taxa de aeração na fermentação de xilose por Scheffersomyces stipitis CBS 5773. Segundo estes autores, a condição de maior aeração estudada proporcionou a maior conversão em células (Y_{X/S} = 0,50 g/g) e a menor conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S} = 0,13 g/g), e na condição de menor aeração ocorreu a menor conversão em células (Y_{X/S} = 0,01 g/g), entretanto a maior conversão em produto assim como a maior produtividade ocorreram em uma condição intermediária de aeração.

Segundo Silva et al. (2012) a disponibilidade de oxigênio no meio foi essencial para garantir elevada produção de etanol por *P. stipitis*. Esta variável deve ser controlada na fermentação e é fundamental para o processo de produção de etanol, uma vez que o excesso de oxigênio pode afetar o metabolismo celular. No cultivo com *P. stipitis* em meio contendo misturas de xilose/glicose (15/90 g/L), este autores conseguiram as máximas concentrações de etanol usando valores baixos de k_La (2,3 e 4,9 h⁻¹).

Segundo Bellido et al. (2013), aeração limitada na produção de etanol por *P. stipitis* resulta em um melhor consumo dos açúcares disponíveis. Em meios contendo xilose e glicose, um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio de 3,3 h⁻¹, foi encontrado como nível suficiente para aumentar a eficiência do processo. Em hidrolisados de palha de trigo, concentrações máximas de etanol foram obtidas com k_La de 3,8 h⁻¹ em um tempo de fermentação menor ao ser comparado com hidrolisados sem aeração, apresentando um incremento na produção de etanol de 29 %.

Apesar das conversões em célula e em produto muitas vezes comportaremse linearmente em relação à taxa de aeração nos processos de bioprodução de etanol, este comportamento não é observado para a produtividade, o que muitas vezes torna necessário um estudo detalhado das condições de transferência de oxigênio para que se possa otimizar a produtividade destes processos.

2.4.7 Influência dos campos eletromagnéticos em células microbianas

Os efeitos biológicos do campo eletromagnético de baixa frequência têm atraído a atenção de muitos pesquisadores, não apenas para estabelecer os mecanismos básicos desta interação, mas também em suas aplicações práticas potenciais. No entanto, os mecanismos pelos quais esses campos podem interagir com o sistema biológico não estão claros. Os efeitos biológicos dos campos eletromagnéticos foram estudados, especialmente em células (mamíferos, linfócitos T, tecidos, tumores), biomoléculas, reações químicas (que influenciam os estados de spin eletrônico de intermediários de reação) e microorganismos (POLK; POSTOW, 1996) e a interação com as membranas celulares (BAURÉUS KOCH et al., 2003).

Moore (1979) relatou que a estimulação ou inibição do crescimento de cinco espécies de bactérias e leveduras foi dependente da intensidade e frequência do campo electromagnético e do tipo de bactéria. Esta estimulação ou inibição do crescimento microbiano também foi estudada por outros autores (CEON et al., 1987; CHACÓN et al., 1996; IVANOVA et al., 1996; RAO et al., 1997; FOJT et al., 2004). Particularmente em um estudo sobre a influência que o campo eletromagnético exerce sobre uma suspensão celular de *Candida utilis* Y-660, observou-se que os campos eletromagnéticos de baixa frequência aceleram significativamente o crescimento celular durante as fermentações submersas a determinadas combinações de indução eletromagnética e tempos de exposição (CHACÓN et al., 1996). Segundo Siannah et al. (1999) o efeito do campo eletromagnético em um sistema de fermentação em suporte sólido em colunas de vidro, para obter um biopesticida produzido por *Trichoderma viride*, mostrou uma influência positiva sobre o crescimento do fungo.

Vários dispositivos de gerador de campo magnético têm sido desenvolvidos para realizar pesquisas sobre os efeitos dos campos magnéticos em materiais biológicos (KAUNE et al., 1984; KINOUCHI et al., 1984; CEON et al., 1987; KROPINSKI et al., 1994; GONZALEZ et al., 1996; BAURÉUS KOCH et al., 2003; FOJT et al., 2004). Estes equipamentos permitem expor culturas de células ao campo magnético em sistemas pequenos, tais como placas de Petri, tubos de inclinação ou pequenos frascos e reservatórios para suspensões celulares. Ao mesmo tempo, Chacón et al. (1996), Ivanova et al. (1996) e Rao et al. (1997) utilizaram campos magnéticos e eletromagnéticos em fermentações e processos enzimáticos mostrando uma influência favorável da aplicação dos campos eletromagnéticos nos processos estudados. De acordo com estas observações pode-se considerar que alguns dos efeitos primários dos campos magnéticos constantes e de baixa frequência, ao interagirem com sistemas biológicos, resultam em: alteração ou modificação da permeabilidade e do potencial de repouso das membranas celulares, favorecimento dos processos de ligação hormônio-receptor pela existência de receptores específicos (magnetossomas) e a potencialização do acoplamento específico, estimulação da síntese de DNA, influenciando o processo de reprodução celular, ativação dos sistemas redox ao nível ribossomal e mitocondrial, influenciando notavelmente na respiração celular.

Em bioprocessos, a aplicação de campos magnéticos ou eletromagnéticos inclui uma ampla gama de fenômenos que vão desde alterações nas taxas de crescimento, inibição, estimulação e até a produção de metabólitos e para tais efeitos, deve-se considerar a força de campo, a frequência, a forma de impulsos, a intensidade magnética e tempo de exposição (HUNT et al., 2009). Na Tabela 2.5, encontram-se alguns estudos da aplicação de campo magnético no crescimento microbiano, onde pode-se observar os fenômenos supracitados.

Os resultados contraditórios e a falta de reprodutibilidade são problemas típicos nas pesquisas com campo magnético, sendo que a diferença entre os resultados obtidos pelos diferentes pesquisadores podem ocorrer por diversos fatores, como o tipo de sistema de gerador de campo, a intensidade do campo, o tipo de orientação do fluxo (oscilatório ou estático), os polos magnéticos, o tempo de contato do micro-organismo com o campo, a densidade de células e meio ambiente da célula (por exemplo, tipo de meio e seus nutrientes) e outras condições físico-químicas que afetam o processo de bioestimulação através de forças eletromagnéticas (MITTENZWEY et al., 1996; HUNT et al., 2009).
Tabela 2.5 Diferer	ites processos biotecnológ	licos conduzidos so	b o efeito de cam	pos magnéticc	s. Adaptado de David (2012)	
Micro- organismo	Sistema de fermentação	Sistema de avaliação	Intensidade do campo	Tempo de exposição	Observações	Referências
Saccharomyces cerevisiae	Campo magnético gerado por condicionador magnético e por pares de ímãs, utilizando-se tubo de ensaio e fermentador.	Concentração final de etanol	Condicionador magnético (250 e 420 Gauss) ou os pares de imãs (5000 Gauss)	12-15 h	Nas condições experimentais estudadas, não existiu a comprovação de algum benefício ocasionado pela presença de campo magnético no processo de produção de etanol em modo batelada.	Lopes et al. (2012)
Aspergillus niger	Agitador rotatório	Produção de ácido cítrico e celulase	1 mT	4 H	Aumento de rendimento na produção de ácido cítrico e celulase	Gao et al. (2011)
Saccharomyces cerevisiae ATCC 7754	Reator	Produção de glutationa	25-34,3 mT	72 h	Estimulou o crescimento e produção de lisina pela levedura	Santos et al. (2010)
Saccharomyces cerevisiae	Reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MSFBR)	Produção de etanol	85 - 120 Oe	0.4 h ⁻¹	Aumento no rendimento, produtividade e concentração de etanol.	Chun-Zhao et al. (2009)
Escherichia coli e Paracoccus denitrificans	Placas de Petri com bobina cilíndrica alimentada por um autotransformador	Mudanças na morfologia	10 mT	۲ ۲	Não observaram nenhuma mudança na morfologia	Fojt et al. (2009)
Escherichia coli 10032	Placa de Petri entre dois ímãs orientados verticalmente. Pólo sul-fixado na parte inferior e o pólo norte, na superior	Efeitos biológicos	45 mT a 450 mT	14 h	A presença do campo e aumento da temperatura diminuíram a formação de colônias causando danos na superfície da célula	Ji et al. (2009)

73

(continua)

Micro- organismo	Sistema de fermentação	Sistema de avaliação	Intensidade do campo	Tempo de exposição	Observações	Referências
Escherichia coli	Biorreator acoplado a um gerador de campo magnético	Produção da proteína recombinante gp-41	10 - 100 mT	1 - 12 h	Aumento na produção e cultivos expostos a 0.1 T durante 6,5 h mostraram um aumento na viabilidade celular	Justo et al. (2006) e Justo et al. (2007)
Spirulina platensis	Air-lift (3,5 L)	Crescimento celular	Até 0,55 T	7 dias	Campo de até 0,4 T estimulou o crescimento, porém 0,25 foi a melhor intensidade.	Li et al. (2007)
Saccharomyces cerevisiae	Em placas no interior de uma bobina cilíndrica alimentada por um transformador	Crescimento da levedura	10 mT	24 min	Inibição do crescimento.	Novák et al. (2007)
Saccharomyces cerevisiae	Fermentador com dois geradores de campo	Produção de etanol	5-20 mT	2 h	Aumento na produtividade em etanol	Perez et al. (2007)
Lactococcus lactis subsp. lactis	Fermentador com sistema de reciclo	Produção de nisina	5-20 mT	4-12 h	Aumento de cinco vezes no rendimento e três vezes na produção de biomassa.	Alvarez et al. (2006)
Saccharomyces cerevisiae	Tubos cilíndricos expostos a um imã supercondutor	Proliferação da levedura	9-14 T	21 h	A 14 T houve proliferação lenta da levedura em 16 h, os autores sugerem que houve falta de oxigênio no meio.	lwasaka et al. (2004)
Escherichia coli	Frascos de 50 mL	Crescimento celular e expressão do gene	300 mT	50 h	Aumento na proliferação das células e alterações na expressão do gene	Potenza et al. (2004)
Saccharomyces cerevisiae WS8105-1C	Em frascos Eppendorf com par de bobinas de Helmholtz	Efeitos no crescimento	0,35 a 2,45 mT	24 e 72 h	Não houve alterações no crescimento	Ruiz-Gómez et al. (2004)

(continua)

74 (continuação)

-									
	Referências	Albertini et al. (2003)	Yavuz e Çelebi (2000)	Yavuz e Çelebi (2000)	Siannah et al. (1999)	Lei e Berg (1998)	Binninger e Ungvichian (1997)	Mehedintu e Berg (1997)	Chacón et al. (1996)
	Observações	Inibição do crescimento, alterações na germinação de esporos e incapacidade de reter reservas celulares	Intensidade de 17,8 mT não resultou em alteração no crescimento, mas sim em aumento no consumo de substrato	Entre 8,9 a 17,8 mT aumento na velocidade de remoção de substrato e acima de 17,8 queda na velocidade de remoção	15 min de exposição e 600 G resultaram em efeitos positivos	Com 3,4 mT aumentou 20 % a produção de ATP após 8h e com 4,9 mT aumentou 30 % após 6 h	Não afetou a taxa de crescimento	0,2 mT inibiu o crescimento em 16 % e 0,5 mT estimulou o crescimento celular e produção de ATP	Aumento do crescimento celular
	Tempo de exposição	1 semana	24 h	40 h	15-30 min	8h	24 h	10 h	20 h
	Intensidade do campo	0,03 T	8,9 a 46,6 mT	8,9 a 46,6 mT	100 - 600 G	3,4 e 4,9 mT	20µT	0,2 a 0,5 mT	525 G
	Sistema de avaliação	Alterações morfológica e bioquímica	Consumo de substratos	Remoção de substratos	Produção do biopraguicida	Formação de ATP	Expressão genética	Crescimento celular	Crescimento celular e condições do sistema
(0	Sistema de fermentação	Placas de Petri	Frascos de vidro colocados em um agitador	Fermentador de 300 mL	Colunas de vidro com eletroímã	Vaso com bobinas Helmholtz	Fermentador	Vaso com bobinas Helmholtz	Fermentador tipo Airlift
(conclusã	Micro- organismo	Fusarium culmorum	Micro- organismos em lodo	Micro- organismos de águas residuais	Trichoderma viride	Corynebacterium glutamicum 227	S. cerevisae	S. cerevisae	Candida utilis Y- 660

Muniz et al. (2007), avaliaram o efeito do crescimento da *S. cerevisiae* sob efeito de campo magnético contínuo durante 24 horas de fermentação em sistema de batelada (Figura 2.12).



Figura 2.12 Esquema do tubo do reator de fermentação com 10 imãs fixados opostos diametralmente. Adaptado de Muniz et al. (2007)

Os experimentos foram conduzidos em um tubo exposto ao campo, com um fluxo de intensidade de 220 mT, produzidos por imãs de NdFeB fixados opostos diametralmente (N para S) em um tubo do reator de fermentação. Em outro tubo, sem a presença de imãs, foi realizada uma fermentação nas mesmas condições (controle), em meio contendo glicose (Figura 2.12). O crescimento da levedura foi monitorado pela densidade óptica e por peso seco. Como resultado, Muniz et al. (2007) verificaram que houve uma maior produção de biomassa celular (2,5 vezes maior quando comparada ao experimento sem campo) e que a taxa de crescimento foi maior do que a taxa de consumo de glicose, sugerindo um ganho no processo de produção de biomassa com aplicação do campo magnético.

Desta forma, em virtude destes efeitos primários, trabalhos sobre a aplicação de campos magnéticos em diversos processos de fermentação vêm surgindo com a finalidade de aprimorar a produção de bioetanol ou de estabelecer melhorias tecnológicas que resultem em benefícios em termos de produtividade, o qual é um dos objetivos deste trabalho.

2.4.8 Biorreatores utilizados nos processos fermentativos

A escolha do modelo de biorreator empregado para determinado processo, utilizando as técnicas de imobilização ou não, é uma etapa bastante importante, pois o conhecimento da cinética de reação e do modo como os reatores biológicos funcionam são fundamentais para a eficiência do processo (DORAN, 1997). Quando se trata do modelo de biorreator empregado deve-se considerar aspectos como configuração e tamanho do biorreator, condições de processo e modo de operação, uma vez que estes aspectos têm um impacto significativo no processo (SCHMIDELL et al., 2001).

A operação em batelada, especialmente em tanques agitados, é uma escolha relativamente barata e flexível podendo ser usada em muitos processos industriais; já a operação continua requer modelos específicos de biorreatores e envolve um gasto enorme de capital para sua implantação, contudo tem vantagens como custos reduzidos de manutenção e controle automático (MAZID, 1993).

Existem várias formas de classificação dos biorreatores. A Figura 2.13 apresenta uma forma de classificação mista, que é a mais abrangente empregada até o momento (SCHMIDELL et al., 2001).

Na produção de etanol, tanto para bebidas quanto para combustível, várias configurações de biorreatores empregam células imobilizadas (BRAVO; GONZALEZ, 1991; ROUKAS, 1994). Na maioria dos casos são usados sistemas de biorreatores de leito empacotado em batelada ou continuo, além de tanques

agitados de fluxo continuo (GOKSUNGUR; ZORLU, 2001). Entretanto, diversos outros modos de operação e configurações vem sendo testados e comparados, principalmente quanto à eficiência e produtividade. Entre estes pode-se citar: leito fluidizado, leito empacotado ou reatores agitados operados em batelada ou batelada alimentada e de forma continua (KOURKOUTAS et al., 2004).



Figura 2.13 Classificação geral dos biorreatores. Adaptado de Schmidell et al. (2001)

3. OBJETIVOS

Geral

Comparar a produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando à aplicação em diferentes configurações de campo electromagnético.

Específicos

- Determinar a influência dos parâmetros operacionais vazão de aeração, pH_{inicial} e agitação na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 em bateladas simples.
- ✓ Analisar comparativamente os resultados obtidos pelas duas leveduras e selecionar aquela que se destaca em conversão e produtividade em etanol.
- Avaliar a influência do campo eletromagnético em biorreatores de leito fluidizado com diferentes configurações de campo empregando a levedura de interesse imobilizada em um suporte com propriedades magnéticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Matéria-prima e preparo do hidrolisado hemicelulósico

4.1.1 Matéria-prima

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado foi cedido pela Usina de Açúcar e Álcool Costa Pinto do Grupo COSAN, localizada na cidade de Piracicaba/SP. O bagaço foi seco ao sol e moído com moinho de facas, ensacado e estocado (temperatura ambiente por 3 meses) para realização das operações de prétratamento.

4.1.2 Caracterização físico-química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar "in natura" e o resíduo sólido após o prétratamento (celulignina) foram caracterizados quanto aos seus compostos químicos (teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas), segundo a metodologia descrita por Gouveia et al. (2009). Para estas determinações, foram realizados experimentos em triplicata contendo 2 g (massa seca) de cada variedade de amostra. Em béqueres de vidro, as amostras foram tratadas com ácido sulfúrico a 72 % (v/v), mantidos em banho termostatizado a 45°C por 7 minutos, permanecendo em contínua agitação durante todo o processo. A reação foi então interrompida com 275 mL de água destilada, e o material foi transferido quantitativamente para frascos Erlenmeyers de 500 mL. Estes frascos, devidamente identificados, foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após este tempo, o material foi retirado e resfriado à temperatura ambiente e então filtrado quantitativamente em funis contendo papel filtro qualitativo Whatman® n° 1, previamente tarados. O hidrolisado resultante foi coletado em balão volumétrico de 500 mL, sendo o volume ajustado com água destilada, homogeneizado e armazenado para determinação das concentrações de celobiose, glicose, xilose, arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e 5-hidroximetilfurfural por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para a quantificação da celulose e hemicelulose presentes nas amostras, utilizaram-se, respectivamente, as seguintes equações 4.1 e 4.2 (GOUVEIA et al., 2009):

$$%C = %Cel*0,95 + %Gli*0,9 + %HMF*1,29$$
 Eq. (4.1)

onde, C é Celulose, Cel é Celobiose, Gli é Glicose, H é Hemicelulose, Xil é Xilose, Ara é Arabinose, Fur é Furfural, A.A. é Acido acético, A.F é Acido fórmico, HMF é 5-Hidroximetilfurfural.

Para determinação da lignina solúvel, 5 mL do hidrolisado filtrado foi transferido para balões volumétricos de 100 mL seguidos da adição de 40 gotas de hidróxido de sódio 6,5 M. Os volumes dos balões foram devidamente ajustados com água destilada e homogeneizados. Leituras da absorbância a 280 nm foram realizadas e utilizadas para determinação conforme a equação 4.3 (GOUVEIA et al., 2009):

LigninaSolúvel (g/L) = 0,04187 * (A -
$$A_{dp}$$
) - 0,0003279 Eq. (4.3)

$$A_{dp} = (C_F * \varepsilon_F + C_{HMF} * \varepsilon_{HMF})$$
 Eq. (4.3a)

onde A é absorbância da solução a 280 nm, Adp é absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural) a 280 nm, C_F e C_{HMF} são as concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, ε_F e ε_{HMF} são as absortividades do furfural e do 5-hidroximetilfurfural.

O material sólido retido no papel filtro qualitativo foi lavado exaustivamente com aproximadamente 1,5 L de água destilada, seco ao ar e, em seguida, transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 105 °C até peso constante. Os filtros contendo o material retido foram então transferidos para cadinhos previamente tarados, tampados e acondicionados em mufla de aquecimento elétrico, onde permaneceram a 800 °C por 2 horas. Após o resfriamento, os cadinhos contendo o material foram transferidos para dessecadores e então quantificados gravimetricamente quanto ao teor de cinzas utilizando-se a equação 4.4 (GOUVEIA et al., 2009):

% Cinzas =
$$\frac{M_{C}}{M_{A}}$$
 * 100 Eq. (4.4)

onde M_C é a massa de cinzas *e* M_A é a massa de amostra base seca.

A lignina insolúvel presente nas amostras foi determinada a partir da diferença entre as massas do resíduo seco e a massa de cinzas contida nos cadinhos conforme equação 4.5 (GOUVEIA et al., 2009):

%
$$L_{\kappa_i} = \frac{M_{\kappa} - M_C}{M_A} * 100$$
 Eq. (4.5)

onde, %L_{Ki} é a Lignina Klason insolúvel

4.1.3 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar para obtenção do hidrolisado hemicelulósico foi realizado em reator de aço inox com volume efetivo de 250 L, localizado no Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena. O bagaço foi percolado com ácido sulfúrico (98 %) como catalisador em uma razão de 100 mg H₂SO₄/ g de matéria seca à temperatura de 121 °C durante 20 minutos, utilizando-se uma proporção de 1/10 entre massa de bagaço e volume da solução de H₂SO₄. Após resfriado, o hidrolisado foi filtrado e estocado em câmara fria.

4.1.4 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-deaçúcar

O hidrolisado foi submetido a um processo de concentração à vácuo em um concentrador de aço inox com capacidade volumétrica de 32 L a 70 °C, a fim de se obter a concentração de xilose da ordem de 50 g/L que corresponde a um fator de concentração igual a 5.

4.1.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-deaçúcar concentrado

O hidrolisado concentrado foi destoxificado para reduzir o teor de inibidores, conforme metodologia estabelecida por Alves et al. (1998), a qual

consistiu da elevação do pH até 7,0 com óxido de cálcio, seguida pela redução do pH até 5,5 com ácido fosfórico e pela adição de carvão ativo na proporção 2,5 % (m/v), sendo esta mistura mantida em incubadora de movimento rotatório a 200 rpm, sob 30 °C por 1 hora. Após cada etapa do procedimento de destoxificação o hidrolisado foi filtrado à vácuo e finalmente autoclavado sob pressão manométrica de 0,5 atm (111 °C) por 15 minutos.

Após as etapas de hidrólise, concentração e destoxificação os diferentes hidrolisados foram caracterizados quimicamente por cromatografia líquida de alta eficiência pela determinação de seus açúcares e inibidores presentes (furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, fenóis).

4.2 Processo fermentativo para avaliar e comparar a produção de etanol de segunda geração pelas leveduras em estudo

4.2.1 Micro-organismos

Nos experimentos foram utilizadas as leveduras *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria-Ilinois (EUA) e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 isolada da Mata Atlântica brasileira e cedida pelo grupo de pesquisa do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2.2 Manutenção das leveduras

A manutenção das leveduras foi realizada por repiques em placas de Petri contendo meio ágar extrato de malte e extrato de levedura (glicose 1 %, extrato de levedura 0,3 %, extrato de malte 0,3 %, peptona bacteriológica 0,5 % e ágar 2 %) a cada dois meses e estocadas a 4 °C.

4.2.3 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado pelo cultivo de cada uma das leveduras (usando duas alçadas) em frascos Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio semisintético composto de 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 30 g/L de xilose. Os frascos foram incubados em incubadora com movimento rotatório QUIMIS sob agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas (fase de crescimento exponencial) e recuperadas por centrifugação a 2600 x g por 15 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Esta suspensão celular foi utilizada como inóculo no biorreator (células livres) e para o processo de imobilização (células imobilizadas), empregando-se uma concentração inicial de células de aproximadamente 1 g/L .

4.2.4 Efeito da agitação, vazão de ar e pH_{inicial} na produção de etanol em biorreator agitado – STR

O processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico a etanol foi conduzido em um fermentador agitado - STR adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça) tipo KLF2000, com capacidade nominal de 2,4 litros (Figura 4.1). O processo de esterilização foi realizado "in situ" com aquecimento elétrico (800W) e jaqueta de segurança. O fermentador foi equipado por sensores de pH, de temperatura e de oxigêno dissolvido (DO), 4 chicanas removíveis, um eixo agitador com turbina de seis pás planas ('flat blade') e um condensador de vidro. O fermentador foi operado em modo descontínuo. O ar comprimido de bancada passou por um filtro e foi adicionado constantemente durante o processo de fermentação.

A instrumentação e controle do fermentador incluiram um sistema de controle direto dos parâmetros do processo temperatura e agitação. As medidas de vazão de ar foram controladas pelo rotâmetro, com auxílio do fluxímetro de bolha. Foi adotado um volume de 250 mL para analisar o tempo em que cada bolha percorria essa distância. Os parâmetros pH e DO foram medidos "in situ" por um transmissor Mettler Toledo M300 multiparâmetro de 2 canais.



Figura 4.1 Biorreator agitado – STR empregado no processo de obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando as leveduras *S. stipitis* e *C. shehatae*

O processo foi iniciado pelo preenchimento do fermentador com o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar previamente destoxificado e autoclavado (1,2 L), suplementado com extrato de levedura (3 g/L) como fonte de nitrogênio. Os parâmetros operacionais foram ajustados para uma temperatura de 30°C e os valores de agitação, vazão de ar e pH_{inicial} ajustados

segundo planejamento experimental 2^3 com três repetições no ponto central. Na Tabela 4.1 estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível alto; o sinal (-) o nível baixo e o sinal (0) o ponto central. Foi proposto inicialmente um planejamento fatorial completo 2^3 , conforme mostrado na Tabela 4,2. Como variável resposta foi considerado o fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}).

Tabela 4.1 Codificação dos níveis para as variáveis agitação, aeração e pH_{inicial} na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

		Níveis	
Variáveis	Baixo (-)	Central (0)	Alto (+)
X1 (agitação, rpm)	100	250	400
X ₂ (aeração, vvm)	0,10	0,40	0,70
X_3 (pH _{inicial})	4,50	5,50	6,50

O fermentador foi inoculado com células ativas livres de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e o processo de fermentação, em bateladas, foi conduzido até 72 horas, com retiradas periódicas, cada 12 horas, de amostras para determinação da concentração de células, xilose, glicose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético.

A mesma metodologia foi empregada para o estudo dos parâmetros agitação, vazão de ar e pH_{inicial} na produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Candida shehatae* UFMG HM 52.2.

_	Níve	is codific	ados		Níveis reais X ₂ X ₃ vvm pH _{inicia}	
Experimentos -	X ₁	X ₂	X ₃	X₁ rpm	X₂ vvm	X ₃ pH _{inicial}
1	+	+	+	400	0,70	6,50
2	-	+	+	100	0,70	6,50
3	+	-	+	400	0,10	6,50
4	-	-	+	100	0,10	6,50
5	+	+	-	400	0,70	4,50
6	-	+	-	100	0,70	4,50
7	+	-	-	400	0,10	4,50
8	-	-	-	100	0,10	4,50
9	0	0	0	250	0,40	5,50
10	0	0	0	250	0,40	5,50
11	0	0	0	250	0,40	5,50

Tabela 4.2 Matriz do planejamento fatorial 2³ com três retições no ponto central para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH_{inicial} na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

4.2.5 Síntese das partículas magnéticas

Soluções aquosas de cloreto ferroso 500 mL (0,2 M) e cloreto férrico 500 mL (0,3 M) foram misturadas e agitadas com agitador mecânico a 250 rpm, sendo adicionada, lentamente por gotejamento, uma solução de hidróxido de sódio 200 mL (4 M). Após a adição de hidróxido de sódio o precipitado formado foi filtrado e lavado duas vezes com acetato de etila, seco a 30 °C por 24 horas, moído e estocado (DUSSÁN et al., 2010).

4.2.6 Imobilização das células em alginato de sódio

As células foram imobilizadas pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio. Considerou-se uma relação de volume de meio de fermentação

por quantidade de suspensão células-alginato-magnetita de 1:10. A concentração de células imobilizadas no meio de fermentação foi de aproximadamente 1 g/L.

A suspensão de alginato de sódio (2 %) (SG 1100–Degussa Ltda, Brasil) contendo partículas magnéticas, previamente sintetizadas e autoclavadas a 111 ^oC por 15 minutos, foi adicionada à suspensão celular obtida conforme descrito no item (4.2.3), de modo a se obter uma suspensão homogênea.

As esferas de polímero com propriedades magnéticas foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão homogênea em uma solução de cloreto de cálcio com concentração igual a 0,1 M, previamente preparada em água bidestilada e esterilizada a 121 °C por 30 min, e mantida sob agitação. Para o gotejamento da suspensão celular na solução de cloreto de cálcio, foi empregada uma bomba peristáltica e uma mangueira previamente autoclavada, conforme ilustrado na Figura 4.2.



Figura 4.2 Fotografia do equipamento utilizado para a imobilização das células em gel de alginato de cálcio-Fe₃O₄

As esferas formadas, contendo as células imobilizadas, foram mantidas na solução de cloreto de cálcio a 4 ºC pelo período de 24 horas. Após este período

de cura, as esferas foram lavadas em água destilada esterilizada e utilizadas nos experimentos fermentativos.

4.2.7 Testes de fermentação para avaliar a influência das partículas magnéticas no processo de imobilização

Ensaios para avaliar a influência das partículas magnéticas no processo de imobilização foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de hidrolisado destoxificado, com células imobilizadas no polímero com propriedades magnéticas (item 4.2.6). Foram avaliados os suportes de polímeros contendo 1 % e 8 % m/v de partículas magnéticas e comparados com o controle (sem partículas magnéticas). Os frascos foram mantidos em incubadora de movimento rotatório sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. O processo de fermentação foi conduzido até 96 horas, com retiradas periódicas de amostras, cada 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.8 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico em biorreator de leito fluidizado assistido por campo eletromagnético

A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em um fermentador protótipo de 500 mL do tipo leito vertical de vidro, acoplado a um condensador em espiral. O volume de trabalho foi de 300 mL e o leito foi fluidizado com uma bomba peristáltica (Figura 4.3). A temperatura no fermentador foi controlada com um banho termostático com refrigeração e circulação externa e interna e verificada através de um termômetro infravermelho. Não foi possível fazer o monitoramento "in situ" das variáveis pH e DO.

Previamente, o sistema de geração de campo eletromagnético foi calibrado para determinar as faixas de indução magnética e os parâmetros de operação que poderiam ser utilizados no sistema. O biorreator assistido por campo eletromagnético (Figura 4.3) foi conectado a um aparelho que quando ligado a uma tomada da rede de energia, pode-se ajustar a saída dele, de modo a se obter qualquer tensão (VARIAC), interligado com um amperímetro para monitorar a corrente de alimentação das bobinas geradoras de campo. Com a variação da tensão (mudança de posição do VARIAC), muda-se a corrente do sistema e consequentemente a indução magnética (B) no sistema. As medições de indução eletromagnética em função da posição dentro da câmara de tratamento magnético foram realizadas usando um gaussímetro digital (Hirst Magnetic, Reino Unido).

Foram realizados experimentos com e sem aplicação de campo eletromagnético em duplicata, utilizando uma intensidade de campo e dois biorreatores assistidos por campo eletromagnético, sendo um sistema transversal e outro sistema axial. Devido ao aquecimento da câmara de tratamento magnético (70 °C), houve a necessidade de se adotar uma estratégia operacional tipo on/off, ou seja, a cultura de levedura ficou sob o efeito do campo eletromagnético com intervalos de tempo de exposição a cada 3 horas e com períodos de desligamento de 1 hora, resultando desta forma no resfriamento do sistema de bobinas, durante as 48 horas de cultivo. Salienta-se ainda que, não foi possível ultrapassar valores de corrente acima de 6 A devido a um aquecimento das bobinas. O processo de fermentação foi conduzido até 48 horas, com retiradas periódicas de amostras, a cada 12 horas.

91



Figura 4.3 Biorreator de leito fluidizado com campo eletromagnético. (a) Sistema transversal (b) Sistema axial

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular no meio de fermentação foi determinada pela leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída.

4.3.2 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético, etanol, furfural e 5-hidroximetilfurfural foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Agilent Technology 1200 series (Agilent, EU). Para a análise do teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol, as amostras foram previamente filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel ácido sulfúrico 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

Para a análise das concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18, (4,6mm x 100mm, 3,5 micras) mantida à temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 µL; detector de ultra-violeta UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 e fluxo de 0,8 mL/min.

4.3.3 Determinação da concentração de fenóis

A concentração de fenóis foi determinada empregando-se a metodologia descrita por Gouveia et al. (2009). Alíquotas de 2 mL das amostras foram adicionados em tubos e alcalinizadas com solução de hidróxido de sódio 6 M até pH 12. Posteriormente as amostras foram diluídas e a absorbância determinada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B a 280 nm. A concentração dos fenóis totais foi determinada empregando-se a equação 4.3 (item 4.1.2).

4.3.4 Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado pela metodologia de "gassing-out", segundo Pirt (1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi desgaseificado com nitrogênio, com o objetivo de

reduzir a zero o oxigênio dissolvido no meio. O meio foi então agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo. Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (equação 4.6) foi possível obter a relação apresentada na equação 4.7:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \left(C^* - C \right)$$

Eq. (4.6)

onde C/C* corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação). O gráfico do logaritmo de (1 - C/C*) em função do tempo permite a determinação do valor de k_La em h⁻¹.

4.3.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

No modelo matemático, procura-se determinar a alteração das concentrações de micro-organismo (X), de substrato (S) e de produto (P) na fermentação ao longo do tempo, isto é, X = X(t), S = S(t) e P = P(t). O modelo é formado por três equações diferenciais ordinárias de 1^a ordem e 1^o grau evolutivas, não lineares.

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x X$$
 Eq. (4.8)

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_S X$$
 Eq. (4.9)

$$\frac{dP}{dt} = \mu_P X$$
 Eq. (4.10)

onde μ_x é a velocidade específica de crescimento, μ_s a velocidade específica de consumo de substrato e μ_p é a velocidade específica de geração de produto, sujeitos às condições iniciais.

O modelo cinético utilizado neste trabalho foi o de Monod, dado pela seguinte equação:

$$\mu_{\chi} = \frac{\mu_m S}{K_s + S}$$
 Eq. (4.11)

4.4 Determinação dos parâmetros fermentativos

a) Fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}, g_{etanol}/g_{xilose+glicose})

A estimativa de Y_{P/S} instantâneo é obtida correlacionando-se a massa de etanol produzida (Δ P) com a massa de açúcares consumidos (Δ S), em gramas, calculado pela equação 4.12. O coeficiente angular da reta que passa pela origem, fornece a estimativa de Y_{P/S} global (SCHMIDELL et al., 2001).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$$
 Eq. (4.12)

onde P_f é a concentração final de etanol, P_i a concentração inicial de etanol, S_f a concentração final de açúcares (xilose e glicose) e S_i a concentração inicial de açúcares (xilose e glicose).

b) Produtividade volumétrica em etanol (Q_P, g_{etanol} L⁻¹ h⁻¹)

A produtividade volumétrica em etanol, a qual expressa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h), foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$Q_{P} = \frac{P_{F} - P_{I}}{t}$$
 Eq. (4.13)

onde, t é o tempo de fermentação, P_f a concentração final de etanol e P_i a concentração inicial de etanol.

4.5 Análise da estatística

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



Figura 4.4 Fluxograma da metodologia empregada no trabalho. BS: Bagaço seco, EL: Extrato de levedura, FBR: Bioreator de leito fluidizado e FBR/M: Biorreator de leito fluidizado com campo eletromagnético.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar

Na obtenção do hidrolisado hemicelulósico foram empregados 20 kg de bagaço de cana-de-açúcar úmida (com 8 % de umidade), sendo o volume total da suspensão ácida no reator de 200 L, obtendo-se no final da hidrólise um volume de 130 L de hidrolisado. O balanço de massa do processo mostrou que aproximadamente 70 L de hidrolisado ficaram retidos no bagaço resultante após o processo de hidrólise (celulignina) e alguma parte perdida por evaporação durante a descompressão do reator. Sugere-se que novas metodologias para separação do hidrolisado e da celulignina sejam avaliadas para se evitar a perda do hidrolisado que fica retido no resíduo sólido após a etapa de pré-tratamento.

5.1.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A caracterização química do bagaço de cana de açúcar "in natura" e da celulignina resultante do pré-tratamento está apresentada na Tabela 5.1. Observa-se que a quantidade de celulose e lignina do bagaço de cana após a hidrólise ácida aumentou devido à solubilização dos açúcares constituintes da hemicelulose (xilose, glicose e arabinose). Isto indica que as condições de hidrólise empregadas foram apropriadas para extrair os açúcares contidos na fração hemicelulósica, com uma eficiência de 61 %.

Componentes	Bagaço "in natura"	Celulignina
Celulose (%)	34,64	50,70
Hemicelulose (%)	18,90	7,33
Lignina Total (%)	27,61	33,24
Cinzas (%)	6,41	3,44
Extrativos (%)	8,77	
Total (%)	96,33	94,70

Tabela 5.1 Caracterização química do bagaço de cana de açúcar "in natura" e celulignina

Como pode ser observado na Tabela 5.1, no bagaço "in natura" a fração hemicelulósica representou 18,9 % do bagaço, enquanto que a celulose correspondeu à maior parte do material, representando 34,6 % da sua composição. Estes valores apresentam algumas diferenças quando comparados a resultados na literatura, também para bagaço de cana (Tabela 5.2). Estas diferenças podem ser atribuídas às características da matéria-prima, como variedade, idade, condições de cultivo e tempo de estocagem.

Dos Santos et al. (2011) comprovaram que o tempo de estocagem influi na composição química do bagaço, seja seco ou conservado em umidade natural, e que este sofre degradação acentuada na presença de grande quantidade de umidade. O ideal seria sua utilização logo após sua produção, pois períodos longos de estocagem levam à sua decomposição, independente da presença ou não de umidade.

Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referências
43,1	28,6	20,8	2,9	Arruda (2011)
54,6	45,4	21,3	n.d	Quintero (2011)
43,0	25,0	23,0	n.d.	Rodrigues e Guirardello (2008)
43,6	33,5	18,1	2,3	Sun et al. (2004)
34,6	18,9	27,6	6,4	Presente trabalho

Tabela 5.2 Comparação química percentual do bagaço de cana-de-açúcar.

n.d: não detectado

5.1.2 Caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Na Tabela 5.3 são apresentadas as concentrações dos principais componentes do hidrolisado obtido após as etapas de pré-tratamento com ácido diluído do bagaço de cana-de-açúcar, concentração e destoxificação. Observa-se a predominância da xilose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em relação aos demais açúcares (Tabela 5.3), o que favorece a utilização deste nas pesquisas com micro-organismos com capacidade de assimilar pentoses. Estes resultados estão de acordo com os reportados por Sarrouh (2009), Chaud (2010) e Ferreira (2010).

Componente	Hidrolisado Hemicelulósico					
(g/L)	Original	Concentrado 5X	Destoxificado			
Xilose	14,19	69,65	63,37			
Glicose	1,52	7,32	7,04			
Arabinose	1,43	7,08	6,95			
Acido Acético	0,85	3,15	2,91			
Furfural	0,146	0,181	0,035			
5-HMF	0,015	0,020	0,019			
Fenóis Totais	2,57	5,47	1,33			
рН	1,10	0,75	5,5			

Tabela 5.3 Características do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

A concentração total de açúcares obtida na hidrólise (hidrolisado não concentrado), foi cerca de 17 g/L, assim como a proporção mássica entre estes foi aproximadamente 1,1:9,9:1 para glicose, xilose e arabinose, respectivamente. Esses resultados foram bastante semelhantes aos reportados por Sarrouh (2009), Chaud (2010) e Ferreira (2010), que otiveram hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar contendo cerca de 20 g/L de açúcares totais, na proporção mássica de 1:9:1 de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, empregando as mesmas condições de hidrólise que as utilizadas neste trabalho, porém com tempo de reação menor.

Observa-se ainda na Tabela 5.3, que além dos açúcares estão também presentes no hidrolisado compostos tóxicos aos micro-organismos como ácido acético, proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose; furfural e 5-hidroximetilfurfural, formados a partir da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989) e compostos fenólicos que são produtos da degradação da lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL,

2000a). Concentrações da ordem de 0,05 g/L de furfural e 5 g/L de ácido acético podem, em uma fermentação, afetar sensivelmente a viabilidade das células, a taxa de crescimento específico e a produtividade volumétrica do processo (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; SILVA et al., 2004). As baixas concentrações destes compostos no hidrolisado indicam, provavelmente, que as condições de hidrólise empregadas foram favoráveis para solubilizar os açúcares contidos na fração hemicelulósica, causando pouca decomposição destes.

Também pode ser observado na Tabela 5.3 que o processo de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico (5 vezes) elevou proporcionalmente as concentrações dos açúcares, enquanto proporcionou um aumento de 2,7 vezes da concentração de ácido acético. De acordo com estudos realizados por Rodrigues et al. (2003), o baixo valor do pH do hidrolisado (aproximadamente 0,8) favorece a volatilização parcial deste ácido que, nestas condições encontra-se sob a forma não dissociada. Já para o furfural, verifica-se também um aumento de 1,24 vezes, o que pode ser justificado pela sua volatilidade a altas temperaturas (GREEN; PERRY, 1977).

Quanto ao método de destoxificação utilizado, verificou-se (Tabela 5.3) que o mesmo proporcionou, além da diminuição das concentrações de compostos tóxicos, uma perda não significativa de açúcares. O maior efeito deste tratamento foi sobre os compostos fenólicos, uma vez que se observou uma remoção de 75 % destes. Sarrouh (2009), Chaud (2010) e Ferreira (2010) também verificaram, com o emprego deste procedimento de destoxificação, remoção de 70 % dos fenólicos, valor próximo ao obtido no presente trabalho. A remoção destes compostos fenólicos é importante devido ao fato deles serem um dos mais

102

relevantes inibidores do metabolismo das leveduras (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

5.2 Processo fermentativo para avaliar e comparar a produção de etanol de segunda geração pelas leveduras em estudo

5.2.1 Efeito da aeração, pH_{inicial} e agitação na produção de etanol em biorreator agitado – STR usando a levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124

Os níveis de agitação, aeração e pH_{inicial} e as respostas avaliadas, fator de conversão de açúcares em etanol, açúcares consumidos e produtividade em etanol estão apresentados na Tabela 5.4 e demonstram que a levedura foi capaz de produzir etanol em todas as condições estudadas.

Os maiores valores do fator de conversão de açúcares em etanol, na faixa de 0,16 g/g a 0,22 g/g, foram observados nos experimentos com pH_{inicial} 6,50 e k_La entre 0,1 e 7 h⁻¹, entretanto quando foi empregado pH_{inicial} de 4,50 houve uma redução de Y_{P/S} para 0,053 g/g. Redução nos valores de produtividade em etanol, devido à diminuição do pH_{inicial} empregado também foi observada.

Nas Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 são apresentados os perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol para os experimentos realizados sob diferentes condições de aeração (0,1 a 0,7 vvm), agitação (100 a 400 rpm) e pH_{inicial} (4,50 a 6,50). Nota-se que a variação na taxa de transferência de oxigênio e pH_{inicial}, apresentaram uma influência significativa sobre o consumo de açúcares, crescimento celular e a produção de etanol pela levedura *S. stipitis*.

	Ν	íveis re	ais		,	/ariáveis Respo	osta
Experimentos	X₁ rpm	X ₂ vvm	$\begin{array}{c} X_{3} \\ pH_{\text{inicial}} \end{array}$	k _L a _{inicial} (h⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Açúcares Consumidos ¹ (%)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)
1	400	0,70	6,50	7,23	0,183	61,59	0,104
2	100	0,70	6,50	3,19	0,156	85,72	0,102
3	400	0,10	6,50	0,97	0,221	48,48	0,086
4	100	0,10	6,50	0,11	0,172	37,32	0,051
5	400	0,70	4,50	7,36	0,114	41,51	0,033
6	100	0,70	4,50	3,35	0,069	38,18	0,026
7	400	0,10	4,50	0,92	0,056	35,08	0,018
8	100	0,10	4,50	0,15	0,053	39,42	0,021
9	250	0,40	5,50	1,60	0,128	50,87	0,060
10	250	0,40	5,50	1,73	0,134	50,66	0,063
11	250	0,40	5,50	1,66	0,127	50,79	0,060

Tabela 5.4 Matriz do planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central para estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH_{inicial} na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis*

¹Açúcares consumidos: Xilose + Glicose

Dentre as condições avaliadas, verificou-se que valores de k_{La} de 3 h^{-1} e $pH_{inicial}$ de 6,50 (Figuras 5.1 E2), favoreceram a bioconversão de xilose em etanol por *S. stipitis*, proporcionando um equilíbrio entre a produtividade volumétrica em etanol, a concentração de etanol produzida e o consumo de açúcares.



Figura 5.1 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S. *stipitis* para os experimentos 1 ao 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}







Figura 5.3 Concentração de de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura S. stipitis para os experimentos 9 ao 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}

Nos experimentos com k_l a aproximadamente igual a 7 h⁻¹ (Figura 5.1 E1 e Figura 5.2 E5), foi observado um consumo de substrato de 62 % em 60 horas, resultando em uma máxima concentração final de células (6,6 g/L) e um acúmulo de etanol de aproximadamente 6 g/L, havendo após este período, uma assimilação de parte do etanol produzido, mesmo com presença de xilose no meio de fermentação. Este comportamento sugere a ocorrência de um excesso no fornecimento de oxigênio, visto que elevada guantidade de oxigênio tem sido considerado um fator capaz de favorecer a assimilação do etanol por S. stipitis (SKOOG et al., 1992). Além disso, a elevada concentração celular observada nesta condição poderia indicar que para a condição de transferência de oxigênio empregada, a maior parte dos açúcares consumidos foi metabolizada pela via oxidativa, favorecendo o crescimento de celular em detrimento da produção de etanol. Resultado semelhante foi reportado por Fiaux et al. (2003), que relataram que a levedura S. stipitis não foi capaz de produzir etanol em condições anaeróbias. Estes resultados sugerem que a formação de etanol por S. stipitis, a partir de xilose ou glicose, depende de um fornecimento adequado de oxigênio para as células (DU PREEZ, 1994).

Com a diminuição do valor de $k_{L}a$ para $3h^{-1}$ (Figura 5.1 E2) verificou-se o máximo consumo de açúcares (86 %) e a máxima formação de etanol (7,34 g/L), após 72 horas de fermentação, com uma concentração final de células de 5,6 g/L. Este comportamento indica que provavelmente a disponibilidade de oxigênio no fermentador foi mais adequada, favorecendo o processo fermentativo.

Nos experimentos realizados com os menores valores de k_La (0,9 h^{-1} e 0,1 h^{-1}) e pH_{inicial} (4,50) observou-se menor consumo de açúcares (abaixo de 38 %), pequena formação de etanol (menor de 1,2 g/L) e de células (menor que
3 g/L) após 72 horas (Figura 5.2 E7 e E8), sugerindo que uma inibição no transporte de açúcares pelas leveduras possa ter ocorrido, semelhante ao efeito Pasteur, uma vez que as leveduras que manifestam tal efeito apresentam uma redução na taxa de consumo de açúcares mesmo em presença de oxigênio, sendo este efeito mais pronunciado quando a respiração é a via predominante no catabolismo de carboidratos (LAGUNAS et al., 1982; BUSTURIA; LAGUNAS, 1986; WEUSTHUIS et al., 1994).

Também foi verificado que os maiores valores de k_La e $pH_{inicial}$ resultaram em redução do tempo necessário para se atingir a máxima concentração de etanol (Tabela 5.5). Para o experimento conduzido sob k_La de 7 h⁻¹ e $pH_{inicial}$ de 6,50, a máxima produção de etanol ocorreu em 60 horas de fermentação, enquanto que para fermentações conduzidas sob valor de k_La de 3 h⁻¹ e $pH_{inicial}$ de 6,50, este tempo foi de 72 horas. Apesar do aumento de aproximadamente duas vezes do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ter reduzido o tempo de fermentação para maior acúmulo de etanol, as concentrações máximas de etanol alcançadas nestes pontos foram menores com o aumento do k_La .

Outro ponto importante a ser destacado é que, independente do valor de $k_{L}a$ empregado, a diminuição do valor de pH resultou em menor consumo de açúcares e menor formação de etanol (Figuras 5.1 e 5.2), demonstrando que o $pH_{inicial}$ da fermentação é um parâmetro fermentativo importante. Estes dados estão de acordo com aqueles obtidos por van Zyl et al. (1991), ou seja, a utilização de pH_{inicial} 6,50 pode ser uma estratégia eficiente para minimizar o efeito inibitório do ácido acético e dos compostos de degradação da lignina (fenólicos) sobre a bioconversão pela levedura *S. stipitis*.

Para os experimentos empregando k_La de aproximadamente 1,7 h⁻¹ e pH_{inicial} de 5,50 (pontos centrais, Figura 5.3 de E9 a E11), foi observado um consumo de aproximadamente 50 % de açúcares, formação de cerca de 4,5 g/L de etanol e 5,5 g/L de células em 72 horas de fermentação.

De um modo geral, o crescimento celular foi favorecido com a elevação dos parâmetros agitação e aeração, enquanto a produção de etanol foi favorecida pela diminuição dos parâmetros agitação e aeração e elevação do parâmetro pH_{inicial}. Uma possível explicação para este comportamento seria que o suprimento de oxigênio em alguns experimentos estava acima do considerado ideal para formação de etanol, uma vez que este é responsável pela ativação do sistema de transporte de xilose, bem como determina a partição do fluxo de carbono da xilose entre crescimento celular e formação de produtos (DU PREEZ, 1994; SILVA et al., 2012).

Condições restritas de aeração favorecem o acúmulo de NADH, que pode inibir a atividade da xilose redutase NADPH-dependente, modificando assim a dependência da preferência do cofactor NADPH para NADH. Esta modificação resulta na formação de NAD+, reduzindo a xilose e recuperando o cofator da enzima xilitol desidrogenase, o que irá favorecer a bioconversão de xilose em etanol, resultando em menor concentração celular (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; SCHIRMER-MICHEL et al., 2008).

Com relação ao ácido acético, observou-se a capacidade de assimilação deste pela levedura com consequente aumento dos valores de pH do meio (Tabela 5.5). O maior consumo de ácido acético ocorreu no experimento com k_La de 3 h⁻¹ e pH_{inicial} de 4,50 (experimento 6). Possivelmente a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio interferiu também na assimilação do acido acético, uma vez que o aumento do consumo deste ácido é característica de maior quantidade de oxigênio no meio (MARTINEZ et al., 2003). A taxa máxima de crescimento específico (μ_{max}) e a constante Monod (K_S) foram 0,28 h⁻¹ e 146,04 g/L, respectivamente, para o experimento com k_La de 3 h⁻¹ e pH_{inicial} de 6,50 (experimento 2).

E	k _∟ a (h⁻¹)	Tempo final fermentação (h)	pHı¹	pH _F ²	Ácido acético (%) ³	DO _{final} (%)	μ _{máx} (h ⁻¹)	Ks
1	7,23	60	6,50	7,48	38	0,00	0,0186	33,82
2	3,19	72	6,50	6,98	39	0,00	0,2822	146,04
3	0,97	72	6,50	6,76	33	0,00	0,0247	67,92
4	0,11	72	6,50	6,80	31	0,00	0,0526	119,17
5	7,36	72	4,50	4,93	38	0,35	0,0069	59,01
6	3,35	60	4,50	4,78	41	100,0	0,0228	64,17
7	0,92	72	4,50	4,82	39	97,80	0,0040	46,77
8	0,15	60	4,50	4,91	39	3,70	0,0049	44,58
9	1,60	72	5,50	6,08	40	0,00	0,0271	74,86
10	1,73	72	5,50	6,11	38	0,00	0,0439	100,08
11	1,66	72	5,50	6,04	40	0,00	0,0412	94,69

Tabela 5.5 Estudo da influência das variáveis: agitação, aeração e pH_{inicial} na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis* sob os parâmetros fermentativos

¹Inicial, ²Final e ³Redução do ácido acético na fermentação

Na Figura 5.4 observa-se a produção de xilitol como subproduto da fermentação, em concentrações inferiores a 2,8 g/L, nos experimentos E2, E3, E4 e E5. Nas condições de fermentação avaliadas, em todos os experimentos, não se observou a formação de glicerol, outro possível subproduto do metabolismo

avaliado. E também não foi verificado, para todos os experimentos realizados, o consumo de arabinose por *S. stipitis*.



Figura 5.4 Produção de xilitol no processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *S. stipitis* de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2)

A influência das variáveis agitação, aeração e pH_{inicial} na fermentação a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis* sobre os parâmetros fermentativos Y_{P/S} e Q_P foi estudada de maneira mais detalhada utilizando-se a metodologia estatística apresentada a seguir.

Nos gráficos de Pareto (Figura 5.5 a e b), são mostradas as análises da estimativa dos efeitos para os parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente, tendo sido considerados significativos os termos cujos valores de t calculado (representado pelas barras do gráfico de Pareto) fossem maiores que o valor de t tabelado (representado pela linha continua do gráfico). Para distribuição de Student, a 95 % de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade, t _{tabelado} = 2,78.



Figura 5.5 Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: fator de conversão de açúcares em etanol (a) e produtividade em etanol (b) de acordo o planejamento fatorial 2³ completo com 3 repetições no ponto central (Tabela 4.2).

No gráfico de Pareto (Figura 5.5 a), observou-se que para a conversão de açúcares em etanol, as variáveis A (agitação), C (pH_{inicial}) e a interação BC (aeração-pH_{inicial}) apresentaram efeitos significativos. A variável B (aeração) e as interações AC e AB não apresentaram significância. Observando a ordem decrescente de importância das variáveis e suas interações, o efeito da variável pH_{inicial} teve maior influência sobre o parâmetro Y_{P/S} na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis*, confirmando as análises anteriores quando o consumo de açúcares, crescimento celular e produção de etanol do processo fermentativo.

Conforme apresentado nos gráficos de Pareto (Figura 5.5 b), para a resposta produtividade em etanol (Q_P), as variáveis B (aeração, vvm) e C (pH_{inicial}) apresentaram efeito positivo. Desta forma, conclui-se que para maximizar este

parâmetro é necessário ter as variáveis aeração e pH_{inicial} no seu nível alto, 0,7 vvm e 6,50, respectivamente.

A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P , no processo de bioprodução de etanol foi confirmada através da análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.6 e 5.7, respectivamente). Os termos considerados significativos foram os mesmos observados nos gráficos de Pareto e o coeficiente de correlação alcançado foi superior a 0,97 para as duas respostas, o que demonstra a relevância das variáveis estudadas. As respostas $Y_{P/S}$ e Q_P , não apresentaram curvatura significativa, o que indica que poderiam ser explicadas através de modelos lineares.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Curvatura	0,000006	1	0,000006	0,0336	0,866193
А	0,001922	1	0,001922	10,6646	0,046930*
В	0,000050	1	0,000050	0,2774	0,634850
С	0,024200	1	0,024200	134,2787	0,001380*
AB	0,000050	1	0,000050	0,2774	0,634850
AC	0,000098	1	0,000098	0,5438	0,514313
BC	0,002048	1	0,002048	11,3637	0,043378*
Error total	0,000541	3	0,000180		
Total (corr.)	0,028915	10			

Tabela 5.6 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão de xilose em etanol ($Y_{P/S}$).

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.98$

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Curvatura	0,000075	1	0,000075	0,95275	0,401008
А	0,000210	1	0,000210	2,65841	0,201498
В	0,000990	1	0,000990	12,52662	0,038383*
С	0,007503	1	0,007503	94,92620	0,002297*
AB	0,000066	1	0,000066	0,83658	0,427820
AC	0,000136	1	0,000136	1,72219	0,280786
BC	0,000300	1	0,000300	3,79705	0,146474
Error total	0,000237	3	0,000079		
Total (corr.)	0,009518	10			

Tabela 5.7 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol (Q_P) .

A = Agitação; B = aeração (vvm); C= $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.98$

Pelo fato das respostas $Y_{P/S}$ e Q_P não terem apresentado curvatura significativa (Tabelas 5.6 e 5.7), foi realizada a análise de variância dos efeitos principais e suas interações, para ajuste em modelos lineares, apresentadas nas Tabelas 5.8 e 5.9, para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente. Os coeficientes de correlação alcançados para $Y_{P/S}$ e Q_P foram superiores a 0,96.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
A	0,001922	1	0,001922	14,0619	0,019949*
В	0,000050	1	0,000050	0,3658	0,577929
С	0,024200	1	0,024200	177,0535	0,000184*
AB	0,000050	1	0,000050	0,3658	0,577929
AC	0,000098	1	0,000098	0,7170	0,444819
BC	0,002048	1	0,002048	14,9837	0,017980*
Error total	0,000547	4	0,000137		
Total (corr.)	0,028915	10			

Tabela 5.8 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), desprezando a curvatura.

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.98$

Tabela 5.9 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol (Q_P), desprezando a curvatura.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
А	0,000210	1	0,000210	2,69019	0,176312
В	0,000990	1	0,000990	12,67637	0,023578*
С	0,007503	1	0,007503	96,06096	0,000607*
AB	0,000066	1	0,000066	0,84658	0,409588
AC	0,000136	1	0,000136	1,74278	0,257263
BC	0,000300	1	0,000300	3,84244	0,121525
Error total	0,000312	4	0,000078		
Total (corr.)	0,009518	10			

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.97$

Com base nos termos significativos, para as respostas avaliadas, modelos lineares foram ajustados para descrever o fator de conversão de açúcares em etanol e a produtividade em etanol, os quais foram avaliados através da análise

da variância de regressão para os modelos apresentados nas Tabelas 5.10 e 5.11, respectivamente.

Pela análise de variância da regressão do modelo (ANOVA) verificou-se que as respostas fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade em etanol (Q_P) apresentaram coeficiente de correlação (R^2) superiores a 0,91. Observa-se também que, para a resposta $Y_{P/S}$, o modelo proposto foi significativo, não apresentando falta de ajuste ao nível de significância de 0,05 (95 % de confiança), o que o valida, possibilitando representá-lo por meio de superfícies de resposta.

O modelo obtido para a produtividade em etanol (Q_P) foi significativo ao nível de 0,05 de significância, entretanto apresentou falta de ajuste significativo, não sendo adequado, portanto, para descrever o comportamento de Q_P. Para este caso o comportamento desta resposta foi representado em um diagrama de cubo, para uma melhor visualização dos efeitos das variáveis.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Modelo	0,026172	3	0,008724	22,27	0,0006*
Resíduo	0,00274273	7	0,000391818		
Falta de ajuste	0,000518061	2	0,00025903	18,07	0,0524
Total (Corr.)	0,0289147	10			

Tabela 5.10 Análise de variância da regressão para o modelo representativo do fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}), obtido com base nos termos significativos.

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.91$

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Modelo	0,00870337	3	0,00290112	24,92	0,0004*
Resíduo	0,000814807	7	0,000116401		
Falta de ajuste	0,000306432	2	0,000153216	51,07	0,0192*
Total (Corr.)	0,00951818	10			

Tabela 5.11 Análise de variância da regressão para o modelo representativo da produtividade em etanol (Q_P), obtido com base nos termos significativos.

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = $pH_{inicial}$; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.91$

Com base nos resultados obtidos com a análise de variância, o modelo matemático, com as variáveis codificadas, para descrever a resposta fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}), dentro da região estudada, pode ser apresentado na forma da Equação 5.1.

$$Y_{P/S} = 0,128455 + 0,0155^{*}Agitação + 0,055^{*}pH_{inicial} - 0,016^{*}aeração^{*}pH_{inicial}$$
 Eq. (5.1)

A equação 5.1 possibilita a obtenção de superfície de resposta para $Y_{P/S}$ (Figura 5.6).

Na Figura 5.6 são mostradas, através de superfície de resposta (a) e curva de nível (b), a relação entre a variável dependente fator de conversão de açúcares em etanol e as variáveis independentes agitação e pH_{inicial}, sendo a variável aeração (vvm) fixada no nível zero. O aumento da agitação apresenta influência positiva sobre a conversão de açúcares em etanol quando o pH_{inicial} está no nível +1, e quando está no nível -1, uma influência negativa. Da mesma forma, o aumento no pH_{inicial} tem um efeito positivo quando a agitação está no nível +1, e negativo quando está no nível -1. Entretanto, quando as variáveis estão no nível +1 têm um efeito positivo sobre a conversão de açúcares em etanol, o que mostra

uma interação positiva entre estas variáveis. O maior fator de conversão de açúcares em etanol estimado, cerca de 0,20 g/g, foi previsto para os níveis +1 e +1 de agitação e pH_{inicial}, respectivamente, correspondente a 400 rpm e 6,50 de pH_{inicial}.



Figura 5.6 Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona o fator de conversão de açúcares em etanol com a agitação e pH_{inicial}, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável aeração (vvm) foi fixada no nível zero (0,4 vvm).

A Figura 5.7 mostra um diagrama de cubo, onde estão representadas as variáveis em seus diferentes níveis e o valor produtividade em etanol observada para cada combinação das três variáveis. O aumento no pH_{inicial} apresentou uma influência positiva sobre a produtividade em etanol, para qualquer combinação das demais variáveis, sendo esta influência a mais pronunciada de todo o diagrama. O aumento na agitação e aeração teve também um efeito positivo na produtividade em etanol.

A máxima produtividade em etanol estimada pelo modelo, cerca de 0,11 g L⁻¹ h⁻¹, foi observada para as variáveis agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial} nos seus níveis +1, +1 e +1, correspondente a 400 rpm, 0,7 vvm e 6,50, respectivamente.

Os dados obtidos mostraram que as condições em que se alcançaram as maiores produtividades em etanol foram aquelas em que se observou um fator de conversão de açúcares em etanol de 0,183 g/g e consumo de açúcares de 62 % (Experimento 1).



Figura 5.7 Diagrama de cubo que mostra a produtividade em etanol (Q_P) estimada para cada combinação das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}.

O estudo das variáveis agitação, aeração e pH_{inicial} na fermentação em biorreator do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *S. stipitis* mostrou que estes fatores são capazes de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos Y_{P/S} e Q_P. Este fato foi relatado também por du Preez (1994) que verificou que a aeração é o fator ambiental mais importante na fermentação de xilose por leveduras, afetando tanto o fator de conversão de açúcares em etanol quanto a produtividade em etanol, uma vez que o nível de aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre o crescimento e a formação de produto.

Dentro da faixa de variação estudada, a condição proposta com base nos modelos obtidos, que levam a uma maximização do fator de conversão de açúcares em etanol pela levedura *S. stipitis*, foi 400 rpm, 0,10 vvm e pH_{inicial} de 6,50. Apesar de ser uma condição significativa, na prática o impacto causado sobre o consumo de açúcares e produtividade em etanol foi menor ao ser comparado com a condição de 100 rpm, 0,70 vvm e pH_{inicial} de 6,50, elevando o consumo de açúcares de 48 a 86 %, resultando em aumento de Q_P de 0,086 a 0,102 g L⁻¹ h⁻¹.

Uma avaliação comparativa entre os dados obtidos no presente trabalho com os reportados na literatura, empregando diferentes biomassas e a mesma levedura, é apresentada na Tabela 5.12. Verifica-se que o fator de conversão de açúcares em etanol no presente trabalho (0,16 g/g) em média foi 60 % menor aos encontrados na literatura. O baixo valor do fator de conversão de açúcares em etanol obtido pode ser devido às características das diferentes matérias-primas empregadas para obtenção dos diferentes hidrolisados, os quais são de constituição complexa, à presença de algum componente no hidrolisado e agitação empregadas. Apesar das diferenças nos valores de Y_{P/S} constatadas, em relação ao consumo de açúcares observou-se semelhança entre os valores obtidos neste trabalho e o reportado por Silva et al. (2012) em um tempo de fermentação de 72 horas.

Substrato	Tipo de Pré-tratamento	Tipo de reator e/ou tamanho	Etanol (g/L)	Υ _{Ρ/S} (g/g)	Aeração	Açúcar Consumido (%)	Tempo de Fermentação (h)	Referências
Red oak wood chips	H ₂ SO4 diluído	Fermentador de 500 ml	9,9	0,46	200 mL/min, 250 rpm	86		Tran e Chambers (1986)
Bagaço de cana	H ₂ SO ₄ diluído	2 L Multigen F- 2000	15	0,38	100 mL/min 300 rpm		62	Zyl et al. (1988)
Xilose		Fermentador Multigen F-2000	29	0,35	60 mL/min e 220rpm		•	Preez et al. (1989)
Palha de arroz	Explosão a vapor	Fermentador de 3L	9	0,4	2 vvm	100	20	Moniruzzaman (1995)
Red oak spent sulfite liquor	Celulose e licor fábrica de papel	Fermentador de 300 ml	20,2	0,41	2 mmol O ₂ I ⁻¹ h ⁻¹	89	46	Nigam (2001a)
Palha de trigo	H ₂ SO ₄ diluído	Fermentador de 5L	22.3	0,43	0,02 wm	85.8	50	Nigam (2001b)
Sunflower seed hull bagasse	H ₂ SO ₄ diluído	Fermentador de 0,6L	9,66	0,41	100 rpm e 2,88 vvm	78	60	Telli e Eken (2006)
Xilose, glucose e arabinose		Fermentador de 1,6L	26,6	0,32	0,25 vvm e 250 rpm	83	84	Silva et al. (2011) e Silva et al. (2012)
Palha de arroz	H ₂ SO ₄ diluído	Fermentador de 100L	ı	0,39	0,05 vvm e 100 rpm		72	Lin et al. (2012)
Bagaço de cana	H ₂ SO ₄ diluído	Fermentador de 2,4 L	7,34	0,16	0,7 vvm e 100 rpm	86	72	Presente trabalho

Sti
S
۲
ă
5
ö
<u>.</u>
ŝ
¥
₹
ຮ
õ
Ъ
ï≝ĭ
S
5
Ľ,
₩
<u></u>
∟
ŝ
μĘ
5
ž
Ξfe
g
Φ
Ó
Ś
2
£
٩
0
SS
8
<u>.</u>
ò
ē
. <u>e</u>
Ε
e
5
8
ŏ
ğ
. <u>≅</u>
9
ō
Ē
Ø
ð
0
ğ
ЭÇ
Ę
ē
Ē
Ц.
Ę
a
σ
SC
ы
ă
Ħ
ູ່
ê
ĽĽ.
2
5
ŝ
0
ĕ
abe

	22
1	<u> </u>

5.2.2 Efeito da agitação, aeração e pH_{inicial} na produção de etanol em biorreator agitado – STR usando a levedura *Candida shehatae* UFMG HM 52.2

Os níveis da agitação, aeração e pH_{inicial} e as respostas avaliadas, fator de conversão de açúcares em etanol, açúcares consumidos e produtividade em etanol, estão apresentados na Tabela 5.13 e demonstraram que a levedura foi capaz de produzir etanol em todas as condições estudadas.

Tabela 5.13 Matriz do planejamento fatorial 2³ com três repetições no ponto central para estudo da influência das variáveis: agitação, vazão de ar e pH_{inicial} na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *C. shehatae*

Experimentos 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	Níveis reais				Variáveis Resposta			
Experimentos	X₁ rpm	X ₂ vvm	$\begin{array}{c} X_{3} \\ pH_{\text{inicial}} \end{array}$	k _∟ a _{inicial} (h⁻¹)	Y _{P/S} (g/g)	Açúcares consumidos (%) ¹	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	
1	400	0,70	6,50	7,84	0,325	90,64	0,253	
2	100	0,70	6,50	3,38	0,275	94,99	0,235	
3	400	0,10	6,50	1,13	0,357	74,44	0,218	
4	100	0,10	6,50	0,21	0,435	84,68	0,253	
5	400	0,70	4,50	7,93	0,039	62,74	0,017	
6	100	0,70	4,50	3,17	0,076	28,79	0,015	
7	400	0,10	4,50	1,15	0,137	35,93	0,035	
8	100	0,10	4,50	0,27	0,226	48,94	0,076	
9	250	0,40	5,50	2,13	0,237	78,95	0,130	
10	250	0,40	5,50	2,42	0,236	78,41	0,129	
11	250	0,40	5,50	2,35	0,245	79,04	0,135	

¹Açúcares consumidos: Xilose + Glicose

Também são apresentados na Tabela 5.13 os valores dos parâmetros fermentativos ($Y_{P/S} e Q_P$) para as diferentes condições de fermentação avaliadas. Os maiores valores do fator de conversão de açúcares em etanol, na faixa de 0,28 g/g e 0,44 g/g, foram observados nos experimentos com pH_{inicial} 6,50 e k_La entre 0,2 e 8 h⁻¹, entretanto quando foi empregado pH_{inicial} de 4,50 houve uma redução de Y_{P/S} atingindo a 0,039 g/g. Redução nos valores de produtividade em etanol devido à diminuição do pH_{inicial} empregado, também foi observada.

Dentre as condições avaliadas, verificou-se que valores de k_{La} de 0,2 h⁻¹ e $pH_{inicial}$ de 6,50 (Figura 5.8 E4) favoreceram a bioconversão de xilose em etanol por *C. shehatae*, proporcionando um equilíbrio entre a produtividade volumétrica em etanol, a concentração de etanol produzida e o consumo de açúcares.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 são apresentados os perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol para os experimentos realizados sob diferentes condições de aeração (0,1 a 0,7 vvm), agitação (100 a 400 rpm) e pH_{inicial} (4,50 a 6,50). Nota-se que uma diminuição na taxa de transferência de oxigênio favoreceu a produção de etanol, diferente do observado para o crescimento celular e o consumo de açúcares, com valores máximos de pH_{inicial}.



Figura 5.8 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 1 ao 4 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}



Figura 5.9 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 5 ao 8 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}



Figura 5.10 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae para os experimentos 9 ao 11 de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2) para o estudo da influência das variáveis: agitação, aeração (vvm) e pH_{inicial}

Nos experimentos com k_La de 8 h⁻¹, 3 h⁻¹ e 1 h⁻¹ e pH_{inicial} 6,50 (Figura 5.8 E1, E2 e E3), foi observado consumo de substrato de 90 %, 95 % e 75 %, resultando em concentração de células de 7,8 g/L, 3,9 g/L e 2,5 g/L acúmulo de etanol de aproximadamente 15 g/L, 14 g/L e 13 g/L em 60 horas de fermentação, respectivamente, havendo após este período, a assimilação de parte do etanol produzido, mesmo com presença de xilose no meio de fermentação. Este comportamento, semelhante ao observado para *S. stipitis*, sugere a ocorrência de um excesso no fornecimento de oxigênio, o que segundo Skoog et al. (1992) favorece a assimilação do etanol pela levedura.

Com a diminuição do valor de k_La para 0,2 h⁻¹ (Figura 5.8 E4) verificou-se consumo de açúcares de 85 % e a máxima formação de etanol (18 g/L), após 72 horas de fermentação, com uma concentração final de células de 3 g/L. Este comportamento indica que provavelmente a disponibilidade de oxigênio no fermentador foi mais adequada, favorecendo o processo fermentativo.

Semelhante ao observado para *S. stipitis*, a diminuição do $pH_{inicial}$ influenciou negativamente a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *C. shehatae*. Nos experimentos realizados com valores de k_La de 3 h⁻¹ e 1 h⁻¹ e menor $pH_{inicial}$ (4,50) observou-se menor consumo de açúcares (abaixo de 35 %), pequena formação de etanol (menor que 2,5 g/L) e de células (menor de 2 g/L) após 72 horas (Figura 5.9 E6 e E7).

Também foi verificado que os maiores valores de k_La e pH_{inicial} resultaram em redução do tempo necessário para se atingir a máxima concentração de etanol (Tabela 5.5). Para os experimentos conduzidos sob k_La de 8 h⁻¹, 3 h⁻¹ e 1 h⁻¹ ¹ e pH_{inicial} de 6,50, a máxima produção de etanol ocorreu em 60 horas de fermentação, enquanto que para fermentações conduzidas sob valor de k_La de 0,2 h⁻¹ e pH_{inicial} de 6,50, este tempo foi de 72 horas. Apesar do aumento no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ter reduzido o tempo de fermentação para maior acúmulo de etanol, as concentrações máximas de etanol alcançadas nestes pontos foram menores com o aumento do k_La.

Outro ponto importante a ser destacado é que, independente do valor de k_La empregado, a diminuição do valor de pH_{inicial} resultou em menor consumo de açúcares e menor formação de etanol (Figuras 5.8 e 5.9), demonstrando que o pH_{inicial} da fermentação é um parâmetro fermentativo importante, confirmando o que foi também verificado para a levedura *S. stipitis*. Felipe et al. (1997), em estudos com *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço da cana, verificaram que em meios com pH baixo, o ácido acético tem sua toxicidade acentuada, inibindo o metabolismo da levedura.

Para os experimentos empregando $k_{L}a$ de aproximadamente 2 h⁻¹ e pH_{inicial} de 5,50 (pontos centrais, Figura 5.10 de E9 a E11), foi observado consumo de aproximadamente 79 % de açúcares e formação de cerca de 9 g/L de etanol e 2,9 g/L de células em 72 horas de fermentação.

De um modo geral, o crescimento celular foi favorecido com a elevação dos parâmetros agitação e aeração, enquanto a produção de etanol foi favorecida pela diminuição dos parâmetros agitação e aeração e elevação do pH_{inicial}. Uma possível explicação para este comportamento seria que o suprimento de oxigênio em alguns experimentos estava acima do considerado ideal para formação de etanol, uma vez que este é responsável pela ativação do sistema de transporte de xilose, bem como determina a partição do fluxo de carbono da xilose entre crescimento celular e formação de produtos. Trabalhos experimentais realizados com a levedura *C. shehatae* reportaram que esta é uma levedura Crabtree-

negativo (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006) que produz principalmente biomassa e dióxido de carbono, quando não há nenhuma limitação nutricional, mas pode produzir etanol em condições limitadas de oxigênio (DU PREEZ; VAN DER WALT, 1983; ALEXANDER et al., 1988; PREEZ et al., 1989; ABBI et al., 1996; FROMANGER et al., 2010).

O papel do oxigênio na formação eficiente de etanol durante as fermentações de xilose dá origem a várias hipóteses sobre o metabolismo desta pentose. O oxigênio é necessário para o transporte de xilose (SIMS; BARNETT, 1978; LIGTHELM et al., 1988), para manter o equilíbrio redox nos primeiros dois passos do metabolismo de xilose (BRUINENBERG et al., 1983; BRUINENBERG et al., 1984; VERDUYN et al., 1985), para o crescimento e para a função mitocondrial intacta (LIGHTHELM et al., 1988). Este fato confirma que é preciso controlar o nível de oxigênio para não haver problemas associados ao acúmulo de NADH durante o processo de assimilação de xilose (JIN; JEFFRIES, 2004; GROTKJÆR et al., 2005) podendo-se obter maior concentração de etanol, favorecendo assim o processo fermentativo.

Com relação ao ácido acético, assim como foi verificado para *S. stipitis*, foi também observado para *C. shehatae*, a capacidade de assimilação deste com consequente aumento dos valores de pH do meio (Tabela 5.14). O maior consumo de ácido acético ocorreu no experimento com k_La de 3 h⁻¹ e pH_{inicial} de 4,50 (experimento 6). A taxa máxima de crescimento específico (μ_{max}) e a constante Monod (K_S) foram 0,104 h⁻¹ e 175,80 g/L, respectivamente, para o experimento um com k_La de 8 h⁻¹ e pH_{inicial} de 6,50 (experimento 1) (Tabela 5.14).

substrato tem mais influência sobre a dissociação que pela formação de produtos

(NAJAFPOUR et al., 2004).

Tabela 5.1	4 Estudo da ir	nfluência	das variá	veis: agitação	, aeração	e pH _{inicial}	na fermenta	ação (de
hidrolisado	hemicelulósic	o de bag	jaço de	cana-de-açúc	ar pela le	evedura C	. shehatae	sob (os
parâmetros	fermentativos								

Ε	k∟a (h⁻¹)	Tempo final fermentação (h)	pH ¹	pH _F ²	Ácido acético (%) ³	DO _{final} (%)	µ _{máx} h⁻¹	Ks
1	7,84	60	6,50	6,90	16,8	0,00	0,104	175,80
2	3,38	60	6,50	6,81	39,8	0,00	0,021	63,11
3	1,13	60	6,50	6,93	63,1	0,87	5,2x10 ⁻³	52,79
4	0,21	72	6,50	6,91	52,2	0,00	3,8x10 ⁻³	51,72
5	7,93	72	4,50	4,95	41,1	0,45	0,049	101,90
6	3,17	72	4,50	5,12	64,8	1,75	2,5x10 ⁻³	57,55
7	1,15	72	4,50	5,04	60,3	0,42	1,7x10 ⁻³	51,92
8	0,27	72	4,50	4,96	50,8	0,00	5,6x10 ⁻⁴	44,19
9	2,13	72	5,50	6,02	51,1	0,00	1,4x10 ⁻³	48,25
10	2,42	72	5,50	6,09	50,0	0,00	8,2x10 ⁻⁴	47,33
11	2,35	72	5,50	6,06	50,9	0,00	9,3x10 ⁻⁴	47,39

¹Inicial ²Final

³Redução do ácido acético na fermentação

Na Figura 5.11 observa-se a produção de xilitol e glicerol como subprodutos do metabolismo microbiano, em concentrações inferiores a 2,3 g/L e 1,9 g/L, respectivamente. Segundo Rodrigues et al. (2003) e Arruda et al. (2007) a formação de glicerol está relacionada a uma resposta ao estresse celular provocado pelas condições ambientais impostas à levedura. Quanto à arabinose, também presente no hidrolisado, semelhante ao observado para *S. stipitis*, nas

condições de fermentação avaliadas, em todos os experimentos, não se observou consumo desta pentose.



Figura 5.11 Produção de xilitol no processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. shehatae* de acordo com o planejamento fatorial completo 2³ (Tabela 4.2)

A influência das variáveis agitação, aeração e p $H_{inicial}$ na fermentação a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *C. shehatae* sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P foi estudada de maneira mais detalhada utilizando-se a metodologia estatística apresentada a seguir.

Nos gráficos de Pareto (Figura 5.12, a e b), são mostradas as análises da estimativa dos efeitos para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente, tendo sido considerados significativos os termos cujos valores de t calculado (representado pelas barras do gráfico de Pareto) fossem maiores que o valor de t tabelado (representado pela linha continua do gráfico). Para distribuição de Student, a 95 % de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade, t tabelado = 2,78.



Figura 5.12 Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: o fator de conversão de açúcares em etanol (a) e produtividade em etanol (b).

No gráfico de Pareto (Figura 5.12 a), observou-se que para o fator de conversão de açúcares em etanol, as variáveis A (agitação), B (vvm), C (pH_{inicial}) e a interação AB (agitação-aeração) mostraram efeitos significativos. As interações AC e BC não apresentaram significância. Observando a ordem decrescente de importância das variáveis e suas interações, o efeito da variável pH_{inicial} teve maior influência sobre o parâmetro Y_{P/S} na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *C. shehatae*, confirmando as análises anteriores quanto ao consumo dos açúcares, crescimento celular e produção de etanol do processo fermentativo.

Conforme apresentado nos gráficos de Pareto (Figura 5.12 b), para a resposta produtividade em etanol (Q_P), as variáveis A (agitação), B (aeração, vvm), a interação AB (agitação-aeração) e BC (aeração-pH_{inicial}) apresentam efeito

positivo significativo e a variável C (pH_{inicial}) apresenta efeito negativo significativo. A interação AC (agitação-pH_{inicial}) não apresentou significância. Desta forma, concluiu-se que para maximizar este parâmetro é necessário ter as variáveis agitação e aeração no seu nível alto, 400 rpm e 0,7 vvm, respectivamente, e o pH_{inicial} no seu nível baixo, 4,50.

A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos $Y_{P/S}$ e Q_P , no processo de bioprodução de etanol foi confirmada através da análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.15 e 5.16, respectivamente). Os termos considerados significativos foram os mesmos observados nos gráficos de Pareto e o coeficiente de correlação alcançado foi superior a 0,99 para as duas respostas, o que demonstra a relevância das variáveis estudadas. As respostas $Y_{P/S}$ e Q_P , não apresentaram curvatura significativa, o que indica que poderiam ser explicadas através de modelos lineares.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Curvatura	0,000068	1	0,000068	0,2648	0,642374
А	0,002964	1	0,002964	11,5400	0,042553*
В	0,024200	1	0,024200	94,2042	0,002323*
С	0,104425	1	0,104425	406,4968	0,000267*
AB	0,004050	1	0,004050	15,7656	0,028554*
AC	0,001201	1	0,001201	4,6732	0,119377
BC	0,000392	1	0,000392	1,5260	0,304641
Error total	0,000771	3	0,000257		
Total (corr.)	0,138070	10			

Tabela 5.15 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$).

A = Agitação; B = aeração (vvm); C = pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.994$

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Curvatura	0,000084	1	0,000084	6,836	0,079368
А	0,000403	1	0,000403	32,811	0,010561*
В	0,000480	1	0,000480	39,128	0,008244*
С	0,082909	1	0,082909	6757,496	0,000004*
AB	0,001146	1	0,001146	93,405	0,002352*
AC	0,000061	1	0,000061	4,993	0,111518
BC	0,001121	1	0,001121	91,357	0,002429*
Error total	0,000037	3	0,000012		
Total (corr.)	0,086241	10			

Tabela 5.16 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol (Q_P).

A = Agitação; B = aeração (vvm); C= pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.999$

Pelo fato das respostas $Y_{P/S}$ e Q_P não terem apresentado curvatura significativa, foi realizada a análise de variância dos efeitos principais e suas interações, para ajuste em modelos lineares os quais são apresentados nas Tabelas 5.17 e 5.18, para $Y_{P/S}$ e Q_P , respectivamente. Os coeficientes de correlação alcançados para $Y_{P/S}$ e Q_P foram superiores a 0,99.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
A	0,002964	1	0,002964	14,1389	0,019772*
В	0,024200	1	0,024200	115,4192	0,000426*
С	0,104425	1	0,104425	498,0411	0,000024*
AB	0,004050	1	0,004050	19,3160	0,011737*
AC	0,001201	1	0,001201	5,7257	0,074937
BC	0,000392	1	0,000392	1,8696	0,243316
Error total	0,000839	4	0,000210		
Total (corr.)	0,138070	10			

Tabela 5.17 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$), desprezando a curvatura.

A =Agitação; B= aeração (vvm); C= pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.993$

Tabela 5.18 Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol (Q_P), desprezando a curvatura.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
A	0,000403	1	0,000403	13,343	0,021717*
В	0,000480	1	0,000480	15,912	0,016279*
С	0,082909	1	0,082909	2748,002	0,000001*
AB	0,001146	1	0,001146	37,984	0,003518*
AC	0,000061	1	0,000061	2,031	0,227280
BC	0,001121	1	0,001121	37,151	0,003665*
Error total	0,000121	4	0,000030		
Total (corr.)	0,086241	10			

A =Agitação; B= aeração (vvm); C= pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.998$

Com base nos termos significativos, para as respostas avaliadas, modelos lineares foram ajustados para descrever o fator de conversão de açúcares em etanol e a produtividade em etanol, os quais foram avaliados através da análise

da variância de regressão para os modelos apresentados nas Tabelas 5.19 e 5.20, respectivamente.

Pela análise de variância da regressão do modelo (ANOVA) verificou-se que as respostas fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade em etanol (Q_P) apresentaram coeficiente de correlação (R^2) superiores a 0,99. Observa-se também que, para as respostas $Y_{P/S}$ e Q_P , o modelo proposto foi significativo, não apresentando falta de ajuste ao nível de significância de 0,05 (95 % de confiança), o que o valida, possibilitando representá-lo por meio de superfícies de resposta.

Tabela 5.19 Análise de variância da regressão para o modelo representativo do fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}), obtido com base nos termos significativos.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Modelo	0,131589	3	0,043863	47,37	0,0001
Resíduo	0,00648118	7	0,000925883		
Falta de ajuste	0,000790	2	0,000395	16,233	0,058028
Total (Corr.)	0,138070	10			

A =Agitação; B= aeração (vvm); C= pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.953$

Tabela 5.20 Análise de variância da regressão para o modelo representativo da produtividade em etanol (Q_P), obtido com base nos termos significativos.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	р
Modelo	0,083792	3	0,0279307	79,84	0,0000
Resíduo	0,00244884	7	0,000349834		
Falta de ajuste	0,000097	2	0,000048	4,067	0,197351
Total (Corr.)	0,086241	10			

A =Agitação; B= aeração (vvm); C= pH; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática. $R^2 = 0.971$

Com base nos resultados obtidos com a análise de variância, os modelos matemáticos, com as variáveis codificadas, para descrever as respostas fator de conversão de açúcares em etanol (Y_{P/S}) e produtividade em etanol (Q_P), dentro da região estudada, podem ser apresentados na forma das Equações 5.2 e 5.3.

$$Y_{P/S} = 0,235273 - 0,01925^*$$
Agitação + 0,11425 * pH_{inicial} - 0,055 * vvm Eq. (5.2)

 $Q_P = 0,1365 + 0,00709375^*$ Agitação - 0,101802*pH_{inicial} + 0,00774*vvm Eq. (5.3)

A equação 5.2 possibilita a obtenção de superfície de resposta para $Y_{P/S}$ (Figuras 5.13, 5.14 e 5.15).

Na Figura 5.13 são mostradas, através de superfície de resposta (a) e curva de nível (b), a relação entre o fator de conversão de açúcares em etanol e agitação e aeração, sendo a variável pH_{inicial} fixada no nível zero. O aumento na agitação apresenta influência positiva sobre o fator de conversão de açúcares em etanol, quando aeração está no nível +1, e na quando está no nível -1 uma influência negativa. Da mesma forma, o aumento na aeração apresenta um efeito negativo, quando a agitação está no nível +1 e -1. A ausência de ambas variáveis (níveis -1 e -1), apresenta um efeito positivo sobre a conversão de açúcares em etanol, o que mostra de forma clara, a presença de uma interação positiva entre elas. O maior fator de conversão de açúcares em etanol estimado, cerca de 0,31 g/g, foi previsto para os níveis -1 e -1 de agitação e aeração, respectivamente, correspondente a 100 rpm e 0,10 vvm.



Figura 5.13 Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona o fator de conversão de açúcares em etanol com agitação e aeração (vvm) em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável pH_{inicial} foi fixada no nível zero (5,50).

Na Figura 5.14 são mostradas, através de superfície de resposta (a) e curva de nível (b), a relação entre o fator de conversão de açúcares em etanol com agitação e pH_{inicial}, sendo a variável aeração (vvm) fixada no nível zero. O aumento da agitação apresenta influência positiva sobre a conversão de açúcares em etanol quando o pH_{inicial} está no nível +1, e quando está no nível -1, uma influência negativa. O aumento no pH_{inicial} apresenta um efeito positivo quando a agitação está no nível +1 e -1. Entretanto, quando as variáveis estão no nível +1 têm um efeito positivo sobre o fator de conversão de açúcares em etanol, o que mostra uma interação positiva entre estas variáveis, sendo que comportamento contrário acontece quando as variáveis estão no seu nível -1. O maior fator de conversão de açúcares em etanol estimado, cerca de 0,35 g/g, foi previsto para os níveis +1 e +1 de agitação e pH_{inicial}, respectivamente, correspondente a 400 rpm e 6,5 de pH_{inicial}.



Figura 5.14 Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona o fator de conversão de açúcares em etanol e produtividade em etanol com a agitação e pH_{inicial}, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável aeração (vvm) foi fixada no nível zero (0,4 vvm).

Na Figura 5.15 são apresentadas, pela superfície de resposta (a) e curva de nível (b), a relação entre o fator de conversão de açúcares em etanol com aeração (vvm) e pH_{inicial}, sendo a variável agitação fixada no nível zero. O aumento da aeração apresenta influência positiva sobre a conversão de açúcares em etanol quando o pH_{inicial} está no nível +1, e quando está no nível -1, uma influência negativa. Da mesma forma, o aumento no pH_{inicial} tem um efeito positivo quando aeração está no nível +1 e -1. Entretanto, quando há aumento do pH_{inicial} e diminuição da aeração existe um efeito positivo sobre a conversão de açúcares em etanol. O maior fator de conversão de açúcares em etanol estimado, cerca de 0,40 g/g, foi previsto para os níveis +1 e -1 de pH_{inicial} e aeração, respectivamente, correspondentes a 6,5 e 0,1 vvm.



Figura 5.15 Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona o fator de conversão de açúcares em etanol com aeração (vvm) e pH_{inicial}, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável agitação foi fixada no nível zero (250 rpm).

O estudo das variáveis agitação, aeração e pH_{inicial} na fermentação em biorreator do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *C. shehatae* mostrou que estes são fatores capazes de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos Y_{P/S} e Q_P. Este fato foi relatado também por du Preez (1994), Nigam (2001b) e Silva et al. (2012) que verificaram que a aeração é um fator importante na fermentação de xilose por leveduras, visto que excessivas ou muito baixas taxas de aeração afetam a divisão do fluxo de carbono da xilose, produzindo efeitos negativos na produção de etanol e favorecendo a produção de biomassa.

Dentro da faixa de variação estudada, a condição proposta com base nos modelos obtidos, que leva a uma maximização do fator de conversão de açúcares em etanol pela levedura *C. shehatae*, foi 100 rpm, 0,10 vvm e pH_{inicial} de 6,50. Esta condição foi validada experimentalmente.

Uma avaliação comparativa entre os dados obtidos no presente trabalho com os reportados na literatura, empregando diferentes biomassas e a mesma levedura, é apresentada naTabela 5.21. Verifica-se que o fator de conversão de açúcares em etanol no presente trabalho (0,44 g/g) foi semelhante aos encontrados na literatura, considerando condições limitadas de oxigênio.

Tabela 5.21 Re	sultados da fermenta	ção de hidrolisados h	emicelulósi	cos obtic	dos de diferentes r	nateriais lignocelul	ósicos por C. sheł	atae
Substrato	Tipo de pré-tratamento	Tipo de reator e/ou tamanho	Etanol (g/L)	Υ _{Ρ/S} (g/g)	Aeração	Açúcar Consumido(%)	Tempo de fermentação (h)	Refêrencias
Xilose	ı	Fermentador de 350 ml	38	0,32	40 mL/min	·	83	Alexander et al. (1988)
Xilose	ı	Fermentador Multigen F-2000	45	0,38	0,7 DO	ı	ı	Preez et al. (1989)
Palha de arroz	H ₂ SO ₄ diluído	Erlenmeyer de 250mL	3,7	0,42	150 rpm	85	24	Abbi et al. (1996)
Xilose	·	Fermentador de 2 L		0,41	0 vvm e 500 rpm		20	Sánchez et al. (1997)
Sabugo de milho	H_2SO_4 diluído	Erlenmeyer de 250mL	6,7	0,26	80 rpm	ı	120	Nurdan e Yeşim (2000)
Bagaço de cana	HCI	Erlenmeyer de 250mL	8,67	0,48	150 rpm	89,93	24	Chandel et al. (2007)
			48,81	0,42	0,2 vvm e 500 rom		22	
Xilose		Fermentador de 5L	41,37	0,35	0,6 vvm e 10 rpm	•	68	Fromanger et al. (2010)
			37,71	0.32	0,6 vvm e 400 rpm	ı	36	
Sabugo de milho	H ₂ SO ₄ diluído	Erlenmeyer de 250mL	9,16	0,421	160 rpm	78,49	96	Chen et al. (2010)
Casca de arroz	H_2SO_4 diluído	Erlenmeyer de 2L	15	0,4	180 rpm	96	100	Hickert et al. (2013)
Bagaço de cana	H ₂ SO ₄ diluído	Fermentador de 2,4 L	18	0,44	0,1 vvm e 100 rpm	85	72	Presente trabalho

5.2.3 Análise comparativa da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras S. stipitis e C. shehatae

A fim de se escolher a levedura com melhor habilidade para produzir etanol a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, para ser utilizada na etapa subsequente de estudo da influência do campo eletromagnético em biorreator de leito fluidizado, foi feita uma análise comparativa entre os resultados obtidos para *S. stipitis* e *C. shehatae*.

Em relação às condições de fermentação, observou-se que os valores de agitação e pH_{inicial} ótimos para as duas leveduras foram de 100 rpm e 6,50, respectivamente; e também que o pH_{final} e consumo de açúcares foram similares para as duas leveduras.

Comparando-se a constante de Monod (K_S), pode-se observar que para a levedura *S. stipitis* a elevada concentração de substrato teve maior influência sobre a produção de biomassa do que sobre a formação de produto, estando assim, relacionada ao metabolismo.

Para os parâmetros fermentativos ($Q_P e Y_{P/S}$), obtidos nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator, para as duas leveduras (Tabela 5.22), nota-se que, de um modo geral, os valores de $Q_P e Y_{P/S}$ para *C. shehatae* foram 148 % e 177 % superiores aos observados para *S. stipitis*. Este comportamento está provavelmente relacionado às condições de aeração do meio e indicam diferenças no metabolismo das leveduras, o que sugere que *C. shehatae* possui maior habilidade para produzir etanol em condições limitadas de oxigênio ao ser comparada com a levedura *S. stipitis*, que
produziu menor concentração de etanol e maior concentração de células, indicando um favorecimento do metabolismo respiratório.

Tabela	5.22	Análise	comparativa	a d	a ferme	ent	açâ	áo do hidr	olisado	hemi	celulo	ósico	de bag	aço c	le
cana-de	e-açúc	car pelas	leveduras	S.	stipitis	е	С.	shehatae.	Condi	ções:	100	rpm,	pH _{inicial}	6,50	е
tempo f	final d	e ferment	tação 72 ho	ras											

Variável	S. stipitis	C. shehatae
	0.7	0.1
Aeração (vvm)	0,7	0,1
pH_{final}	6,98	6,91
k _L a (h⁻¹)	3,0	0,2
Y _{P/S} (g/g)	0,157	0,435
Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,102	0,253
Concentração de etanol (g/L)	7,34	18,0
Açúcares consumidos (%)	85,72	84,68
Concentração de células (g/L)	5,6	3,0
Ks	146,04	51,72
µ _{max} (h⁻¹)	0,2822	3,8 * 10 ⁻³

Na Figura 5.16 são apresentados os perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol pelas leveduras *S. stipitis* e *C. shehatae* sob condições de aeração (0,1 a 0,7 vvm), agitação (100 rpm) e pH_{inicial} (6,50). Nota-se que praticamente não houve diferença em relação ao consumo de açúcares, entretanto há diferenças significativas quanto ao crescimento celular, que foi 86 % maior para *S. stipitis* em comparação à *C. shehatae* e formação de etanol, que foi 143 % maior para *C. shehatae*.



Figura 5.16 Concentração de açúcares (•), células (•) e produção de etanol (\blacktriangle) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pelas leveduras (a) *S. stipitis* e (b) *C. shehatae*.

O favorecimento da bioconversão de açúcares em etanol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela *C. shehatae* fez com que ela fosse escolhida para os experimentos seguintes em biorreatores com campo eletromagnético.

5.2.4 Imobilização da levedura Candida shehatae UFMG HM 52.2

Antes da realização das fermentações em biorreator de leito fluidizado com campos eletromagnéticos empregando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e a levedura *C. shehatae*, foi necessário fazer uma avaliação da influência das partículas magnéticas no processo de imobilização das células em alginato de sódio em cultivo realizado em frascos agitados.

Os resultados indicaram que a imobilização das células em alginato com a inclusão das partículas magnéticas não afetou significativamente os parâmetros fermentativos, pois o consumo de açúcares, o fator de rendimento e produtividade em etanol na presença ou ausência destas partículas apresentaram valores muitos semelhantes, como pode ser verificado na Tabela 5.23.

Expe	erimentos	Respostas				
No.	No. Fe ₃ O ₄ (% m/v)		Açúcares Consumidos (%)	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)		
1	0	0,151	39,59	0,032		
2	1	0,157	33,54	0,027		
3	8	0,147	31,55	0,024		

Tabela 5.23 Estudo da influência do conteúdo de partículas magnéticas (Fe_3O_4) nos parâmetros fermentativos na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar usando a levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propriedades magnéticas. Tempo de fermentação 96 h, Temperatura: 30°C e 150 rpm. Alginato (2 % m/v)

Os resultados apresentados na Figura 5.19 e e na Tabela 5.23, revelam mínimas diferenças na cinética de crescimento celular e produção de etanol. Nas condições de fermentação avaliadas, em todos os experimentos, não se observou consumo de arabinose e produção de xilitol e glicerol. Com relação ao ácido acético, observou-se a capacidade de assimilação de 38 % deste ácido pela levedura, com consequente aumento dos valores de pH do meio (6,40 a 6,8).

As células imobilizadas apenas em alginato resultaram em um consumo de açúcares 21 % e produtividade em etanol 25 % maiores, respectivamente aos observados para as células que continham partículas magnéticas, provavelmente pela existência de limitações difusionais impostas pelas partículas magnéticas, as quais estão distribuídas na matriz polimérica. Baixo crescimento das células foi notado no final das fermentações para todas as condições testadas (Figura 5.17). Este fato ocorreu devido à baixa aeração empregada, o que traz como consequência uma deficiência na disponibilidade de oxigênio no meio fermentativo. Abbi et al. (1996) relataram que durante o cultivo de *C. shehatae* imobilizada em alginato em hidrolisado de palha de arroz houve um consumo de

90 % dos açúcares e formação de 4,6 g/L de etanol em um tempo de fermentação de 48 horas.

Desta forma, para a continuação dos experimentos em biorreator de leito fluidizado, foram realizados ensaios qualitativos para testar a influência do campo eletromagnético (6A de campo), com as células imobilizadas com 1 e 8 % m/v de partículas magnéticas, observando-se uma fixação do leito quando foram utilizadas as células imobilizadas com 8 % m/v, condição empregada para os respectivos ensaios em biorreator.

Entretanto, como este trabalho não previu a otimização do processo de imobilização, estudos futuros deverão ter como propósito estudar o desenvolvimento e otimização desta etapa.



Figura 5.17 Concentração de açúcares (●), células (■) e produção de etanol (▲) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pelas levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propriedades magnéticas para os experimentos 1 ao 3 (Tabela 5.23).

5.2.1 Efeito da configuração do campo eletromagnético na produção de etanol em biorreator de leito fluidizado usando a levedura imobilizada *Candida shehatae* UFMG HM 52.2

As fermentações para avaliar o efeito do campo eletromagnético sobre a produção de etanol foram realizadas em um sistema experimental versátil, permitindo estudar o efeito de campo eletromagnético para diferentes valores de indução eletromagnética e sob duas configurações de incidência da direção das linhas de campo, isto é, variando as linhas de campo da direção axial para a transversal. Inicialmente, foi necessário conduzir experimentos preliminares para a determinação das faixas de operação, em termos da distribuição de indução eletromagnética e do sistema de geração de campo magnético integrado ao sistema de fermentação.

Os resultados da distribuição de campo eletromagnético no interior das bobinas são apresentados na Figura 5.18, que mostra o perfil dessa distribuição de campo eletromagnético para o centro geométrico entre bobinas, que corresponde à posição de localização do biorreator, para ambos biorreatores com linhas de campo transversais (Figura 5.18 a) e axiais (Figura 5.18 b).



Figura 5.18 Distribuição de indução de campo eletromagnético (B) no centro da câmara reacional dos sistemas assistidos por campos eletromagnéticos em função da intensidade de corrente expressa em amperes (A) e da posição da medida ao longo da direção axial, considerando dois sistemas de geração de campo: (a) linhas de campo na direção transversal (b) linhas de campo na direção axial, cuja calibração deste ultimo sistema axial foi realizado previamente por Araujo (2012)

Uma análise sobre o comportamento desta distribuição indica que no centro geométrico entre bobinas há uma distribuição de campo relativamente uniforme e mais intensa que nos extremos da câmara reacional. Desta forma, colocando-se um fermentador volumétrico de vidro com geometria cilíndrica, com uma relação entre altura (H) e diâmetro (D) de tal forma que H >> D, garante-se uma distribuição de campo incidindo sobre o meio de cultura e sobre a suspensão celular livre ou imobilizada nos suportes com propriedades magnéticas. Obviamente, há de se supor que o campo eletromagnético sobre o meio de cultura e as células microbianas de fato atua sobre a fluidodinâmica das partículas magnéticos ao longo do meio reacional, sendo esta a principal aplicação em que se focou o presente estudo. Trata-se de uma correlação entre a vazão do meio reacional, a partir da velocidade mínima de fluidização e a variação da indução eletromagnética necessária para estabilizar magneticamente o leito de partículas.

De forma geral, apesar da diversidade de trabalhos publicados e as controvérsias sobre efeitos biológicos negativos ou positivos dos campos eletromagnéticos (PEREZ et al., 2007; SANTOS, 2008; HUNT et al., 2009; HRISTOV, 2010; SANTOS et al., 2010; HRISTOV; PEREZ, 2011; LOPES et al., 2012), no presente trabalho estes resultados, mesmo que preliminares, apresentaram um efeito positivo na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, mesmo que do ponto de vista macroscópico quando nos referimos ao efeito biológico do campo.

Por outro lado, ao comparar o comportamento fluidodinâmico das células imobilizadas em partículas com propriedades magnéticas para ambos os sistemas, transversal e axial, foi possível verificar distribuições distintas dos biocatalisadores estabilizados magneticamente (Figura 5.19).



Figura 5.19 Ilustração da distribuição das células imobilizadas em polímero com propriedades magnéticas sob o efeito de campos eletromagnéticos nos biorreatores com linhas de campo na direção: (a) transversal; (b) axial.

Deve-se salientar que o propósito de se trabalhar com sistemas estabilizados magneticamente está focado na redução dos problemas de transferência de calor e massa, característicos de sistemas empacotados ou de leito fixo, seja com células imobilizadas ou quando se trabalha com altas densidades celulares. De qualquer maneira, os resultados obtidos mostraram que as condições que favoreceram a produção de etanol foram alcançadas quando se usou o sistema axial a uma intensidade de 6A (Tabela 5.24), provavelmente porque a concentração de campo neste sistema é mais intensa e consequentemente a estabilidade do leito é maior.

Tabela 5.24 Estudo da influência das linhas de campo eletromagnético nos parâmetros fermentativos na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando a levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propriedades magnéticas

	Experimento	S	Respostas				
No.	Fermentador	Campo (A)	Y _{P/S} (g/g)	Açúcares Consumidos (%) ¹	Q _P (g L ⁻¹ h ⁻¹)		
1	1*	0	0,110	25,94	0,034		
2	I	6	0,133	27,11	0,041		
3	0**	0	0,121	25,37	0,037		
4	Ζ."	6	0,149	30,24	0,055		

*Biorreator assistido por campo eletromagnético – Sistema Transversal

**Biorreator assistido por campo eletromagnético – Sistema Axial

¹Acúcares consumidos: Xilose + Glicose

Na Figura 5.20 e na Tabela 5.24 pode-se observar uma diferença entre os processos com e sem campo eletromagnético para os dois sistemas. Tanto no sistema axial quanto no transversal verificou-se favorecimento do processo fermentativo pelo emprego do campo eletromagnético, constatando-se aumento no consumo de açúcares, na produção de etanol e no crescimento celular de 1,2, 1,5 e 1,5 vezes, respectivamente.

O biorreator assistido por campo eletromagnético – sistema axial (experimento 4) resultou em um fator de rendimento e produtividade em etanol

12 % e 34 % maiores, respectivamente, quando comparados ao biorreator assistido por campo eletromagnético – sistema transversal (experimento 2). Já para o crescimento celular observou-se redução de 28 % na formação de células empregando-se o sistema axial. Segundo Westrin e Axelsson (1991), o efeito do uso de campo eletromagnético em processos de fermentação em biorreatores de leito fluidizado está relacionado ao fato de se conseguir fixar o leito sem ter problemas com maiores fluxos de fluidização, que favorecem uma melhor transferência de oxigênio no meio, além de favorecer a transferência de massa para o interior do suporte de imobilização, uma vez que o encapsulamento celular, em suportes sólidos, apresenta limitações na difusão de massa.

Nas condições de fermentação avaliadas, em todos os experimentos, não se observou consumo de arabinose e produção xilitol e glicerol. Com relação ao ácido acético, observou-se a capacidade de assimilação de 36 % deste ácido pela levedura, com consequente aumento dos valores de pH do meio (6,40 a 6,8).

Também é difícil explicar, neste momento, os mecanismos biofísicos que constituem o fundamento da interação destes campos eletromagnéticos com a levedura. Relatos na literatura têm postulado que um dos efeitos biológicos mais prováveis seja devido à alteração da permeabilidade das membranas celulares e consequentemente a alterações no metabolismo celular (ALVAREZ et al., 2006; PEREZ et al., 2007). Entretanto, neste trabalho as condições fluidodinâmicas impostas ao sistema, pela ação do campo durante a fermentação, foram favoráveis ao bom desempenho do processo.



campo eletromagnético do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura C. shehatae imobilizada em polímero com propriedades magnéticas para os experimentos 1 ao 4 (Tabela 5.24) Figura 5.20 Concentração de açúcares (•), células (•) e produção de etanol (▲) durante a fermentação em biorreator de leito fluidizado sob efeitos de

6. CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho podemos concluir que:

- As condições de agitação, aeração e pH_{inicial}, utilizadas neste trabalho, permitiram fazer uma avaliação da produção de etanol por *S. stipitis* e *C. shehatae* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator-STR.
- A produção de etanol a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *S. stipitis* em biorreator-STR foi favorecida empregando-se a condição de 100 rpm, 0,7 vvm e pH_{inicial} 6,50.
- A produção de etanol a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *C. shehatae* em biorreator-STR foi favorecida empregando-se a condição de 100 rpm, 0,1 vvm e pH_{inicial} 6,50.
- Nas fermentações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-deaçúcar a levedura *C. shehatae* produziu 143 % mais de etanol do que *S. stipitis*, apresentando valores de Y_{P/S} e Q_P de 0,44 g/g e 0,25 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente.
- O uso de biorreator assistido por campo eletromagnético favoreceu a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando a levedura *C. shehatae* imobilizada em polímero com propiedades magnéticas resultando em aumento de 49 % na produção de etanol se comparado ao biorreator sem campo eletromagnético.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a imobilização de células em suportes inorgânicos para aplicação na produção de etanol de segunda geração
- Otimizar as variáveis velocidade de agitação, concentração de suporte, tempo de cura e concentração celular no processo de imobilização de leveduras para a aplicação na produção de etanol de segunda geração.
- Estudar o desenvolvimento de processo de fermentação para a obtenção de etanol de segunda geração em biorreator agitado mecanicamente assistido por campo eletromagnético com células livres, explorando outras configurações e parâmetros de operação dos biorreatores assistidos por campo eletromagnético, tanto quanto aos parâmetros de campo propriamente ditos como as outras variáveis de processo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBI, M.; KUHAD, R.C.; SINGH, A. Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): Fermentation behaviour. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 555-560, 1996.

AGBOGBO, F.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.

ALBERTINI, M.C.; ACCORSI, A.; CITTERIO, B.; BURATTINI, S.; PIACENTINI, M.P.; UGUCCIONI, F.; PIATTI, E. Morphological and biochemical modifications induced by a static magnetic field on *Fusarium culmorum*. **Biochimie**, v. 85, n. 10, p. 963-970, 2003.

ALEXANDER, M.A.; CHAPMAN, T.W.; JEFFRIES, T.W. Continuous xylose fermentation by *Candida shehatae* in a two-stage reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 1-3, p. 221-229, 1988.

ALIZADEH, H.; TEYMOURI, F.; GILBERT, T.I.; DALE, B.E. Pretreatment of Switchgrass by Ammonia Fiber Explosion (AFEX). In: TWENTY-SIXTH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 26, 2005. Humana Press, 2005, 1133-1141 p.

ALLEN, S.; CLARK, W.; MCCAFFERY, J.M.; CAI, Z.; LANCTOT, A.; SLININGER, P.; LIU, Z.L.; GORSICH, S. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 2, 2010.

ALVAREZ, D.C.; PÉREZ, V.H.; JUSTO, O.R.; ALEGRE, R.M. Effect of the extremely low frequency magnetic field on nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using cheese whey permeate. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 9, p. 1967-1973, 2006.

ALVES, L.; FELIPE, M.A.; SILVA, J.A.; SILVA, S.; PRATA, A.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 89-98, 1998.

ALVES, L.A. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 1997. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) -Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1997.

ANDO, S.; KAKIMOTO, T.; ITOH, K.; ARAI, I.; KIYOTO, K.; HANAI, S. Increased digestibility of cedar by pretreatment with peracetic acid and steam explosion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 31, n. 8, p. 802-804, 1988.

ARAUJO, V.F. Estudo de parametros operacionais de biorreator não convencional aplicado a produção de biocombustíveis: proposta preliminar de instrumentação e automação. 2012. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade Estadual do Norte Fluminense-UENF, Campos dos Goytacazes, R.J., 2012.

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. 163 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica. **Revista Analytica**, v. 26, p. 56-62, 2007.

BALAT, M.; BALAT, H.; CAHIDE, O.Z. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion**, v. 34 p. 551-573, 2008.

BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M.; CABAÑAS, A.; CARRASCO, J.; MARTÍN, C.; NEGRO, M.; SAEZ, F.; SAEZ, R. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, n. 1, p. 307-315, 1991.

BARNETT, J.A. The Utilization of Sugars by Yeasts. Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, v. 32, p. 125-234, 1976.

BAUDEL, H.M.; ZAROR, C.; ABREU, C.A.M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 309-315, 2005.

BAURÉUS KOCH, C.L.M.; SOMMARIN, M.; PERSSON, B.R.R.; G., S.L.; L., E.J. Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes. **Bioelectromagnetics**, v. 24, p. 395-402, 2003.

BELLIDO, C.; GONZÁLEZ-BENITO, G.; COCA, M.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M.T. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 133, n. 0, p. 51-58, 2013.

BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 355-385, 2000.

BINNINGER, D.M.; UNGVICHIAN, V. Effects of 60 Hz AC magnetic fields on gene expression following exposure over multiple cell generations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 1, p. 83-89, 1997.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. . **Progress in Polymer Science**, v. 19, p. 797-841, 1994.

BOBLETER, O.; CONCIN, R. Degradation of poplar lignin by hydrothermal treatment. **Cellulose Chemistry & Technology**, v. 13, p. 583-593., 1979.

BRAVO, P.; GONZALEZ, G. Continuous ethanol fermentation by immobilized yeast cells in a fluidized-bed reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 52, n. 1, p. 127-134, 1991.

BROWNELL, H.H.; YU, E.K.C.; SADDLER, J.N. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 792-801, 1986.

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

BRUINENBERG, P.M.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. A Theoretical Analysis of NADPH Production and Consumption in Yeasts. **Journal of' General Microbiology**, v. 129, p. 953-964, 1983.

BUSTURIA, A.; LAGUNAS, R. Catabolite Inactivation of the Glucose Transport System in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, v. 132, n. 2, p. 379-385, 1986.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C.A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012.

CADETE, R.M.; SANTOS, R.O.; MELO, M.A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D.L.; STAMBUK, B.U.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.-A.; ROSA, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a d-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.

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

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

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

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. Journal of Scientific and Industrial Research, v. 67, n. 11, p. 849-864, 2008.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; LOPES, S.; PARAJÓ, J.C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1215-1223, 2005.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; SILVA, S.S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate: Metabolic behaviour of *Candida guilliermondii* cells entrapped in Caalginate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 25, n. 1, p. 25-31, 2005.

CEON, R.; MARTIN, J.T.; POWELL, M.R. Low-level, magnetic-field-induced growth modification of *Bacillus* subtilis. **Bioelectromagnetics**, v. 8, p. 275-282, 1987.

CHACÓN, D.A.; HABER, V.P.; FONG, A.R.; MAS, S.D.; SERGUERA, M.N.; RODRIGUEZ, O.J. Influence of the electromagnetic field in the growth of *Candida utilis* Y-660 yeast. **Tecnología Química**, v. 15-16, p. 52-60, 1996.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANG, V.; HOLTZAPPLE, M. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1, p. 5-37, 2000.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; KIM, C.-H.; HOLTZAPPLE, M. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 94, n. 1, p. 1-28, 2001.

CHANG, V.S.; KAAR, W.E.; BURR, B.; HOLTZAPPLE, M.T. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 16, p. 1327-1333, 2001.

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

CHEN, Y.; DONG, B.; QIN, W.; XIAO, D. Xylose and cellulose fractionation from corncob with three different strategies and separate fermentation of them to bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 6994-6999, 2010.

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

CHUN-ZHAO, L.; FENG, W.; FAN, O.-Y. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 878-882, 2009.

CONVERSE, A.; KWARTENG, I.; GRETHLEIN, H.; OOSHIMA, H. Kinetics of thermochemical pretreatment of lignocellulosic materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20-21, n. 1, p. 63-78, 1989.

COWLING, E.B.; KIRK, T.K. Properties of cellulose and lignocellulosic materials as substrates for enzymatic conversion processes. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, v. 6, p. 95-123., 1976.

DA CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L.R.; SEHNEM, N.T.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4218-4225, 2011.

DALLINGER, D.; KAPPE, C.O. Microwave-assisted synthesis in water as solvent. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2563-2591, 2007.

DAVID, G.F. **Proposta tecnológica de reuso de glicerina residual da produção de biodiesel: Processo integrado**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, R. J., 2012.

DAVIS, L.; JEON, Y.J.; SVENSON, C.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, p. 49-59, 2005.

DIEN, B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 258-266, 2003.

DIJKERMAN, R.; LEDEBOER, J.; OP DEN CAMP, H.J.M.; PRINS, R.A.; VAN DER DRIFT, C. The Anaerobic Fungus *Neocallimastix* sp. Strain L2: Growth and Production of (Hemi)Cellulolytic Enzymes on a Range of Carbohydrate Substrates. **Current Microbiology**, v. 34, n. 2, p. 91-96, 1997.

DOMANSKY, R.; RENDOS, F. On the pyrolysis of wood and its components. **Holz Roh Werkst**, v. 29, p. 473-476, 1962.

DORAN, P.M. Bioprocess Engineering Principles. Elsevier Science & Technology Books, 1997. 439 p.

DOS SANTOS, M.L.; DE LIMA, O.J.; NASSAR, E.J.; CIUFFI, K.J.; CALEFI, P.S. Estudo das condições de estocagem do bagaço de cana-de-açúcar por análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 507-511, 2011.

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

DU PREEZ, J.C.; VAN DER WALT, J.P. Fermentation of D-xylose to ethanol by a strain of *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 5, p. 357-362, 1983.

DUARTE, L.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. Effects of aliphatic acids, furfural, and phenolic compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121, n. 1-3, p. 413-425, 2005.

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

DUSSAN, K.J.; CARDONA, C.A.; GIRALDO, O.H.; GUTIÉRREZ, L.F.; PÉREZ, V.H. Analysis of a reactive extraction process for biodiesel production using a lipase immobilized on magnetic nanostructures. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 24, p. 9542-9549, 2010.

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

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XYS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3381-3386, 2000.

FAULON, J.-L.; CARLSON, G.A.; HATCHER, P.G. A three-dimensional model for lignocellulose from gymnospermous wood. **Organic Geochemistry**, v. 21, n. 12, p. 1169-1179, 1994.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 1–2, p. 11-14, 1997.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood-chemistry, ultrastructure, reactions.** Berlin: John Wiley & Sons, 1989. 613 p.

FERREIRA, A.D. **Utilização da levedura** *Pichia stipitis* **UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2010. 116 f. Disertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2010.

FERREIRA, A.D.; DUSSÁN, K.; CHANDEL, A.K.; RODRIGUES, R.C.L.B.; DA SILVA, S.S. Influence of the Yeast Extract as Nitrogen Source on Bioethanol Production by a New Xylose Fermenting Yeast Scheffersomyces (*Pichia*) stipitis UFMG-IMH 43.2 In: THE WORLD CONGRESS ON INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY & BIOPROCESSING, 2011. Toronto, Ontario, Canada, 2011.

FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**, v. 28, n. 7, p. 547-554, 2011.

FIAUX, J.; ÇAKAR, Z.P.; SONDEREGGER, M.; WÜTHRICH, K.; SZYPERSKI, T.; SAUER, U. Metabolic-Flux Profiling of the Yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 1, p. 170-180, 2003.

FOJT, L.; KLAPETEK, P.; STRAŠÁK, L.; VETTERL, V. 50Hz magnetic field effect on the morphology of bacteria. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 918-922, 2009.

FOJT, L.; STRASAK, L.; VETTERL, V.; SMARDA, J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. **Bioelectrochemistry**, v. 63, p. 337-341, 2004.

FONSECA, B.G.; MOUTTA, R.D.O.; FERRAZ, F.D.O.; VIEIRA, E.R.; NOGUEIRA, A.S.; BARATELLA, B.F.; RODRIGUES, L.C.; HOU-RUI, Z.; DA SILVA, S.S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 199-207, 2011.

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

FTA. ThermoWood® Handbook. Finland: Finnish Thermowood Association, 2003.

GÁMEZ, S.; GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. **Journal of Food Engineering**, v. 74, p. 78-88, 2006.

GANDI, J.; HOLTZAPPLE, M.T.; FERRER, A.; BYERS, F.M.; TURNER, N.D.; NAGWANI, M.; CHANG, S. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. **Animal Feed Science and Technology**, v. 68, n. 3–4, p. 195-211, 1997.

GAO, M.; ZHANG, J.; FENG, H. Extremely low frequency magnetic field effects on metabolite of *Aspergillus niger*. **Bioelectromagnetics**, v. 32, n. 1, p. 73-78, 2011.

GARROTE, G.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Hydrothermal processing of lignocellulosic materials. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 57, n. 3, p. 191-202, 1999.

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

GLASSER, W.G.; WRIGHT, R.S. Steam-assisted biomass fractionation. II. Fractionation behavior of various biomass resources. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, p. 219-235, 1997.

GOKSUNGUR, Y.; ZORLU, N. Production of Ethanol from Beet Molasses by Ca-Alginate Immobilized Yeast Cells in a Packed-Bed Bioreactor. **Turkish Journal of Biology**, v. 25, p. 265-275, 2001.

GONZALEZ, A.S.; CASTILLO, J.B.; BRITO, L.L.D.; MULET, M.H.; MARANON, M.C.; HABER, V.P. Local magnetic stimulator NAK. **Tecnología Química**, v. 15-16, p. 32-36, 1996.

GOSSETT, J.M.; STUCKEY, D.C.; OWEN, W.F.; MCCARTY, P.L. Heat Treatment and Anaerobic Digestion of Refuse. Journal of the Environmental Engineering Division, v. 108, n. 3, p. 437-454, 1982.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M.; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de 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, n. 4, p. 511-516, 2002.

GREEN, D.W.; PERRY, R.H. Perry's Chemical Engineers' Handbook. 7th (Ed). New York: McGraw-Hill, 1977. 2700 p.

GREGG, D.; SADDLER, J. A techno-economic assessment of the pretreatment and fractionation steps of a biomass-to-ethanol process. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, n. 1, p. 711-727, 1996.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, v. 15, p. 59-80, 1985.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Dilute acid pretreatment of biomass at high solids concentration. **Biotechnology & Bioengineering Symposium**, v. 17, p. 135-151, 1986.

GROOTJEN, D.R.J.; JANSEN, M.L.; VAN DER LANS, R.G.J.M.; LUYBEN, K.C.A.M. Reactors in series for the complete conversion of glucose/xilose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 13, p. 828-833, 1991.

GROTKJÆR, T.; CHRISTAKOPOULOS, P.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Comparative metabolic network analysis of two xylose fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Metabolic Engineering**, v. 7, n. 5–6, p. 437-444, 2005.

GUNSALUS, I.C.; HORECKER, B.L.; WOOD, W.A. Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms. **Bacteriological Reviews**, v. 19, n. 2, p. 79-128, 1955.

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

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

HAMACHER, T.; BECKER, J.; GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B.; BOLES, E. Characterization of the xilose-transporting properties of yeast hexose transporters and their influence on xylose utilization. **Microbiology**, v. 148, p. 2783-2788, 2002.

HARI-KRISHNA, S.; PRASANTHI, K.; CHOWDORY, G.V.; AYYANNA, C. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. **Process Biochemistry**, v. 33, p. 825-830, 1998.

HARMSEN, P.F.H.; HUIJGEN, W.J.J.; BERMÚDEZ LÓPEZ, L.M.; BAKKER, R.R.C. Literature Review of **Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass.** Wageningen: Food & Biobased Research, 2009. 54 p.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HERNÁNDEZ-SALAS, J.M.; VILLA-RAMÍREZ, M.S.; VELOZ-RENDÓN, J.S.; RIVERA-HERNÁNDEZ, K.N.; GONZÁLEZ-CÉSAR, R.A.; PLASCENCIA-ESPINOSA, M.A.; TREJO-ESTRADA, S.R. Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1238-1245, 2009.

HICKERT, L.R.; DA CUNHA-PEREIRA, F.; DE SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. In Press, 2013.

HOLMGREN, M.; SELLSTEDT, A. Producing ethanol through fermentation of organic starting materials, involves using fungus e.g., *Chalara parvispora*, capable of metabolizing pentose compounds. SE527184, 2006.

HRISTOV, J. Magnetic field assisted fluidization – a unified approach. Part 8. Mass transfer: magnetically assisted bioprocesses. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 26, p. 55-128, 2010.

HRISTOV, J.; PEREZ, V.H. Critical analysis of data concerning *Saccharomyces cerevisiae* free-cell proliferations and fermentations assisted by magnetic and electromagnetic fields. **International Review of Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 3-20, 2011.

HRISTOZOVA, T.; ANGELOV, A.; TZVETKOVA, B.; PASKALEVA, D.; GOTCHEVA, V.; GARGOVA, S.; PAVLOVA, K. Effect of furfural on carbon metabolism key enzymes of lactose-assimilating yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1108-1112, 2006.

HUNT, R.; ZAVALIN, A.; BHATNAGAR, A.; CHINNASAMY, S.; DAS, K. Electromagnetic Biostimulation of Living Cultures for Biotechnology, Biofuel and Bioenergy Applications. International Journal of Molecular Sciences, v. 10, n. 10, p. 4515-4558, 2009.

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

IVANOVA, V.; HRISTOV, J.; DOBREVA, E.; AL-HASSAN, Z.; PENCHEV, I. Performance of a magnetically stabilized bed reactor winth immobilized yeast cell. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, p. 187-198, 1996.

IWASAKA, M.; IKEHATA, M.; MIYAKOSHI, J.; UENO, S. Strong static magnetic field effects on yeast proliferation and distribution. **Bioelectrochemistry**, v. 65, n. 1, p. 59-68, 2004.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Xylose Monomer and Oligomer Yields for Uncatalyzed Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose at Varying Solids Concentration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 41, n. 6, p. 1454-1461, 2002.

JAMES D, M. Bioethanol production: Status and prospects. **Renewable Energy**, v. 10, n. 2–3, p. 295-302, 1997.

JEFFRIES, T. Utilization of xylose by bacteria, yeasts, and fungi. In: PENTOSES and lignin. Berlin: Heidelberg, 1983, 1-32 p.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.

JI, W.; HUANG, H.; DENG, A.; PAN, C. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. **Micron**, v. 40, n. 8, p. 894-898, 2009.

JIN, Y.-S.; JEFFRIES, T.W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 6, n. 3, p. 229-238, 2004.

JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 6816-6825, 2004.

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

JUSTO, O.R.; PEREZ, V.H.; ALVAREZ, D.C. gp-41 protein production by *E. coli* in unconventional bioreactor coupled with magnetic field generator. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 8, p. 738-744, 2007.

JUSTO, O.R.; PÉREZ, V.H.; ALVAREZ, D.C.; ALEGRE, R.M. Growth of the *Escherichia coli* under Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 134, n. 2, p. 155-164, 2006.

KAAR, W.E.; GUTIERREZ, C.V.; KINOSHITA, C.M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. **Biomass and Bioenergy**, v. 14, n. 3, p. 277-287, 1998.

KADAM, K.L.; SCHMIDT, S.L. Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, n. 6, p. 709-713, 1997.

KARCZEWSKA, H. Some observations on pentose utilization by *Candida tropicalis*. **Comptes rendus des travaux du laboratoire Carlsberg**, v. 31, p. 251-258, 1959.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.J. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 653-658, 2006.

KAUNE, W.T.; FRAZIER, A.J.; KING, J.E.; SAMUEL, J.E.; HUNGATE, F.P.; CAUSEY, S.C. System for the exposure of cell suspensions to power-frequency electric fields. **Bioelectromagnetics**, v. 5, p. 117-129, 1984.

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

KIM, K.H.; HONG, J. Supercritical CO2 pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 2, p. 139-144, 2001.

KINOUCHI, Y.; USHITA, T.; SATO, K.; MIYAMOTO, H.; YAMAGUCHI, H.; YOSHIDA, Y. Desing of a magnetic field generator for experiments on magnetic effects in cell cultures. **Bioelectromagnetics**, v. 5, p. 399-410, 1984.

KIRK-OTHMER. Encyclopedia of Chemical Technology. New York: John Wiley & Sons, 2001. 1087 p.

KLINKE, H.B.; AHRING, B.K.; SCHMIDT, A.S.; THOMSEN, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 82, n. 1, p. 15-26, 2002.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I.M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A.A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377-397, 2004.

KRÄSSIG, H.; SCHURZ, J.; STEADMAN, R.G.; SCHLIEFER, K.; ALBRECHT, W.; MOHRING, M.; SCHLOSSER, H. **ULLMANN'S Encyclopedia of Industrial Chemistry.** Weinheim: Wiley-VCH, 2004.

KROPINSKI, A.M.; MORRIS, W.C.; SZEWCZUK, M.R. Sinusoidal 60 Hz electromagnetic fields failed to induce changes in protein synthesis in *Escherichia coli*. **Bioelectromagnetics**, v. 15, p. 283-291, 1994.

KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W. The Yeasts: A taxonomic Study. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LAGUNAS, R.; DOMINGUEZ, C.; BUSTURIA, A.; SÁEZ, M.J. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport systems. **Journal of Bacteriology**, v. 152, n. 1, p. 19-25, 1982.

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

LAWTHER, J.M.; SUN, R.; BANKS, W.B. Effect of steam treatment on the chemical composition of wheat straw. **Holzforschung**, v. 50, p. 365-371, 1996.

LEE, W.; LEE, J.; SHIN, C.; PARK, S.; CHANG, H.; CHANG, Y. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 78, n. 1-3, p. 547-559, 1999.

LEI, C.; BERG, H. Electromagnetic window effects on proliferation rate of *Corynebacterium glutamicum*. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, n. 2, p. 261-265, 1998.

LI, C.; WANG, Q.; ZHAO, Z.K. Acid in ionic liquid: An efficient system for hydrolysis of lignocellulose. **Green Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 177-182, 2008.

LI, Z.-Y.; GUO, S.-Y.; LI, L.; CAI, M.-Y. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 3, p. 700-705, 2007.

LIGHTHELM, M.; PRIOR, B.; PREEZ, J. The effect of respiratory inhibitors on the fermentative ability of *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* under various conditions of aerobiosis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 67-71, 1988.

LIGTHELM, M.; PRIOR, B.; PREEZ, J.; BRANDT, V. An investigation of d-{1-13C} xylose metabolism in *Pichia stipitis* under aerobic and anaerobic conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 293-296, 1988.

LIGTHELM, M.E.; PRIOR, B.A.; PREEZ, J.C. The oxygen requirements of yeasts for the fermentation of dxylose and d-glucose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 63-68, 1988.

LIN, T.-H.; HUANG, C.-F.; GUO, G.-L.; HWANG, W.-S.; HUANG, S.-L. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 116, n. 0, p. 314-319, 2012.

LINOJ, K.N.V.; DHAVALA, P.; GOSWAMI, A.; MAITHEL, S. Liquid biofuels in South Asia: resources and technologies. **Asian Biotechnology and Development Review**, v. 8, p. 31-49, 2006.

LIU, C.; WYMAN, C.E. The Effect of Flow Rate of Very Dilute Sulfuric Acid on Xylan, Lignin, and Total Mass Removal from Corn Stover. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 11, p. 2781-2788, 2004.

LOPES, P.; BORZANI, W.; RODRIGUES, J.A.D.; RATUSZNEI, S.M. Influência de campo magnético na fermentação alcoólica descontínua. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 1, p. 38-51, 2012.

LORA, J.H.; WAYMAN, M. Delignification of hardwoods by autohydrolysis and extraction. **Tappi**, v. 61, p. 47-50, 1978.

MARTÍN, C.; ALMAZÁN, O.; MARCET, M.; JÖNSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1297, p. 33-39, 2007.

MARTÍN, C.; KLINKE, H.B.; THOMSEN, A.B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 40, p. 426-432, 2008.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Effects of Ca(OH)2 treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526-536, 2000.

MARTINEZ, E.A.; SILVA, S.S.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N.; FELIPE, M.G.A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1677-1683, 2003.

MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; PESSOA JUNIOR, A. 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.

MAZID, M.A. Biocatalysis and Immobilized Enzyme/Cell Bioreactors. **Nature Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 690-695, 1993.

MEHEDINTU, M.; BERG, H. Proliferation response of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on electromagnetic field parameters. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, p. 67-70, 1997.

MESA, L.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ, E.; ROMERO, I.; CARA, C.; FELISSIA, F.; CASTRO, E. Preliminary evaluation of organosolv pre-treatment of sugar cane bagasse for glucose production: Application of 23 experimental design. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 109-114, 2010.

MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzyme and Microbial Technology**, 2004.

MITTENZWEY, R.; SÜßMUTH, R.; MEI, W. Effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on bacteria—the question of a co-stressing factor. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 40, n. 1, p. 21-27, 1996.

MODIG, T.; LIDÉN, G.; TAHERZADEH, M.J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical Journal**, v. 363, p. 769-776, 2002.

MOK, W.S.L.; ANTAL, M.J.A. Uncatalyzed solvolysis of whole biomass hemicellulose by hot compressed liquid water. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 31, p. 1157-1161, 1992.

MONIRUZZAMAN, M. Alcohol fermentation of enzymatic hydrolysate of exploded rice straw by *Pichia stipitis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 6, p. 646-648, 1995.

MOORE, R.L. Biological effects of magnetic fields: studies with microorganisms. Canadian Journal of Microbiology, v. 25, p. 1145-51, 1979.

MOSIER, N.; HENDRICKSON, R.; HO, N.; SEDLAK, M.; LADISCH, M.R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 18, p. 1986-1993, 2005.

MUNIZ, J.B.; MARCELINO, M.; MOTTA, M.D.; SCHULER, A.; MOTTA, M.A.D. Influence of static magnetic fields on *S. cerevisae* biomass growth. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 515-520, 2007.

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

NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; KU ISMAIL, K.S. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *S. cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 251-260, 2004.

NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 76, p. 586-592, 2001.

NEGRO, M.J.; MANZANARES, P.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, I.; BALLESTEROS, M. Changes in various physical/chemical parameters of Pinus pinaster wood after steam explosion pretreatment. **Biomass and Bioenergy**, v. 25, n. 3, p. 301-308, 2003.

NGUYEN, N.H.; SUH, S.-O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

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

NIGAM, J.N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Journal of **Biotechnology**, v. 87, n. 1, p. 17-27, 2001b.

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

NIGAM, J.N.; IRELAND, R.S.; MARGARITIS, A.; LACHANCE, M.A. Isolation and Screening of Yeasts That Ferment d-Xylose Directly to Ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1486-1489, 1985.

NOVÁK, J.; STRAŠÁK, L.; FOJT, L.; SLANINOVÁ, I.; VETTERL, V. Effects of low-frequency magnetic fields on the viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 1, p. 115-121, 2007.

NURDAN, E.-S.; YEŞIM, A. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 10, p. 855-858, 2000.

O'CONNOR, R.P.; WOOLEY, R.; KOLSTAD, J.J.; KEAN, R.T.; GLASSNER, D.A.; MASTEL, B.; RITZENTHALER, J.M.; BIRK, R.H.; WARWICK, J.; HETTENHAUS, J.R.; BROOKS, R.K. **Process for Fractionating Lignocellulosic Biomass into Liquid and Solid Products**. US20090176286, 2009.

OJEDA, K.; KAFAROV, V. Energy analysis of enzymatic hydrolysis reactors for transformation of lignocellulosic biomass to bioethanol. **Chemical Engineering Journal**, 2009.

OKAMOTO, T.; TAGUCHI, H.; NAKAMURA, K.; IKENAGA, H.; KURAISHI, H.; YAMASATO, K. *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. **Archives of Microbiology**, v. 160, n. 5, p. 333-337, 1993.

OLIVA, J.M.; NEGRO, M.J.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; MANZANARES, P.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1223-1228, 2006.

OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochemistry**, v. 28, n. 4, p. 249-257, 1993.

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

OLSSON, L.; LINDÉN, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Performance of microorganisms in spent sulfite liquor and enzymatic hydrolysate of steam-pretreated. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 359-368, 1992.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000a.

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

PANAGIOTOU, G.; VILLAS-BÔAS, S.G.; CHRISTAKOPOULOS, P.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* converting glucose to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 115, n. 4, p. 425-434, 2005.

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

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

PARK, E.Y.; MICHINAKA, A.; OKUDA, N. Enzymatic Hydrolysis of Waste Office Paper Using Viscosity as Operating Parameter. **Biotechnology Progress**, v. 17, n. 2, p. 379-382, 2001.

PEREZ, V.H.; REYES, A.F.; JUSTO, O.R.; ALVAREZ, D.C.; ALEGRE, R.M. Bioreactor Coupled with Electromagnetic Field Generator: Effects of Extremely Low Frequency Electromagnetic Fields on Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Progress**, v. 23, n. 5, p. 1091-1094, 2007.

PERSSON, P.; ANDERSSON, J.; GORTON, L.; LARSSON, S.; NILVEBRANT, N.-O.; JÖNSSON, L.J. Effect of Different Forms of Alkali Treatment on Specific Fermentation Inhibitors and on the Fermentability of Lignocellulose Hydrolysates for Production of Fuel Ethanol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 19, p. 5318-5325, 2002.

PIRT, J.S. Principles of microbe and cell cultivation. Oxford: Blackwell Scientific, 1975.

POLK, C.; POSTOW, E. Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Field. 2nd (Ed). New York: CRS Press, 1996.

POTENZA, L.; UBALDI, L.; DE SANCTIS, R.; DE BELLIS, R.; CUCCHIARINI, L.; DACHÀ, M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 561, n. 1–2, p. 53-62, 2004.

PREEZ, J.C.; DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. D-xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at low dissolved oxygen levels in fed-batch cultures. **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 2, p. 131-136, 1989.

QUINTERO, J.A. **Diseño y Evaluación de la Producción de Alcohol Carburante a partir de Materias Primas Lignocelulósicas** 2011. 178 f. Tesis (Doctor de Filosofía en Ingeniería - Ingeniería Automática) -Departamento de Ingeniería Eléctrica, Electrónica y Computación, Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, Manizales, 2011.

QUINTERO, J.A.; RINCÓN, L.E.; CARDONA, C.A. Production of Bioethanol from Agroindustrial Residues as Feedstocks. In: BIOFUELS. Amsterdam: Academic Press, 2011, 251-285 p.

RAMOS, L.P. The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 863-871, 2003.

RAMOS, L.P.; BREUIL, C.; KUSHNER, D.J.; SADDLER, J.N. Steam pretreatment conditions for effective enzymatic hydrolysis and recovery yields of Eucalyptus viminalis wood chips. **Holzforschung**, v. 46, p. 149-154, 1992.

RAMOS, L.P.; CARPES, S.T.; SILVA, F.T.; GANTER, J.L.M.S. Comparison of the susceptibility of two hardwood species, Mimosa scabrella Benth and Eucalyptus viminalis Labill, to steam explosion and enzymatic hydrolysis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, p. 185-206, 2000.

RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of ethanol-producing yeasts from fruits and tree barks. Letters in Applied Microbiology, v. 47, n. 1, p. 19-24, 2008.

RAO, T.B.M.L.R.; SONOLIKAR, R.L.; SAHEB, S.P. Influence of magnetic field on the performance of bubble columns and airlift bioreactor with submerged microorganisms. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 41, p. 55-60, 1997.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biology of Plants.** New York: W.H. Freeman & Company, 1992.

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

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.M.A.; FELIPE, M.G.A.; SATO, S.; CASTRO, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 11, p. 1211-1216, 1994.

RODRIGUES, F.Á.; GUIRARDELLO, R. Evaluation of a Sugarcane Bagasse Acid Hydrolysis Technology. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 6, p. 883-892, 2008.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 2, p. 103-107, 2003.

ROUKAS, T. Continuous ethanol production from carob pod extract by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in a packed-bed reactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 59, n. 4, p. 387-393, 1994.

RUIZ-GÓMEZ, M.J.; PRIETO-BARCIA, M.I.; RISTORI-BOGAJO, E.; MARTÍNEZ-MORILLO, M. Static and 50 Hz magnetic fields of 0.35 and 2.45 mT have no effect on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioelectrochemistry**, v. 64, p. 151-155, 2004.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 279-291, 2003.

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

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

SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A.J.; CAMACHO, F. The influence of pH and aeration rate on the fermentation of d-xylose by *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, n. 5, p. 355-360, 1997.

SANJUAN, R.; ANZALDO, J.; VARGAS, J.; TURRADO, J.; PATT, R. Morphological and chemical composition of pith and fibres from Mexican sugarcane bagasse. **Holz als Roh-und Werkstoff**, v. 59, p. 447-450, 2001.

SANTOS, L.O.; ALEGRE, R.M.; GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR, J. Effects of magnetic fields on biomass and glutathione production by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1362-1367, 2010.

SANTOS, L.O.D. Estudo da produção de glutationa a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações. 2008. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) - Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA) UNICAMP, Campinas, 2008.

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

SCHIRMER-MICHEL, Â.C.; FLÔRES, S.H.; HERTZ, P.F.; MATOS, G.S.; AYUB, M.A.Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008.

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

SHAHBAZI, A.; LI, Y.; MIMS, M. Application of sequential aqueous steam treatments to the fractionation of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 124, n. 1, p. 973-987, 2005.

SHEVCHENKO, S.; BEATSON, R.; SADDLER, J. The nature of lignin from steam explosion/enzymatic hydrolysis of softwood. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, n. 1, p. 867-876, 1999.

SIANNAH, M.; GONZÁLEZ, A.; MELEK, S.; CABEZA, D. Influencia del campo electromagnético en la propagación de *Trichoderma viride* mediante fermentación en estado sólido (FES). **Tecnología Química**, v. 19, n. 3, p. 64-69, 1999.

SIEVERS, C.; VALENZUELA-OLARTE, M.B.; MARZIALETTI, T.; MUSIN, I.; AGRAWAL, P.K.; JONES, C.W. Ionic-liquid-phase hydrolysis of pine wood. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 3, p. 1277-1286, 2009.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; LUCHESE, R.H.; SILVA, S.S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248-254, 2004.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 1, p. 151-156, 2011.

SILVA, J.P.A.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 259-265, 2012.

SIMS, A.P.; BARNETT, J.A. The requirement of oxygen for the utilization of maltose, cellobiose and dgalactose by certain anaerobically fermenting yeasts. **Journal of General Microbiology**, v. 106, p. 277-288, 1978.

SINGH, A.; KUMAR, P.; SCHÜGERL, K. Bioconversion of cellulosic materials to ethanol by filamentous fungi. In: ENZYMES and Products from Bacteria Fungi and Plant Cells. Berlin: Heidelberg, 1992, 29-55 p.

SKOOG, K.; JEPPSSON, H.; HAHN-HÄGERDAL, B. The effect of oxygenation on glucose fermentation with *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 34-35, n. 1, p. 369-375, 1992.

SKOTNICKI, M.L.; WARR, R.G.; GOODMAN, A.E.; LEE, K.J.; ROGERS, P.L. High-productivity alcohol fermentations using *Zymomonas mobilis*. **Biochemical Society Symposia**, v. 48, p. 53-86, 1983.

SLININGER, P.J.; BOLEN, P.L.; KURTZMAN, C.P. *Pachysolen tannophilus*: Properties and process considerations for ethanol production from d-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 1, p. 5-15, 1987.

SOCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.D.S.; MEDEIROS, A.B.P.; KARP, S.G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L.P.; PITARELO, A.P.; FERREIRA-LEITÃO, V.; GOTTSCHALK, L.M.F.; FERRARA, M.A.; SILVA BON, E.P.D.; MORAES, L.M.P.D.; ARAÚJO, J.D.A.; TORRES, F.A.G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4820-4825, 2010.

SÖDERSTRÖM, J.; PILCHER, L.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Two-step steam pretreatment of softwood with SO2 impregnation for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, n. 1, p. 5-21, 2002.

SUES, A.; MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M.J. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 6–7, p. 669-676, 2005.

SUH, S.-O.; MARSHALL, C.J.; MCHUGH, J.V.; BLACKWELL, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. **Molecular Ecology**, v. 12, n. 11, p. 3137-3145, 2003.

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

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

TAHERZADEH, M.J.; NIKLASSON, C. Ethanol from Lignocellulosic Materials: Pretreatment, Acid and Enzymatic Hydrolyses, and Fermentation. In: LIGNOCELLULOSE Biodegradation. Washington, DC: American Chemical Society, 2004, 49-68 p.

TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 83, p. 364-370, 1997.

TEIXEIRA, L.; LINDEN, J.; SCHROEDER, H. Alkaline and peracetic acid pretreatments of biomass for ethanol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 19-34, 1999.

TELLI OKUR, M.; EKEN SARAÇOGLU, N. Ethanol Production from Sunflower Seed Hull Hydrolysate by *Pichia stipitis* under Uncontrolled pH Conditions in a Bioreactor. **Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences** v. 30, n. 5, p. 317-322, 2006.

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

TOIVOLA, A.; YARROW, D.; VAN DEN BOSCH, E.; VAN DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. Alcoholic Fermentation of d-Xylose by Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1223, 1984.

TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, n. 7, p. 439-444, 1986.

UNCTAD. Challenges and opportunities for developing countries in producing biofuels. Geneva: UNCTAD, 2006.

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

VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A.; DU PREEZ, J.C. Acetic acid inhibition of d-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 1, p. 82-86, 1991.

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

WANG, P.; YU, H.; ZHAN, S.; WANG, S. Catalytic hydrolysis of lignocellulosic biomass into 5-hydroxymethylfurfural in ionic liquid. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 5, p. 4179-4183, 2011.

WEIL, J.; BREWER, M.; HENDRICKSON, R.; SARIKAYA, A.; LADISCH, M. Continuous pH monitoring during pretreatment of yellow poplar wood sawdust by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 99-111, 1998.

WEIL, J.; SARIKAYA, A.; RAU, S.-L.; GOETZ, J.; LADISCH, C.; BREWER, M.; HENDRICKSON, R.; LADISCH, M. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 73, n. 1, p. 1-17, 1998.

WESTRIN, B.A.; AXELSSON, A. Diffusion in gels containing immobilized cells: A critical review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 5, p. 439-446, 1991.

WEUSTHUIS, R.A.; VISSER, W.; PRONK, J.T.; SCHEFFERS, W.A.; VAN DIJKEN, J.P. Effects of oxygen limitation on sugar metabolism in yeasts: a continuous-culture study of the Kluyver effect. **Microbiology**, v. 140, n. 4, p. 703-715, 1994.

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

WOHLBACH, D.J.; KUO, A.; SATO, T.K.; POTTS, K.M.; SALAMOV, A.A.; LABUTTI, K.M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J.L.; LINDQUIST, E.A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B.E.; JEFFRIES, T.W.; ZINKEL, R.; BARRY, K.W.; GRIGORIEV, I.V.; GASCH, A.P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS**, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

WU, Y.; ZHANG, C.; LIU, Y.; FU, Z.; DAI, B.; YIN, D. Biomass char sulfonic acids (BC-SO3H)-catalyzed hydrolysis of bamboo under microwave irradiation. **BioResources**, v. 7, n. 4, p. 5950-5959, 2012.

XIAO, W.; CLARKSON, W.W. Acid solubilization of lignin and bioconversion of treated newsprint to methane. **Biodegradation**, v. 8, n. 1, p. 61-66, 1997.

YAVUZ, H.; ÇELEBI, S.S. Effects of magnetic field on activity of activated sludge in wastewater treatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 1, p. 22-27, 2000.

YOOSIN, S.; SORAPIPATANA, C. A study of ethanol production cost for gasoline substitution in Thailand and its competitiveness. **Thammasat International Journal of Science and Technology**, v. 12, p. 69-80, 2007.

ZHANG, Y.P.; DING, S.; MIELENZ, J.R.; CUI, J. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, p. 214-223, 2007.

ZHU, Y.; LEE, Y.; ELANDER, R. Dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 117, n. 2, p. 103-114, 2004.

ZHU, Y.; LEE, Y.Y.; ELANDER, R.T. Optimization of Dilute-Acid Pretreatment of Corn Stover Using a High-Solids Percolation Reactor In: TWENTY-SIXTH SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS. 2005. Humana Press, 2005, 1045-1054 p.

ZYL, C.; PRIOR, B.; PREEZ, J. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 1-3, p. 357-369, 1988.