UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PAULO MARCELO MOTA NASCIMENTO

Avaliação da tolerância das leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar visando à utilização de pentoses

LORENA

2015

PAULO MARCELO MOTA NASCIMENTO

Avaliação da tolerância das leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar visando à utilização de pentoses

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Dr[a]. Maria das Graças de Almeida Felipe.

Edição reimpressa e corrigida

LORENA

2015

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

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

Nascimento, Paulo Marcelo Mota
Avaliação da tolerância das leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar visando à utilização de pentoses / Paulo Marcelo Mota Nascimento; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
107 p.

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

1. Leveduras xilanolíticas. 2. Antártica. 3. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. 4. Xilitol. 5. Tóxicos. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

Aos meus pais Celiamara Mota Nascimento e Valdise José Nascimento Santos, pelo apoio e amor incondicionais, que sempre estiveram ao meu lado. Ao meu irmão André Wagner pelo companheirismo e carinho e a minha querida esposa por ser minha inspiração, minha amiga e minha luz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida e pela força para lutar, mesmo nos momentos difíceis.

A orientadora Prof. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de mestrado.

A todos os técnicos da faculdade que nos ajudam tanto e com tanto carinho.

Aos amigos de laboratório, Andrés, Isabela, Tainah, Bruna e Paulo que conjuntamente tornaram os dias de fermentação e análises mais agradáveis e também aos amigos dos laboratórios vizinhos.

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

A minha esposa, Denise, por ser minha pequena guerreira, guardiã, luz e amor.

Aos meus pais, Celiamara e Valdise e ao meu irmão André e minha cunhada Luciana pelo amor e carinho. A todos os familiares que sempre estão presentes em todos os momentos.

A todos os professores pelos conhecimentos transmitidos ao longo do curso.

"Criatividade é inventar, experimentar, crescer, correr riscos, quebrar regras, cometer erros, e se divertir."

Mary Lou Cook

RESUMO

Nascimento, P.M.M., **Avaliação da tolerância das leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar visando à utilização de pentoses.** 2015. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

Microrganismos oriundos de ecossistemas restritivos como o continente Antártico têm despertado grande interesse científico, visto que pesquisas podem resultar em produtos de grande interesse comercial. Visando o melhor aproveitamento da fração hemicelulósica de biomassas vegetais para obtenção de bioprodutos, junto ao potencial biotecnológico das leveduras da Antártica, a presente pesquisa avaliou a tolerância destas ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em função de sua concentração, bem como em meio semi-definido. A avaliação das leveduras *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95), *Candida davisiana* (L101 e 107) e *Guehomyces pullulans* (L109) foi feita a partir do consumo de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, compostos fenólicos totais, produção de xilitol, células e pigmentos. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL de meio a 200 RPM, a 30 °C por 48h. Considerando que a L109 demonstrou melhor desempenho quanto ao consumo de xilose e produção de xilitol do que as demais leveduras, a mesma foi utilizada para avaliar a influência da suplementação nutricional do hidrolisado sobre estes parâmetros utilizando delineamento composto central rotacional (DCCR). Todas as leveduras consumiram totalmente a glicose independente da concentração do hidrolisado, enquanto o consumo de xilose, arabinose, ácido acético e fenóis totais variaram de acordo com a concentração do hidrolisado e a levedura empregada, da mesma forma para produção de xilitol, células e pigmento. O planejamento realizado (DCCR) demonstrou que o consumo de xilose é favorecido na máxima concentração do extrato de farelo de arroz, e níveis intermediários de $(NH_4)_2SO_4$, enquanto que a concentração de $CaCl_2$ não foi significativa. Para o fator Yp/s de xilitol, baixos níveis de extrato de farelo de arroz e $CaCl_2$ aumentaram este fator enquanto que o $(NH_4)_2SO_4$ favoreceu em níveis intermediários. Conclui-se com estes resultados que as leveduras da Antártica são capazes de tolerar o hidrolisado, sendo capazes também de consumir os compostos tóxicos, ácido acético e fenólicos totais.

Palavras-chave: Leveduras xilanolíticas. Antártica. Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Xilitol. Tóxicos.

ABSTRACT

Nascimento, P.M.M., **Tolerance evaluation of xylanolytic yeasts isolated from Antarctica to sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate aiming to use pentose.**2015. 107 p. Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

Microorganisms from restrictive ecosystems such as Antarctica have aroused great scientific interest, since research studies may result in high value-added products. Given the need for better utilization of the hemicellulose fraction of biomass to obtain bioproducts, coupled with great biotechnological potential of the Antarctic yeast. This research evaluated the tolerance of these yeasts related to the hemicellulosic hydrolyzate from sugarcane bagasse at different concentrations, as well as in a semi-defined medium. Performance evaluation of the yeasts was based on consumption of xylose, glucose, arabinose, acetic acid, phenolics compounds, production of xylitol, cells and pigments. The following yeasts were employed: *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95), *Candida davisiana* (L101 and 107) and *Guehomyces pullulans* (L109). Cultures were cultivated in 125 mL Erlenmeyer flasks with a 50 mL medium at 200 RPM and 30 °C for 48h. Since the L109 showed a better performance in relation to the xylose consumption and xylitol production than the other yeasts when cultivated in hemicellulosic hydrolyzate diluted with 25% distilled water, the same was used to evaluate the influence of nutritional supplementation of the hemicelulosic hydrolyzate utilizing central composite rotational design (CCRD). All yeasts completely consumed glucose regardless of the hemicelulosic hydrolyzate concentration; while the consumption of xylose, arabinose, acetic acid and phenolics varied according to the concentration of hydrolyzate and yeast employed, the same was observed with xylitol production, cells and pigment. The design (CCRD), demonstrated that the xylose consumption was favored by maximum the concentration of the rice bran extract, and intermediate levels of $(NH_4)_2SO_4$, whereas the concentration of $CaCl_2$ was not significant. For the conversion into xylitol, low levels of rice bran extract and $CaCl_2$ increased $Y_{P/S,}$ while $(NH_4)_2SO_4$ favored at intermediate levels. It was concluded that the Antarctic yeast tolerate the hydrolyzed, being also able to consume toxic compounds such as acetic acid and phenolic compounds.

Keywords: Xylanolytic yeasts. Antarctica. Sugar cane hemicellulosic hydrolyzate. Xylitol. Toxics.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Codificação dos níveis para as variáveis $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e solução de Extrato de farelo de arroz (E.F.A) utilizado no planejamento estatístico. 52

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central (DCCR), visando avaliar o efeito da suplementação de $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de farelo de arroz (E.F.A) sobre o consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109).....52

Tabela 3 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar "in natura".....57

Tabela 4 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar e de outras matérias primas. 58

Tabela 5 - Média dos valores obtidos na caracterização química do hidrolisado após a hidrólise ácida diluída (Original), a concentração a vácuo (Concentrado), a destoxificação e de diluições do hidrolisado com água destilada: 75% de água (H-25), 50% de água (H-50), 25% de água (H-75), hidrolisado não diluído (H-100), meio Semi-definido (M.S.D), bem como do hidrolisado semelhante ao H-75, utilizado no planejamento estatístico (H-PE). 60

Tabela 6 - pH final dos meios de cultivo, em diferentes diluições de hidrolisado hemicelulósico e em meio semi-definido. 70

Tabela 7 - Codificação dos níveis para as variáveis $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Extrato de Farelo de Arroz (E.F.A) no consumo de xilose e fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE), para o planejamento estatístico com a levedura *Guehomyces pullulans.* 82

Tabela 8 - Matriz do planejamento composto central rotacional (valores codificados) com suas respectivas respostas consumo de xilose e fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) após 72h de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, com a levedura *Guehomyces pullulans.* 83

Tabela 9 - Efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90% de confiança, em ordem decrescente de efeito, para o fator de conversão de substrato em produto (YP/S) e

do consumo de xilose pela *Guehomyces pullulans* (L109), de acordo com planejamento proposto..... 89

Tabela 10 - Análise de variância dos efeitos principais sobre o fator de conversão de substrato em produto (Yp/s) e consumo de xilose para a levedura *Guehomyces pullulans* (L109). 90

Tabela 11 - Analise da variância de regressão para os modelos representativos das respostas. 91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principal polissacarídio estrutural das plantas; constituído de monômeros de glicose ligados entre si. 26

Figura 2 - Representação esquemática da hemicelulose nas plantas, contendo uma cadeia principal de xilose, bem como resíduos de acetil, arabinosssil e glucoromil. 26

Figura 3- Esquema estrutural da lignina de folhosas. 28

Figura 4 - Fracionamento dos polímeros dos materiais lignocelulósicos pelo emprego de um pré-tratamento. 29

Figura 5 - Exemplos de pré-tratamentos existentes de acordo com as suas categorias. 30

Figura 6 - Composição aproximada das frações dos materiais lignocelulósicos e compostos derivados da hidrolise. 32

Figura 7 - Esquema do metabolismo de glicose, xilose e arabinose por *Candida guilliermondii*. 37

Figura 8 - (a) Estrutura da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas. (a) Cadeia principal da xilana e seus grupos substituintes, (b) xilo-oligossacarídeo e o sítio de ação da β-xilosidase. 42

Figura 9 - Leveduras xilanolíticas da Antártica utilizadas no presente trabalho. 49

Figura 10 - Consumo dos açúcares glicose, xilose e arabinose pelas leveduras xilanolíticas da Antártica, em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido. 65

Figura 11 - Consumo dos fenólicos totais e ácido acético, pelas leveduras xilanolíticas da Antártica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. 69

Figura 12 - pH final do cultivo, em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido. 71

Figura 13 - Crescimento celular das leveduras xilanolíticas da Antártica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido após 48h de cultivo. 75

Figura 14 - Características morfológicas das leveduras sendo que (a) = lâminas fixadas e coradas com fucsina, (b) = Coloração das leveduras no meio caldo Sabouraud após ativação por 24h a 200RPM, 30°C, (c) = Coloração das leveduras cultivadas em hidrolisado hemicelulósico após 48h, Controle a = Caldo Sabouraud sem adição de leveduras, Controle b = Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar suplementado sem adição de leveduras. 77

Figura 15 - Obtenção de bioprodutos pelas leveduras xilanolíticas da Antártica, em diferentes concentraçõe de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em M.S.D após 48h de cultivo. 81

Figura 16 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 1 a 5 de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz. ..85

Figura 17 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 6 a 10 de acordo com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz. ..86

Figura 18 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 11 a 15 de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz. 87

Figura 19 - Superfície de resposta para o consumo de xilose pela *Guehomyces pullulans* (L109), onde (A) = $(NH_4)_2SO_4$ x CaCl2, (B) = E.F.A X CaCl2 e (C) = $(NH_4)_2SO_4$ x E.F.A. 93

Figura 20 - Superfície de resposta para o fator conversão de substrato em produto Yp/s pela *Guehomyces pullulans* (L109), onde (A) = $(NH_4)_2SO_4$ x CaCl2, (B) = E.F.A X CaCl2 e (C) = $(NH_4)_2SO_4$ x E.F.A. 95

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 23

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 25

2.1.1 Composição química dos materiais lignocelulósicos 25

2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR 28

2.2.1 Hidrólise ácida diluída 30

2.2.2 Compostos inibidores liberados durante a hidrólise ácida diluída 31

2.2.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 35

2.3 UTILIZAÇÃO MICROBIANA DE HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS 36

2.4 ECOSSISTEMAS DO CONTINENTE ANTÁRTICO 39

2.5 LEVEDURAS DA ANTÁRTICA 40

2.5.1 Gênero *Cryptococcus* 42

2.5.2 Gênero *Cândida* 43

2.5.3 Gênero *Guehomyces* 44

3 OBJETIVOS 45

3.1 OBJETIVO GERAL 45

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 45

4 MATERIAL E MÉTODOS 46

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA 46

4.1.1 Hidrólise ácida 46

4.1.2 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina 47

4.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO 47

4.2.1 Hidrólise ácida diluída 47

4.2.2 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar 48

4.2.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana 48

4.2.4 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana 48

4.3 MICRORGANISMOS..... 49

4.3.1 Preparo do inóculo 50

4.3.2 Avaliação prévia do desempenho das leveduras xilanolíticas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em diferentes concentrações 51

4.3.3 Avaliação da influência da suplementação nutricional com extrato de farelo de arroz, cloreto de cálcio e sulfato de amônio sobre o consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura *Guehomyces pullulans* 51

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS 53

4.4.1 Determinação do teor de umidade 53

4.4.2 Determinação dos compostos fenólicos totais do hidrolisado hemicelulósico 53

4.4.3 Remoção de extrativos 53

4.4.4 Determinação de cinzas 54

4.4.5 Teor de lignina insolúvel 54

4.4.6 Teor da lignina solúvel 55

4.4.7 Determinação do pH 55

4.4.8 Viabilidade e pureza da cultura 55

4.4.9 Determinação da concentração celular 56

4.5 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, xilitol e etanol..... 56

4.6 Determinação do fator de conversão de D- xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$)..... 56

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 57

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR 57

5.2 OBTENÇÃO DO HIDRÓLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR 59

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA DE-AÇÚCAR 59

5.4 AVALIAÇÃO PRÉVIA DO DESEMPENHO DAS LEVEDURAS XILANOLÍTICAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES 61

5.4.1 Avaliação do consumo de açúcares pelas leveduras 61

5.4.2 Avaliação consumo de compostos fenólicos e ácido acético pelas leveduras 66

5.4.4 Concentração Celular 72

5.4.5 Morfologia 76

5.4.6 Obtenção de bioprodutos pelas leveduras 78

5.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE EXTRATO DE FARELO DE ARROZ, CLORETO DE CÁLCIO E SULFATO DE AMÔNIO SOBRE O CONSUMO DE XILOSE E PRODUÇÃO DE XILITOL PELA LEVEDURA *GUEHOMYCES PULLULANS* 82

6 CONCLUSÕES 96

7 PERSPECTIVAS FUTURAS 97

REFERÊNCIAS 98

1. INTRODUÇÃO

A capacidade de utilizar as leveduras da Antártica pode ser considerada um dos desafios do século 21. Estas leveduras atraem a atenção de indústrias e pesquisadores pelo grande potencial biotecnológico na obtenção de uma diversidade de biomoléculas como: enzimas, pigmentos e biosurfactantes, entre outros, além da capacidade de consumir alguns compostos tóxicos. Os produtos obtidos a partir destas leveduras podem possuir características diferenciadas, devido à distinta habilidade de crescerem e metabolizarem compostos em baixas temperaturas. Também o fato de algumas destas leveduras serem xilanase positivas, ou seja, degradarem xilana para obter xilose como fonte de carbono, pode ser uma vantagem estratégica para aproveitamento de hidrolisados hemicelulósicos derivados de materiais lignocelulósicos.

Os materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar, são uma importante fonte de carboidratos para obtenção de bicombustíveis e outros produtos químicos. No processamento do bagaço de cana-de-açúcar, para a produção de etanol de segunda geração, empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, não fermentadora de pentose, é necessário um pré-tratamento que separa a hemicelulose. Embora grandes avanços tenham sido alcançados quanto à obtenção de etanol a partir de biomassas vegetais, em particular da fração celulósica do bagaço de cana de açúcar, há ainda limitações quanto à utilização da fração hemicelulósica destes materiais, particularmente pelo fato de que a *Saccharomyces cerevisiae* naturalmente não fermenta pentoses.

Dessa forma, para o uso econômico dos materiais lignocelulósicos, é importante o uso eficiente de todos os açúcares derivados destas matérias primas. Para tanto o uso efetivo de todos os açúcares presentes nos materiais lignocelulósicos é de grande importância na sustentabilidade do processo. Neste contexto, visando à necessidade de um melhor aproveitamento da fração hemicelulósica, aliado ao grande potencial biotecnológico das leveduras da Antártica, o objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho das leveduras xilanolíticas da Antártica durante o cultivo no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar quanto à formação de produtos e características que possam ser de interesse tecnológico, como consumo de ácido acético, compostos fenólicos e formação de xilitol, etanol e pigmentos.

As leveduras empregadas no presente trabalho foram as leveduras das espécies *Cryptococcus laurentii* (L62), *Cryptococcus adeliensis* (L95), *Candida davisiana* (L101 e 107) e *Guehomyces pullulans* (L109) previamente identificadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Fernando C. Pagnocca, da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Rio Claro). O presente trabalho está inserido no projeto "Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações", com suporte da FAPESP (Processo 13/19486-0), coordenado pela professora Lara Durães Sette do Instituto de Biociências, (UNESP/Rio Claro).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

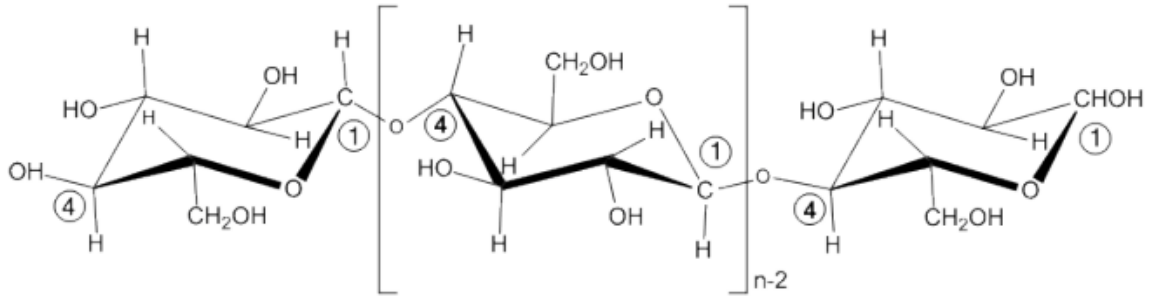
Materiais lignocelulósicos são um recurso natural, abundante e renovável, que podem ser obtidos de uma grande variedade de matérias-primas a custos relativamente baixos (TAHERZADEH; KARIMI, 2007). Estes materiais são uma importante fonte de carboidratos para obtenção de produtos e apresentam uma grande vantagem em relação aos combustíveis fósseis: A capacidade de absorver o dióxido de carbono durante a fase de crescimento, transformando-o em carboidratos através da fotossíntese (SILVA et al., 2009).

Esses materiais são de grande abundância e disponibilidade na biosfera, representando cerca de 50% da biomassa vegetal. Na constituição destes há três frações principais que podem ser destacadas: a celulose, a hemicelulose e a lignina. As concentrações destes componentes variam de acordo com o tipo de biomassa, podendo ser encontrada 40 a 80% de celulose, 10 a 40% de hemicelulose e 5 a 25% de lignina (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011).

2.1.1 Composição química dos materiais lignocelulósicos

A celulose é um dos principais constituintes das paredes celulares das plantas. É um homopolímero composto por cadeias lineares de glicose, formadas por ligações glicosídicas β-1,4 (Figura 1). Devido à distribuição homogênea de hidroxilas em ambos os lados dos monômeros de glicose, esta estrutura também forma ligações de hidrogênio entre cadeias vizinhas, resultando a formação de várias cadeias paralelas de glicose (BOGATI, ; HARMSEN et al., 2010).

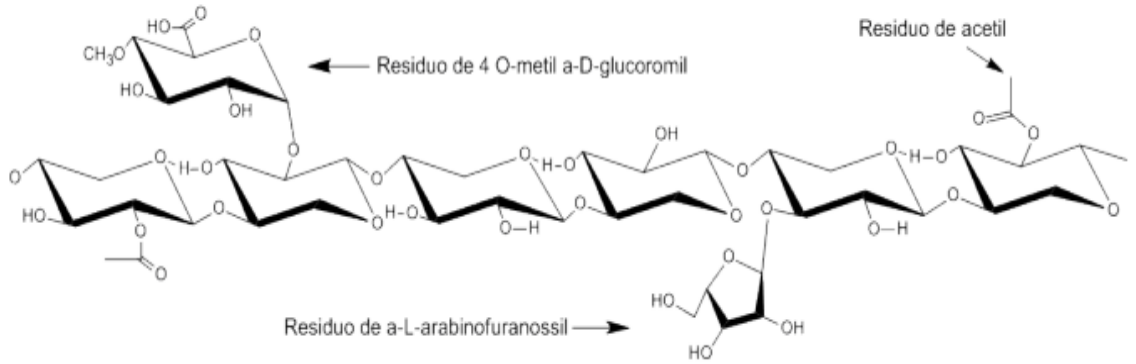
Figura 1 - Principal polissacarídeo estrutural das plantas; constituído de monômeros de glicose ligados entre si.



Fonte: Harmsen et al., (2010).

Quanto à hemicelulose, este é um termo geral utilizado para representar uma família de heteropolissacarídeos como as xilanas, arabinoxilanas, gluco-mananas e galactanas, entre outras, encontradas na parede celular. Dentre estas, a xilana é o polímero mais comumente encontrado, sendo composta por ligações 1→4 de unidades xilopiranosil com unidades α-(4-O)-metil-D-glucuronopiranosil, anexadas a unidades de anidroxilose (Figura 2). Isto resulta em uma cadeia ramificada composta principalmente por pentoses, como a xilose, e uma pequena quantidade de hexoses como a glicose (HARMSEN et al., 2010).

Figura 2 - Representação esquemática da hemicelulose nas plantas, contendo uma cadeia principal de xilose, bem como resíduos de acetil, arabinosssil e glucoromil.

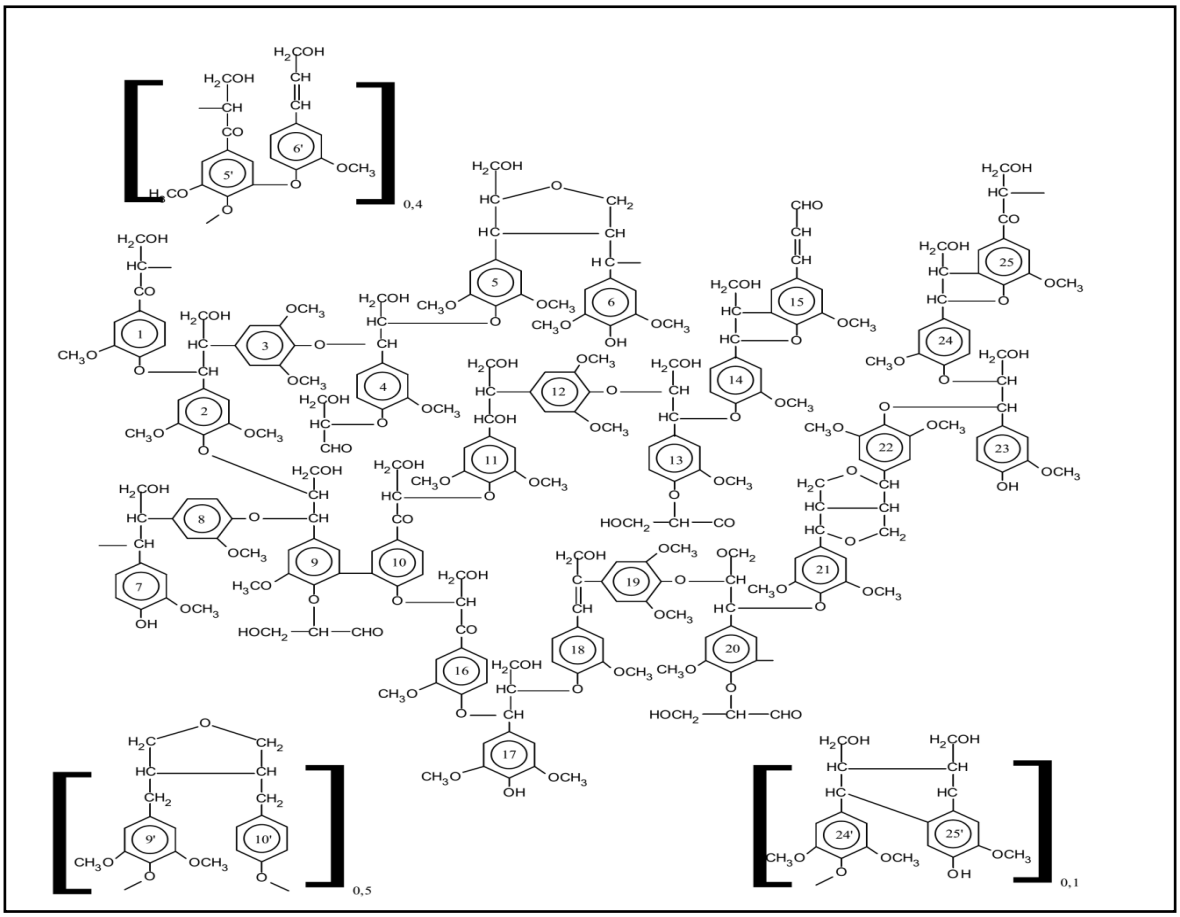


Fonte: Adaptado de Harmsen et al., (2010**)**

As hemiceluloses estão presentes em todas as camadas da parede celular das plantas e encontram-se intimamente associadas à celulose e à lignina. Sua estrutura apresenta ramificações que interagem facilmente com a celulose, dando estabilidade e flexibilidade ao agregado (SCHELLER; ULVSKOV, 2010). Comparadas com a celulose, as hemiceluloses apresentam maior susceptibilidade à hidrólise ácida, pois oferecem maior acessibilidade aos ácidos minerais comumente utilizados como catalisadores (SANTOS et al., 2012).

A lignina é o composto aromático mais abundante na biosfera e um dos principais constituintes dos vegetais (MORAIS; ROSA; MARCONCINI, 2010). A lignina é responsável por manter a integridade entre as fibrilas dos vegetais e também age como agente enrijecedor. A presença de ligações covalentes entre as cadeias de lignina e as outras frações aumenta a capacidade de adesão existente entre as fibras de celulose e a lignina (SILVA et al., 2009). Sua estrutura tridimensional é altamente ramificada, constituída por arranjo irregular de várias unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações entre os monômeros, resultando uma estrutura polifenólica complexa (Figura 3) (RAMIRES, 2010).

Figura 3 - Esquema estrutural da lignina de folhosas.



Fonte: Ramires., (2010)

2.2 BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

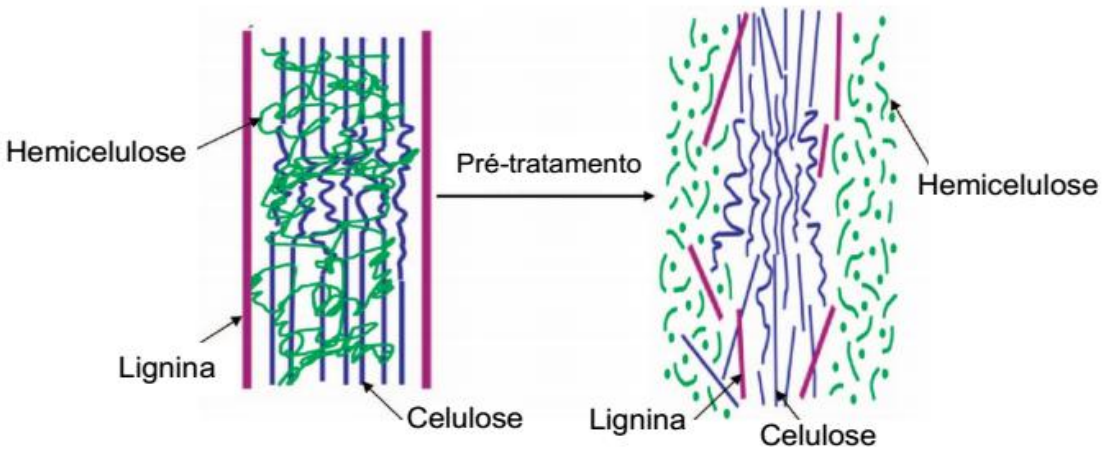
A cana de açúcar foi introduzida no Brasil durante o período colonial e transformou-se em uma das principais culturas na economia brasileira. Além de destacar-se como o maior produtor de cana o Brasil também é o primeiro no mundo na produção de açúcar e bioetanol de cana de açúcar, conquistando cada vez mais o mercado externo, com o uso de biocombustíveis como fonte renovável de energia (BRASIL, 2014).

Sendo responsável por mais da metade do açúcar produzido no mundo, o Brasil deve alcançar um aumento de 3,25% na produção até o ano de 2019, e colher cerca de 47,34 milhões de toneladas deste produto, o que corresponde a um aumento de aproximadamente 14,6 milhões de toneladas em relação ao período de 2007/2008 (BRASIL, 2014).

Para o bioetanol, a produção projetada é de 58,8 bilhões de litros em 2019, representando o dobro da produção registrada em 2008. O consumo interno está projetado em 50 bilhões de litros enquanto o consumo externo está estimado em 8,8 bilhões (BRASIL, 2014).

O co-produto gerado ao final do processo de extração do caldo de cana é o bagaço de cana, constituído de celulose (38,8 a 45,5%) hemicelulose (22,7 a 27,0%), lignina (19,1 a 32,4%), cinzas (1,0 a 2,8%) e extrativos (4,6 a 9,1%) (ARRUDA., 2011; CANILHA et al., 2013; GOUVEIA et al., 2009). Este bagaço possui diversas aplicações, como forragem, na alimentação animal e na co-geração de energia elétrica (COSTA; BOCCHI, 2011). Outra aplicação do bagaço é na produção de etanol de segunda geração (COSTA; BOCCHI, 2011; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2014), porém, devido à sua natureza polissacarídica, este não é facilmente metabolizado por microrganismos, sendo necessária, na maioria das vezes, a hidrólise de seus componentes, através de pré-tratamento, como é demonstrado na Figura 4 (KUMAR et al., 2009).

Figura 4 - Fracionamento dos polímeros dos materiais lignocelulósicos pelo emprego de um pré-tratamento.



Fonte: Kumar et al., (2009).

O pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos pode ser realizado por processos biológicos, químicos, físico-químicos, físicos ou a combinação destes métodos (KUMAR et al., 2009a). Alguns exemplos podem ser visualizados na Figura 5. Dentre os métodos apresentados nesta Figura, pode-se destacar a hidrólise ácida diluída, que tem sido empregada com frequência em diversos trabalhos (SILVA et al., 2014; SILVA; FELIPE, 2006; SILVA et al., 2014).

Figura 5 - Exemplos de pré-tratamentos existentes de acordo com as suas categorias.

Físicos	Físico Químicos	Químicos	Biológico
• Fragmentação mecânica • Pirólise • Extrusão	• Explosão a vapor • AFEX (Ammonia Fiber Explosion) • Explosão de CO_2 • Água líquida quente • Deslignificação oxidativa • Oxidação úmida	• Ozonólise • Hidrólise ácida • Hidrólise alcalína • Deslignificação • Organosolv • Líquidos Iônicos	• Pré-tratamento fúngico : Fungos de prodridão branca, marrom e podridão mole. • Enzimático

Fonte: Baseado em Kumar et al., (2009).

2.2.1 Hidrólise ácida diluída

Este método proporciona alto rendimento na obtenção de açúcares a partir da fração hemicelulosica (KUMAR et al., 2009a; MOSIER et al., 2005), menor custo em relação à hidrólise ácida concentrada e menor formação de produtos tóxicos aos microrganismos, como o 5-hidroximetilfurfural e o furfural. Também reduz a corrosão nos tanques de hidrólise e tubulações (VAN WALSUM, 2001) e promove a remoção e a recuperação efetiva de grande parte dos açúcares existentes na fração hemicelulósica (CHANDEL et al., 2012; KUMAR et al., 2009a).

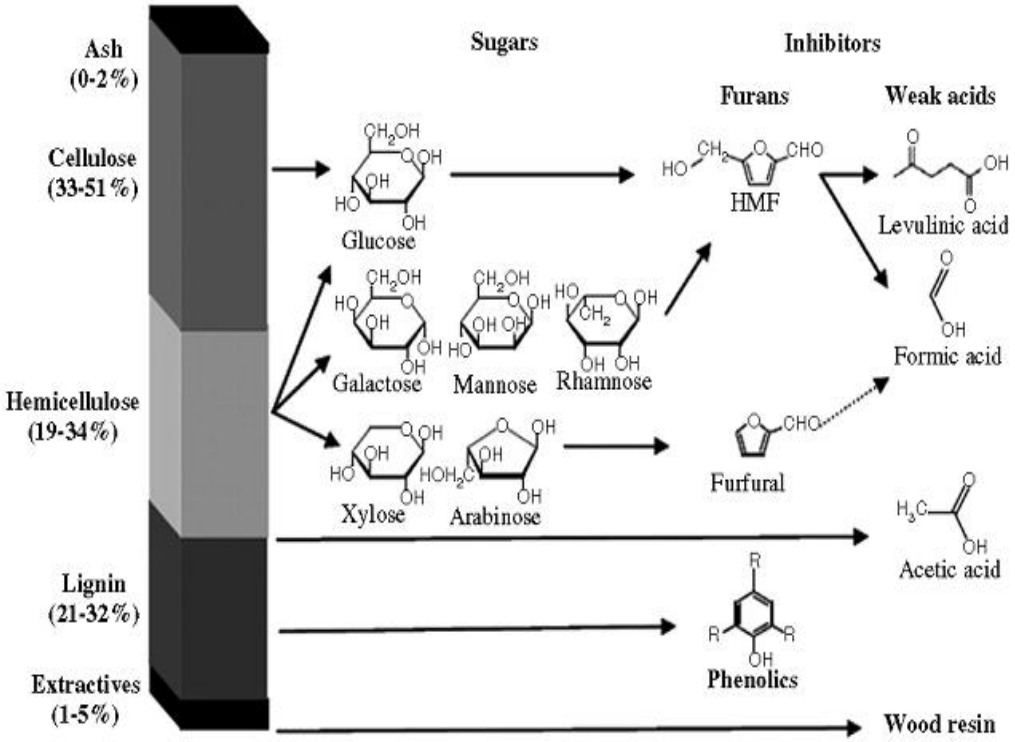
O pré-tratamento por hidrólise ácida diluída afeta principalmente a fração hemicelulósica, tornando-a solúvel, enquanto exerce um impacto mínimo na degradação da lignina (BINOD et al., 2010). O uso dessa técnica altera a estrutura da biomassa permitindo a recuperação dos açúcares da fração hemicelulósica. Esta tem sido utilizada em diversos estudos envolvendo uma variedade de biomassas agrícolas como bagaço de maçã (DALANHOL, 2014), palha de sorgo (SENE et al., 2011), palha de trigo (CANILHA et al., 2008), palha de arroz (ROBERTO et al., 1996), palha de cana de açúcar (PÉREZ, 2015) e bagaço de cana (CANILHA et al., 2010; DA SILVA et al., 2014; ARRUDA et al., 2011).

2.2.2 Compostos inibidores liberados durante a hidrólise ácida diluída

Durante o processo de fracionamento da hemicelulose por hidrólise ácida são liberados produtos de degradação, que ocorrem de acordo com a severidade do processo de hidrólise (LAL; SARMA, 2011; ZEFERINO, 2013). A quantidade de produtos inibidores formados durante o processo de pré-tratamento de um material lignocelulósico é variável, sendo observado que a sua formação depende da biomassa utilizada e das condições de pré-tratamento utilizadas no processo como a concentração do ácido, temperatura, o tempo e pressão (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

No caso da hemicelulose, a sua hidrólise libera os açúcares xilose, glicose, manose, galactose, ramnose e também o composto tóxico, ácido acético, enquanto que a celulose libera apenas glicose (Figura 6) (ALMEIDA et al., 2007). Sob a ação de temperatura e pressão elevadas, os açúcares continuam o processo de degradação, formando compostos inibidores como o furfural, que vem das pentoses, 5-hidroximetilfural, originados das hexoses e também os ácidos fórmico e levulínico, gerados na degradação dos furanos (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Os compostos fenólicos são gerados a partir da quebra parcial da estrutura da lignina. A Figura 6 (ALMEIDA et al., 2007) representa a principal via de formação dos compostos tóxicos (FENSKE; GRIFFIN; PENNER, 1998; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Figura 6 - Composição aproximada das frações dos materiais lignocelulósicos e compostos derivados da hidrolise.



Fonte: Almeida et al., (2007).

O ácido acético é o único composto tóxico, cuja liberação não pode ser evitada, visto que o mesmo pertence à matriz lignocelulósica (LAKSHMANASWAMY et al., 2011). Desta forma, o consumo de ácido acético presente no hidrolisado é uma característica interessante para processos de bio-destoxificação, onde se busca o rápido consumo de ácido, com baixo consumo dos demais açúcares (LAKSHMANASWAMY et al., 2011; SCHNEIDER, 1996; SHAW et al., 2015).

Os ácidos, na sua forma protonada, são lipossolúveis e podem difundir através da membrana plasmática. De acordo com a teoria do acumulo de ânion, a forma dissociada do ácido é impedida de atravessar a parede celular enquanto a forma protonada penetra na parece celular, até que um equilíbrio seja atingido. Desta forma, quando se tem um pH externo ácido, atinge-se uma maior concentração do ácido protonado no interior da célula, o ácido então libera o seu próton abaixando o pH intracelular. A presença do ácido acético também pode interferir na atividade de enzimas chaves do metabolismo dos

microrganismos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Em pesquisas com *C. guilliermondii*, realizada em meio semi-definido contendo diferentes concentrações de ácido acético, foi evidenciado que concentrações superiores a 3,0 g/L deste composto interferiram negativamente na bioconversão de xilose em xilitol, enquanto baixa concentração (1,0 g/L) favoreceu esta bioconversão, sendo que todo o ácido foi assimilado durante o processo (FELIPE et al., 1995). Já Silva et al., (2004) observaram que a toxicidade do ácido acético também depende da fase de crescimento em que é adicionado ao meio de fermentação, sendo que a adição deste no tempo 12h resultou maior inibição de consumo de xilose e crescimento celular do que nos tempos, inicial, 24 e 48h.

Existem diversos mecanismos propostos para explicar a toxicidade dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) como: a capacidade de inibir o ciclo glicolítico, causar dano na membrana plasmática e interferir no balanço redox de co-fatores (devido à alta demanda de NADH, necessária para reduzir estes compostos a suas formas alcoólicas, menos tóxicas). Por serem substâncias químicas muito reativas também apresentam capacidade de interagir com várias moléculas biológicas como ácidos nucléicos, proteínas e lipídios (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 1999).

O furfural foi capaz de reduzir a velocidade de crescimento específico e a produção de biomassa de *Candida guilliermondi*, e também a produtividade volumétrica em etanol por *Saccharomyces cerevisiae* (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). O 5-HMF apresenta efeitos inibitórios semelhantes aos do furfural, no entanto seu efeito tóxico foi considerado menor que o do furfural (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988), em parte por sua concentração no hidrolisado hemicelulósico ser menor, devido à baixa quantidade de hexoses na hemicelulose (MUSSATTO; ROBERTO; IN, 2004; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Kelly et al., (2008), ao estudarem a ação do furfural sobre o crescimento de *Candida guillliermondii*, observaram que concentrações entre 0,5 e 2,0 g/L reduziram as taxas de crescimento celular, devido ao aumento da fase *lag* de crescimento cuja duração variou de 0 a 15 horas, dependendo da concentração de furfural no meio de fermentação. Já para 5-Hidroximetilfurfural, Delgenes; Moletta; Navarro, (1996) observaram que as concentrações 1,0 3,0 e 5,0 g/L inibiram o crescimento celular com aumento da concentração deste composto para ambas leveduras avaliadas *Candida shehatae e Pichia stipitis.*

No caso dos compostos fenólicos, os quais possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, sua estrutura pode variar desde simples moléculas fenólicas até polímeros complexos de elevada massa molecular (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Estes compostos também se encontram nos hidrolisados lignocelulósicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Segundo Villa et al., (1998) concentrações destes compostos a partir de 0,1 g/L foram suficientes para reduzir drasticamente a capacidade de assimilar xilose pela levedura *Candida guilliermondii* durante fermentação em meio sintético. Por outro lado, Roberto et al., (1991a) verificaram que, para a levedura *Picha stipitis* CBS 5773, concentrações abaixo de 0,5 g/L de compostos fenólicos atuaram como fonte de carbono, favorecendo o crescimento celular, enquanto concentrações acima de 2,0 g/L inibiram totalmente o crescimento celular. A capacidade de leveduras de biodegradar compostos fenólicos e utilizá-los como fonte de carbono têm sido estudada há décadas, sendo que muitos destes estudos encontraram aplicações tecnológicas, como tratamento biológico de efluentes industriais, filtros biológicos ou biorremediação (BERGAUER et al., 2005; KRASTANOV; ALEXIEVA; YEMENDZHIEV, 2013). O mecanismo da toxicidade destes compostos está relacionado ao seu acúmulo na membrana plasmática causando perda de integridade, reduzindo a sua habilidade de agir como uma barreira seletiva e matriz enzimática. Consequentemente, tanto o crescimento celular quanto a capacidade de assimilar açúcares é comprometida (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Dentre os compostos tóxicos presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, aqueles resultantes da degradação da lignina (fenólicos) são consideramos mais tóxicos aos microrganismos do que os furanos furfural e 5-HMF, mesmo quando em concentrações menores (BÜCHERT; PULS; POUTANEN, 1989; LARSSON et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Desta forma, com o objetivo de melhorar a fermentabilidade dos açúcares encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos, diferentes estratégias podem ser utilizadas a fim de reduzir a concentração dos compostos tóxicos (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011).

2.2.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Três tipos de técnicas de destoxificação podem ser destacados, sendo estas físicas, químicas ou biológicas (CHANDEL; SILVA; SINGH, 2011; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a). Os métodos físicos são aqueles pelos quais a diminuição da concentração dos compostos inibidores presentes no meio é realizada pela simples remoção destes compostos. Os métodos biológicos de destoxificação de hidrolisados são aqueles que se baseiam no emprego de agentes biológicos, como certas enzimas e determinados microrganismos, capazes de promover modificações na estrutura química dos compostos inibidores. Já os métodos químicos, baseiam-se em processos de alteração do pH e na adição de substâncias redutoras, que podem modificar a estrutura química dos compostos inibidores, alterando o grau de toxicidade (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

A combinação de bases e ácidos tem sido empregada no ajuste de pH do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, sendo um tratamento de baixo custo, que produz bons resultados, principalmente quando realizado com bases e sais de cálcio ($Ca(OH)_2$ e CaO (ROBERTO et al., 1991b). Pesquisas realizadas com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana demonstra que a combinação da alteração de pH do hidrolisado, associada à adsorção em carvão ativo resulta na melhoria da fermentabilidade do hidrolisado (ALVES et al., 1998; ARRUDA, 2011; CANILHA et al., 2010; CHAUD, 2010; MUSSATO; ROBERTO, 2002). A combinação de ambos os métodos resulta em grande remoção de compostos fenólicos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, como verificado por Carvalho et al. (2005) (79,9%) e Arruda (2011) (77%). Com relação ao ácido acético a combinação de alteração de pH com carvão ativado resultou uma remoção de 15,66 e 44,2% na pesquisa realizada por Arruda (2011) e Marton (2002), respectivamente. Quanto aos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, Arruda (2011) verificou a remoção de 65,1 e 44,0% com carvão ativado, enquanto Chaud (2010) verificou a remoção de 67,57 e 65,81% de 5-hidroximetilfurfural e furfural, respectivamente.

O carvão ativado é um dos materiais adsorventes mais usados na indústria, tendo sido utilizado para tratamento de poluentes atmosféricos e na adsorção de compostos orgânicos. Também é utilizado no tratamento de água residencial, de efluentes, na remoção de pesticidas e metais pesados (SCHNEIDER, 2008). O uso de carvão ativado depende,

essencialmente, de duas características: superfície de contato e diâmetro de seus poros (GREENBANK; SPOTTS, 1995).

O mais interessante do carvão ativado talvez seja que quase todos os compostos com alto teor de carbono podem ser utilizados para sua obtenção como: ossos de animais, serragem, algas, turfa, casca de coco, madeiras, caroço de frutas, carvões minerais e resíduos de petróleo, dentre outros. A escolha do material a ser ativado deve levar em conta o grau de pureza, preço e potencial de ativação (SCHNEIDER, 2008).

2.3 UTILIZAÇÃO MICROBIANA DE HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS

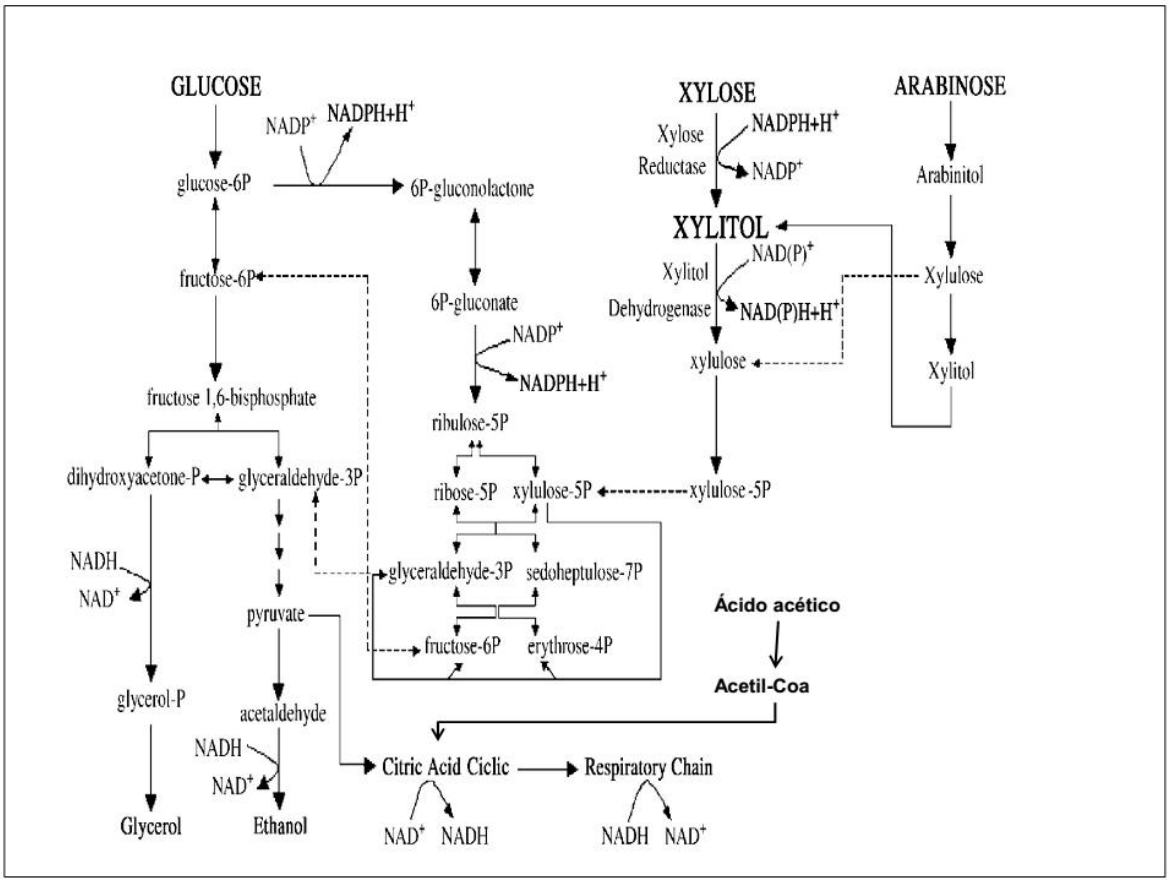
Para o uso econômico dos materiais lignocelulósicos, é importante a utilização eficiente de todos os açúcares derivados desta matéria prima. Para tanto o uso efetivo do açúcar xilose e outras pentoses, é de grande importância na sustentabilidade de todo processo (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Sabe-se que a glicose é assimilada pela via glicolítica (Figura 7), uma via oxidativa (LEE, 2013) e que cultivos de leveduras em diferentes hidrolisados demonstram que esta hexose é rapidamente assimilada após poucas horas de cultivo (APOLINARIO, 2013; CHAUD, 2014; SILVA et al., 2014; DALANHOL, 2014; ARRUDA et al., 2011; PÉREZ, 2015). O rápido consumo desta hexose em hidrolisado deve-se fato de esta ser fonte de carbono preferencial para as leveduras no início do seu crescimento celular (SILVA et al., 2014a; YAHASHI et al., 1996). A glicose também pode ser assimilada através da via das pentoses fosfato, que é uma via alternativa para assimilação desta hexose. Quando assimilada por esta via, sua principal função deixa de ser a produção de energia em forma de ATP e passa a ser a produção de NAPDH, pentoses e tetroses, utilizadas em reações de biossíntese de nucleosídeos e aminoácidos (LEE, 2013).

Na via das pentoses fosfato a Glicose 6-P é convertida a ribulose 5-P através de duas reações de desidrogenação (rendendo 2 NADPH) e uma de descarboxilização. A enzima que inicia esta via (glicose-6-P desidrogenase) é uma enzima regulada em função dos co-fatores $NADP^+$ e NADPH. Sua atividade aumenta quando há maior concentração de $NADP^+$ e diminui quando há predominância de NADPH (LEE, 2013). Em seguida reações de isomerização e epimerização envolvendo a ribulose 5-P levam à formação de

ribose 5-P e xilulose 5-P, respectivamente. A ribose 5-P pode ser então utilizada em reações de biossíntese. Caso não sejam utilizadas na biossíntese, essas pentoses sofrem uma série de conversões, originando açúcares fosforilados com numero de carbonos variando entre 3 e 7. Estas conversões são catalisadas por duas enzimas, a transcetolase, que transfere grupos de 2 carbonos e a transaldolase que transfere grupos de 3 carbonos. Dentre os compostos intermediários estão a frutose 6-P e o gliceraldeido 3-P que são intermediários da via glicolítica e podem ser utilizados pela via PPP (Figura 7). Todas as reações da etapa não-oxidativa são reversíveis, permitindo livre interconversão dos diferentes açúcares (LEE, 2013; MARZZOCO; TORRES, 2007).

Figura 7 - Esquema do metabolismo de glicose, xilose e arabinose por *Candida guilliermondii*.



Fonte: Modificado de Silva; Felipe, (2006)

A via das pentoses fosfato é capaz de suprir diferentes necessidades metabólicas, se há uma demanda excessiva por pentoses, as enzimas transcetolase e transaldolase podem inverter o ciclo para formar pentoses (LEE, 2013). No entanto se houver um excesso de pentose, por exemplo, a xilose, comumente encontrada em hidrolisados hemicelulósicos, a assimilação ocorre pelo processo de óxido-redução. Nestas reações a xilose é reduzida a

xilitol pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21), em seguida o xilitol é oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.9) e por último a xilulose formada é fosforilada a xilulose-5-P (GONG et al., 1983; SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998). Diversos trabalhos relatam a assimilação de xilose por leveduras quando cultivadas em hidrolisado hemicelulósico (ALVES et al., 1998; APOLINARIO, 2014; DALANHOL, 2014; PÉREZ, 2015; RODRIGUES et al., 2010; SILVA; FELIPE, 2006), tendo como resultado a produção de xilitol e/ou etanol.

Já a assimilação de arabinose por leveduras, embora seja semelhante ao processo de assimilação de xilose (Figura 7), é pouco reportada em leveduras (SILVA et al., 2014a), provavelmente devido à diferença de transportadores (VERHO et al., 2004). Estudos demonstram que em meios de cultivo contendo diversos açúcares, como é caso do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, esta pentose geralmente é consumida apenas após esgotamento das outras fontes de carbono (FONSECA et al., 2007; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). É sabido no entanto que as leveduras podem ser alteradas geneticamente para o favorecimento do consumo de arabinose (BECKER; BOLES, 2003; WIEDEMANN; BOLES, 2008).

No caso de outros compostos, diferentes dos carboidratos, como o ácido acético presente nos hidrolisados hemicelulósicos, a assimilação ocorre com ação da enzima Acetil-CoA sintetase, o Acetil-CoA formado pode então ser assimilado pelo ciclo de Krebs e ser utilizado pelas leveduras como fonte de carbono (FELIPE et al., 1995; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

2.4 ECOSSISTEMAS DO CONTINENTE ANTÁRTICO

A temperatura é um parâmetro determinante na sobrevivência de um organismo em seu ambiente, podendo agir de forma indireta, influenciando no estado físico da água (liquida, sólida ou gasosa) ou diretamente, afetando a velocidade das reações, aumentando o grau de cristalinidade e causando rompimento das células (MARGESIN; MITEVA, 2011).

No planeta terra, temperaturas baixas são predominantes, 85% da biosfera está exposta constantemente a temperaturas abaixo de 5°C. "Habitats" com baixa temperatura são encontrados desde o Ártico até a Antártica, em altas cadeias de montanhas e oceanos. Sendo que as regiões oceânicas, que cobrem 71% da biosfera terrestre, correspondem à maior influência para as baixas temperaturas uma vez que 90% de seu volume esta abaixo dos 5°C (MARGESIN; MITEVA, 2011).

A Antártica é um continente que ocupa 14 milhões de km² e 99% de sua superfície está coberta de gelo. Este continente é considerado um "habitat" extremo devido à baixa temperatura (até -60 °C) e pequena umidade (1 a 10%), ventos fortes, alta irradiação solar, frequentes ciclos de congelamento e descongelamento, pequena precipitação, poucos nutrientes disponíveis, alta salinidade, pH alcalino e longos períodos na ausência de luz solar (MARGESIN; MITEVA, 2011; ONOFRI et al., 2007; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Tendo em vista as características do meio ambiente antártico, seria natural assumir que estas representariam uma grande barreira para a existência de vida microbiana local (DUARTE et al., 2013). No entanto, o que se observa é justamente o contrário, a Antártica hospeda diversas formas de vida entre elas, bactérias, leveduras, fungos, liquens, pequenos invertebrados, aves e mamíferos (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

2.5 LEVEDURAS DA ANTÁRTICA

Os microrganismos capazes de se adaptar a ambientes de baixas temperaturas são denominados psicrófilos (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009), e podem ser divididos em duas classes: psicrófilos estritos ou psicrófilos facultativos (BUZZINI et al., 2012).

Os organismos psicrófilos estritos se diferenciam dos facultativos, baseado em sua temperatura cardeal. Psicrófilos estritos possuem taxa de crescimento ótimo em torno de 15 °C, uma temperatura máxima de 20 °C e mínima menor ou igual a 0 °C. Tais organismos são predominantes em regiões de temperaturas constantemente baixas como montanhas, oceanos profundos e calotas polares. Já os organismos psicrófilos facultativos apresentam uma faixa de temperatura de crescimento ótima mais alta, em torno de 20 a 30°C e capacidade de crescer a temperatura mínima de 0°C, sendo predominantemente encontradas em "habitats" onde as temperaturas baixas são sazonais ou em rochas e solos árticos, onde a variação de temperatura é maior (BUZZINI et al., 2012; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

O processo de adaptação a baixas temperaturas requer uma complicada gama de modificações estruturais e funcionais nos microrganismos. Temperaturas menores ou iguais a 0 °C influenciam os organismos de diversas formas: reduzindo a taxa de crescimento celular, aumentando a viscosidade do meio, reduzindo a fluidez da membrana celular, alterando a conformação das proteínas e diminuindo a disponibilidade dos nutrientes (BUZZINI et al., 2012).

Microrganismos expostos a ambientes frios sejam eles permanentes ou sazonais, desenvolvem uma série de adaptações chaves para a sobrevivência neste ambiente (BUZZINI et al., 2012; MARGESIN; MITEVA, 2011). Dentre estas pode-se citar: (1) Aumento na fluidez da membrana em baixas temperaturas pela alteração na composição química dos ácidos graxos; (2) Síntese de proteínas protetoras; (3) Síntese de macromoléculas crio-protetoras; (4) Alterações moleculares e metabólicas; (5) Redução da taxa de crescimento e (6) Síntese de enzimas ativas a baixa temperatura (BUZZINI et al., 2012).

Turkiewicz et al. (2003) sugerem que as leveduras possam ser melhor adaptadas a baixas temperaturas do que as bactérias. As leveduras são um grupo de microrganismos

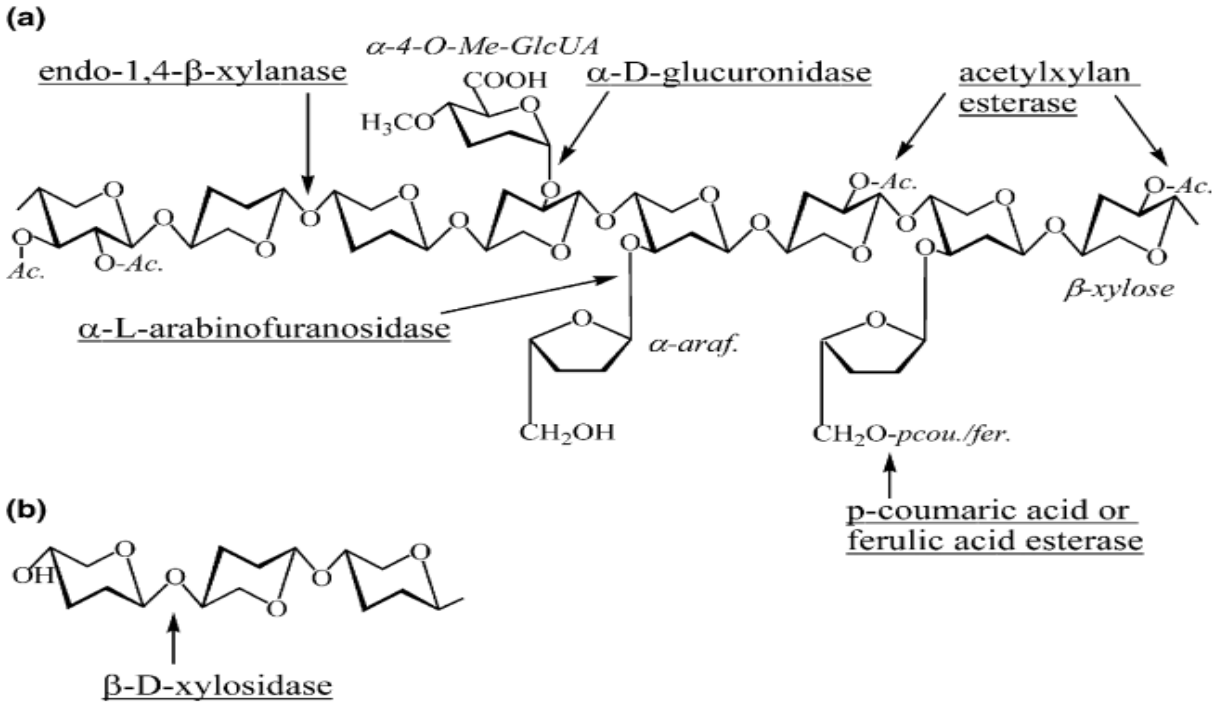
eucarióticos de grande versatilidade nutricional com capacidade de sobreviver em uma variada gama de "habitats" como oceanos, águas poluídas e ambientes desidratados (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

A capacidade de utilizar as leveduras da Antártica pode ser considerada um dos desafios do século 21 (BUZZINI et al., 2012). Estas leveduras atraem a atenção de indústrias e pesquisadores pelo grande potencial biotecnológico na obtenção produtos com características diferenciadas, resultantes de sua distinta habilidade de crescer e metabolizar compostos a baixas temperaturas (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009).

Tendo em mente esse potencial, recentemente, (APOLINARIO, 2014) estudou o comportamento de leveduras xilanolíticas da Antártica, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Foi observado que algumas leveduras se mantiveram viáveis ao final de 72h de cultivo, sendo constatada a produção de etanol, em pequena concentração, apenas por uma das leveduras (*Cryptococcus adeliensis* L95) enquanto o xilitol não foi produzido. Também foi constatado o consumo de xilose pelas leveduras *Cryptococcus.adeliensis* (L95), *Guehomyces pullulans* (L109), enquanto que para as leveduras *Cryptococcus laurentii* (L62) e *Candida davisiana* (L101 e L107) foi observado um aumento na concentração de xilose.

As leveduras xilanolíticas são classificadas desta forma quando apresentam a capacidade de produzir enzimas xilanase. Estas enzimas são capazes de hidrolisar a xilana, principal constituinte da hemicelulose (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). No entanto para a completa hidrólise da xilana é requerida uma grande variedade de enzimas atuando em conjunto, como a β-1,4-endoxilanase (EC 3.2.1.8), responsável por clivar o suporte principal da xilana; a β-xilosidase (EC 3.2.1.37), que cliva monômeros de xilose não redutores. As enzimas α-L-arabinofuranosidase (EC3.2.1.55), α-glucuronidases (EC 3.2.1.139), acetil xilanoácido esterases (EC 3.1.1.72), esterases de ácido ferúlico (EC 3.1.1.73) e esterases do ácido p-cumárico (EC 3.1.1) são responsaveis por catalisar a remoção dos grupos laterais da xilana, como pode ser visualizado na Figura 8 (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). Estas enzimas possuem uma grande importância comercial. Podem ser utilizadas na indústria alimentícia para clarificação de sucos, na indústria de papel, no processo de branqueamento da polpa Kraft e no aproveitamento de biomassa lignocelulósica na indústria de bicombustíveis, entre outros (BEG et al., 2001; BIELY; PUCHART, 2006; LARA et al., 2014).

Figura 8 - (a) Estrutura da xilana e os sítios de ataque das enzimas xilanolíticas. (a) Cadeia principal da xilana e seus grupos substituintes, (b) xilo-oligossacarídeo e o sítio de ação da β-xilosidase.



Fonte: Collins et al., (2005**).**

2.5.1 Gênero *Cryptococcus*

Cryptococcus é um gênero de fungos e representa o grupo de leveduras mais abundante encontrado na Antártica (SATYANARAYANA; KUNZE, 2009). As células deste gênero podem ser esferoidais, ovóides ou alongadas. A reprodução ocorre por brotamento polar ou multilateral; pseudo-hifas e hifas também podem ser encontradas. Quanto cultivadas em meio sólido podem apresentar pigmentação branca, creme, vermelha, amarela ou marrom. A maioria das espécies é capaz de sintetizar amido. Não apresentam capacidade fermentativa (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011).

Cryptococcus laurentii é uma levedura não patogênica, embora já tenha sido relacionada a alguns raros casos de infecção pulmonar e cutânea em humanos. Alguns estudos já foram realizados envolvendo estas leveduras como: Produção de enzima β-xilosidase (DUARTE et al., 2013), enzima fitase (PAVLOVA et al., 2008),

exopolissacarídeos (PAVLOVA et al., 2011; RUSINOVA-VIDEVA; PAVLOVA; GEORGIEVA, 2011) e biodegradação de atrazina, um herbicida utilizado na agricultura (ABIGAIL; SALAM; DAS, 2013).

Cryptococcus adeliensis é uma espécie recém descrita na literatura e foi isolada pela primeira vez de algas no continente Antártico. Casos de infecção por esta levedura já foram identificados, como o caso de meningite, reportado em paciente com leucemia na Alemanha (TINTELNOT; LOSERT, 2005). Desde sua descoberta diversas cepas desta espécie foram encontradas em humanos e em fezes de animais (VELÁZQUEZ et al., 2006). A maioria dos estudos encontrados está relacionada à produção de xilanase (DUARTE et al., 2013; SATYANARAYANA; KUNZE, 2009; SCORZETTI et al., 2000) e protease (CHAUD, 2014; DUARTE et al., 2013), porém, recentemente foi verificado que esta levedura é capaz de produzir etanol em caldo Sabouraud (CHAUD, 2014) e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (APOLINARIO, 2014).

2.5.2 Gênero *Cândida*

Cândida é o gênero de levedura mais comumente associado a infecções fúngicas. Diversas espécies deste gênero são inofensivas; no entanto quando os pacientes apresentam imunodeficiência, até mesmo as espécies inofensivas podem causar infecção (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). As células podem ser globosas, elipsoidais, cilíndricas, alongadas, ogivais ou triangulares. A reprodução ocorre por brotamento holoblástico. Pseudo-hifas e hifas-septadas podem ser encontradas. Quando cultivadas em meio sólido as colônias são geralmente grandes, arredondas e de pigmentação branca ou creme. A capacidade de fermentar é encontrada em algumas espécies (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Leveduras pertencentes a este grupo correspondem ao segundo gênero mais comumente encontrado na Antártica, atrás somente dos *Cryptococcus.* Diversas espécies já foram encontradas neste "habitat" como *Candida nivalis, Candida gelida, Candida frigida, Candida davisiana, Candida humicola, Candida famata, Candida ingeniosa, Candida auriculariae, Candida oleophila* entre outras. Para *Candida davisiana*, a maioria das pesquisas encontradas estão relacionadas à produção de enzimas como a xilanase (DUARTE et al., 2013; ZAKY et al., 2014), manganês

peroxidase (YANG et al., 2013), lipase (YALÇIN; ÇORBACI; UÇAR, 2014) e celulase (VASILEVA-TONKOVA et al., 2014).

2.5.3 Gênero *Guehomyces*

Segundo Kurtzman; Fell; Boekhout, (2011), as células deste gênero de leveduras são ovóides ou levemente cilíndricas. Quando cultivadas em Agar Sabouraud, a 20-22 °C, a colônia adquire inicialmente uma coloração creme, mas com o envelhecimento da cultura a coloração fica alaranjada. A única espécie aceita neste gênero é a *Guehomyces pullulans*, que não é considerada perigosa para os humanos pela inabilidade de crescer a 37 °C, temperatura do corpo humano, (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Anteriormente esta espécie era conhecida como *Trichosporon pullulans*, até ser atribuída ao gênero *Guehomyces* por FELL, (2004) comparado por análises sequenciais de nucleotídeos. Esta espécie tem sido estudada para obtenção de β-galactosidade (SONG et al., 2010a, 2010b; XU et al., 2012), protease e xilanase (DUARTE et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a tolerância de leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, para a utilização de pentoses e características que possam apresentar aplicações biotecnológicas, como consumo de xilose, arabinose, ácido acético e compostos fenólicos, produção de xilitol e pigmentos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as leveduras xilanolíticas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em diferentes concentrações, bem como em meio semi-definido (controle), quanto à tolerância ao hidrolisado e características que possam apresentar aplicações biotecnológicas, como consumo de xilose, arabinose, ácido acético e compostos fenólicos, produção de xilitol e pigmentos.

- Selecionar a levedura que apresentou melhor desempenho quanto ao consumo de xilose e produção de xilitol e avaliar a influência da suplementação nutricional do meio com Extrato de farelo de arroz, Cloreto de cálcio e Sulfato de amônio, sobre o consumo de xilose e produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar utilizando planejamento estatístico (DCCR)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DE CANA

O bagaço de cana utilizado no presente trabalho foi cedido pela Usina Pederneiras, localizada na cidade Tietê/SP. Com a finalidade de armazenar o bagaço de cana e evitar sua deterioração, o mesmo foi submetido à secagem ao ar livre, até umidade menor ou igual a 10%. O teor de umidade inicial do bagaço proveniente da usina foi de aproximadamente 40%.

4.1.1 Hidrólise ácida

A caracterização química do bagaço de cana foi realizada da seguinte forma: 300 mg de amostra de bagaço de cana seco foram pesados em tubos de ensaio onde foram adicionados 3 mL de H_2SO_4 72% (m/m). O experimento foi conduzido em banho-maria a 30 °C, por uma hora. Durante este período de tempo a amostra foi homogeneizada a cada 5 minutos com auxílio de bastão de vidro. Após uma hora a amostra foi transferida, cuidadosamente, para frascos Erlenmeyer de 250 mL e acrescida de 79 mL de água destilada, de modo que o ácido atingisse concentração final de 3%. Os frascos foram levados a autoclave a 121 °C durante uma hora. O material resultante foi resfriado e em seguida filtrado, em filtro de vidro de placa porosa, para análise de lignina insolúvel. O volume do líquido filtrado foi ajustado para 100 mL com água destilada (FERRAZ, 2000).

4.1.2 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose e lignina

Uma alíquota da fração líquida que foi obtida da hidrólise ácida do bagaço foi filtrada em cartucho Sep-Pak e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para obter a concentração de glicose, xilose, celobiose e arabinose, assim como de ácido acético, que foi utilizado no cálculo da porcentagem de celulose e hemicelulose presentes na amostra pelas equações 1 e 2 (FERRAZ, 2000).

$$\%\,Celulose = (\%Gli\ x\ 0{,}9 + \%Cel\ x\ 0{,}95) \qquad (1)$$

$$\%\,Hemicelulose = (\ \%Xil\ x\ 0{,}88 + \%Ara\ x0{,}88 + \%Aa\ x\ 0{,}72) \qquad (2)$$

Onde: Gli =Glicose; Xil = xilose; Ara = arabinose; Cel = Celobiose; Aa = ácido acético.

4.2 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

4.2.1 Hidrólise ácida diluída

O bagaço de cana, previamente seco, foi submetido à hidrólise ácida em reator de aço inox, localizado no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, com o volume total de 50 litros de capacidade e volume útil de 40 litros, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por sobre o próprio eixo. O reator foi carregado com bagaço de cana e solução de ácido sulfúrico, empregando-se as seguintes condições: 100 mg de ácido sulfúrico (98%) para 1 g de matéria seca em uma proporção entre massa seca de bagaço e volume de solução ácida de 1:10, temperatura de 121 °C durante 20 minutos de agitação por tombamento, baseado em metodologia proposta por (PESSOA JR.; MANCILHA; SATO, 1997), em reator de menor escala. Ao final o reator foi desligado e esperou-se 24h para o resfriamento e retirada do hidrolisado hemicelulósico.

4.2.2 Concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Posteriormente o hidrolisado foi submetido a um processo de concentração a vácuo em um concentrador de aço inox à temperatura de 70 °C ±5 °C, com capacidade de 30 L, com o objetivo de atingir uma concentração de aproximadamente 54 g/L de Xilose.

4.2.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foi destoxificado com a finalidade de reduzir a concentração dos compostos inibidores, formados ou liberados durante a hidrólise ácida. O tratamento consistiu em elevar o pH do hidrolisado para 7,0 utilizando CaO comercial, seguido de uma redução para 2,5 com H_3PO_4. O hidrolisado foi então submetido à adsorção em carvão vegetal ativado a 1% (m/v). Esta mistura foi mantida sob agitação de 100 RPM, a 60 °C, por 30 minutos, em frascos Elemeyer. A cada alteração de pH e adição de carvão o hidrolisado foi filtrado a vácuo com papel filtro (MARTON et al., 2006). Ao final do processo o pH foi ajustado para 6,0 com hidróxido de sódio. O hidrolisado foi então autoclavado a 111 °C por 15 minutos e armazenado a 4 °C por no máximo 24h.

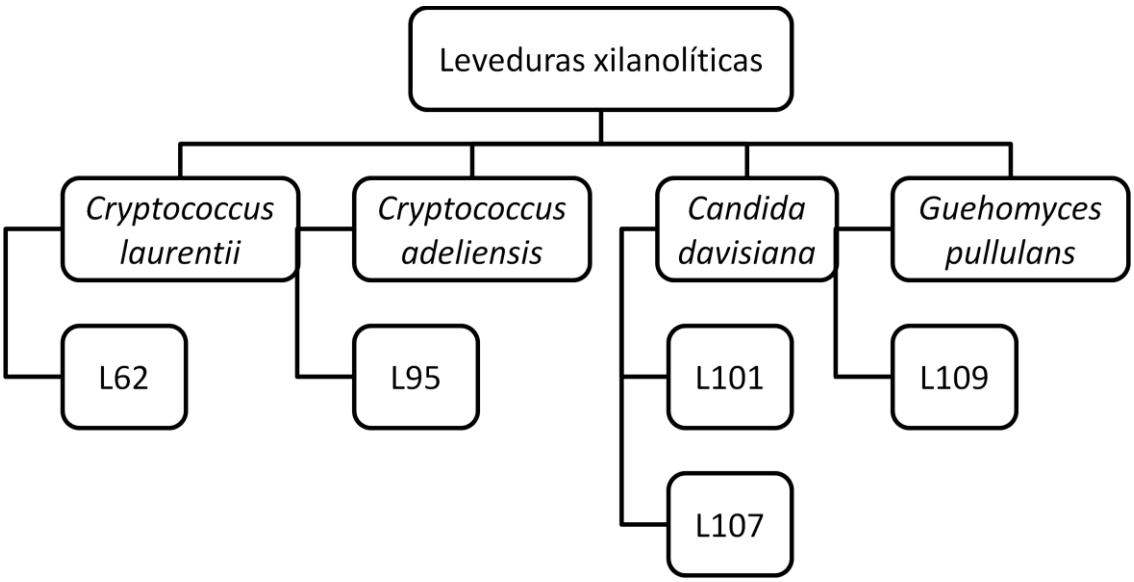
4.2.4 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana

O hidrolisado foi caracterizado quanto ao pH, concentração dos açúcares xilose, glicose e arabinose e à concentração dos compostos tóxicos furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e fenólicos totais.

4.3 MICRORGANISMOS

Neste trabalho foram utilizadas leveduras xilanolíticas, obtidas em colaboração com o projeto intitulado "Biotecnologia marinha e Antártica: enzimas microbianas e suas aplicações", com suporte da FAPESP (Processo: 13/19486-0), coordenado pela professora Drª Lara Durães Sette (Instituto de Biociências (IB), Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil. As linhagens de leveduras *Candida davisiana* L101 e L107 foram isoladas de pedras com Liquens, as leveduras *Guehomyces pullulans* L109 e *Cryptococcus adeliensis* L95, de estrela do mar e a levedura *Cryptococcus larentii* L62 foi isolada de ouriço do mar (DUARTE et al., 2013). As cinco leveduras, representantes de três diferentes gêneros, (Figura 9), foram selecionadas em função da capacidade de se desenvolverem em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (APOLINARIO, 2014).

Figura 9 - Leveduras xilanolíticas da Antártica utilizadas no presente trabalho.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.1 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo para a realização dos cultivos foi realizando a partir de células preservadas por ultracongelamento em criotubos (1mL) com solução de glicerol 10% (v/v) a -80 °C ± 2. A cada cultivo os criotubos (um para cada levedura) foram retirados do ultrafreezer e transferidos para um freezer por 30 minutos, em seguida foram transferidos para geladeira por mais 30 minutos e por fim foram deixados em temperatura ambiente até o total descongelamento. O conteúdo dos criotubos foi transferido assepticamente para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio caldo Sabouraud e incubado a 200 RPM, 30 °C por 24h. As células recém ativadas foram semeadas em agar Sabouraud inclinado e mantidos a 30 °C por 48h. Alçadas desta cultura recém repicada foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio contendo xilose (30 g/L) e glicose (5 g/L) e suplementado com sulfato de amônio (2 g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g/L) e solução de extrato de farelo de arroz (20 g/L). Os frascos foram inoculados e incubados em shaker a 30 °C, 200 RPM, por 24 horas. Após este período as leveduras foram recuperadas por centrifugação a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division), lavadas com água destilada esterilizada, sob nova centrifugação para o descarte do sobrenadante e utilização das células para o preparo de uma suspensão com água esterilizada, a qual foi empregada como inóculo para as etapas posteriores. Em todos os experimentos a concentração inicial de células nos frascos foi de 10^7cél/ mL, em média.

Quanto ao preparo das soluções, a de sulfato de amônio e de cloreto de cálcio dihidratado foram preparadas separadamente nas concentrações de 250 e 50 g/L, respectivamente, e esterilizadas a 121 °C por 20 minutos. Para a utilização do extrato de farelo de arroz como nutriente, foi empregado 200 g de farelo para um volume de 1L de água destilada, o qual foi autoclavado por 15 minutos a 111 °C. Após o resfriamento esta suspensão foi centrifugada por 30 minutos em condições assépticas a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division). A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e conservada em geladeira até a sua utilização, num prazo máximo de uma semana após o seu preparo (FELIPE et al., 1997).

4.3.2 Avaliação prévia do desempenho das leveduras xilanolíticas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em diferentes concentrações

Os experimentos foram realizados em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar concentrado e destoxificado (H-100) e em diferentes concentrações de hidrolisado, obtidas a partir da diluição do hidrolisado H-100 com água destilada esterilizada, de forma a se obter hidrolisados diluídos nas proporções 25% (H-75), 50% (H-50) e 75% (H-25) de água destilada. Também foram feitos cultivos em meio semi-definido contendo glicose e xilose em concentração semelhantes ao do hidrolisado 100%. Tanto os hidrolisados quanto o meio semi-definido foram suplementados com os mesmos nutrientes empregados no item 4.3.1, com exceção de xilose e glicose, as quais foram adicionadas somente no meio semi-definido

Ao longo do cultivo, realizado em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio em triplicata, sob agitação de 200 RPM a 30 °C, foram obtidas amostras correspondentes ao volume de 50 mL de cada frasco, no tempo inicial e 48h de incubação. Estas foram avaliadas quanto à concentração, pigmentação e viabilidade celular e, após centrifugação a 2000x g por 15 min, o sobrenadante foi utilizado para determinação do pH, consumo de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, compostos fenólicos totais e formação de bioprodutos, xilitol, glicerol e etanol.

4.3.3 Avaliação da influência da suplementação nutricional com extrato de farelo de arroz, cloreto de cálcio e sulfato de amônio sobre o consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura *Guehomyces pullulans*

Considerando que a levedura L109 demonstrou melhor desempenho quanto ao consumo de xilose e maior produção de xilitol do que as demais leveduras, em hidrolisado diluído com 25% de água destilada, esta foi utilizada para avaliar a influência da suplementação nutricional deste hidrolisado sobre o consumo de xilose e produção de xilitol, utilizando planejamento DCCR.

Um planejamento experimental com três variáveis independentes foi realizado empregando a levedura *Guehomyces pullulans* L109, selecionada do cultivo realizado em

hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, visando avaliar o impacto da variação de nutrientes sobre o consumo de xilose e produção de xilitol e à otimização da produção de xilitol.

As variáveis avaliadas foram: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de farelo de arroz (E.F.A), conforme a Tabela 1. A matriz do delineamento composto central rotacional completo (DCCR) está apresentada na Tabela 2 (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Tabela 1 - Codificação dos níveis para as variáveis $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e solução de Extrato de farelo de arroz (E.F.A) utilizado no planejamento estatístico.

Variáveis	**Níveis**				
	-1,68	**-1**	**0**	**1**	**1,68**
X1 = $CaCl_2$ (g/L)	0,039	0,08	0,14	0,2	0,24
X2 = $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	0,114	1,1	2,55	4	4,99
X3 = E.F.A (g/L)	6,5	15	27,5	40	48,5

E.F.A =Extrato de farelo de arroz.

Tabela 2 - Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central (DCCR), visando avaliar o efeito da suplementação de $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de farelo de arroz (E.F.A) sobre o consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109).

Ensaios	**Níveis reais**		
	X1 - $CaCl_2$	**X2 - $(NH_4)_2SO_4$**	**X3 - E.F.A**
1	1	1	1
2	-1	1	1
3	1	-1	1
4	-1	-1	1
5	1	1	-1
6	-1	1	-1
7	1	-1	-1
8	-1	-1	-1
9	1,68	0	0
10	-1,68	0	0
11	0	1,68	0
12	0	-1,68	0
13	0	0	1,68
14	0	0	-1,68
15*	0	0	0
16*	0	0	0
17*	0	0	0
18*	0	0	0

* Ponto central, E.F.A =Extrato de farelo de arroz.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade do bagaço de cana foi determinado por meio de secagem de amostra em balança com infravermelho, a 105 °C, até massa constante. O teor de umidade foi determinado pela diferença de massa obtida antes e após o aquecimento, calculada pela balança.

4.4.2 Determinação dos compostos fenólicos totais do hidrolisado hemicelulósico

A concentração dos compostos fenólicos totais foi determinada pelo método descrito por Simões; Petrovick, (2003). Uma alíquota de 1 mL do hidrolisado obtido foi diluído em água destilada na proporção 1:10 em balão volumétrico. Em seguida 50µl desta diluição foram pipetados para um tubo de ensaio contendo 450µl de água destilada. No mesmo tubo foram adicionados 500µl de reagente Folin Ciocalteau 50% e Carbonato de sódio 20%. Esta mistura foi agitada em vortex por 5 segundos e após 40 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro UV/visível, a 720 nm, utilizando-se água destilada contendo folin e carbonato de sódio como referência. A concentração da lignina solúvel foi calculada pela Equação 3.

$$Concentração\ \left(\frac{mg}{mL}\right) = [(0{,}0472 * Abs) + 0{,}0003] * Dil \qquad (3)$$

Em que: Abs = Absorbância da solução a 720nm; Dil = Diluição da amostra em balão volumétrico.

4.4.3 Remoção de extrativos

A composição química do bagaço de cana foi determinada após o processo de remoção de extrativos com etanol 95%. Aproximadamente 3 g de amostra cominuída a 25 mesh sofreram o processo de extração por um período de 6 h, em extrator Soxhlet. Após a

remoção dos extrativos, as amostras extraídas foram hidrolisadas com ácido sulfúrico 72% para posterior caracterização de seus componentes (FERRAZ, 2000).

4.4.4 Determinação de cinzas

A biomassa livre de extrativos foi pesada em triplicata (0,500 g em base seca) em cadinhos previamente tarados. Os cadinhos com a amostra foram levados a mufla a 575 ^{o}C por 24h. Após resfriamento em dessecador, os cadinhos foram novamente pesados e a massa de cinzas totais determinada utilizando-se a equação 4.

$$\%Cinzas = \left(\frac{Mt - Mc}{Ma}\right) * 100 \quad (4)$$

Onde: Mt = Massa do cadinho com as cinzas; Mc = Massa do cadinho; Ma = massa seca da amostra.

4.4.5 Teor de lignina insolúvel

A lignina, retida no filtro de placa porosa, foi lavada com aproximadamente 100 mL de água destilada e secada em estufa a 105°C, até atingir massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel presente na amostra foi obtida de acordo com a equação 5.

$$\%\ de\ Lignina\ insolúvel = \left(\frac{Ft - F}{Ai}\right) \times 100 \quad (5)$$

Onde Ft = massa do filtro com lignina insolúvel (g); F = massa do filtro (g); Ai = massa seca da amostra inicial (g).

4.4.6 Teor da lignina solúvel

Uma alíquota que foi obtida da hidrólise foi utilizada para análise de lignina solúvel. A quantidade de lignina solúvel na amostra foi obtida de 100 µL da amostra, diluídos (2:10) com ácido sulfúrico 3% e a solução foi analisada em espectrofotômetro a 205 nm. Os cálculos foram realizados de acordo com a equação 6.

$$\%Lig\ sol\acute{u}vel = \left(\frac{Abs\ x\ D\ x\ V}{\varepsilon\ x\ Ma\ x\ a}\right) X\ 100 \qquad (6)$$

Onde: Abs= absorbância da amostra a 205 nm; ε = absortividade molar da lignina (105 L/g.cm); V= Volume do balão volumétrico utilizado (0,2L); D= Diluição; Ma = Massa da amostra seca; a = passo óptico da cubeta (1 cm).

4.4.7 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, por meio de um aparelho da marca Micronal modelo B 474, com correção de temperatura.

4.4.8 Viabilidade e pureza da cultura

A viabilidade das culturas de leveduras testadas foi verificada a partir de visualizações microscópicas de lâminas, preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (m/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (m/v) (ODUMERO et al., 1992). A pureza foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular (LABO) equipado com câmera digital de forma a fornecer dados referentes à morfologia celular.

4.4.9 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada pelo método da contagem de células em Câmera de Neubauer (células/mL).

4.5 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, xilitol e etanol.

As concentrações dos açúcares (D-xilose, D-glicose e L-arabinose), bem como de ácido acético, glicerol, etanol e xilitol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), nas seguintes condições: coluna "Bio-Rad Aminex" HPX-87H mantida a 45 ºC; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,05M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro "Sep Pack" C18 (MILLIPORE).

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural também foram determinadas por HPLC, nas seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25 ºC; detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume da amostra injetada 20µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart 0,22 µm (MILLIPORE).

4.6 Determinação do fator de conversão de D- xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de xilitol produzida pela massa de xilose consumida, em gramas. Foi calculado pela Equação 7:

$$Y\left(\frac{P}{S}\right) = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{Pf - Pi}{Sf - Si} \qquad (7)$$

Onde:

Sf e Si correspondem às concentrações final e inicial de xilose (g/L);
Pf e Pi correspondem às concentrações final e inicial do produto (g/L).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

A Tabela 3 apresenta os principais constituintes do bagaço de cana de açúcar, como as frações celulose, hemicelulose, e de lignina, a celulose Estes valores são comparados com os resultados encontrados na literatura (Tabela 4).

Tabela 3 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar "in natura".

Componentes da Biomassa	**(%)**
Celulose	41,25
Hemicelulose	26,03
Lignina	22,22
Extrativos	4,66
Cinzas	3,61
TOTAL	**97,77**

Tabela 4 - Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar e de outras matérias primas.

Matériais Lignocelulósicos	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrativos	Cinzas	Referência
Bagaço de Cana	41,25	26,03	22,22	4,66	3,61	**Presente Trabalho**
Bagaço de Cana	43,1	28,6	20,8	4,6	2,9	Arruda, (2011)
Bagaço de Cana	42,8	25,8	22,1	6,1	1,4	Gouveia et al., (2009)
Bagaço de Maçã	32,62	23,60	25,38	17,67	0,14	Dalanhol, (2014)
Palha de Cana	38,1	29,2	24,2	5,9	2,4	Silva, (2009)
Palha de Arroz	43,5	22,0	17,2	5,9	11,4	Mussato; Roberto, (2002)

Avaliando a Tabela 4, pode-se observar que a composição química do bagaço de cana do presente trabalho apresenta resultados próximos daqueles encontrados para o bagaço de cana por Arruda (2011) e Gouveia et al. (2009), sendo que os valores obtidos se encontram num ponto intermediário entre os dois, exceto para o teor de cinzas cujo valor foi superior. Características da matéria prima, como tempo de estocagem, idade e condições de cultivo podem ser responsáveis pelas diferenças encontradas (Bobleter 1994). Quando comparada a outras matérias primas o teor de hemicelulose encontrado no presente trabalho (26,03%) foi superior ao bagaço de maçã (23,6%) e à palha de arroz (22,0%) e inferior a palha de cana (29,2%).

5.2 OBTENÇÃO DO HIDRÓLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR

Na obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar obtido por hidrólise ácida diluída, foram utilizados 2,68 ± 0,068 kg de bagaço de cana-de-açúcar (peso seco), 26,8 ± 0,68 L de suspensão ácida no reator, obtendo-se no final da hidrólise um volume de 17,36 ± 1,65 litros de hidrolisado. Verificou-se uma perda de 35 ± 6% de hidrolisado, que provavelmente ficaram retidos na celulignina.

5.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA DE-AÇÚCAR

Na Tabela 5 se encontram os resultados da caracterização química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em diferentes etapas e concentrações, assim como do meio semi-definido. Foi observada a predominância na concentração do açúcar xilose, seguida de arabinose e glicose, esta mesma proporção é encontrada também em outras pesquisas com bagaço de cana de açúcar (MARTON et al., 2006; RODRIGUES et al., 2010; SILVA et al., 2004).

Pelos dados apresentados na Tabela 5, verifica-se uma proporção média de glicose: xilose de 1:12,75 relação considerada inferior a encontrada como ótima (1:5) para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* (SILVA; FELIPE, 2006). Verifica-se também a presença de compostos tóxicos como o ácido acético, proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose, além dos compostos fenólicos totais provenientes da degradação da lignina presente no hidrolisado (ALMEIDA et al., 2007). Ainda na Tabela 5 pode-se constatar que a concentração a vácuo resultou em aumento proporcional nas concentrações dos açúcares enquanto que para os compostos tóxicos, esta proporcionalidade não foi observada, comportamento semelhante foi observado por Arruda, (2011) .

Tabela 5 - Média dos valores obtidos na caracterização química do hidrolisado após a hidrólise ácida diluída (Original), a concentração a vácuo (Concentrado), a destoxificação e de diluições do hidrolisado com água destilada: 75% de água (H-25), 50% de água (H-50), 25% de água (H-75), hidrolisado não diluído (H-100), meio Semi-definido (M.S.D), bem como do hidrolisado semelhante ao H-75, utilizado no planejamento estatístico (H-PE).

Características	Original	Concentrado	H-25	H-50	H-75	H-100	M.S.D	H-PE
Xilose (g/L)	20,805	53,530	9,160	23,630	32,380	40,930	44,950	37,410
Glicose (g/L)	1,620	3,975	0,700	1,690	2,360	3,510	5,210	3,290
Arabinose (g/L)	1,830	5,685	1,340	2,290	3,850	5,090	0,000	2,990
Ác.Acético (g/L)	2,200	4,315	0,690	1,670	2,590	2,890	0,000	2,750
Fenólicos Totais (g/L)	1,000	2,610	0,230	0,390	0,570	0,840	n.d	0,690
Furfural (g/L)	0,031	0,231	0,000	0,013	0,029	0,056	n.d	0,033
5-HMF (g/L)	0,061	0,182	0,000	0,003	0,008	0,010	n.d	0,009

n.d = Não determinado

Quanto ao efeito do processo de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (H-100), verifica-se a redução na concentração de todos os compostos tóxicos, bem como a de açúcares, ao mesmo tempo em que nota-se redução progressiva destes compostos com o aumento do fator de diluição do hidrolisado (Tabela 5). O maior efeito deste procedimento foi sobre o composto 5-HMF, uma vez que se observou remoção de 94,25%. Os valores obtidos para remoção de 5-HMF foram superiores aqueles obtidos por Arruda, (2011) e Chaud, (2010), que obtiveram 67,6 e 67,57%, respectivamente. O segundo composto que teve maior remoção foi o Furfural, com 75,69% de remoção. Os resultados obtidos para remoção deste composto foram superiores aqueles obtidos por Arruda, (2011) e Chaud, (2010) de 65,1 e 65,81%, respectivamente e inferior ao obtido por Carvalheiro et al., (2005) de 92%. É importante destacar que a concentração encontrada no presente trabalho para Furfural e 5-HMF foi inferior aquela considerada tóxica para outras leveduras (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996; KELLY et al., 2008).

Quanto aos compostos fenólicos totais a remoção foi de 67,82%, resultado inferior ao obtido por Carvalho et al (2005) (79,9%) e Arruda (2011) (77%). Para o ácido acético a

remoção foi de 33,02% em H-100, superior ao encontrado por Arruda, (2011),15,66%, e inferior ao obtido por Marton (2002), 44,2%. As diferença encontradas nas caracterizações podem estar relacionadas com as características da biomassa, bem como a forma de armazenamento ou tempo de estoque.

Para os açúcares presentes no hidrolisado, durante o processo de destoxificação foi observada a perda de 24,66% de xilose, o que representa uma perda maior do que a obtida por Arruda (2011), de 16,4%, e por Carvalho et al. (2005), de 20%, porém inferior a de Apolinario (2014), com 37% de perda desta pentose. Quanto à glicose, Arruda (2011) e Canilha et al (2010) observaram a perda de 11,3 e 11%, respectivamente durante a destoxificação, semelhantes ao do presente trabalho (11,70%). Para arabinose foi observada uma perda 10,47%, valor superior ao obtido por Canilha et al., (2010) e (Chaud, 2010), de 7 e 3,28%, respectivamente.

5.4 AVALIAÇÃO PRÉVIA DO DESEMPENHO DAS LEVEDURAS XILANOLÍTICAS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES

5.4.1 Avaliação do consumo de açúcares pelas leveduras

Avaliando o consumo dos açúcares (Figura 10), observou-se que a glicose foi totalmente consumida por todas as leveduras, no período de 48h, independentemente do meio de cultivo empregado. Quanto ao consumo dos demais açúcares, foi observado que para a levedura *Cryptococcus laurentii* (L62), o consumo máximo de xilose foi de 8,17 g/L (94,45%), observado quando cultivada em hidrolisado de maior diluição (H-25), seguido dos hidrolisados H-50 e H-100 e H-75, com consumo de 7,58 (36,49%), 7,49 (20,73%) e 4,17 g/L (13,6%), respectivamente. Também foi observado que o consumo desta pentose foi maior nos hidrolisados hemicelulósicos do que em M.S.D (4,10 g/L). Tal comportamento demonstra que esta levedura apresenta melhor capacidade de consumir xilose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, independente da diluição utilizada, do que em M.S.D. E este resultado aponta para a possibilidade desta levedura ser resistente aos compostos tóxicos existentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar utilizado no presente trabalho (Tabela 5). Para a arabinose, foi

observado o consumo máximo de 2,78 g/L (54,91%), quando a levedura foi cultivada em hidrolisado não diluído (H-100) seguido dos hidrolisados H-50 e H-75 e H-25, com consumo de 1,33 (41,72%), 1,25 (26,43%) e 0,833 g/L (57,08%), respectivamente. Desta forma, observou-se a tendência no aumento do consumo de arabinose a medida que a concentração de hidrolisado aumentou de forma que o máximo consumo ocorreu no hidrolisado com maior concentração de açúcares, bem como de compostos tóxicos (H-100), conforme Tabela 5.

Para *Cryptococcus adeliensis* (L95) o consumo máximo de xilose (11,99 g/L, 28,95%) ocorreu em hidrolisado H-100, seguido dos meios de cultivo M.S.D, H-50, H-75 e H-25 com consumo de 8,73 (23,64%), 7,11 (35,75%), 6,22 (19,40%) e 5,33 g/L (59,91%), respectivamente. O que se observa para esta levedura é que a capacidade de consumir xilose parece estar relacionada a concentração deste açúcar no meio, de forma que maiores concentrações, obtidas no hidrolisado H-100 e M.S.D (Tabela 5), resultaram em maior consumo desta pentose, desta forma testes avaliando a capacidade de consumir xilose de acordo com a concentração do meio podem ser realizados visando confirmar tal comportamento. Para arabinose, o consumo máximo ocorreu em hidrolisado H-100, 3,79 g/L(59,32%), sendo que este consumo decaiu a cada aumento de diluição do hidrolisado, de forma que o consumo nos meios H-75, H-50, e H-25 foram de 2,23 (37,0%), 0,225 (7,48%) e 0,220 g/L (15,12%), respectivamente. Este comportamento demonstra que quanto maior a concentração de arabinose no meio, maior é sua assimilação. Novamente o consumo de açúcar por esta levedura pode estar relacionado à concentração do mesmo no meio (Figura 10).

Quanto ao consumo de xilose para *Candida davisiana* (L101) observou-se que o maior consumo ocorreu em hidrolisado H-50, com 6,38 g/L (36,0%), seguido dos hidrolisados H-25, H-100 e H-75 com consumo de 5,73 (80,78%), 5,52 (14,23%) e 3,42 g/L (11,67%) respectivamente, sendo que o consumo de xilose em M.S.D foi de 4,16 g/L (9,35%) maior apenas que o consumo no meio H-75. Quanto à arabinose foi observado que o máximo consumo 2,99 g/L (54,33%)ocorreu no hidrolisado não diluído H-100. Desta forma, para esta levedura, quando se reduz a concentração de açúcares, bem como de tóxicos, presentes no hidrolisado, há aumento no consumo de xilose em relação aos outros meios comparados, indicando que esta levedura necessita de concentrações menores de tóxicos do que as encontradas no hidrolisado H-100 para assimilar esta xilose. O consumo

nos hidrolisados H-75 e H-50 foram de 1,23 (24,95%) e 0,75 g/L (25,0%), respectivamente, para o hidrolisado H-25 o consumo foi de 0,34 g/L (35,55%), sendo observado que o aumento da diluição, reduziu o consumo desta pentose semelhantemente as leveduras L95 e L107 (Figura 10).

Avaliando o consumo das pentoses (Figura 10) pela levedura *Candida davisiana* (L107), observa-se que a maior assimilação de xilose 8,97 g/L (94,06%) ocorreu no hidrolisado H-25, seguido dos hidrolisados, H-100, H-50 e H-75 com consumo de 7,25 (19,63%), 5,14 (29,24%) e 3,71 g/L (12,26%) respectivamente. É importante destacar que o consumo desta pentose foi maior no hidrolisado hemicelulósico do que em meio M.S.D (3,15 g/L) (7,10%), independente do fator de diluição empregado no experimento. Isto sinaliza para o fato de que o hidrolisado hemicelulósico é melhor meio de cultivo do que o meio semi-definido, uma vez que foi demonstrado que esta levedura apresenta melhor capacidade de consumir xilose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar do que em meio M.S.D. Comportamento semelhante foi observado nas leveduras L62 e L109, indicando que estas podem ter melhor desempenho em hidrolisado (meio complexo) do que em meio semi-definido, quanto ao consumo de xilose. Para arabinose o consumo máximo ocorreu em hidrolisado não diluído H-100 3,17 g/L (56,60%) seguido dos hidrolisados H-75, H-50 e H-25 com 1,24 (26,62%), 0,51 (19,21%), e 0,49 (46,89%) g/L, respectivamente (Figura 10).

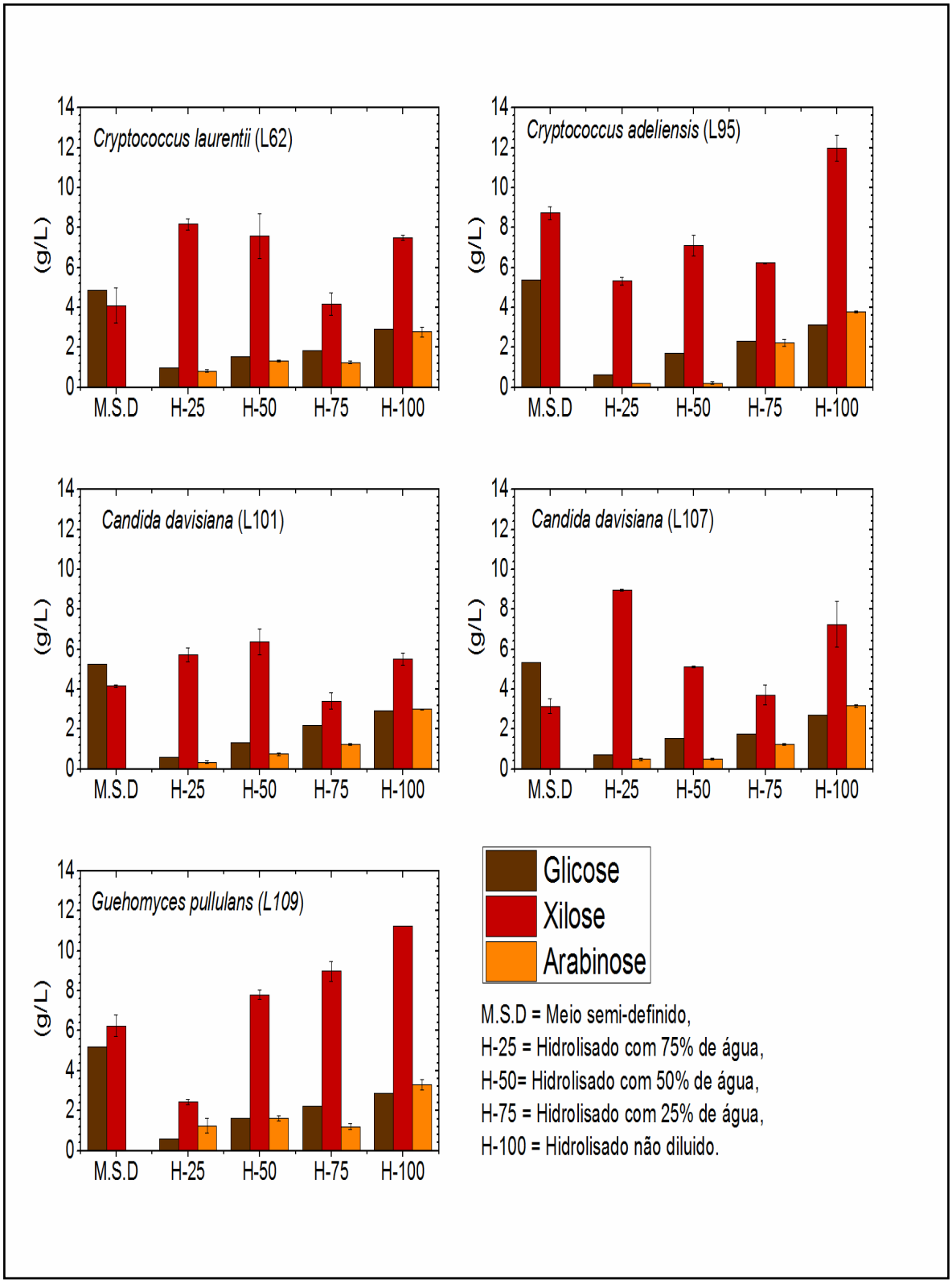
Dentre todas as leveduras avaliadas, *Guehomyces pullulans* (L109) foi a que apresentou o melhor perfil de consumo de xilose, visto que a mesma consumiu em média 34,43$\pm$ 0,053% desta pentose independente da diluição de hidrolisado empregado, obtendo um bom consumo de xilose até em hidrolisado H-75, que representou o pior hidrolisado, quanto ao consumo de xilose, para a maioria das leveduras avaliadas (Figura 10). O consumo máximo desta pentose 11,23 g/L (29,67%) ocorreu em hidrolisado não diluído H-100. Nos demais hidrolisados o consumo foi de 8,98 (30,42%), 7,80 (40,70%) e 2,45 g/L (36,93%), respectivamente, para as diluições H-75, H-50 e H-25. Vale notar que o consumo de xilose em todos hidrolisados foi superior ao consumo em meio M.S.D. Para arabinose o consumo máximo 3,29 g/L (55,91%) ocorreu em hidrolisado H-100, semelhante as demais leveduras, seguida dos hidrolisados H-50, H-25 e H-75, com consumo de 1,63 (45,29%), 1,25 (61,79%) e 1,21 g/L (27,18%), respectivamente (Figura 10).

Como pode ser observado na Figura 10, a glicose foi totalmente consumida, por todas as leveduras independentemente do hidrolisado. (APOLINARIO, 2014) observou em pesquisa anterior, que estas mesmas leveduras foram capazes de consumir totalmente a glicose em um período de 48h, quando cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado e destoxificado, bem como em meio semi-definido. Outros trabalhos também relatam o consumo de glicose preferencialmente, mesmo na presença de outros açúcares (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; LEE, 2013). A capacidade de consumir esta hexose mais rapidamente, se dá devido à glicose ser uma fonte de carbono preferencial para leveduras (YAHASHI et al., 1996).

Com relação ao consumo de xilose, não foi observado um padrão único para todas as leveduras, como ocorreu com a glicose. Observa-se que, o H-75 resultou em baixo consumo de xilose pelas leveduras L62, L101 e L107, enquanto que para L95 e L109 foi o meio H-25 que resultou em menor consumo. O cultivo em meio M.S.D não resultou na melhor condição de cultivo, o que indica que os compostos tóxicos podem não ter sido o fator de maior influência sobre o consumo desta pentose. Para as leveduras L95 e L109, o hidrolisado H-100, com maior concentração de tóxicos, proporcionou o maior consumo de xilose. Os resultados obtidos neste trabalho representam uma melhora no consumo de xilose, quando comparado a pesquisa anterior (APOLINARIO, 2014), onde foi observado o consumo de xilose apenas pelas leveduras L95 e L109.

Quanto à arabinose, foi observado que todas as leveduras tiveram o máximo consumo em hidrolisado não diluído (H-100), ou seja, com maior teor de açúcar e tóxicos. Também foi observada a tendência em reduzir o consumo em hidrolisados com maior diluição. Apolinario, (2014), também observou o consumo de arabinose, porém apenas com a levedura L109. A capacidade de consumir arabinose, mesmo da presença de outros açúcares, representa um diferencial nestas leveduras, uma vez que estudos têm verificado que esta pentose só começa a ser consumida após o esgotamento das outras fontes de carbono (FONSECA et al., 2007; HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

Figura 10 - Consumo dos açúcares glicose, xilose e arabinose pelas leveduras xilanolíticas da Antártica, em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido.



Fonte: Arquivo próprio

5.4.2 Avaliação consumo de compostos fenólicos e ácido acético pelas leveduras

Avaliando o consumo dos compostos fenólicos e de ácido acético pelas leveduras xilanolíticas da Antártica (Figura 11), observou-se que todas as leveduras consumiram tanto ácido acético, quanto os compostos fenólicos, independente da diluição do hidrolisado.

Foi observado que levedura *Cryptococcus laurentii* (L62) foi capaz de consumir compostos fenólicos em todas as condições de cultivo avaliadas, sendo que o consumo máximo de fenólicos totais ocorreu em hidrolisado H-50 (0,104 g/L), o que corresponde a 22,95%, seguido dos hidrolisados H-25, H-75 e H-100, com consumo de 0,084, 0,074, e 0,065 g/L, respectivamente (Figura 11). Este comportamento demonstra que a concentração de hidrolisado H-50 favorece o consumo deste tóxico, porém quando há aumento na concentração do mesmo, seu consumo reduz, desta forma o efeito tóxico deste composto para esta levedura pode estar relacionado a concentração do mesmo no meio de cultivo. Quanto ao ácido acético, houve um elevado consumo (maior que 90%), em todas as condições de cultivo avaliadas. Esta levedura apresentou consumo crescente de ácido acético à medida que a concentração de hidrolisado aumentou, desta forma o consumo máximo (2,65 g/L) ocorreu em hidrolisado H-100 seguido de 2,42, 1,95 e 0,66 g/L, para os hidrolisados H-75, H-50 e H-25 respectivamente.

Quanto à levedura *Cryptococcus adeliensis* (L95) pode-se constatar que o maior consumo de fenólicos totais ocorreu em H-75, com 0,191 g/L, correspondendo a 31,02% seguido dos hidrolisado H-100, H-50 e H-25, com consumo de 0,150, 0,123 e 0,007 g/L, respectivamente (Figura 11), sendo capaz de consumir compostos fenólicos em todas as condições avaliadas. Para ácido acético, foi observado que o maior consumo ocorreu em H-75, com 1,36 g/L (45,81%), seguidos dos hidrolisados H-50 (1,10 g/L) H-25 (0,78 g/L) e H-100 (0,27 g/L) (Figura 11). Vale ressaltar que esta levedura apresentou o maior consumo de compostos fenólicos (0,191 g/L), dentre todas as leveduras avaliadas. Porém, de forma contrária, a mesma apresentou a menor capacidade de assimilar ácido acético dentre as leveduras estudadas (Figura 11).

Para a *Candida davisiana* (L101), o máximo consumo de fenólicos totais ocorreu em hidrolisado H-75 (0,185 g/L) equivalente a 30,21%, seguido dos hidrolisados H-100

(0,062 g/L) H-50 (0,053 g/L) e H-25 (0,044 g/L). Quanto ao ácido acético, foi observado um elevado consumo, maior que 80%, em todos meios cultivados. O consumo máximo ocorreu em hidrolisado H-75 (2,70 g/L) seguido dos hidrolisados H-100, H-50 e H-25 com consumo de 2,43, 1,86 e 0,77 g/L. Para essa levedura, o consumo máximo de fenólicos totais, bem como o consumo máximo de ácido acético ocorreram no hidrolisado H-75, hidrolisado com adição de 25% de água destilada, comportamento semelhante foi observado na levedura L95 (Figura 11)

Quanto ao consumo de fenólicos totais pela levedura *Candida davisiana* (L107) foi verificado que o consumo máximo (20,68%) ocorreu em hidrolisado H-75 (0,153 g/L) seguido dos hidrolisados H-100 (0,130 g/L), H-25 (0,113 g/L) e H-50 (0,108 g/L). É possível observar um aumento progressivo do consumo de ácido acético pela levedura à medida que aumentou a concentração do hidrolisado, de forma que o consumo em ordem crescente foi de 0,77, 1,15, 1,59,e 1,99, g/L nos hidrolisados H-25, H-50, H-75 e H-100 respectivamente.

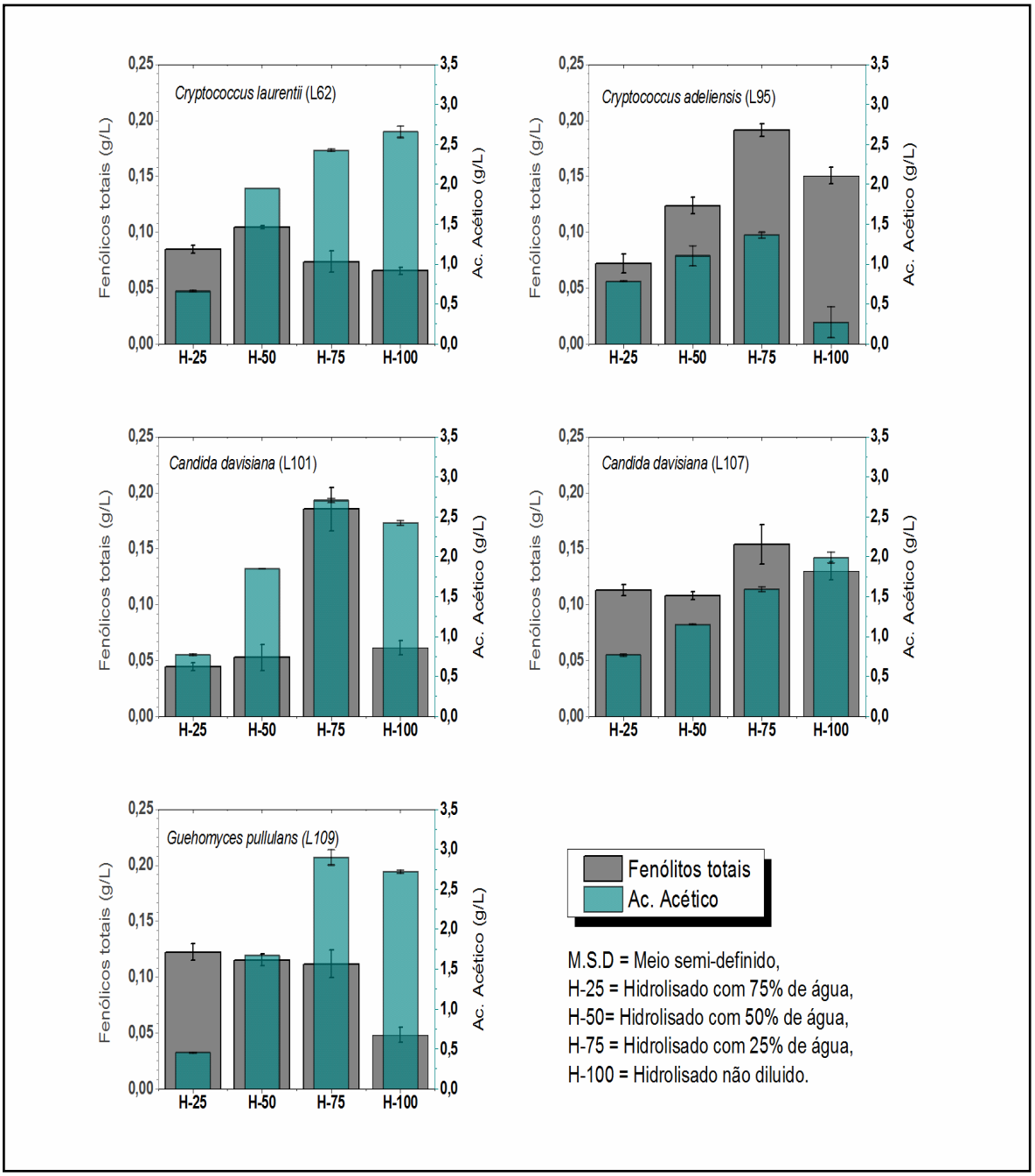
Avaliando o consumo dos fenólicos totais pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) (Figura 11) pode-se observar um aumento no consumo destes compostos à medida que se reduziu a concentração do hidrolisado, desta forma o consumo máximo obtido (39,35%) foi de 0,122 g/L, seguido de 0,115, 0,111 e 0,048 g/L para os hidrolisados H-25, H-50, H-75 e H-100, respectivamente. Para o ácido acético foi observado que o máximo (94,46%) consumo ocorreu em hidrolisado H-75 (2,90 g/L) seguido dos hidrolisados H-100 H-50 e H-25, com 2,72, 1,67 e 0,45 g/L de consumo, respectivamente. Esta levedura foi a única que apresentou maior consumo de fenólicos totais à medida que se reduziu a concentração do hidrolisado.

Como pode ser observado na Figura 11, todas as leveduras apresentaram capacidade de consumir os compostos fenólicos nas diferentes diluições de hidrolisado empregado. Apolinario (2014) também observou a capacidade destas leveduras em consumir estes compostos, quando cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Segundo Bergauer et al (2005) a maioria dos microrganismos conhecidos que possuem a capacidade de degradar fenólicos são mesofílicos. No entanto as leveduras mesófilas apresentam crescimento ótimo apenas em temperaturas maiores do que aquelas encontradas na natureza. Portanto, a busca por leveduras com capacidade de degradar estes compostos tóxicos a baixas temperaturas é de grande importância ecológica, uma vez que

estas leveduras poderiam ser utilizadas para degradação de poluentes em regiões onde as temperaturas são menores, como em regiões polares, alpinas, em água subterrânea ou de superfície onde as temperaturas variam entre 8 a 10 °C (BERGAUER et al., 2005). Porém no presente trabalho, foi avaliada apenas a capacidade destas leveduras em consumir os compostos fenólicos, presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana a uma temperatura de 30 °C. Por outro lado, vale salientar que estas leveduras são psicrófilas ou psicrotolerantes, e podem crescer em temperaturas menores do que as leveduras mesófilas. Apolinario (2014) avaliou o crescimento destas leveduras em temperatura de 25 e 30 °C e verificou que as leveduras L95 e L109 tiveram a mesma taxa de crescimento em ambas as temperaturas enquanto L101, L107 e L62 apresentaram melhor capacidade de se desenvolverem a 30 °C do que a 25 °C. Pesquisadores como Krastanov; Alexieva; YemendzhieV, (2013) destacam que existe uma grande necessidade de se descobrir e selecionar leveduras que possam biodegradar compostos fenólicos com alta eficiência para aplicações ecológicas. Logo estudos podem ser conduzidos avaliando a capacidade destas leveduras em consumir compostos fenólicos a baixas temperaturas visando aplicações ecológicas.

Quanto ao ácido acético, foi observado que as leveduras L62, L101, L107 e L109 foram capazes de consumir mais de 75% deste ácido, independentemente do hidrolisado empregado. Para a levedura L95 foi observado que hidrolisado em menores concentrações favoreceram o consumo deste composto tóxico, enquanto concentrações maiores desfavoreceram o seu consumo (Figura 11). Ao contrário dos outros compostos inibitórios, o ácido acético é o único cuja liberação não pode ser evitada, uma vez ele faz parte da constituição da fibra lignocelulósica (SHAW et al., 2015). Este composto pode ser utilizado pelas leveduras como fonte de carbono, entrando no ciclo de Krebs via acetil-Coa (FELIPE et al., 1995; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Figura 11 - Consumo dos fenólicos totais e ácido acético, pelas leveduras xilanolíticas da Antártica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.



Fonte: Arquivo próprio

5.4.3 Variação de pH

Como pode ser observado na Figura 12, o comportamento do pH foi semelhante para todas as leveduras xilanolíticas, de forma que, o máximo valor de pH ocorreu em hidrolisado H-75, seguido de hidrolisado H-100, H-50 e por último H-25. Os valores podem observados na Tabela 6. Este comportamento pode estar relacionado ao consumo de ácido acético, uma vez que em hidrolisado H-75 o consumo médio pelas leveduras foi de 86,54% enquanto que em H-100 este consumo foi de 70%. Para concentrações menores de hidrolisado (H-50 e H-25), onde há menor concentração de ácido acético, bem como em meio semi-definido, a queda de pH pode estar associada ao consumo do sulfato de amônio, que ao ser assimilado libera íons de amônio e podem formar uma pequena quantidade de ácido, contribuindo para queda de pH (ZHAO; CAI; XU, 2007).

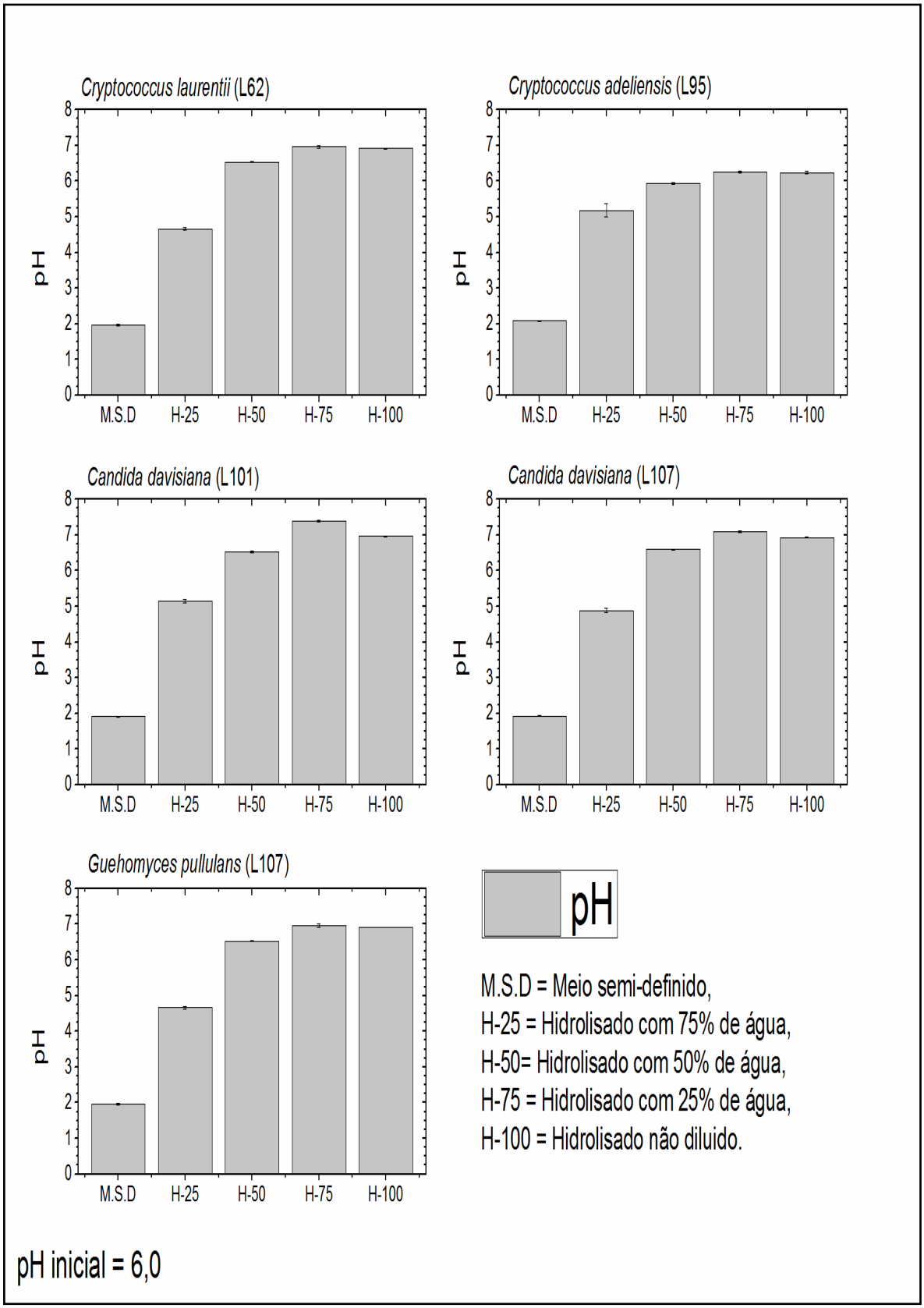
O pH do meio de cultivo também pode ter ação inibitória sobre o crescimento celular. A literatura indica que leveduras tem pH de crescimento ótimo em torno de 4 a 6 (NARENDRANATH; POWER, 2005; PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1993). Em um trabalho realizado com uma levedura da antártica *Candida humicola* foi observado que os valores de pH de 3 7 e 8 reduziram o crescimento celular, enquanto que pH 4 e 5 favoreceram o crescimento (RAY et al., 1992). Como pode ser observado na Tabela 6 os hidrolisado H-50, H-75 e H-100 tiveram, na maioria das vezes, um pH final acima do valor considerado ótimo para leveduras, enquanto o pH final do M.S.D ficou abaixo deste valor. O único meio cujo pH final ficou entre 4 e 6 foi o H-25.

Tabela 6 - pH final dos meios de cultivo, em diferentes diluições de hidrolisado hemicelulósico e em meio semi-definido.

Leveduras	pH Final dos Meios de Cultivo				
	M.S.D	H-25	H-50	H-75	H-100
L62	1,96	4,97	6,53	7,14	7,04
L95	2,08	5,18	5,93	6,26	6,24
L101	1,91	5,15	6,52	7,38	6,96
L107	1,94	4,88	6,59	7,1	6,93
L109	1,96	4,66	6,54	6,96	6,91

* pH inicial = 6,0.

Figura 12 - pH final do cultivo, em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido.



Fonte: Arquivo próprio

5.4.4 Concentração Celular

A avaliação do crescimento celular das leveduras por de Câmera de Neubauer, a partir de lâminas coradas a fresco, após o cultivo de 48h em hidrolisado hemicelulósico de bagaço e M.S.D permitiu constatar que todas as linhagens permaneceram 100% viáveis até o final do cultivo.

De acordo com a Figura 13, a levedura L62 obteve o máximo crescimento celular, quando cultivada em H-25 ($1,74x10^8 \pm 0,05\ x10^8$ Cél/mL) seguido dos hidrolisados H-50, H-100, e H-75 com crescimento celular de ($1,64x10^8 \pm 0,05x10^8$ Cél/mL), ($1,42x10^8 \pm 0,07x10^8$ Cél/mL) e ($1,23x10^8 \pm 0,05x10^8$ Cél/mL) respectivamente. Comparando o crescimento celular em hidrolisado com meio M.S.D ($1,34x10^8 \pm 0,05\ x10^8$ Cél/mL) pode-se afirmar que o H-25 favoreceu o crescimento em 29,81%, para H-50 este favorecimento foi de 22,36%, seguido do hidrolisados H-100 com 5,59%, enquanto que para o hidrolisado H-75 esse valor foi 8,07% menor do que o crescimento celular em M.S.D. Ou seja, em se tratando de crescimento celular, esta levedura apresenta, de forma geral, melhor crescimento, quando cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, do que em meio semi-definido, indicando que esta levedura é capaz de tolerar o hidrolisado.

Quanto a L95, a mesma foi a que apresentou o maior crescimento celular dentre todas as leveduras (Figura 13). Para esta levedura foi observado que quanto menor a concentração do hidrolisado, maior é o crescimento celular, de forma que o crescimento máximo obtido ocorreu no hidrolisado H-25 chegando à concentração final de ($1,14x10^9 \pm 0,02^9$ Cél/mL), seguido dos hidrolisados H-50 ($9,53x10^8 \pm 0,15x10^8$ Cél/mL), H-75 ($7,77x10^8 \pm 0,3x10^8$Cél/mL), H-100 ($6,68x10^8 \pm 0,3x10^8$ Cél/mL) e M.S.D ($5,35x10^8 \pm 0,3x10^8$ Cél /mL). Comparando o crescimento celular em hidrolisado com o meio semi-definido observou-se que os hidrolisado H-25, H-50 H-75 e H-100 favoreceram o crescimento em 113,71, 78,19, 45,17 e 24,92% respectivamente.

De acordo com a Figura 13, a levedura L101 obteve o máximo crescimento celular, quando cultivada em M.S.D ($2,45x10^8 \pm 0,03x10^8$ Cél/mL) seguido dos hidrolisados H-100, H-50, H-25 e H-75 com crescimento celular de ($2,25x10^8 \pm 0,02x10^8$ Cél/mL),

($2,10x10^8 \pm 0,1x10^8$ Cél/mL), ($1,88x10^8 \pm 0,08x10^8$ Cél/mL) e ($1,23x10^8 \pm 0,06x10^8$ Cél/mL) respectivamente. Observa-se que o cultivo em hidrolisado não favoreceu o crescimento celular em relação ao M.S.D sugerindo que esta levedura tem menor resistência ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Para a L107, o crescimento celular máximo foi de ($1,96E^8 \pm 0,05E^8$ Cél/mL) em hidrolisado H-25 seguido dos hidrolisados H-100, H-75, H-50 com crescimento celular de ($1,79E^8 \pm 0,08E^8$ Cél/mL), ($1,50E^8 \pm 0,06E^8$ Cél/mL), ($1,38E^8 \pm 0,02E^8$ Cél/mL) respectivamente. Comparando o crescimento celular em hidrolisado com o M.S.D ($1,24E^8 \pm 0,05\ E^8$ Cél/mL) observou-se que os hidrolisado H-25, H-100, H-75 e H50 favoreceram o crescimento em 57,72, 44,30, 20,81 e 10,74 e 9,40% respectivamente (Figura 13). Esta levedura, assim como a L95 e L109 apresentaram maior resistência ao hidrolisado hemicelulósico uma vez que o cultivo em hidrolisado resultou em maior crescimento celular final, do que quando cultivadas em meio semi-definido.

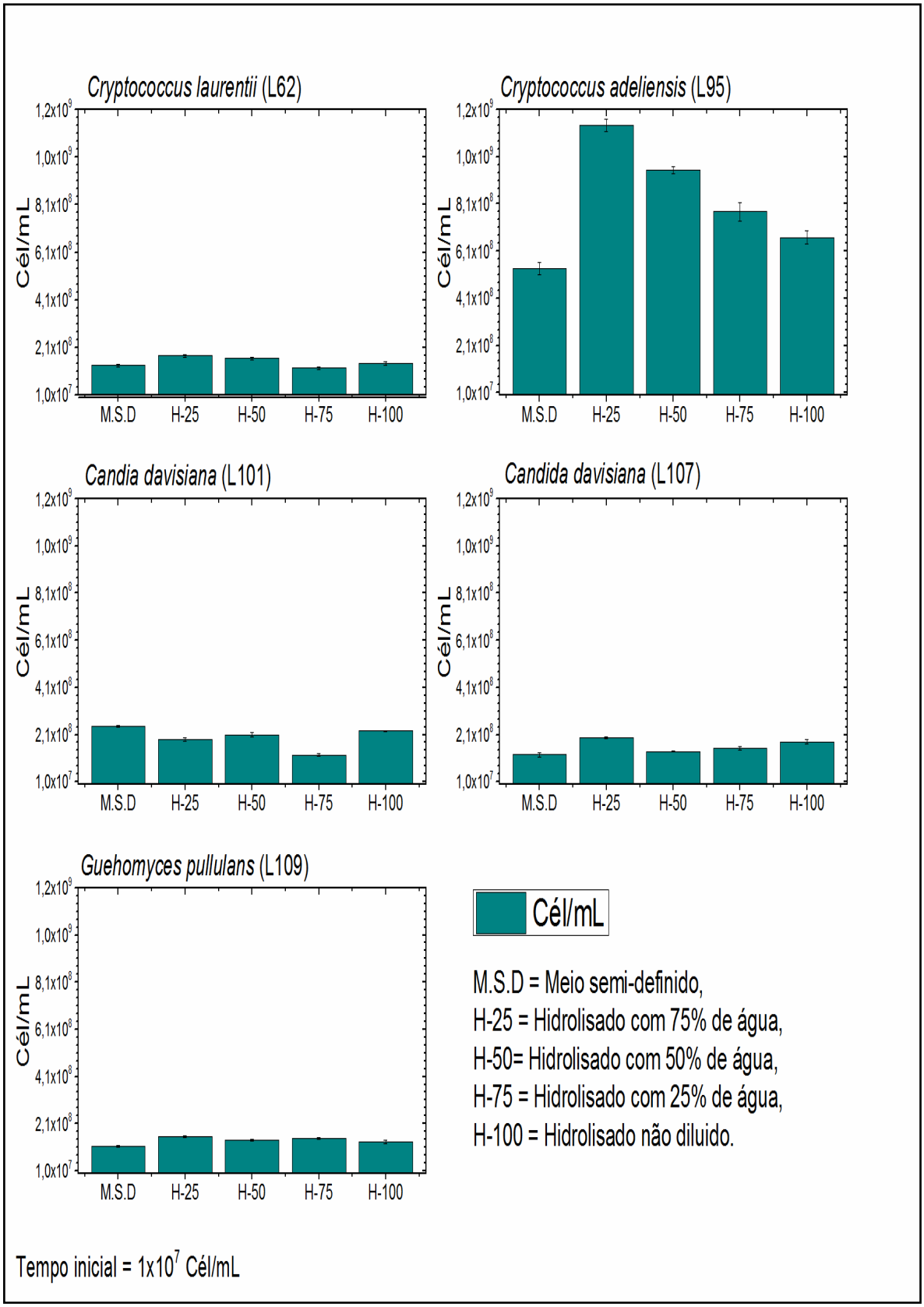
Para a L109, o crescimento máximo ocorreu na condição com menor concentração, H-25 ($1,55x10^8 \pm 0,05x10^8$ Cél/mL), seguido dos hidrolisados H-75 ($1,48x10^8 \pm 0,04x10^8$ Cél/mL), ($1,40x10^8 \pm 0,05x10^8$ Cél/mL), H-50 ($1,33x10^8 \pm 0,07x10^8$ Cél/mL) e H-100 ($1,13x10^8 \pm 0,04x10^8$ Cél/mL) Comparando o crescimento celular em hidrolisado com o M.S.D ($1,13x10^8 \pm 5,0x10^6$ Cél/mL) observou-se que os hidrolisado H-25, H-50 H-75 e H-100 favoreceram o crescimento em 36,76, 23,53, 30,88, e 17,65% respectivamente (Figura 13). Dentre as leveduras avaliadas, a L109 foi a única que apresentou um crescimento celular estável perante a variação da concentração de hidrolisado e cultivo em meio de semi-definido de forma que o crescimento celular médio, para todas as condições de cultivo, foram de $1,3x10^8$ com desvio padrão de $0,16\ x10^8$.

A presença dos compostos fenólicos pode influênciar no crescimento celular. Pesquisas têm associado à presença deste composto com um aumento na fase *lag* de crescimento da levedura (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996; LARSSON et al., 2000; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005). Os compostos fenólicos podem danificar a membrana celular, comprometendo a habilidade de agir como barreira seletiva e matriz enzimática reduzir a taxa de crescimento celular (ALMEIDA et al., 2007; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Por outro lado, Roberto et al., (1991a) verificaram que, para a levedura *Picha stipitis* CBS

5773, concentrações abaixo de 0,5 g/L de compostos fenólicos atuaram como fonte de carbono.

Segundo Felipe et al. (1995), concentrações superiores a 3,0 g/L de ácido acético interferiram negativamente na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*, enquanto baixa concentração (1,0 g/L) favoreceu esta bioconversão. Uma pesquisa com *Candida guilliermondii* demonstra que a presença de ácido acético é capaz de inibir o crescimento celular, sendo que seu efeito inibitório varia de acordo com a fase de crescimento (SILVA et al., 2004). Em um trabalho realizado com a levedura *Picha stipitis*, foi observado que quanto maior a concentração deste composto no meio, maior a inibição do crescimento celular, onde 1,5 g/L foram capazes de inibir o crescimento em 9,3%, sendo que as concentrações de 2,5 e 4,5 g/L reduziram o crescimento em 28% e 57,5%, respectivamente (ZEFERINO, 2013). A presença deste ácido no meio também pode desviar o uso de ATP para manutenção do equilíbrio intracelular. Palmqvist; Hahn-hägerdal, (2000b) sugerem que o mecanismo de inibição deste composto pode ocorrer devido a difusão deste ácido para o interior do citoplasma celular, reduzindo o pH intracelular e resultando um desequilíbrio homeostático, acarretando em gasto de ATP para manutenção do equilíbrio do pH, em detrimento do crescimento celular.

Figura 13 - Crescimento celular das leveduras xilanolíticas da Antártica em diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em meio semi-definido após 48h de cultivo.



Fonte: Arquivo próprio

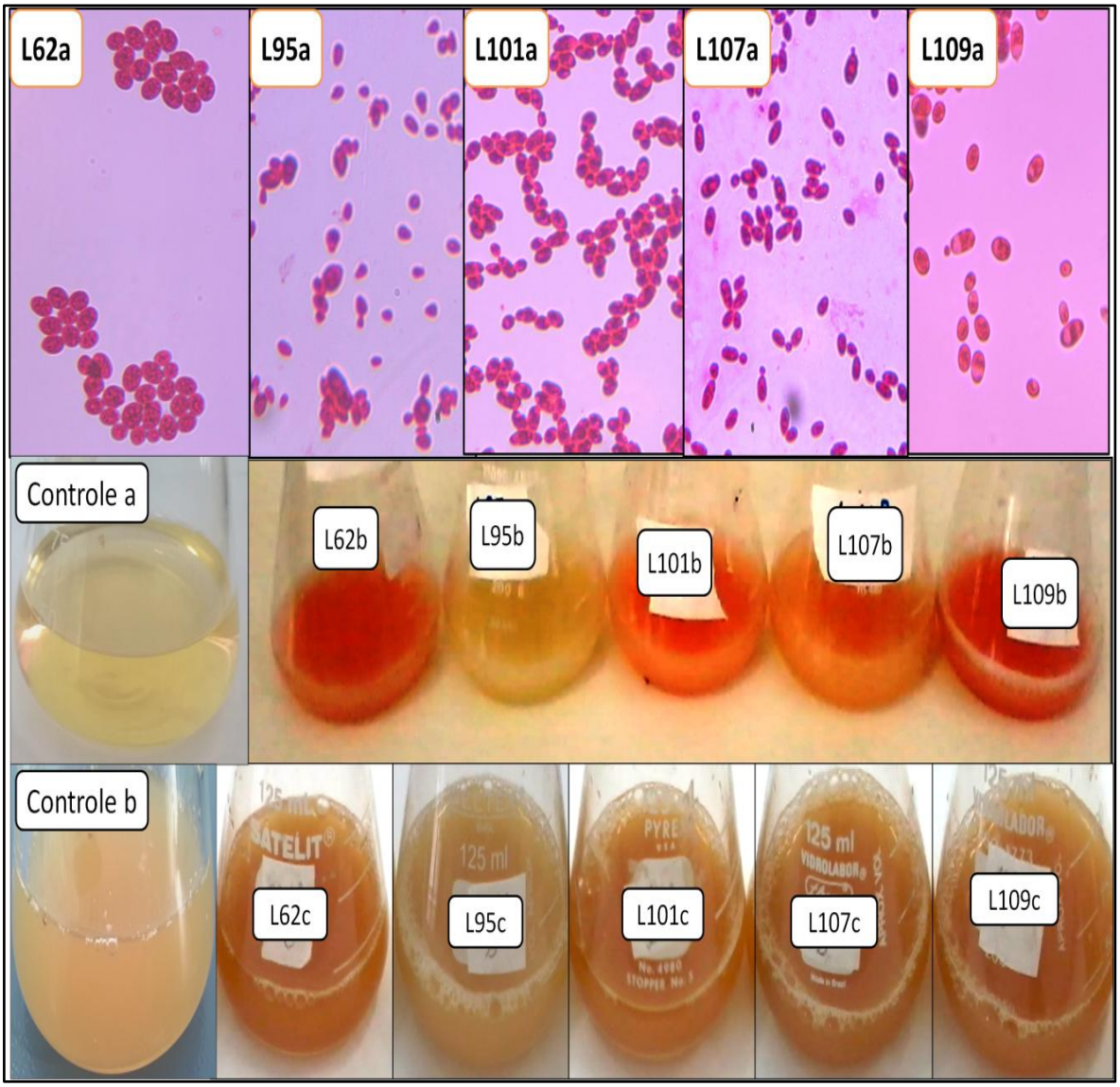
5.4.5 Morfologia

Quanto à morfologia celular, de acordo com a Figura 14, as leveduras L62, L107 e L109 apresentaram células esferoidais, já leveduras L101 e L107 possuem células elipsoidais, enquanto a L95 possui células ovóides, conforme indicado na literatura (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Em nenhum cultivo com estas leveduras foi observado à formação de hifas ou pseudo-hifas.

Além das características morfológicas, também foi observado que todas as leveduras, exceto a L95, apresentaram coloração alaranjada em todos os meios de cultivo empregados, esta coloração é um forte indício de estas leveduras podem estar produzindo pigmentos carotenóides (LIBKIND; VAN BROOCK, 2006; MATA-GÓMEZ et al., 2014; YURKOV et al., 2011). Esses pigmentos são moléculas de alto valor agregado que podem ser aplicadas em diferentes setores industriais, como os setores químicos, farmacêuticos e produção de cosméticos. Também podem ser utilizadas como precursores de vitamina A e como pigmentos naturais bioativos (MATA-GÓMEZ et al., 2014; VOLP; RENHE; STRINGUETA, 2009). É sabido que leveduras podem sintetizar carotenóides a partir de diversas fontes de açúcares como glicose, xilose, celobiose, sacarose, glicerol e sorbitol, no entanto o cultivo em meios de cultura comerciais pode ser muito custoso. Assim existe grande interesse na produção carotenóides em substratos de baixo custo, como o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, extrato e hidrolisado de turfa, mosto de uva entre outros para produção destes pigmentos (MATA-GÓMEZ et al., 2014). Portanto seria de grande interesse avaliar a produção destes pigmentos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Quanto à reprodução celular, observada na Figura 14, as leveduras L62, L101, L107 e L109 apresentaram brotamento polar enquanto a L95 demonstrou se reproduzir por brotamento duplo polar, conforme encontrado na literatura (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Tais características foram observadas durante a contagem de células em câmara de neubauer.

Figura 14 - Características morfológicas das leveduras sendo que **(a)** = lâminas fixadas e coradas com fucsina, **(b)** = Coloração das leveduras no meio caldo Sabouraud após ativação por 24h a 200RPM, 30°C, **(c)** = Coloração das leveduras cultivadas em hidrolisado hemicelulósico após 48h, **Controle a** = Caldo Sabouraud sem adição de leveduras, **Controle b** = Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar suplementado sem adição de leveduras.



Fonte: Arquivo próprio

5.4.6 Obtenção de bioprodutos pelas leveduras

Avaliando a produção de xilitol (Figura 15), observou-se que todas as leveduras foram capazes de produzi-lo, tanto em meio semi-definido quanto em hidrolisado, porém não em todas as concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

A levedura *Cryptococcus laurentii* (L62), teve a produção máxima de xilitol (3,07 g/L) em hidrolisado H-50, seguido dos hidrolisados H-75 e H-25, com produção de 2,32, e 1,98 respectivamente, sendo que não houve produção em H-100 (Figura 15). A produção deste produto em hidrolisados H-50 e H-75 foi 54,62 e 16,97% maior do que a produção em M.S.D (2,02 g/L) enquanto a produção em H-25 foi 1,93% menor. A produção de etanol pela L62 não detectada em nenhuma concentração de hidrolisado. Quanto a produção de glicerol, este foi detectado apenas em hidrolisado H-75 e H-100, com produção de 0,99 e 0,50 g/L, respectivamente (Figura 15).

Para a levedura *Cryptococcus adeliensis* (L95) a produção máxima de xilitol (3,60 g/L) ocorreu em M.S.D, seguido dos hidrolisados, H-75, e H-100, com produção de 2,87 e 1,40 g/L, respectivamente, sendo que esses valores foram 20,21 e 61,22% menores do que em M.S.D (Figura 15). Nos hidrolisados H-25 e H-50 não foi detectada a produção de xilitol. O glicerol foi detectado em todas as concentrações de hidrolisado e em M.S.D, a produção máxima ocorreu em H-75, com 3,75 g/L seguido dos meios H-100, H-50, M.S.D, e H-25 com produção de 1,55, 1,03, 0,48 e 0,42 g/L, respectivamente. Já o etanol foi detectado apenas nos meio M.S.D, e H-100 com produção de 1,09 e 0,63 g/L respectivamente (Figura 15).

Observa-se pela Figura 15 que a levedura *Candida davisiana* L101 atingiu a máxima produção de xilitol, quando cultivada em H-50 (3,58 g/L), seguido dos hidrolisados H-75, H-25, e H-100 com produção de 2,2 g/L, 1,95 g/L e (0,0 g/L) respectivamente. Comparando a produção com meio M.S.D (1,83 g/L), pode-se observar que o H-50 favoreceu a produção em 95,09%, para H-75 este favorecimento foi de 20,61%, seguido do hidrolisado H-25, com 6,44%, enquanto que em hidrolisado H-100 não foi detectada a produção de xilitol (Figura 15). A produção de glicerol ocorreu nos hidrolisados H-75 e H-100 com produção de 0,83 e 0,54 g/L, respectivamente, enquanto a produção de etanol não foi detectada (Figura 15).

Para a levedura *Candida davisiana* L107, a máxima produção de xilitol (3,48 g/L) ocorreu em hidrolisado H-50, seguido dos hidrolisados H-75 e H-25, com produção de (2,94 g/L) e (1,81 g/L), respectivamente, sendo que não foi observada produção de xilitol em H-100. Comparando a produção de xilitol em hidrolisado com o M.S.D (1,94 g/L), observou-se que H-50 e H-75 favoreceram a produção em 79,55, e 62,39%, ,respectivamente enquanto a produção em H-25 foi 6,62% menor do que o controle (Figura 15). O glicerol foi produzido apenas nos hidrolisados H-75 (0,85 g/L) e H-100 (0,50 g/L). Não foi detectada a produção de etanol em nenhum meio de cultivo.

Quanto à levedura *Guehomyces pullulans* L109, a produção máxima de xilitol ocorreu em hidrolisado H-75 (7,57 g/L), o que corresponde a aproximadamente o dobro da produção de xilitol obtido quando comparada com a produção das demais leveduras estudadas, seguido dos hidrolisados H-50 (2,92 g/L) e H-25 (1,99 g/L). Comparando com o meio M.S.D observou-se que os hidrolisados H-75 e H-50 favoreceram a produção em 274,33 e 44,39%, respectivamente (Figura 15). Semelhante às leveduras L62, L101 e L107, esta levedura não produziu etanol. A produção de glicerol foi detectada apenas nos hidrolisados H-75 e H-100, com produção de 2,16 e 0,51 g/L, respectivamente.

Avaliando os gráficos da Figura 15 pode-se observar que apenas a levedura L95 foi capaz de produzir etanol, embora em pequena quantidade. Tal comportamento era esperado uma vez que a literatura indica que as leveduras L62, L101, L107 e L109 não são capazes de fermentar glicose (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Em pesquisa realizada recentemente, foi detectada a produção de etanol pela levedura L95 em caldo Sabouraud, rico em glicose (CHAUD, 2014). A produção de etanol apenas no hidrolisado não diluído (H-100) e em M.S.D, pode estar relacionado a concentração de glicose no meio,sendo que a concentração deste açúcar nestes meios de cultivo são maiores do que nos demais.

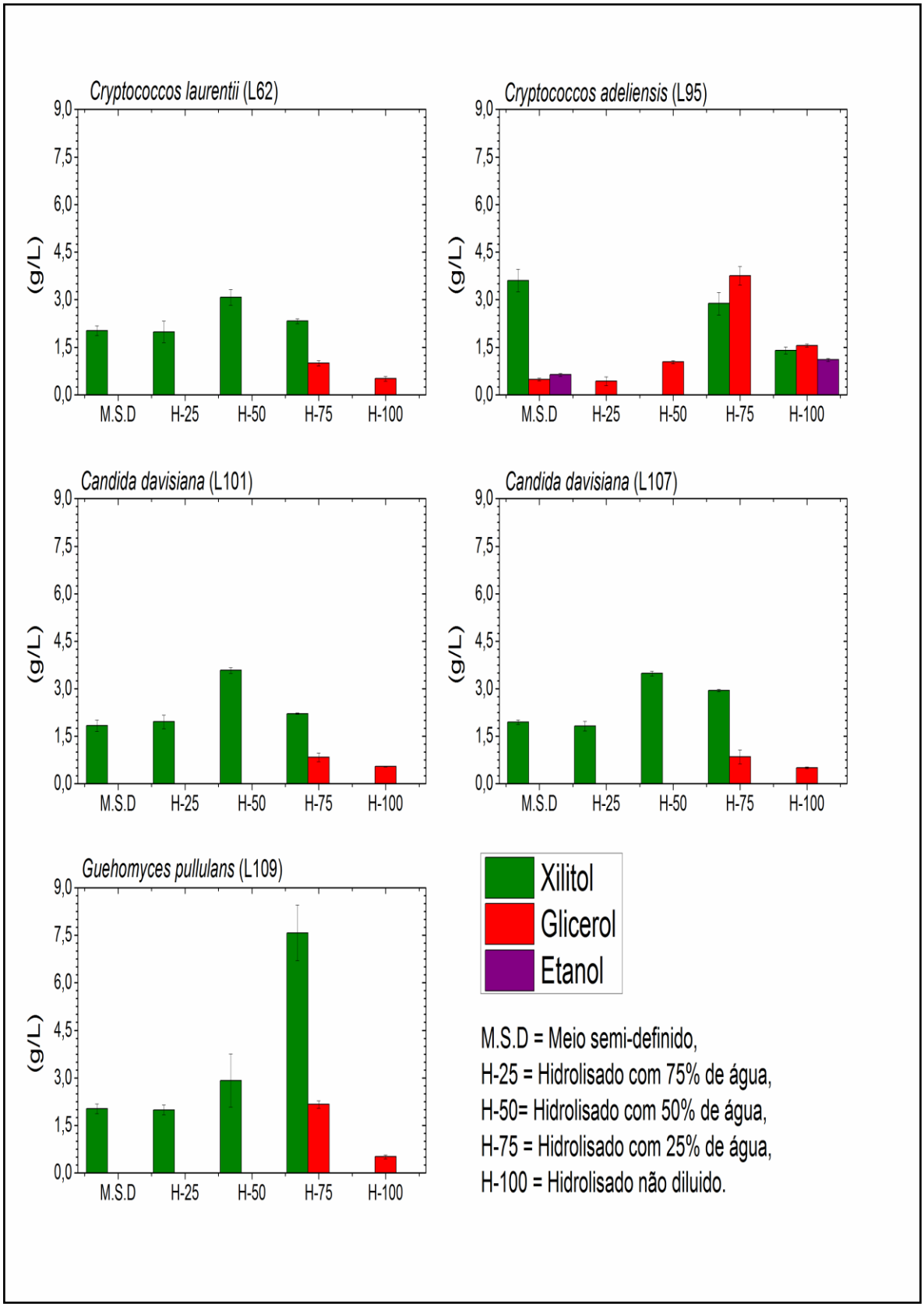
Quanto ao xilitol foi observado na Tabela 5 que o hidrolisado H-100, não diluído, portanto com maior concentração de compostos tóxicos, ácido acético (2,89 g/L) e fenólicos totais (0,84 g/L), inibiu completamente a obtenção deste produto pelas leveduras L62, L101, L107 e L109, ao contrário da levedura L95 que foi capaz de produzir xilitol neste hidrolisado. Também foi observado que todas as leveduras produziram xilitol no hidrolisado H-75 e em M.S.D, e que apenas a levedura L95 não foi capaz de produzir xilitol nos hidrolisados H-50 e H-25. Embora não existam pesquisas avaliando o efeito dos

compostos tóxicos sobre as leveduras estudadas no presente trabalho, é sabido que concentrações acima de (3 g/L) de ácido acético são capazes interferir negativamente na bioconversão de xilose em xilitol para *Candida guilliermondii* (FELIPE et al., 1995) e que concentrações de fenólicos totais acima de 0,1 g/L podem causar inibição da assimilação de xilose para mesma levedura (VILLA et al., 1998), podendo comprometer a produção de xilitol.

Para glicerol, foi observado que as leveduras L62, L101, L107 e L109 foram capazes de produzir este bioproduto em hidrolisados H-75 e H-100, sendo que a presença deste não foi verificado em trabalhos anteriores (APOLINARIO, 2014; CHAUD, 2014). Quanto à levedura L95 foi detectada a obtenção deste produto em todos os meios de cultivo avaliados. Chaud, (2014) também detectou a produção de glicerol por esta levedura, porém em caldo Sabouraud. O glicerol pode ser encontrado como um co-produto da fermentação em leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; MAIORELLA; BLANCH; WILKE, 1983) e *Candida guilliermondii* (ARRUDA; FELIPE, 2009; ARRUDA et al., 2011).

É importante salientar que os resultados obtidos apresentam um avanço na compreensão do comportamento dessas leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a obtenção de bioprodutos. Em pesquisa realizada previamente com estas leveduras não foi verificada a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico (APOLINARIO, 2014) e este comportamento pode estar fortemente relacionado aos compostos tóxicos existentes neste meio, uma vez que no presente trabalho a produção de xilitol só foi observada (na maioria das leveduras) quando houve diluição dos açúcares, bem como dos compostos tóxicos, com água destilada.

Figura 15 - Obtenção de bioprodutos pelas leveduras xilanolíticas da Antártica, em diferentes concentraçõe de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e em M.S.D após 48h de cultivo.



Fonte: Arquivo próprio

5.5 AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DE EXTRATO DE FARELO DE ARROZ, CLORETO DE CÁLCIO E SULFATO DE AMÔNIO SOBRE O CONSUMO DE XILOSE E PRODUÇÃO DE XILITOL PELA LEVEDURA *Guehomyces pullulans*

Considerando que, dentre as cinco leveduras xilanolíticas estudas, a espécie *Guehomyces pullulans* apresentou o melhor perfil de consumo de xilose e crescimento celular estável, foram realizados experimentos visando avaliar a influência da variação de nutrientes sobre o consumo de xilose e o fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s). Desta forma foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3, incluindo 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 18 ensaios. A Tabela 7 apresenta os valores utilizados no planejamento e a Tabela 8 o resultado do consumo de xilose e Yp/s de xilitol para cada ensaio.

De acordo com a matriz do DCCR apresentada na Tabela 8, o maior consumo de xilose (56,29%), foi observado no ensaio 13, no qual as concentrações de nutrientes foram de 0,14, 2,55 e 48,5 g/L, respectivamente. Para Cloreto de cálcio, Sulfato de amônio e extrato de farelo de arroz**.**

Tabela 7 - Codificação dos níveis para as variáveis $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Extrato de Farelo de Arroz (E.F.A) no consumo de xilose e fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE), para o planejamento estatístico com a levedura *Guehomyces pullulans.*

Variáveis	**Níveis**				
	-1,68	**-1**	**0**	**1**	**1,68**
X1 = $CaCl_2$ (g/L)	0,039	0,08	0,14	0,20	0,24
X2 = $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	0,114	1,1	2,55	4	4,99
X3 = E.F.A (g/L)	6,5	15	27,5	40	48,5

Tabela 8 - Matriz do planejamento composto central rotacional (valores codificados) com suas respectivas respostas, consumo de xilose e fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s), após 72h de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, com a levedura *Guehomyces pullulans*.

Ensaios	Níveis reais			Respostas	
	X1 - $CaCl_2$	X2 - $(NH_4)_2SO_4$	X3 - E.F.A	Consumo de Xilose (%)	Yp/s Xilitol (g/g)
1	1	1	1	42,11	0,10
2	-1	1	1	42,81	0,08
3	1	-1	1	37,89	0,10
4	-1	-1	1	36,30	0,09
5	1	1	-1	28,92	0,11
6	-1	1	-1	31,02	0,29
7	1	-1	-1	24,95	0,13
8	-1	-1	-1	20,24	0,21
9	1,68	0	0	41,32	0,19
10	-1,68	0	0	32,17	0,30
11	0	1,68	0	39,87	0,25
12	0	-1,68	0	9,43	0,00
13	0	0	1,68	56,29	0,07
14	0	0	-1,68	29,08	0,22
15*	0	0	0	32,81	0,21
16*	0	0	0	34,19	0,15
17*	0	0	0	31,10	0,24
18*	0	0	0	32,14	0,21

* Ponto central, E.F.A =Extrato de farelo de arroz.

Nas figuras 16, 17 e 18 é apresentado o consumo dos açúcares: xilose, glicose e arabinose, bem como o consumo de ácido acético e produção de xilitol realizado sob diferentes suplementações, feitas de acordo com a Tabela 8. Avaliando o consumo de xilose, foi observado que todos os pontos axiais positivos (Ensaios 9,11 e 13) favoreceram o consumo desta pentose (Tabela 8, Figuras 17 e 18), sendo que, dentre eles, o melhor resultado foi no ensaio 13. Nos ensaios 1 e 2, que possuem níveis +1 para sulfato de amônio e extrato de farelo de arroz, também foi observado maior consumo de xilose. Por outro lado, foi observado que nos ensaios 7 e 8, com níveis -1 para Extrato de farelo e $(NH_4)_2SO_4$ o consumo de xilose foi menor. O menor consumo de xilose registrado ocorreu no ensaio 12, com menor concentração de Sulfato de Amônio (Tabela 8). Desta forma conclui-se que a levedura L109 necessita de maiores concentrações de nutrientes para consumir xilose, notadamente $(NH_4)_2SO_4$ e E.F.A. É importante destacar que a utilização deste planejamento experimental possibilitou o favorecimento do desempenho desta levedura, com o aumento no consumo de xilose no valor de 43,68% em relação aos ensaios referentes ao item 5.4.1, que tratam do consumo de açúcares, como a xilose. Este favorecimento observado no presente trabalho resultou também em uma melhoria no

consumo de xilose por esta levedura, quando comparado com pesquisas anteriores (APOLINARIO, 2014).

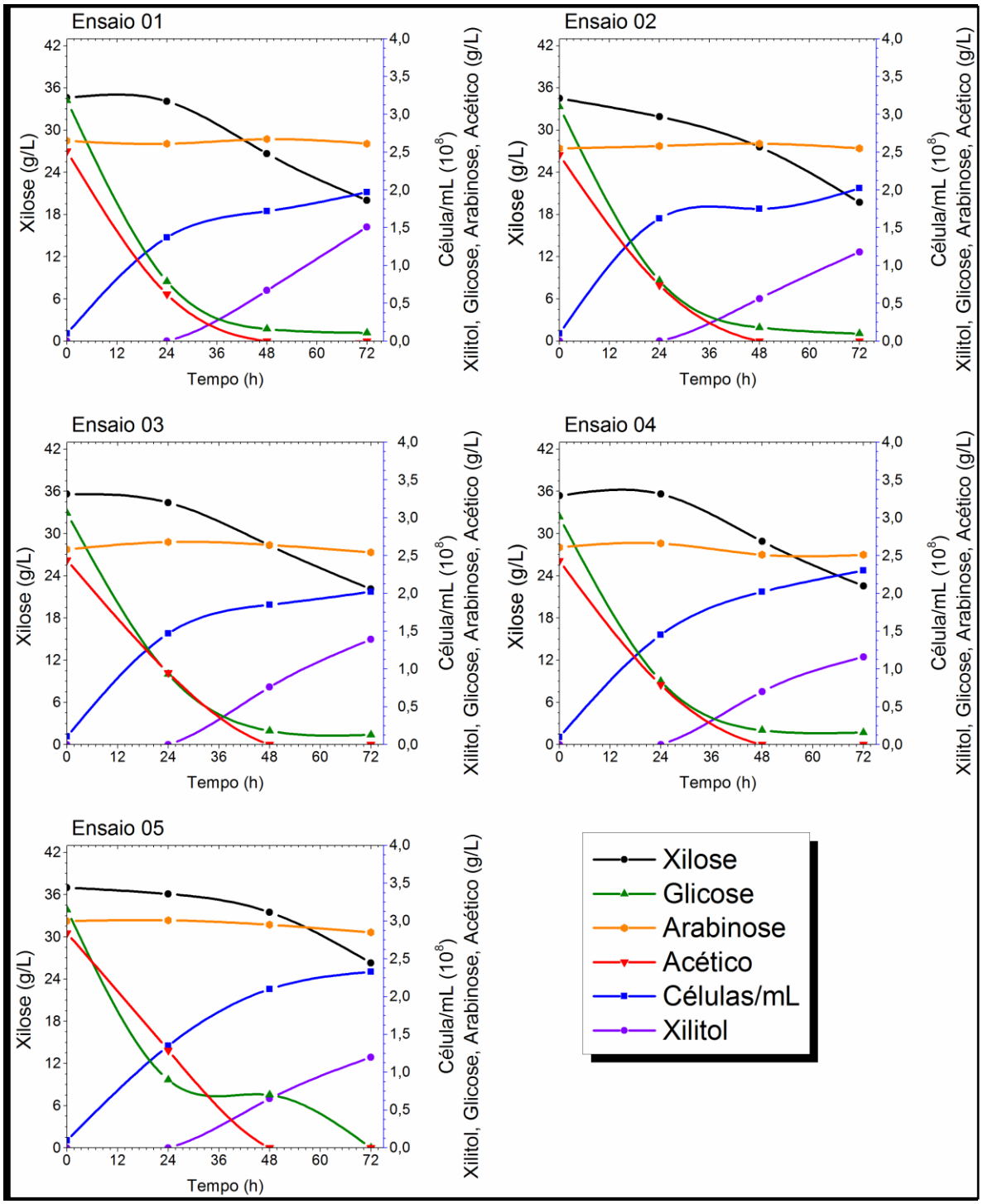
Quanto à arabinose, seu maior consumo 17,79,% ocorreu coincidentemente no mesmo experimento que favoreceu o consumo de xilose (Ensaio 14). Desta forma, conclui-se que a concentração de 48,5 g/L de extrato de farelo de arroz favorece a assimilação de ambas as pentoses. Segundo Manosroi et al., (2010) o extrato de farelo de arroz é rico em vitaminas e lipídios que podem ser utilizados como fonte de nutrientes, como o gênero Guehomyces já foi identificado anteriormente como lípase positiva (DUARTE et al., 2013).

Nota-se também que em todos os ensaios houve uma rápida queda na concentração de ácido acético e glicose, sendo que nas primeiras 24h foi observado um consumo, em média, de 63,12±7,81% e 71,92±5,85% de ácido acético e glicose respectivamente. Foi observado também que, independentemente do ensaio, o ácido acético foi consumido totalmente em 48h, diferentemente da glicose, cujo consumo foi de 93,1±7,1%. No tempo 72h, foi observado que a glicose foi totalmente consumida, exceto nos ensaios 1 a 4.

Como discutido no item 5.5, o ácido acético pode ser utilizado pelas leveduras como fonte de carbono, entrando no ciclo de Krebs via Acetil-Coa (FELIPE et al., 1995; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b), e sua característica de consumir rapidamente este composto tóxico pode ser interessante para processos de destoxificação biológica (LAKSHMANASWAMY et al., 2011; SCHNEIDER, 1996; SILVA et al., 2004). Para glicose, seu rápido consumo nas primeiras 24h era esperado, uma vez que a glicose é uma fonte de carbono preferencial para leveduras (YAHASHI et al., 1996).

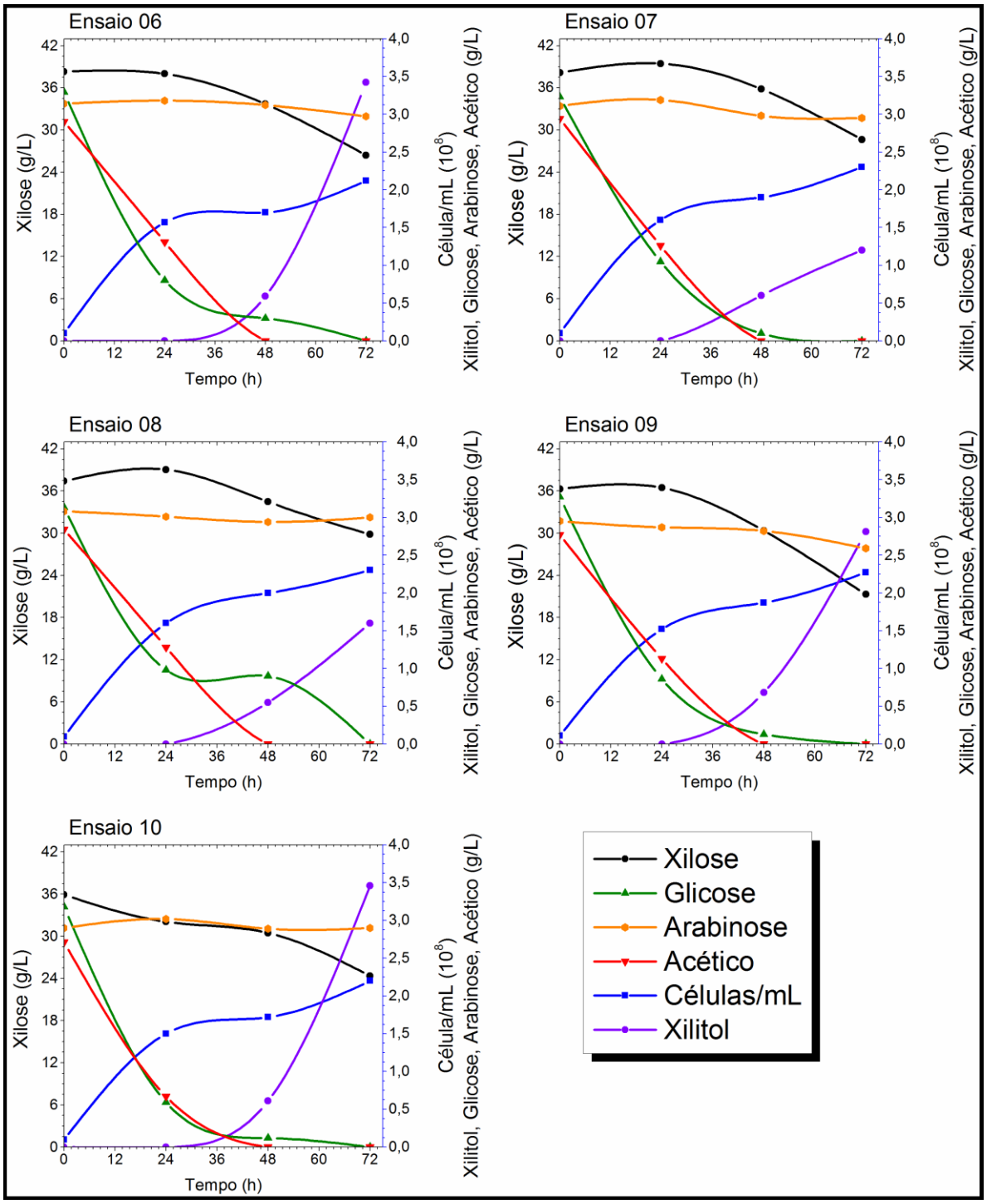
Ainda em relação às Figuras 16, 17 e 18 pode-se observar que os melhores resultados para crescimento celular ocorreram nos pontos centrais (Ensaios 15, 16, 17 e 18) com concentração celular final de $2{,}63x10^8 \pm 0{,}05x10^8$, nos demais ensaios este valor em média foi de $2{,}2x10^8 \pm 0{,}2x10^8$, indicando que a variação de nutrientes na suplementação surtiu pouco efeito sobre o crescimento celular desta levedura. Em se tratando do bioproduto xilitol, foi observada a sua produção após 24h em quase todos os ensaios, exceto no 12. As maiores concentrações de xilitol foram encontradas nos ensaio 6, 10 e 11 com 3,42, 3,46 e 3,73 g/L, respectivamente, sendo que o valor de Yp/s para cada ensaio foi de 0,288, 0,3 e 0,248 respectivamente.

Figura 16 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 1 a 5 de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz.



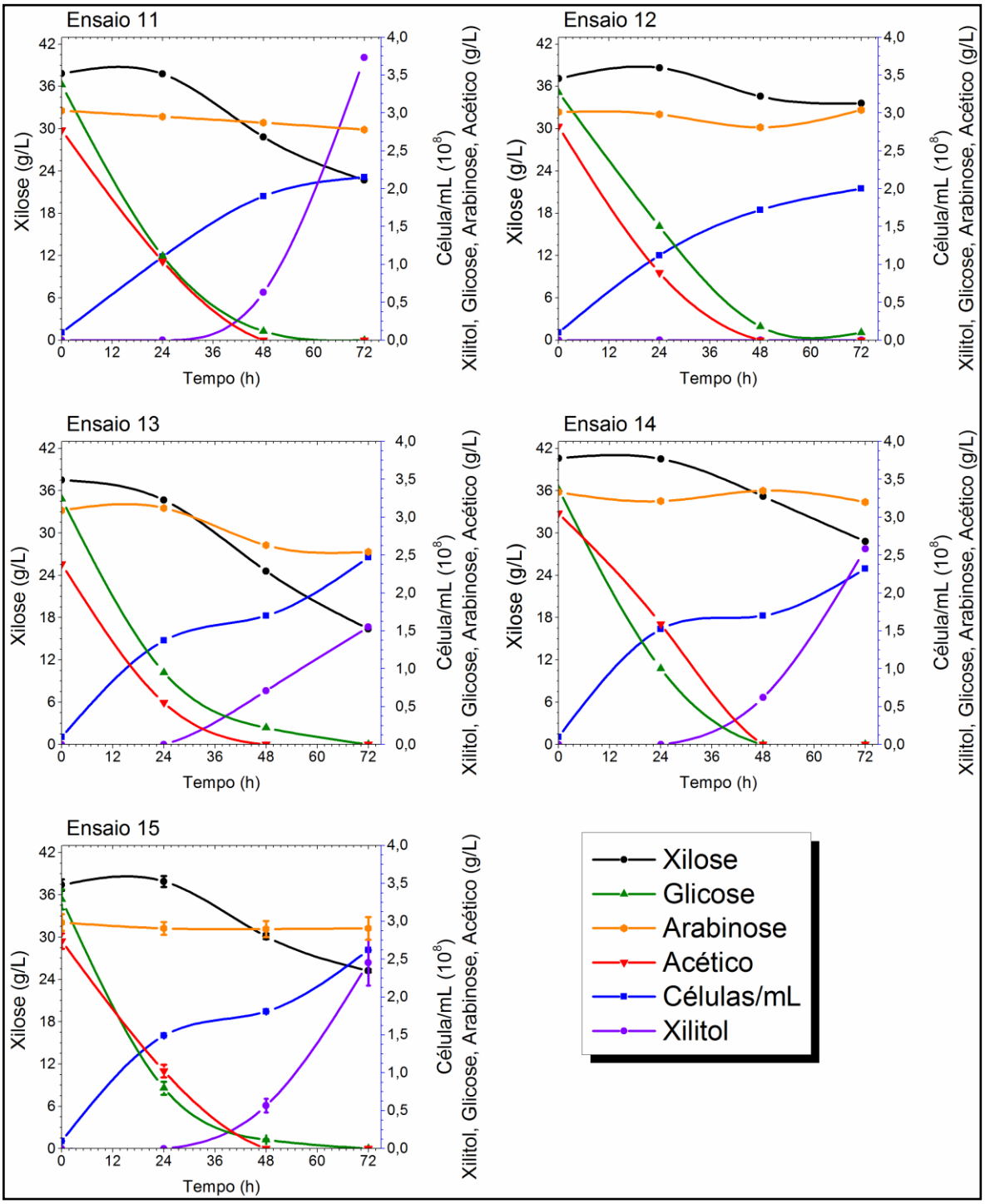
Fonte: Arquivo próprio

Figura 17 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 6 a 10 de acordo com Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz.



Fonte: Arquivo próprio

Figura 18 - Concentração dos açúcares, xilose, glicose e arabinose, ácido acético, crescimento celular e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (H-PE) pela levedura *Guehomyces pullulans* (L109) para os ensaios 11 a 15 de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das variáveis: $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$ e Farelo de arroz.



Fonte: Arquivo próprio

A fim de avaliar as respostas obtidas através dos ensaios (Tabela 8), na Tabela 9 são apresentadas as estimativas dos efeitos, erros-padrão e teste *t* de Student para as respostas consumo de xilose e Yp/s. Nota-se que o fator principal para o consumo de Xilose (%) foi o E.F.A (L) seguido dos fatores $(NH_4)_2SO_4$(L), E.F.A(Q) e $(NH_4)_2SO_4$(Q). Todos estes fatores foram significativos ao nível de 90% de confiança. Para a resposta Yp/s, a Tabela 9 demonstra que o principal fator foi o E.F.A (L), seguido dos fatores $CaCl_2$ (L) x E.F.A (L), $(NH_4)_2SO_4$ (Q), $(NH_4)_2SO_4$ (L) e, por último, $CaCl_2$, sendo que os efeitos de todos estes foram significativos ao nível de 90% .

Com base nesses resultados, foi realizada uma nova análise de variância (ANOVA) eliminando os termos não significativos (Tabela 10). Esta medida facilita a interpretação dos efeitos sobre o consumo de xilitol e Yp/s de xilitol, facilitando também a interpretação da superfície de resposta que será baseada em um modelo mais simples, o qual será ajustado considerando-se apenas coeficientes correspondentes a efeitos significativos.

Tabela 9 - Efeitos estimados das variáveis significativas no nível de 90% de confiança, em ordem decrescente de efeito, para o fator de conversão de substrato em produto (YP/S) e do consumo de xilose pela *Guehomyces pullulans* (L109), de acordo com planejamento DCCR.

Variável Resposta	Fonte	Efeito	Erro-Padrão	*t* (8)	p
Consumo de Xilose (%)	Média	32,64952	2,199906	14,84133	0,000000
	(X3) E.F.A (L)	14,61429	2,385973	6,12509	0,000282
	(X2) $(NH_4)_2SO_4$ (L)	11,22866	2,385973	4,70611	0,001529
	E.F.A (Q)	6,39418	2,481759	2,57647	0,032796
	$(NH_4)_2SO_4$ (Q)	-6,38684	2,481759	-2,57351	0,032947
	(X1) $CaCl_2$ (L)	2,76603	2,385973	1,15929	0,279768
	$CaCl_2$ (L) x $(NH_4)_2SO_4$ (L)	-2,27547	3,116048	-0,73024	0,486073
	$CaCl_2$ (Q)	2,18506	2,481759	0,88045	0,404290
	$CaCl_2$ (L) x E.F.A (L)	-1,00506	3,116048	-0,32254	0,755309
	$CaCl_2$ (L) x E.F.A (L)	-0,42888	3,116048	-0,13764	0,893928

Variável Resposta	Fonte	Efeito	Erro-Padrão	*t* (8)	p
Yp/s (g/g)	Média	0,204362	0,026617	7,67790	0,000059
	(X3) E.F.A (L)	-0,088670	0,028868	-3,07155	0,015312
	$CaCl_2$ (L) x E.F.A (L)	0,074216	0,037701	1,96854	0,084535
	$(NH_4)_2SO_4$ (Q)	-0,069041	0,030027	-2,29928	0,050528
	(X2) $(NH_4)_2SO_4$ (L)	0,068593	0,028868	2,37608	0,044819
	(X1) $CaCl_2$ (L)	-0,060648	0,028868	-2,10087	0,068844
	E.F.A (Q)	-0,053319	0,030027	-1,77570	0,113693
	$CaCl_2$ (L) x $CaCl_2$ (L)	-0,020032	0,037701	-0,53132	0,609626
	$CaCl_2$ (L) x E.F.A (L)	-0,018271	0,037701	-0,48464	0,640924
	$CaCl_2$ (Q)	0,015777	0,030027	0,52542	0,613537

L – Linear; Q- Quadrático, Significativo a 90% de confiança (vermelho), E.F.A =Extrato de farelo de arroz.

Tabela 10 - Análise de variância dos efeitos principais sobre o fator de conversão de substrato em produto (Yp/s) e consumo de xilose para a levedura *Guehomyces pullulans* (L109), de acordo com planejamento DCCR.

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	*F*	p
Consumo de Xilose (%)	(X2) $(NH_4)_2SO_4$ (L)	430,094	1	430,0937	26,71996	0,000181
	$(NH_4)_2SO_4$ (Q)	154,308	1	154,3085	9,58655	0,008509
	(X3) E.F.A (L)	728,556	1	728,5558	45,26219	0,000014
	E.F.A (Q)	116,253	1	116,2528	7,22231	0,018635
	Erro	209,252	13	16,0963		
R^2 = 0,87	Total	1694,367	17			

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	*F*	p
Yp/s (g/g)	(X1) $CaCl_2$ (L)	0,012547	1	0,012547	5,52130	0,038505
	(X2) $(NH4)_2SO_4$ (L)	0,016050	1	0,016050	7,06260	0,022284
	$(NH_4)_2SO_4$ (Q)	0,017243	1	0,017243	7,58781	0,018736
	(X3)E.F.A (L)	0,026820	1	0,026820	11,80211	0,005570
	E.F.A (Q)	0,010562	1	0,010562	4,64770	0,054093
	$CaCl_2$ (L) x E.F.A (L)	0,011016	1	0,011016	4,84764	0,049935
	Erro	0,024997	11	0,002272		
R^2 = 0,78	Total	0,115290	17			

L – Linear; Q- Quadrático, Significativo a 90% de confiança (vermelho), E.F.A =Extrato de farelo de arroz. SQ (soma quadrática); GL (graus de liberdade); MQ (média quadrática).

A partir desses dados foi elaborada então, uma análise de variância de regressão para o consumo de xilose e Yp/s, sendo os resultados apresentados na Tabela 11. Nota-se que os coeficientes de correlação (R^2) foram de 0,87 para o consumo de xilose e de 0,78 para Yp/s, e que o modelo foi significativo ($p < 0,004$), no entanto foi detectada uma falta de ajuste para o consumo de xilose. No entanto, como o p-valor da resposta consumo de xilose foi altamente significativo ($p < 0,0001$) foi feita a análise da superfície de resposta para o modelo.

Tabela 11 - Analise da variância de regressão para os modelos representativos das respostas.

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	*F*	p
Consumo de Xilose (%)	Modelo	1485,1147	4	371,278668	23,06602304	< 0.0001
	Resíduo	209,25249	13	16,0963451		
	Falta de Ajuste	204,22063	10	20,4220631	12,17566421	0.0318
	Erro Puro	5,031856	3	1,67728534		
R^2 = 0,87	Total	1694,3672	17			

Variável Resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	*F*	p
Yp/s (g/g)	Modelo	0,090293	6	0,01504883	6,622198931	0.0036
	Resíduo	0,0249973	11	0,00227248		
	Falta de Ajuste	0,0213832	8	0,00267291	2,218753125	0.2762
	Erro Puro	0,0036141	3	0,00120469		
R^2 = 0,78	Total	0,1152903	17			

Significativo a 90% de confiança (vermelho)

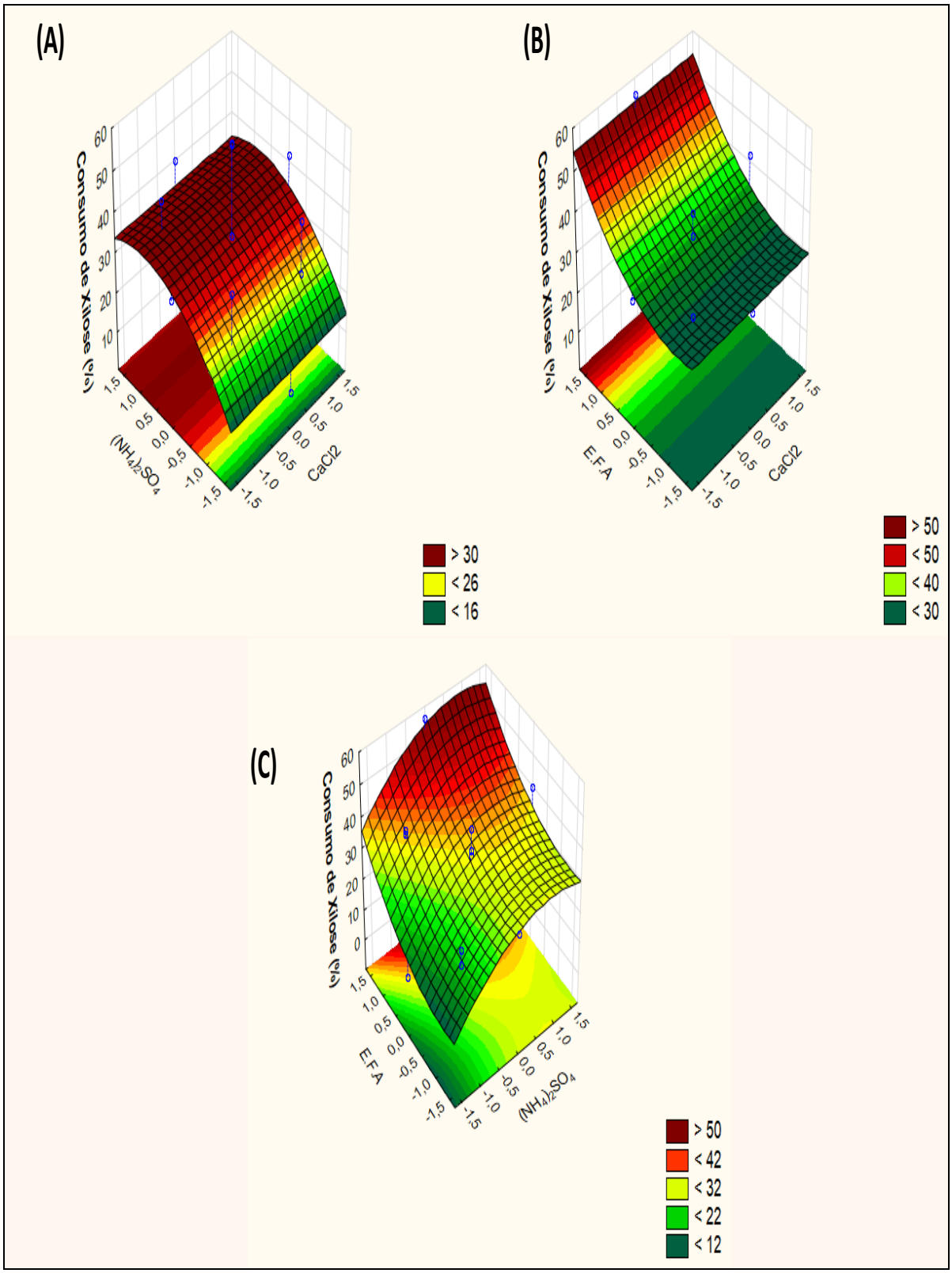
Com base nos dados obtidos da análise de variância, os modelos matemáticos para descrever o fator de conversão de substrato em produto (Yp/s) e o consumo de xilose na região em estudo, são apresentados nas Equações (8) e (9), onde: X1 = $CaCl_2$, X2 = $(NH_4)_2SO_4$ e X3= Extrato de Farelo de Arroz.

$$\% \text{ Consumo} = +33{,}82 + 5{,}61(X2) + 7.31(X3) - 3{,}42(X2)^2 + 2{,}97(X3)^2 \quad (8)$$

$$Y_{ps} = +0{,}21 - 0{,}030(X1) + 0{,}034(X2) - 0{,}044(X3) + 0{,}037(X1.X2) - 0{,}036(X2)^2 - 0{,}028(X3)^2 \quad (9)$$

A partir destas equações foram geradas as curvas de nível para os modelos obtidos (Figura 19). De acordo com o predito pelo modelo (Equação 8), pode-se observar na Figura 19(A) que concentrações entre 2,55 e 4,99 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ resultaram em um consumo de xilose superior a 30%, enquanto concentrações superiores a 40,0 g/L de E.F.A favorecem o consumo de xilose, resultando um consumo em torno de 50% Figura 19(B). Na Figura 19(C) observa-se que concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ entre 2,55 e 4,99 g/L e concentração máxima de E.F.A (48,5 g/L) resultaram em uma região em que o consumo de xilose foi maior que 50%. Tal comportamento pode estar relacionado à presença de lipídios no extrato de farelo de arroz (MANOSROI et al., 2010). Possivelmente que esta levedura esteja utilizando os açúcares presentes no hidrolisado como fonte de energia para a síntese de enzimas, uma vez que esta levedura pode ser lipase positiva (DUARTE et al., 2013). Neste contexto o $(NH_4)_2SO_4$ também é de grande importância, pois para a síntese de enzimas é necessário a utilização de fontes de nitrogênio (BOYLE, 2005). Uma segunda suposição é de que esta levedura pode estar utilizando os lipídios para a produção de carotenóides, uma vez que estes são sintetizados a partir de fontes ricas em lipídios (MATA-GÓMEZ et al., 2014), como é o caso de extrato de farelo de arroz (MANOSROI et al., 2010).

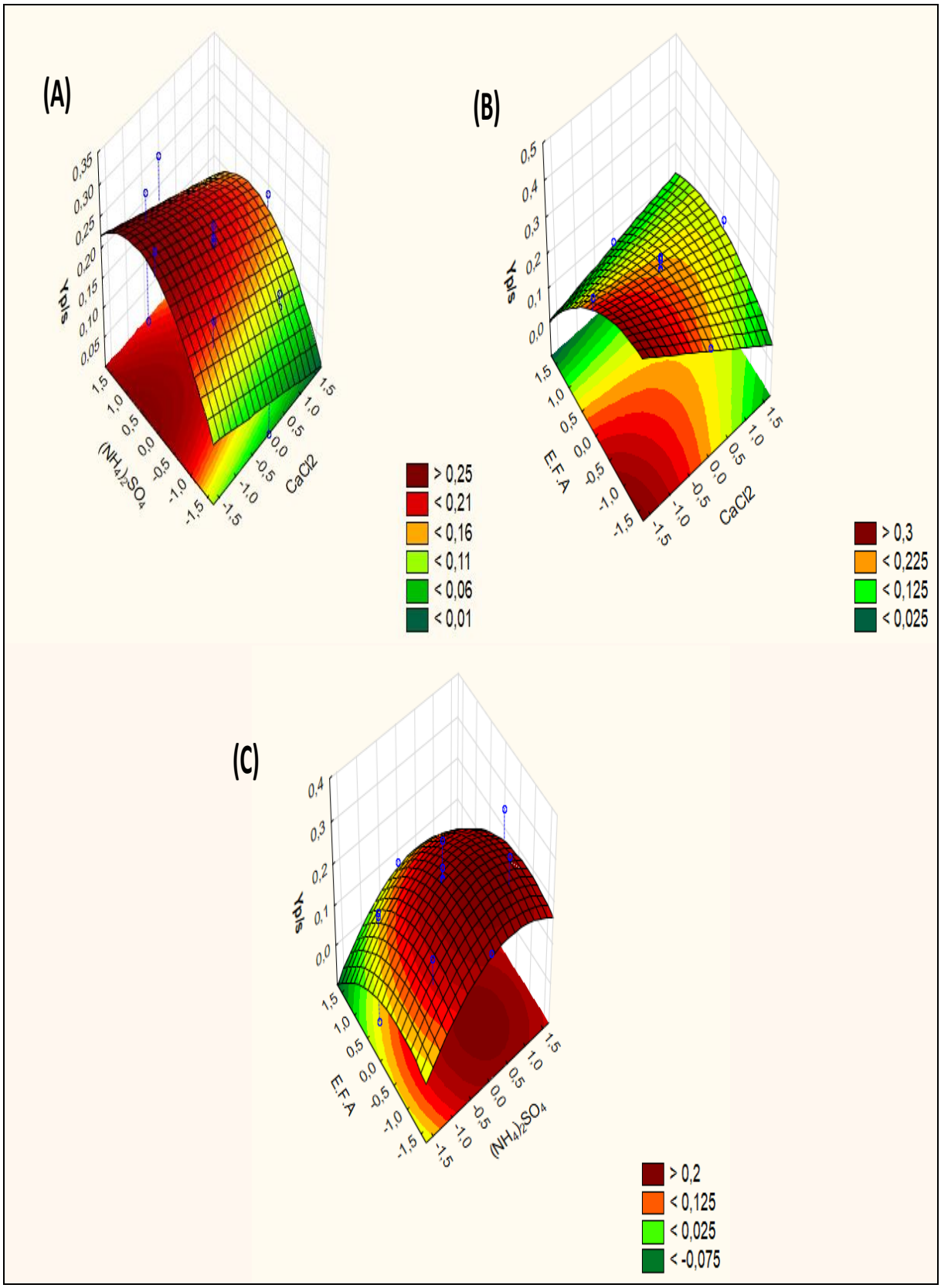
Figura 19 - Superfície de resposta para o consumo de xilose pela *Guehomyces pullulans* (L109), onde (A) = $(NH_4)_2SO_4$ x CaCl2, (B) = E.F.A X CaCl2 e (C) = $(NH_4)_2SO_4$ x E.F.A, de acordo com planejamento DCCR.



Fonte: Arquivo próprio

Para o fator conversão de substrato em de xilitol (Yp/s) foram geradas as curvas de nível para os modelos obtidos, conforme o predito pelo modelo (Equação 9). De acordo com a Figura 20 (A) e (C,) conclui-se que as concentrações de $(NH_4)_2SO_4$, 2,55 e 4,0 g/L aumentaram o Yp/s, já para $CaCl_2$ Figura 20 (A) e (B), foi observado que com menores concentrações, entre 0,039 e 0,08 g/L o fator de conversão aumentou. Por último, com relação ao extrato de farelo de arroz, Figura 20 (B) e (C), foi observado que, semelhantemente ao cloreto de cálcio, menores concentrações de E.F.A (entre 6,5 e 27,5 g/L) favoreceram o fator de conversão positivamente. É interessante observar que os valores de extrato de farelo de arroz que favorecem o consumo de xilose foram os de concentração maior, entre 40 e 48,5 g/L, enquanto que para aumentar o Yp/s é necessário reduzir a concentração do mesmo. Desta forma para esta levedura, quando o consumo de xilose é favorecido, ocorre desfavorecimento da produção de xilitol e vice versa. Quanto ao $(NH_4)_2SO_4$, a faixa de concentração (entre 2,55 e 4,0 g/L) que favoreceu o consumo de xilose também favoreceu a produção de xilitol. É possível que a redução da concentração favoreça a produção de xilitol devido ao stress causado pela baixa concentração de nutrientes.

Figura 20 - Superfície de resposta para o fator conversão de substrato em produto Yp/s pela *Guehomyces pullulans* (L109), onde (A) = $(NH_4)_2SO_4$ x CaCl2, (B) = E.F.A X CaCl2 e (C) = $(NH_4)_2SO_4$ x E.F.A, de acordo com planejamento DCCR.



Fonte: Arquivo próprio

6 CONCLUSÕES

Com relação às características que podem apresentar aplicações biotecnológicas conclui-se que:

- O consumo de açúcares foi observado em todas as leveduras sendo elas capazes de consumir a glicose totalmente, independentemente de ser meio semi-definido ou hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, já para xilose e arabinose o consumo variou de acordo com a levedura e meio empregado.
- Com relação a assimilação de compostos tóxicos, foi observado que todas as leveduras consumiram compostos fenólicos e ácido acético, nas diferentes concentrações de hidrolisado empregado.
- Quanto à morfologia celular, todas as leveduras apresentaram características semelhantes ao encontrado na literatura. Verificou-se que as leveduras L62, L101, L107 e L109 também demonstraram produção de pigmentos, possivelmente carotenóides.

- A produção de xilitol, glicerol, etanol e células, variaram de acordo com o meio de cultivo empregado bem como levedura empregada. Dentre as leveduras avaliadas a L109 é potencial para pesquisas que buscam o aproveitamento de pentoses para obtenção de bioprodutos.

Com relação à tolerância ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar conclui-se que:

- As leveduras L62, L95, L107 e L109 são mais tolerantes ao hidrolisado, uma vez que tiveram maior crescimento celular quanto cultivadas em hidrolisado do que em meio semi-definido.

Com relação ao planejamento estatístico (DCCR) que avaliou a influencia do $CaCl_2$ $(NH_4)_2SO_4$ e extrato de farelo de arroz para o cultivo da levedura L109.

- Conclui-se que este planejamento possibilitou compreender melhor a influência dos nutrientes estudados sobre o comportamento da mesma. Principalmente quanto ao favorecimento do consumo de xilose e redução na produção de xilitol quando há aumento na concentração de extrato de farelo arroz.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

A partir do presente estudo são sugeridos os seguintes temas para desenvolvimento em trabalhos futuros:

- Produção de carotenóides pelas leveduras L62, L101 L107 e L109 em hidrolisados hemicelulósicos;

- Consumo de compostos fenólicos pelas leveduras estudadas no presente trabalho, em baixas temperaturas, visando aplicações ecológicas;

- Avaliação do potencial das leveduras L62, L101 L107 e L109 quanto à destoxificação biológica de hidrolisados hemicelulósicos;

- Avaliação dos fatores que induzem ou reprimem a assimilação de arabinose pelas leveduras xilanolíticas da Antártica.

REFERÊNCIAS

ABIGAIL, E. A.; SALAM, J. A.; DAS, N. Atrazine degradation in liquid culture and soil by a novel yeast *Pichia kudriavzevii* strain Atz-EN-01 and its potential application for bioremediation. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 06, p. 35–43, 2013.

ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340–349, abr. 2007.

ALVES, L. A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 89–98, mar. 1998.

APOLINARIO, M. D. F. **Avaliação do cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de leveduras xilanolíticas isoladas da Antártica.** 2014. 81p. Dissertação Departamento de Biotecnologia Escola de Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

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. 163p. Tese: (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2011.

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

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.

BECKER, J.; BOLES, E. A Modified *Saccharomyces cerevisiae* strain that consumes L - arabinose and produces Ethanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4144–4150, 2003.

BEG, Q. K. et al. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 3-4, p. 326–338, 1 ago. 2001.

BERGAUER, P. et al. Biodegradation of phenol and phenol-related compounds by psychrophilic and cold-tolerant alpine yeasts. **Chemosphere**, v. 59, n. 7, p. 909–18, 2005.

BIELY, P.; PUCHART, V. Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 11, p. 1636–1647, 2006.

BINOD, P. et al. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767–74, jul. 2010.

BOBLETER, O. BOBLETER, Ortwin. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Progress in Polymer Science**, v. 19, n. 5, p. 797–841, 1994.

BOGATI, D. R. Cellulose based biochemicals and their applications. **2011, p. 37 Bachelor thesis (Degree Programme in Paper Technology) – Saimaa University of Applied Sciences, Imatra (2011).**

BOYLE, J. Lehninger principles of biochemistry (4th ed.): Nelson, D., and Cox, M. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 33, n. 1, p. 74–75, jan. 2005.

BRASIL. **Pecuária e Abastecimento. Cana-de-açucar**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em: 21 mar. 2014.

BÜCHERT, J.; PULS, J.; POUTANEN, K. The use of steamed hemicellulose as substrate in microbial conversions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 20, 1989.

BUZZINI, P. et al. Psychrophilic yeasts from worldwide glacial habitats: diversity, adaptation strategies and biotechnological potential. **Fems Microbiol Ecology**, v. 82, n. 2, p. 217–241, 27 nov. 2012.

CANILHA, L. et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 2, p. 333–6, abr. 2008.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1-8, p. 84–92, 2010.

CANILHA, L. et al. Bioconversion of Hemicellulose from Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. InTech, 2013.

CARVALHEIRO, F. et al. 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, R. J. et al. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de- açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado. **Revista Analytica**, v. 18, n. 12, p. 48–55, 2005.

CHANDEL, A. K. et al. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the polymerization of hemicellulose: state-of-the-art. In: **D-Xylitol**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 39–61.

CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production Biofuel Production. **Developments and Prospects**. 2011. p. 225-246.

CHAUD, L. C. S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2010.

CHAUD, L. C. S. **Estabelecimento de condições de cultivo de leveduras isoladas da Antáritca visando à produção de proteases**. 2014. 124 p. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

COSTA, W. L. S.; BOCCHI, M. L. DE M. Aplicações do bagaço da cana-de-açúcar utilizadas na atualidade. **Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 1, 2011.

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã**. 2014. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2014.

ARRUDA, P. V et al. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 4, p. 815–822, 2011.

DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae, Zymomonas mobilis, Pichia stipitis,* and *Candida shehatae.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 3, p. 220–225, 1996.

DUARTE, A. W. F. et al. Taxonomic assessment and enzymes production by yeasts isolated from marine and terrestrial Antarctic samples. **Extremophiles**, v. 17, n. 6, p. 1023–1035, 2013.

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

FELIPE, M. G. A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii.* **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 251–254, 1997.

FELL, J. W. Reassignment of the basidiomycetous yeasts *Trichosporon pullulans* to *Guehomyces pullulans* gen. nov., comb. nov. and *Hyalodendron lignicola* to *Trichosporon lignicola* comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 995–998, 1 maio 2004.

FENSKE, J. J.; GRIFFIN, D. A; PENNER, M. H. Comparison of aromatic monomers in lignocellulosic biomass prehydrolysates. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 364–368, 1 jun. 1998.

FERRAZ, A. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by drift spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201–212, set. 2000.

FONSECA, C. et al. L-Arabinose transport and catabolism in yeast. **FEBS Journal**, v. 274, n. 14, p. 3589–3600, 2007.

GONG, C. S. et al. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 85–102, jan. 1983.

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

GREENBANK, M.; SPOTTS, S. Effects of starting material on activated carbon characteristics and performance. **Information Bulletin IB-1017-06/95, Calgon Corporation, Pitttsburgh**, p. 1–13, 1995.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of Xylose Fermentation by Yeasts Enzyme and Microbial Technology. **Enzyme Microbial Technology** 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 937–53, abr. 2007.

HARMSEN, P. et al. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass. **Bio Synergy**, v. 1, n. September, p. 1–49, 2010.

KELLY, C. et al. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 97–108, 2008.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, nov. 2004.

KRASTANOV, A.; ALEXIEVA, Z.; YEMENDZHIEV, H. Microbial degradation of phenol and phenolic derivatives. **Engineering in Life Sciences**, v. 13, n. 1, p. 76–87, 2013.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009a.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 15 abr. 2009b.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The Yeasts - A Taxonomic Study.** Springer, 2005.

LAKSHMANASWAMY, A. et al. Microbial removal of acetate selectively from sugar mixtures. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1477–1484, 2011.

LAL, B.; SARMA, P. M. **Wealth From Waste: Third Edition**. Teri Press, 2011.

LARA, C. A et al. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 105, n. 6, p. 1107–1119, 2014.

LARSSON, S. et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3-4, p. 151–159, fev. 1999.

LARSSON, S. et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 617–632, 2000.

LEE, S. Y. Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology. **Biotechnology Journal**, v. 8, n. 1, p. 13–14, 9 jan. 2013.

LIBKIND, D.; VAN BROOCK, M. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 7, p. 687–692, 7 mar. 2006.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.* **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103–21, jan. 1983.

MANOSROI, A. et al. Biological activities of the rice bran extract and physical characteristics of its entrapment in niosomes by supercritical carbon dioxide fluid. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, n. 2, p. 137–144, 2010.

MARGESIN, R.; MITEVA, V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 162, n. 3, p. 346–61, abr. 2011.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol.** 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2002.

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

MARZZOCO, A.; TORRES, B. **Bioquímica Básica**. 3ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 2007.

MATA-GÓMEZ, L. C. et al. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. **Microbial Cell Factories**, v. 13, p. 12, jan. 2014.

MORAIS, J.; ROSA, M. DE F.; MARCONCINI, J. **Procedimentos para Análise Lignocelulósica**. Embrapa Algodão. p.54, 2010.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 5, n. 28, p. 34–39, 2002.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 3801–3806, 2005.

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

NARENDRANATH, N. V.; POWER, R. Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2239–2243, 2005.

ONOFRI, S. et al. Evolution and adaptation of fungi at boundaries of life. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 11, p. 1657–1664, jan. 2007.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates. I: Inhibition and Detoxification Bioresource Technology**, 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, ago. 2000b.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 203–212, set. 1998.

PAVLOVA, K. et al. Phytase from antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL27. **Folia Microbiologica**, v. 53, n. I, p. 29–34, 2008.

PAVLOVA, K. et al. Synthesis and characterization of an exopolysaccharide by antarctic yeast strain *Cryptococcus laurentii* AL100. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 1038–1052, 2011.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiology : Concepts and Applications**. Mcgraw, 1993.

PÉREZ, A. F. H. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular**. 2015. 129p. Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) – Departamento de Biotecnologia Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, 2015.

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

RAMIRES, E. C. **Biocompósitos a partir de matrizes poliméricas baseadas em lignina , tanino e glioxal reforçadas com fibras naturais**. 2010. 272 p. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RAY, M. K. et al. Extracellular protease from the antarctic yeast extracellular protease from the antarctic yeast *Candida humicola*. v. 58, n. 6, 1992.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 15–21, 1991a.

ROBERTO, I. C. et al. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p. 271–275, jan. 1991b.

ROBERTO, I. C. C. et al. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, n. 1, p. 339–347, mar. 1996.

RODRIGUES, M. ISABEL; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos.** Casa do Pão Editora, 2014.

RODRIGUES, R. DE C. L. B. et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1247–1253, 2010.

RUSINOVA-VIDEVA, S.; PAVLOVA, K.; GEORGIEVA, K. Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharide from antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL 62. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. sup1, p. 80–84, jan. 2011.

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

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SATYANARAYANA, T.; KUNZE, G. **Yeast Biotechnology**. Dordrecht: Springer: Springer, 2009. v. 78

SCHELLER, H. V; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review Plant of Biology**, v. 61, p. 263–289, 2010.

SCHNEIDER, E. **Adsorção de compostos fenólicos sobre carvão ativado**. Dissertação (Mestrado Engenharia Química– Programa de Pós-Graduação Desenvolvimento de Processos) – Departamento de Química da Unoeste. Toledo, 2008.

SCHNEIDER, H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 2, p. 94–98, 1996.

SCORZETTI, G. et al. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 77, n. 2, p. 153–157, 2000.

SENE, L. et al. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1141–1146, set. 2011.

SHAW, A J. et al. Anaerobic detoxification of acetic acid in a thermophilic ethanologen. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2015.

SILVA, D. et al. Adaptation of *Scheffersomyces Stipitis* cells as a strategy to the improvement of ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Chemical Engineering**, v. 38, p. 427–432, 2014a.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, 2014b.

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

SILVA, V. F. N. DA. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico .**113 p. Dissertação (Mestrado em Conversão de Biomassa) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2009.

SILVA, R. et al. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661–671, 2009.

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

SILVA, D. D. V et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 248–254, 2004.

SIMÕES, C. O.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**. 5ed. ed. Florianópolis.

SONG, C. et al. Galactosidase production by the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulan*s 17-1 isolated from sea sediment in Antarctica and lactose hydrolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 33, p. 1025–1031, 2010.

TAHERZADEH, M.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bio Resources**, v. 2, n. 2007, p. 472–499, 2007.

TAVARES, J. M. et al. Phosphate limitation stress induces xylitol overproduction by *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Microbiology.,** v. 171, p. 115–120, 1999.

TINTELNOT, K.; LOSERT, H. Isolation of *Cryptococcus adeliensis* from clinical samples and the environment in Germany. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 1007, 2005.

TURKIEWICZ, M. et al. A cold-adapted extracellular serine proteinase of the yeast *Leucosporidium antarcticum*. **Extremophiles : Life Under Extreme Conditions**, v. 7, n. 6, p. 435–42, dez. 2003.

VAN VLEET, J. H.; JEFFRIES, T. W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300–6, jun. 2009.

VAN WALSUM, G. P. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, p. 317–329, 2001.

VASILEVA-TONKOVA, E. et al. Ecophysiological properties of cultivable heterotrophic bacteria and yeasts dominating in phytocenoses of Galindez Island, maritime Antarctica. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 1387–98, 2014.

VELÁZQUEZ, E. et al. Ultrastructural and chemotaxonomic analysis of a xylanolytic strain of *Cryptococcus adeliensis* isolated from sheep droppings in Spain. **Archives of Microbiology**, v. 186, p. 195–202, 2006.

VERHO, R. et al. A Novel NADH-linked L-Xylulose Reductase in the L-Arabinose Catabolic Pathway of Yeast. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 15, p. 14746–14751, 2004.

VILLA, P. et al. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biochemical Engineering Science.**, 1998.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; STRINGUETA, P. C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 1, p. 157–166, 2009.

WIEDEMANN, B.; BOLES, E. Codon-optimized bacterial genes improve L-arabinose fermentation in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 7, p. 2043–2050, 2008.

XU, J. L. et al. Enhanced galactosidase production from whey powder by a mutant of the psychrotolerant yeast *Guehomyces pullulans* 17-1 for hydrolysis of lactose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 599–611, 2012.

YAHASHI, Y. et al. Production of xylitol from d-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of d-glucose feeding. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 148–152, 1996.

YALÇIN, H. T.; ÇORBACI, C.; UÇAR, F. B. Molecular characterization and lipase profiling of the yeasts isolated from environments contaminated with petroleum. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 85–92, 2014.

YANG, Q. et al. Extracellular enzyme production and phylogenetic distribution of yeasts in wastewater treatment systems. **Bioresource Technology**, v. 129, p. 264–273, 2013.

YURKOV, A. M. et al. Pigmented basidiomycetous yeasts are a promising source of carotenoids and ubiquinone Q10. **Microbiology**, v. 77, n. 1, p. 1–6, 19 jan. 2011.

ZAKY, A. S. et al. Marine yeast isolation and industrial application. **FEMS Yeast Research**, v. 14, p. 1–13, 2014.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 65, n. 1, p. 24–33, 5 out. 1999.

ZEFERINO, I. A. D. M. **Identificação de compostos inibidores presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal e seus efeitos sobre a produção de etanol por *Pichia stipitis***. 218 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

ZHAO, W.; CAI, Z. C.; XU, Z. H. Does ammonium-based N addition influence nitrification and acidification in humid subtropical soils of China. **Plant and Soil**, v. 297, p. 213–221, 2007.