UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

SABRINA EVELIN MARTINIANO

**Potencial fermentativo das leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e
Spathaspora arborariae UFMG-HM 19.1A para a produção de etanol de segunda geração**

Lorena
2013

SABRINA EVELIN MARTINIANO

**Potencial fermentativo das leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e
Spathaspora arborariae UFMG-HM 19.1A para a produção de etanol de segunda geração**

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

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão Original

Lorena

2013

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

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Martiniano, Sabrina Evelin

Potencial fermentativo das leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A para a produção de etanol de segunda geração / Sabrina Evelin Martiniano. – 2013.

103 p. : il.

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

Orientador: Silvio Silvério da Silva

1. *Candida shehatae* 2. *Spathaspora arborariae* 3. Etanol de segunda geração
4. Fermentação de D-xilose. I. Título. II. Silva, Silvio Silvério da, orient.

662.636 - CDU

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional, orientação, confiança e paciência ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca e ao Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa, pelo fornecimento e oportunidade de estudo com as leveduras *Candida shehatae* e *Spathaspora arborariae*, respectivamente, utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Dr. Messias Borges Silva, pela gentileza e paciência ao me auxiliar nas análises estatísticas deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Biotecnologia, que contribuíram direta e indiretamente para meu desenvolvimento intelectual, profissional e pessoal, em especial ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pelos conselhos e pela paciência.

Aos funcionários da USP, em especial ao Nicamor, pela boa vontade com que sempre me ajudou.

À Ivy, Kelly, Raquel, Ellen, Anuj, pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Weriton, pela atenção e boa vontade com que me ajudou.

Aos meus amigos, Samira, Luma, Danielle, Eduardo, Bruna, pela ajuda e também pelos momentos de descontração.

A todos os colegas que fiz no laboratório e na USP como um todo, que estiveram presentes durante o desenvolvimento deste trabalho: Juliana, Natalya, Aline, Maurício, Bruno, Giovanna, Samuel, Thais, Felipe, Anna, Paulo, Adriana, Cris, Samira, Larissa, Daniel, Wagner e tantos outros, não menos importantes, que não haveria espaço suficiente neste trabalho para descrever sua importância.

À Tainá, por sempre me ouvir e me fazer sorrir mesmo diante dos problemas.

Ao Rafael, por todo o apoio, carinho e dedicação imensuráveis, obrigada por sempre acreditar em mim.

À minha mãe e a toda a minha família, por todo o carinho, incentivo, paciência e apoio durante toda a minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro.

“O valor de nossas vidas não é pelo que aparentamos ser, mas pelo que fizemos e sabemos.”

Autor desconhecido

RESUMO

MARTINIANO, S. E. **Potencial fermentativo das leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A para a produção de etanol de segunda geração.** 2013. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

O etanol de segunda geração é produzido a partir da hidrólise da biomassa vegetal, liberando os açúcares presentes em sua estrutura com sua subsequente fermentação. Entretanto, um dos desafios em sua produção é a baixa diversidade de microrganismos capazes de fermentar eficientemente a D-xilose, principal açúcar no hidrolisado hemicelulósico. Este trabalho avaliou o potencial fermentativo de novas linhagens das leveduras *Candida shehatae* e *Spathaspora arborariae* para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Foram avaliadas quatro linhagens de *C. shehatae* em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose) e, posteriormente, em hidrolisado hemicelulósico. A levedura *C. shehatae* CG8-8BY apresentou o melhor desempenho fermentativo em hidrolisado. Após esta etapa, avaliou-se o efeito da suplementação do meio na fermentação de D-xilose por *C. shehatae* CG8-8BY e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A. O extrato de farelo de arroz na concentração de 20 g/L demonstrou ser uma fonte de nitrogênio eficiente e de baixo custo para a suplementação de hidrolisado hemicelulósico. Por último, foi estudado o efeito da temperatura, agitação e pH na fermentação de hidrolisado hemicelulósico por meio de planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central, para as duas leveduras. Todos os experimentos foram conduzidos em incubadora de bancada. De acordo com os resultados, o pH é o parâmetro mais relevante para a produção de etanol pelas linhagens estudadas, seguido da temperatura. Os melhores resultados foram obtidos nas condições de 30°C, 150 rpm e pH 5,0, referentes ao ponto central, para as duas linhagens avaliadas. Nestas condições, a linhagem *C. shehatae* CG8-8BY produziu 11,58 g/L de etanol, com fator de rendimento em etanol de 0,26 g/g, produtividade volumétrica de 0,16 g/L.h, eficiência de fermentação de 50,36% e consumo de D-xilose de 99,83%. A linhagem *S. arborariae* UFMG-HM19.1A produziu 11,6 g/L de etanol, com fator de rendimento em etanol de 0,26 g/g, produtividade volumétrica de 0,15 g/L.h, eficiência de fermentação de 51,1% e consumo de D-xilose de 88%. Os resultados demonstram que as leveduras estudadas apresentam potencial para produção de etanol de segunda geração. A importância do uso de linhagens microbianas eficazes e o aprimoramento dos métodos contribuem para um melhor desenvolvimento desta tecnologia em larga escala.

Palavras-chave: *Candida shehatae*. *Spathaspora arborariae*. Etanol de segunda geração. Fermentação de D-xilose.

ABSTRACT

MARTINIANO, S. E. **Fermentative potential of *Candida shehatae* CG8-8BY and *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A yeasts to second generation ethanol production**. 2013. 103 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2013.

Second generation ethanol is produced from vegetal biomass, releasing sugars present into its structure with its subsequent fermentation. However, one of the challenges in its production is the low diversity of microorganisms able to ferment efficiently D-xylose, the main sugar in hemicellulosic hydrolysate. This study evaluated the fermentative potential of new yeasts strains *Candida shehatae* and *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A to ethanol production from sugarcane hemicellulosic hydrolysate. Four strains of *C. shehatae* were evaluated in YPX medium (10 g/L yeast extract, 20 g/L peptone, 50 g/L D-xylose) and, subsequently, in hemicellulosic hydrolysate. *C. shehatae* CG8-8BY presented the best fermentative performance in hydrolysate. Then, the effect of medium supplementation in D-xylose fermentation by *C. shehatae* CG8-8BY e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A were evaluated. Rice bran extract in a concentration of 20 g/L was presented as an efficient and inexpensive nitrogen source for hemicellulosic hydrolysate supplementation. Lastly, it were evaluated the effects of temperature, agitation and pH on hemicellulosic hydrolysate fermentation, studied by full factorial design 2^3 , with three replications at the central point, to both yeasts. All experiments were carried out in rotatory shaker. According to results, pH is the most important parameter to ethanol production by strains studied, followed by temperature. The best results were obtained at 30 °C, 150 rpm and pH 5.0, concerning the central point, for two yeasts evaluated. Accordingly, *C. shehatae* CG8-8BY strain produced 11.58 g/L of ethanol, with ethanol yield equal 0.26 g/g, productivity equal 0.16 g/L.h, fermentation efficiency equal 50.36% and xylose consumption equal 99.83%. *S. arborariae* UFMG-HM19.1A strain produced 11.6 g/L of ethanol, with ethanol yield equal 0.26 g/g, productivity equal 0.15 g/L.h, fermentation efficiency equal 51.1% and D-xylose consumption equal 88%. Present data showed that yeasts studied have potential to second generation ethanol production. The importance of use of new effective strains and increasing of methods contributes for a better development of this technology in large scale.

Key-words: *Candida shehatae*. *Spathaspora arborariae*. Second-generation ethanol. D-xylose fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Rotas tecnológicas para produção de etanol.....	21
Figura 2 – Representação esquemática da estrutura da celulose	24
Figura 3 – Representação esquemática da hemicelulose do tipo arabinoglucoronoxilana	25
Figura 4 – Precursores básicos e suas respectivas unidades aromáticas na lignina.	29
Figura 5 – Representação esquemática das etapas de produção de etanol de segunda geração.	32
Figura 6 – Esquema simplificado do metabolismo de pentoses em leveduras.....	38
Figura 7 – Fermentação alcoólica teórica de D-xilose com respectivo balanço redox em condições de ausência de oxigênio e xilose-redutase/xilitol-desidrogenase com especificidades de cofator correspondentes.	40
Figura 8 – Células de <i>Candida shehatae</i> CBS 7261 após 3 dias de cultivo em D-glicose, extrato de levedura e peptona a 25 °C.....	41
Figura 9 – Células em brotamento e ascos de <i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19.1A com um único ascosporo alongado e de extremidades curvas em ágar V8 diluído após 3 dias a 20°C.....	42
Figura 10 – Hidrólise do bagaço <i>in natura</i> com H ₂ SO ₄ a 72% (v/v) em banho termostatizado a 45 °C	49
Figura 11 – Reator para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.....	51
Figura 12 – Concentrações de D-xilose, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com <i>Candida shehatae</i> BR6-2AI (a), <i>C. shehatae</i> CG8-8BY (b), <i>C. shehatae</i> PT1-1BASP (c) e <i>C. shehatae</i> BR6-2AY (d) em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 50 g/L D-xilose).	63
Figura 13 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY (a) e <i>C. shehatae</i> BR6-2AY (b) em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado suplementado com 3 g/L de extrato de levedura.	65
Figura 14 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado suplementado com 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,1 g/L de CaCl ₂ (0,1 g/L) (a); e suplementado com 3 g/L de extrato de levedura (b).....	68
Figura 15 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa por <i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM 19.1A em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (2 g/L), CaCl ₂ (0,1 g/L).	70
Figura 16 - Concentrações (g/L) de etanol e xilitol obtidas nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2 ³ para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY.	73
Figura 17 – Fator de rendimento em etanol [Y _{P/S} (g/g)] e produtividade volumétrica [Q _P (g/L.h)], obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2 ³ para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY.....	74
Figura 18 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis e suas interações com nível de confiança de 90% (p ≤ 0,1) para as variáveis resposta: fator de rendimento em etanol [Y _{P/S} (g/g)] e produtividade volumétrica [Q _P (g/L.h)] (b) por <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY.....	76

Figura 19 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] por <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	78
Figura 20 - Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] por <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	78
Figura 21 – Superfície de resposta para o fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] com os fatores temperatura e pH para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	79
Figura 22 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] com os fatores temperatura e pH para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	79
Figura 23 - Concentrações (g/L) de etanol e xilitol obtidas nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM19.1A.	81
Figura 24 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] e produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM19.1A.....	82
Figura 25 – Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis e suas interações com nível de confiança de 90% ($p \leq 0,1$) para as variáveis resposta: fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] (a) e produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] (b) por <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A.....	84
Figura 26 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] por <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	86
Figura 27 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] por <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	86
Figura 28 – Superfície de resposta para o rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] com os fatores temperatura e pH para <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	87
Figura 29 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] com os fatores temperatura e pH para <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química média (%) das principais estruturas da cana-de-açúcar	22
Tabela 2 – Composição da biomassa de alguns resíduos lignocelulósicos.	24
Tabela 3 – Principais polissacarídeos presentes na hemicelulose.....	27
Tabela 4 – Características de microrganismos produtores de etanol a partir de hemicelulose.....	35
Tabela 5 – Algumas espécies de leveduras fermentadoras de pentoses	36
Tabela 6 – Suplementações utilizadas no preparo do inóculo e na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	54
Tabela 7 – Níveis em valores reais e codificados para o planejamento fatorial completo 2^3	54
Tabela 8 – Planejamento fatorial completo do tipo 2^3 , com três repetições no ponto central, para avaliação do efeito dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de etanol por <i>C. shehatae</i> CG8-8BY e <i>S. arborariae</i> UFMG-HM19.1A.	55
Tabela 9 – Composição química (%) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar <i>in natura</i>	59
Tabela 10 – Concentrações de açúcares e compostos inibidores em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	61
Tabela 11 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para linhagens de <i>Candida shehatae</i> em meio YPX (10,0 g/L de extrato de levedura, 20,0 g/L de peptona, 30,0 g/L D-xilose).	64
Tabela 12 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para linhagens de <i>Candida shehatae</i> em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 3 g/L de extrato de levedura.....	67
Tabela 13 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY e <i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19.1A em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura (3 g/L) e suplementado com extrato de farelo de arroz (20g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2 g/L) e $CaCl_2$ (0,1 g/L).	71
Tabela 14 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	75
Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para o fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] pela levedura <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	77
Tabela 16 – Análise de variância (ANOVA) para a produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] pela levedura <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	77

Tabela 17 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para <i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM19.1A obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.	83
Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para o fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] pela levedura <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	85
Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) para a produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] pela levedura <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.....	85

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1.1	Os biocombustíveis e o etanol no Brasil	19
2.1.2	A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo.....	22
2.1.3	Os materiais lignocelulósicos	23
2.4.1	Metabolismo de D-xilose em leveduras	36
2.4.2	A levedura <i>Candida shehatae</i>	40
2.4.3	A levedura <i>Spathaspora arborariae</i>	41
2.4.4	Fatores que interferem na fermentação de pentoses a etanol.....	43
3	OBJETIVOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.4	Processo Fermentativo	52
4.4.1	Microrganismos	52
4.4.2	Preparo do inóculo	52
4.4.3	Avaliação das linhagens de <i>Candida shehatae</i>	53
4.4.4	Avaliação da fonte de nitrogênio na fermentabilidade de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	53
4.4.5	Avaliação dos efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	54
4.5	Métodos analíticos	55
4.5.1	Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar	55
4.5.2	Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, glicerol, xilitol e etanol.....	55
4.5.3	Determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural.....	56
4.5.4	Determinação da concentração celular.....	56
4.5.5	Determinação do pH	56
4.5.6	Determinação dos parâmetros fermentativos.....	57
4.5.6.1	Fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$).....	57
4.5.6.2	Produtividade volumétrica em etanol (Q_P)	57
4.5.6.3	Eficiência de fermentação ($\eta\%$)	57
4.5.6.4	Porcentagem de consumo de D-xilose ($Y\%$).....	58

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1	Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.....	59
5.2	Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	60
5.3	Processo Fermentativo	62
5.3.1	Avaliação do desempenho das linhagens de <i>Candida shehatae</i>	62
5.3.1.1	Avaliação de linhagens de <i>Candida shehatae</i> em meio YPX	62
5.3.1.2	Avaliação de linhagens de <i>Candida shehatae</i> em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	65
5.3.1.3	Avaliação da fonte de nitrogênio na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	67
5.3.1.4	Avaliação dos efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY e <i>Spathaspora arborariae</i> UFMG-HM 19.1A	71
5.3.1.4.1	Efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por <i>Candida shehatae</i> CG8-8BY	71
5.3.1.4.2	Efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por <i>Spathaspora arborariae</i> UFM-HM 19.1A.....	80
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES.....	96

1 INTRODUÇÃO

A demanda por fontes alternativas de combustíveis tem aumentado nos últimos anos, uma vez que o petróleo e seus derivados são uma fonte de energia não-renovável e altamente poluente. A crescente necessidade de energia, assim como os impactos ambientais causados pela queima de combustíveis fósseis reforça a necessidade de sua substituição por fontes alternativas renováveis, como aquelas provenientes da biomassa vegetal. Os biocombustíveis são obtidos a partir de biomassa renovável e podem substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis derivados de petróleo e gás natural. O bioetanol pode ser produzido de diversas fontes vegetais, como, por exemplo, a cana-de-açúcar, a beterraba, o milho e o trigo. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar e, como consequência de seu beneficiamento, são geradas anualmente milhões de toneladas de bagaço.

Este material lignocelulósico é, como todo vegetal, composto basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A celulose e a hemicelulose constituem a fração polissacarídica desta biomassa, enquanto que a lignina é um composto aromático de estrutura complexa. A indústria canavieira utiliza parte do bagaço de cana para geração de energia, por meio de sua queima, porém a fração remanescente permanece no ambiente, inutilizando uma área de terra e acarretando problemas ambientais e industriais. Neste contexto, o etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos contribui para uma maior produção do combustível sem aumentar a área de lavoura e sem competir com a produção atual de alimentos.

A primeira etapa na conversão de biomassa a etanol é o pré-tratamento, que fragiliza e rompe a estrutura vegetal. Geralmente, utiliza-se o pré-tratamento com ácido diluído, do qual se obtém uma fase líquida, o hidrolisado hemicelulósico, e uma fase sólida, a celulignina. O hidrolisado hemicelulósico é composto principalmente por açúcares derivados da hemicelulose, sendo a D-xilose, uma pentose, o açúcar mais abundante. Também estão presentes neste hidrolisado compostos tóxicos, gerados durante a hidrólise da biomassa, como o furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenóis. A utilização dos açúcares presentes na hemicelulose é essencial para uma eficiente fermentação e redução dos custos de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, entretanto, poucos microrganismos são capazes de fermentar a D-xilose. Com isso, a avaliação do potencial de novas linhagens e o

aperfeiçoamento dos métodos de condução do processo fermentativo são fatores preponderantes para uma fermentação eficiente.

A levedura *Candida shehatae* tem sido estudada devido a sua eficiente fermentação de pentoses e a levedura *Spathaspora arborariae*, uma espécie recentemente isolada de biomas brasileiros, também apresenta elevado potencial para a conversão de D-xilose a etanol. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial fermentativo de novas linhagens de *C. shehatae* e de *S. arborariae* para a produção de etanol de segunda geração. Avaliou-se o efeito da fonte de nitrogênio e dos parâmetros temperatura, agitação e pH para as leveduras em estudo na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Espera-se que os resultados obtidos contribuam com importantes informações para o desenvolvimento da tecnologia de produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O etanol combustível

2.1.1 Os biocombustíveis e o etanol no Brasil

O petróleo e seus derivados, além de serem uma fonte de energia não-renovável, também são altamente poluentes. A crescente procura por fontes alternativas de combustíveis, como forma de substituição à demanda excessiva por combustíveis fósseis e redução dos impactos ambientais causados por sua queima, torna importante que fontes renováveis, como aquelas provenientes da biomassa vegetal, sejam utilizadas. Grande parte dos esforços atuais para reduzir as emissões de gases do efeito estufa se concentra em aprimorar a tecnologia para reduzir o consumo de energia, aumentar sua eficiência de conversão ou utilização, utilizar combustíveis com baixo teor de carbono, aumentar as áreas naturais responsáveis por absorver gás carbônico e também coletar e armazenar este gás (BALAT; BALAT; OZ, 2008).

Os biocombustíveis são obtidos a partir de biomassa renovável e podem substituir, parcial ou totalmente, os combustíveis derivados de petróleo e gás natural. Os dois principais biocombustíveis líquidos utilizados no Brasil são o etanol de cana-de-açúcar e o biodiesel, produzido a partir de óleos vegetais ou gorduras animais (ANP, 2011). O etanol de cana-de-açúcar, produzido sob condições adequadas, é um combustível renovável e vantajoso em relação à gasolina, pois o seu uso reduz as emissões de gases do efeito estufa e, conseqüentemente, melhora a qualidade do ar nas regiões metropolitanas (GOLDEMBERG, 2008). Apresenta fórmula estrutural C_2H_6O e pode ser utilizado como combustível de duas formas: em mistura de gasolina e etanol anidro ou como etanol puro, geralmente hidratado (BNDES; CGEE, 2008), sendo que os motores dos veículos movidos à gasolina vendidos no Brasil contêm um volume de 20 a 25% de etanol anidro (BNDES; CGEE, 2008; GOLDEMBERG, 2008; WALTER et al., 2008).

O incentivo à produção em grande escala de etanol no Brasil teve início em 1975, com a criação do Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL). A primeira crise do petróleo, em 1973, que causou grande aumento no preço do barril foi o principal estímulo para a implantação do PROÁLCOOL, pois na época a maior parte do petróleo utilizado no país era

importado e a elevação de seu preço teve grande impacto na economia. Na década de 80, mais de 90% dos automóveis brasileiros eram movidos a etanol hidratado, porém, no início de 1990 uma escassez na sua produção levou a uma crise e gradual abandono de seu uso como combustível em veículos (GOLDEMBERG, 2008). As vendas de veículos movidos a etanol puro começaram a crescer novamente em 2001, devido a uma maior diferença entre o preço do etanol e da gasolina, mas foi somente em 2003, com o início da produção de motores *flex*, que a demanda pelo combustível atingiu grande escala (GOLDEMBERG, 2008; WALTER et al., 2008).

O Brasil é o único país no mundo com condições para a rápida expansão da capacidade de produção de etanol devido à disponibilidade de terra, tecnologia, capital e mão-de-obra relativamente barata (WALTER et al., 2008). A maior parte da produção deste combustível no Brasil se concentra na região Centro-Sul, seguida pela Norte-Nordeste, sendo o estado de São Paulo o maior produtor (GOLDEMBERG, 2008; UNICA, 2008).

A produção de etanol pode ser realizada a partir de diversas matérias-primas, cada qual correspondendo a um custo de produção e valor de mercado, sendo assim, seu preço mínimo para os produtores deve cobrir os custos de produção e ter valor igual ou superior aos resultados que seriam obtidos caso a matéria-prima se destinasse à fabricação de produtos alternativos (BNDES; CGEE, 2008).

No caso do etanol de cana-de-açúcar, o produto alternativo é o açúcar. A partir de 1 kg de açúcar é possível, teoricamente, produzir 0,684 litro de etanol anidro, porém, devido ao alto preço do açúcar, não é muito rentável; em contrapartida, com o uso do melaço – subproduto da usina açucareira – a produção de etanol é favorecida (BNDES; CGEE, 2008). Em relação ao caldo de cana, produz-se mais de 80 litros de etanol por tonelada de cana-de-açúcar, enquanto que por meio do melaço se produz 12 litros por tonelada de cana processada e também açúcar (BNDES; CGEE, 2008). O balanço energético do etanol é definido como a relação entre a energia contida em um determinado volume dividido pela energia fóssil utilizada em sua produção. O etanol de cana-de-açúcar apresenta balanço energético alto, entre 8,2 e 10, superior ao etanol produzido a partir de outras fontes vegetais (GOLDEMBERG, 2008).

Mediante rotas biológicas, o etanol pode ser produzido a partir de biomassa açucarada, amilácea ou celulósica (Figura 1), liberando açúcares fermentescíveis, os quais são posteriormente fermentados por microrganismos. A produção brasileira se baseia na utilização

da sacarose presente na cana, porém esta representa apenas um terço de toda a energia contida na planta (GOLDEMBERG, 2008).

Figura 1 – Rotas tecnológicas para produção de etanol. Adaptado de BNDES e CGEE (2008).

A produção de etanol total é estimada em 23,62 bilhões de litros para a safra 2012/13 de cana-de-açúcar, 5,22% menor que a safra 2011/12, e, deste total, 9,66 bilhões são destinados para a produção de etanol anidro e 13,96 bilhões para a produção de etanol hidratado (CONAB, 2012). Com o desenvolvimento da tecnologia do etanol de segunda geração, ou etanol lignocelulósico, obtido a partir de resíduos lignocelulósicos, a biomassa vegetal pode ser aproveitada de modo mais eficiente, aumentando, consequentemente, a produção de etanol por hectare plantado.

2.1.2 A cana-de-açúcar no Brasil e no mundo

A cana-de-açúcar é uma angiosperma de origem asiática, semiperene, com ciclo fotossintético do tipo C4 e pertencente ao gênero *Saccharum*, da família das gramíneas (BNDES; CGEE, 2008). Possui de três a quatro metros de altura e aproximadamente cinco centímetros de diâmetro (HERRERA, 2000). A parte aérea da planta é composta por colmos, onde se concentra a sacarose, e por folhas e inflorescência, que constituem a palha, sendo que esses componentes somados totalizam cerca de 35 toneladas de matéria seca por hectare (BNDES; CGEE, 2008).

A cana-de-açúcar é composta principalmente por água e sacarose, seguida por fibras, cinzas e outros compostos (Tabela 1). A quantidade destes componentes pode variar de acordo com a espécie e condições de cultivo.

Tabela 1 – Composição química média (%) das principais estruturas da cana-de-açúcar (Adaptado de Herrera, 2000).

Componentes	Hastes limpas	Pontas e folhas
Açúcares totais	15,43	2,18
Sacarose	14,10	–
Lignocelulose (Fibras)	12,21	19,80
Cinzas	0,54	2,31
Outros	0,82	2,43
Massa seca total	29,00	26,00
Água	71,00	74,00

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia, China e Tailândia (FAO, 2011). O ciclo completo da cana-de-açúcar no Brasil é em torno de seis anos e são realizados cinco cortes, sendo o primeiro efetuado entre 12 e 18 meses após o plantio e os subsequentes uma vez por ano, com redução gradual da produtividade (BNDES; CGEE, 2008). A lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil, principalmente na região Sudeste, e o estado de São Paulo continua sendo o maior produtor, com 51,87% dos hectares cultivados (CONAB, 2012). A produtividade média para a safra 2012/13 está estimada em 69.846 kg/ha, 4,2% maior que a safra 2011/12, que foi de 67.060 kg/ha, devido à recuperação

das condições climáticas a partir do segundo semestre nas principais regiões produtoras do país (CONAB, 2012).

2.1.3 Os materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica compreende os resíduos agroindustriais e florestais, tais como bagaços, palhas e cavacos de madeiras, e sua composição varia de acordo com a espécie (Tabela 2). Representa a mais abundante fonte de materiais renováveis do solo, porém apenas uma pequena quantidade é utilizada como subprodutos pelos setores agroindustrial e florestal, sendo o restante considerado resíduo (SÁNCHEZ, 2009). Os materiais lignocelulósicos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, mas também estão presentes, em proporções menores, extrativos e minerais (GÍRIO et al., 2010). Estes componentes estão firmemente associados uns aos outros, constituindo a parede celular vegetal, que é responsável pelo suporte estrutural, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos e estresse oxidativo (SÁNCHEZ, 2009).

A celulose e a hemicelulose constituem cerca de dois terços da composição dos materiais lignocelulósicos e são os substratos para a produção do etanol de segunda geração (GÍRIO et al., 2010). Gera-se aproximadamente 135 kg de bagaço para cada tonelada de cana-de-açúcar processada (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009). Atualmente, cerca de metade do bagaço de cana gerado durante a moagem é utilizado para a queima e geração de energia para a própria usina (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), porém a parte remanescente se acumula no solo, constituindo um problema ambiental e econômico.

Tabela 2 – Composição da biomassa de alguns resíduos lignocelulósicos (Adaptado de Saha, 2003).

	Composição (% , massa seca)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sabugo de milho	45	35	15
Palha de milho	40	25	17
Palha de arroz	35	25	12
Palha de trigo	30	50	20
Bagaço de cana	40	24	25

A celulose (Figura 2) corresponde de 30 a 60% da composição da biomassa vegetal (BALAT, 2011), sendo o principal constituinte da parede celular vegetal e um homopolissacarídeo linear de cadeias compostas por moléculas de D-glicose unidas em ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (CAMPBELL, 2000). Estas ligações formam o dissacarídeo celobiose. O grau de polimerização das cadeias de celulose pode variar de 100 a até mais de 15000 unidades de D-glicose (FENGEL; WEGENER, 1989). As moléculas formam cadeias lineares, o que possibilita a formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares e acarreta na agregação das cadeias celulósicas em fibrilas elementares, as quais possuem alto grau de cristalinidade (CANILHA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009; SÁNCHEZ, 2009). A associação destas fibrilas acarreta na formação de microfibrilas (RAMOS, 2003).

A celulose é constituída por regiões cristalinas e amorfas, de acordo com o número de ligações de hidrogênio (BALAT, 2011). A região cristalina possui elevado número de pontes de hidrogênio, tornando-a ordenada, enquanto que a região amorfa é menos ordenada, devido à menor quantidade deste tipo de ligação (FENGEL; WEGENER, 1989).

Figura 2 – Representação esquemática de parte da estrutura da celulose (Adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

A hemicelulose (Figura 3) é um heteropolissacarídeo complexo, composto por açúcares pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e/ou ácidos urônicos (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003; CANILHA et al., 2009; SÁNCHEZ, 2009; GÍRIO et al., 2010), apresenta grau de polimerização inferior a 200 e é ramificada (CANILHA et al., 2009). Outros açúcares também podem estar presentes, assim como seus grupos hidroxilas podem estar parcialmente substituídos por grupo acetila (GÍRIO et al., 2010). É o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, representando cerca de 15 a 35% da biomassa lignocelulósica (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010). A composição varia de acordo com o tecido e a espécie vegetal (RAMOS, 2003) e difere largamente entre angiospermas e gimnospermas. A hemicelulose das angiospermas é composta principalmente por glucuronoxilanas (*O*-acetil-4-*O*-metilglucuronoxilana), enquanto que nas gimnospermas há predomínio de glucomananas e galactoglucomananas (RAMOS, 2003; CANILHA et al., 2009; GÍRIO et al., 2010).

Figura 3 – Representação esquemática de parte da estrutura da hemicelulose do tipo arabinoglucuronoxilana (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilana) (Adaptado de Fengel e Wegener, 1989).

Os tipos de hemicelulose mais relevantes são as xilanas e as glucomananas, sendo o primeiro grupo mais abundante e constituindo normalmente de 20 a 30% da parede celular das angiospermas (SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010). As xilanas estão normalmente presentes em grandes quantidades como subprodutos florestais e agroindustriais, como no caso das indústrias de papel (GÍRIO et al., 2010). O grau de polimerização da xilana em angiospermas está entre 150 e 200 unidades, enquanto que em gimnospermas varia entre 70 e 130 unidades (SAHA, 2003). As glucuronoxilanas são os principais componentes da hemicelulose das

angiospermas, que também pode conter pequenas quantidades de glucomananos (GÍRIO et al., 2010). Apresentam cadeias principais formadas por unidades de β -D-xilopiranosose unidas em ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (SAHA, 2003; GÍRIO et al., 2010). As arabinoglucoronoxilanas (arabino-4-*O*-metilglucuronoxilanas) são os principais componentes dos resíduos agroindustriais e também consistem de uma cadeia principal de β -(1,4)-D-xilopiranosose (GÍRIO et al., 2010). Além destes, existem diversos outros tipos de componentes da hemicelulose (Tabela 3), variando de acordo com o grupo vegetal.

Tabela 3 – Principais polissacarídeos presentes na hemicelulose (Adaptado de Gírio et al., 2010).

Tipo de polissacarídeo	Origem biológica	Abreviação	Unidades		
			Cadeia principal	Cadeias laterais	Ligação
Arabinogalactana	Gimnospermas	AG	β -D-Galactose	β -D-Galactose α -L-Arabinofuranose β -L-Arabinopiranosose	β -(1 $\rightarrow$ 6) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 3)
Xiloglucana	Angiospermas e gramíneas	XG	β -D-Glicopiranosose β -D-Xilopiranosose	β -D-Galactopiranosose β -D-Xilopiranosose α -L-Arabinofuranose α -L-Fucofuranose Acetila	β -(1 $\rightarrow$ 4) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2)
Galactoglucomanana	Gimnospermas	GGM	β -D-Manopiranosose β -D-Glicopiranosose	β -D-Galactopiranosose Acetila	β -(1 $\rightarrow$ 4) α -(1 $\rightarrow$ 3) β -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 2)
Glucomanana	Gimnospermas e Angiospermas	GM	β -D-Manopiranosose β -D-Glicopiranosose	–	
Glucuronoxilana	Angiospermas	GX	β -D-Xilopiranosose	4-O-Me- α -D-GlicopiranososeA Acetila	α -(1 $\rightarrow$ 2)
Arabinoglucuronoxilana	Gramíneas, cereais e gimnospermas	AGX	β -D-Xilopiranosose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-Glicopiranosose	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)
Arabinoxilana	Cereais	AX	β -D-Xilopiranosose	α -L-Arabinofuranose Feruloil esterase	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)
Glucuronoarabinoxilana	Gramíneas e cereais	GAX	β -D-Xilopiranosose	α -L-Arabinofuranose 4-O-Me- α -D-Glicopiranosose Acetila	α -(1 $\rightarrow$ 2) α -(1 $\rightarrow$ 3)
Homoxilana	Algas	X	β -D-Xilopiranosose	–	

A lignina é um dos principais componentes da biomassa vegetal, de natureza aromática e complexa, e está presente em quantidades que variam de 15 a 36% de acordo com a espécie vegetal (CHEN, 1991). Ocorre em plantas com sistema vascular, entretanto, recentemente foi descoberta a presença de lignina nas paredes secundárias da alga vermelha *Calliarthron cheilosporioides* (MARTONE et al., 2009). Este componente é uma macromolécula complexa sintetizada a partir de três álcoois *p*-hidroxi-cinâmicos precursores: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989; CHEN, 1991; BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004; RAMOS, 2003; CANILHA et al., 2009; CARVALHO et al., 2009). Constitui a fração não polissacarídica mais abundante dos materiais lignocelulósicos (CANILHA et al., 2009). O teor de lignina presente em gimnospermas geralmente é mais alto do que em angiospermas (CARVALHO et al., 2009). Esta macromolécula envolve as microfibrilas de celulose, conferindo rigidez e proteção contra a degradação química e biológica (CHEN, 1991; CANILHA et al., 2009).

As unidades básicas que compõem a lignina são classificadas de acordo com o grau de metoxilação do anel aromático, sendo elas: *p*-hidroxifenila, guaiacila e siringila (Figura 4). A *p*-hidroxifenila não é metoxilada e deriva do álcool *p*-cumarílico, a guaiacila apresenta uma metoxila e é derivada do álcool coniferílico, enquanto que a siringila possui duas metoxilas e é proveniente do álcool sinapílico (FENGEL; WEGENER, 1989). O elevado número de combinações possíveis entre as unidades de fenilpropanóides faz com que a molécula de lignina tenha uma estrutura complexa. Em geral, gimnospermas apresentam lignina composta principalmente por unidades guaiacila, sendo denominada lignina do tipo G; as angiospermas apresentam quantidades equilibradas de guaiacila e siringila, recebendo o nome de lignina tipo GS, enquanto que gramíneas contêm os três precursores básicos, sendo denominada lignina HGS (FENGEL; WEGENER, 1989; CHEN, 1991; RAMOS, 2003; BUDZIAK; MAIA; MANGRICH, 2004).

Figura 4 – Precusores básicos e suas respectivas unidades aromáticas na lignina (Adaptado de Budziak, Maia e Mangrich, 2004).

Os extrativos incluem um diverso número de compostos que podem ser extraídos por meio do uso de solventes, sendo que seu conteúdo e composição variam de acordo com a espécie e condições ambientais (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.2 Métodos de pré-tratamento

O bagaço de cana-de-açúcar, como qualquer material lignocelulósico, é rico em açúcares, mas para que estes possam ser fermentados a etanol é necessário primeiramente fragilizar sua estrutura, liberando os açúcares presentes na hemicelulose e facilitando o acesso das enzimas celulolíticas, que clivam a celulose, liberando os monômeros de D-glicose.

A etapa de pré-tratamento é de fundamental importância na produção de etanol lignocelulósico, pois é responsável por esta ruptura física e química do bagaço. Apesar de ser considerada uma etapa imprescindível na conversão biológica de biomassa a etanol, o pré-tratamento representa um dos principais custos econômicos do processo (ALVIRA et al., 2010). Uma vez que cada material lignocelulósico possui propriedades físico-químicas

características, torna-se necessário utilizar métodos de pré-tratamento específicos para cada tipo de biomassa lignocelulósica (ALVIRA et al., 2010).

Existem vários tipos de pré-tratamento, que podem ser utilizados individualmente ou combinados, sendo de origem biológica, física e química. Diversos métodos de pré-tratamento podem ser utilizados, tais como: fungos filamentosos (SÁNCHEZ, 2009), moagem (ALVIRA et al., 2010), explosão a vapor (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008), hidrólise ácida (GÍRIO et al., 2010), expansão da fibra com amônia (*“ammonia fiber expansion”* – AFEX) (BALAT; BALAT; OZ, 2008), hidrólise alcalina (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008), água quente (*“hot-water”*) (SHUPE; LIU, 2012); extração alcalina (BRIENZO; SIQUEIRA; MILAGRES, 2009), entre outros.

O principal objetivo do pré-tratamento ácido é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível às enzimas celulolíticas (ALVIRA et al., 2010). A hidrólise ácida pode ocorrer de dois modos: utilizando ácido concentrado em baixas temperaturas ou ácido diluído em altas temperaturas (CARVALHEIRO; DUARTE; GÍRIO, 2008; CHANDEL et al., 2007b), mas a utilização de ácido concentrado é menos atrativa para a produção de etanol, devido à formação de compostos inibidores e corrosão dos equipamentos empregados nesta etapa (ALVIRA et al., 2010).

A hidrólise com ácido diluído tem sido eficaz principalmente por solubilizar a hemicelulose e facilitar o acesso de enzimas degradantes à celulose (GÍRIO et al., 2010), além de gerar baixas quantidades de produtos de degradação, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos, que normalmente atuam como inibidores do processo fermentativo; sendo que entre os compostos fenólicos, a vanilina e o seringaldeído são os inibidores mais frequentemente considerados (CHEN et al., 2012). A principal vantagem do pré-tratamento com ácido diluído é a solubilização e recuperação dos açúcares hemicelulósicos, porém não é tão eficaz para a celulose, pois as altas temperaturas requeridas para a hidrólise deste homopolissacarídeo podem levar a uma maior formação de produtos de degradação (GÍRIO et al., 2010).

2.3 A produção de etanol lignocelulósico

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (FAO, 2011) e, como consequência dessa produção, são geradas milhões de toneladas de bagaço anualmente, e isso, somado à constante expansão da área de lavoura, constitui um grave problema ambiental. O bagaço é um material lignocelulósico e, como todo vegetal, é composto basicamente de celulose, hemicelulose e lignina. A associação desses componentes confere grande resistência mecânica às plantas.

O etanol de segunda geração é obtido a partir da hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, liberando os açúcares presentes em sua estrutura, os quais poderão ser fermentados por microrganismos. Qualquer material lignocelulósico gera uma mistura de açúcares quando submetido a um pré-tratamento individual ou combinado.

A produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica compreende a hidrólise da celulose e hemicelulose, fermentação dos açúcares, separação do resíduo de lignina e recuperação e purificação do etanol (Figura 5) (ALVIRA et al., 2010). A utilização dos açúcares hemicelulósicos é essencial para uma conversão eficiente e relação custo x benefício positiva dos materiais lignocelulósicos para a produção de etanol (SAHA, 2003), mas este processo pode ser ainda mais rentável com a fermentação da fração celulósica. Para a liberação dos açúcares presentes na celulose, pode-se utilizar a hidrólise enzimática, precedida ou não de outro pré-tratamento, como a hidrólise alcalina, que visa remover a lignina presente na celulignina, restando a polpa de celulose. A hidrólise enzimática é realizada com enzimas específicas (celulases), que atuam em sinergismo, clivando a celulose para a liberação dos açúcares fermentescíveis.

O hidrolisado hemicelulósico é composto principalmente por açúcares derivados da hemicelulose, sendo principalmente as pentoses e também algumas hexoses, apesar destas últimas estarem em menor quantidade. Dependendo do pré-tratamento utilizado, da quantidade de açúcares liberados e do tipo de linhagem microbiana empregada, o hidrolisado necessita ser concentrado e destoxificado para aumentar a concentração de açúcares e remover alguns compostos inibidores do processo fermentativo. Devido à presença destes compostos tóxicos, quando o hidrolisado hemicelulósico é fermentado sem tratamento prévio de destoxificação ocorre uma diminuição na eficiência do processo fermentativo (MUSSATO; ROBERTO, 2004). Em trabalho realizado por Chen et al. (2012) para a conversão de hidrolisado de palha

de arroz destoxificado por “overlimming” e sem suplementação nutricional foi obtido rendimento em etanol de 0,45 g/g pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Figura 5 – Representação esquemática das etapas de produção de etanol de segunda geração.

O etanol lignocelulósico pode contribuir para uma maior produção de combustível sem aumento da área de lavoura de cana-de-açúcar, pois aproveita de forma eficiente os resíduos que normalmente seriam descartados no meio ambiente. Além disso, o uso da energia contida da biomassa pode exercer um papel importante na redução de gases do efeito estufa, pois o etanol possui um ciclo de dióxido de carbono fechado, uma vez que o CO₂ emitido por sua queima é reabsorvido pelas plantas através da fotossíntese (CHANDEL et al., 2007b).

2.4 Fermentação de pentoses a etanol

Para que o processo de produção de etanol de segunda geração seja viável é necessário, entre outros fatores, que a maioria dos açúcares presentes na estrutura lignocelulósica seja liberada e fermentada por microrganismos. A avaliação de linhagens microbianas para a

fermentação de hidrolisados lignocelulósicos é feita em relação ao rendimento de etanol relacionado à quantidade total de açúcares presentes inicialmente no mesmo, visando sua conversão em etanol com o mínimo de formação de subprodutos (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Os microrganismos utilizados para a fermentação a etanol podem ser descritos de acordo com seus parâmetros de desempenho, sendo eles: temperatura e pH, tolerância ao etanol, taxa de crescimento, produtividade, tolerância osmótica, rendimento, estabilidade genética e tolerância a compostos inibidores (BALAT, 2011).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais amplamente utilizado nas fermentações industriais tradicionais, sendo empregada para a produção de etanol baseada na sacarose, na maltose, pois fermenta hexoses eficientemente e suporta altas taxas de etanol e de pressão osmótica (GÍRIO et al., 2010). Entretanto, os açúcares do tipo pentose, presentes na hemicelulose, necessitam de microrganismos específicos capazes de metabolizá-los e convertê-los eficientemente a etanol.

Os microrganismos fermentadores de pentoses devem apresentar, além de resistência à pressão osmótica, certa tolerância aos compostos inibidores gerados durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Dentre os açúcares presentes na hemicelulose, a D-xilose é o mais abundante em monocotiledôneas e por este motivo, grande parte dos estudos em fermentações de batelada tem utilizado este açúcar como fonte de carbono (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Algumas leveduras, bactérias e fungos filamentosos têm sido reportados como capazes de fermentar hidrolisados lignocelulósicos para produzir etanol (GÍRIO et al., 2010). Embora muitas espécies de leveduras sejam capazes de crescer em D-xilose sob condições aeróbias, grande parte não consegue fermentar este açúcar (JEFFRIES; ALEXANDER, 1990), e as espécies que são capazes não realizam esse processo diretamente e por isso convertem a D-xilose em xilulose, seu isômero (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1988).

Dentro do contexto do uso dos materiais lignocelulósicos e considerando as estratégias de desenvolvimento de linhagens, cada grupo de microrganismos apresenta vantagens e desvantagens (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007), assim como características específicas para a fermentação (Tabela 4).

A fermentação de pentoses pelas bactérias *Escherichia coli* e *Klebsiella oxytoca* tem sido realizada a partir da inserção dos genes de *Zymomonas mobilis* (HAHN-HÄGERDAL et

al., 2006). Algumas bactérias anaeróbias fermentam pentoses, mas são mais susceptíveis à contaminação devido ao pH do meio ser próximo à neutralidade, apresentam baixa tolerância aos compostos inibidores e algumas são inibidas mesmo em baixas concentrações de açúcar e de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006, GÍRIO et al., 2010).

Os fungos filamentosos, apesar de tolerarem os compostos inibidores, apresentam metabolismo lento para um processo industrial de produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). As linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não são capazes de utilizar D-xilose como fonte de carbono, mas linhagens geneticamente modificadas conseguem metabolizar este açúcar (PASHA; KUHAD; VENKATESWAR RAO, 2007). Entretanto, esta espécie pode ser utilizada na fermentação de materiais lignocelulósicos devido a sua rápida fermentação de D-glicose, um dos açúcares liberados durante a etapa de pré-tratamento, presente na celulose.

Tabela 4 – Características de microrganismos produtores de etanol a partir de hemicelulose.

Características	Microrganismo			
	<i>E. coli</i>	<i>Z. mobilis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. stipitis</i>
Fermentação de D-glicose	+	+	+	+
Utilização de D-galactose e D-manose	+	–	+	+
Utilização de D-xilose e L-arabinose	+	–	–	+
Fermentação anaeróbia	+	+	+	–
Formação de subprodutos	+	f	f	f
Alta produtividade de etanol (a partir de D-glicose)	–	+	+	f
Tolerância a etanol	f	f	+	f
Tolerância a compostos inibidores	f	f	+	f
Tolerância osmótica	–	–	+	f

+, presente; –, ausente; f, fraca. Adaptado de Gírio et al. (2010).

Diversas leveduras têm sido identificadas como capazes de fermentar D-xilose a etanol (Tabela 5) e, entre estas, destacam-se as espécies naturalmente fermentadoras de pentoses, como *Candida shehatae*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* e *Pachysolen tannophilus*, que têm sido extensivamente estudadas devido ao seu potencial biotecnológico (WALKER, 2000).

Tabela 5 – Algumas espécies de leveduras fermentadoras de pentoses (Adaptado de Walker, 2000; e Cadete et al., 2009).

Gênero	Espécies representativas
<i>Candida</i>	<i>C. shehatae</i> , <i>C. tenuis</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. jeffriesii</i>
<i>Pichia</i>	<i>P. stipitis</i>
<i>Pachysolen</i>	<i>P. tannophilus</i>
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. marxianus</i> , <i>K. cellobiovorus</i>
<i>Brettanomyces</i>	<i>B. naardenensis</i>
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. nepalensis</i> , <i>D. polymorpha</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>S. Pombe</i>
<i>Spathaspora</i>	<i>S. arborariae</i> , <i>S. passalidarum</i>

2.4.1 Metabolismo de D-xilose em leveduras

A primeira etapa no metabolismo da D-xilose é seu transporte para o interior da célula através da membrana citoplasmática (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Os sistemas de transporte para um açúcar específico dependem do microrganismo e das suas condições de cultivo (GÍRIO et al., 2010).

As leveduras que naturalmente utilizam D-xilose possuem no mínimo dois sistemas de transporte deste açúcar para o interior da célula: o sistema de difusão facilitada, o qual não necessita de energia e a substância é transportada a favor do gradiente de concentração, e o sistema de transporte ativo, que necessita de energia, pois o composto é carregado contra o gradiente de concentração (SPENCER-MARTINS, 1994; GÍRIO et al., 2010). Entretanto, na presença de D-glicose, pode ocorrer repressão da síntese de enzimas do metabolismo de D-xilose, inativação do sistema de transporte ativo ou inibição da entrada de D-xilose pelo sistema de difusão facilitada (SPENCER-MARTINS, 1994;).

O metabolismo de pentoses varia de acordo com o tipo de organismo utilizado. Em microrganismos procarióticos, a primeira etapa do metabolismo envolve a indução de enzimas seguida pela isomerização da xilose em xilulose (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998), catalisada pela enzima xilose-isomerase (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1988).

Em microrganismos eucarióticos, como as leveduras, após a entrada da D-xilose na célula, esta é reduzida a xilitol pela enzima xilose-redutase (aldose-redutase) dependente de NAD(P)H e este poliol pode ser secretado pela célula ou oxidado à xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase dependente de NAD(P), seguido da fosforilação da xilulose à xilulose-5-fosfato, catalisada pela xiluloquinase (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). As enzimas xilose-redutase e xilitol-desidrogenase não estão presentes durante a fermentação da D-glicose (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1988), porém as reações catalisadas são consideradas fatores limitantes para a fermentação de D-xilose (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

A xilulose-5-fosfato formada pode seguir para a via das fosfopentoses, onde será convertida a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, e, posteriormente, em piruvato, devido a sua conexão com a via glicolítica (CAMPBELL, 2000; SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998). O piruvato formado na glicólise pode seguir para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos se houver disponibilidade de oxigênio suficiente ou ser direcionado para outras vias, como a fermentação alcoólica, com a atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase (CAMPBELL, 2000) (Figura 6).

A formação de subprodutos, tais como glicerol e xilitol, está associada à manutenção do equilíbrio redox da célula. Nas leveduras que metabolizam a D-xilose por meio das enzimas xilose-redutase e xilitol-desidrogenase o excesso de NADH pode ser removido pela aeração do meio, entretanto, a aeração excessiva pode levar a uma competição entre respiração e fermentação alcoólica, reduzindo o rendimento em etanol (KUYPER et al., 2004).

Sob condições limitadas de oxigênio, as leveduras com atividade da enzima xilose-redutase dependente de ambos NADH e NAPH podem regenerar o NAD^+ utilizado na segunda etapa do metabolismo de xilose por meio da produção de etanol devido ao equilíbrio redox entre os cofatores da xilose-redutase e xilitol-desidrogenase; neste caso, o principal produto é o etanol, enquanto que o xilitol não seria acumulado (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

Figura 6 – Esquema simplificado do metabolismo de pentoses em leveduras (Adaptado de Parajó, Domínguez e Domínguez, 1998; e Gírio et al., 2010).

Em contrapartida, leveduras que consomem D-xilose e apresentam a enzima xilose-redutase dependente apenas de NADPH na primeira etapa do metabolismo de xilose exibem maior acúmulo de xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Para leveduras com baixa dependência de NADH pela xilose-redutase, a oxidação de xilitol em xilulose é

uma etapa limitante para o metabolismo de xilose e a atividade da xilitol-desidrogenase tem sido relevante para que ocorra o acúmulo de xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

Em relação à L-arabinose, outra pentose presente em hidrolisados hemicelulósicos, as leveduras capazes de fermentar este açúcar o convertem em L-arabitol por meio da enzima L-arabinose-redutase, sendo posteriormente oxidado à L-xilulose pela arabitol-4-desidrogenase e esta L-xilulose é convertida em xilitol pela L-xilulose redutase (GÍRIO et al., 2010).

O valor de rendimento máximo teórico na produção de etanol a partir tanto de D-glicose quanto de D-xilose é de 0,51 g/g na ausência de oxigênio (KUYPER et al., 2004). Teoricamente, para que não ocorra acúmulo de NADH e consequente formação de subprodutos, as enzimas xilose-redutase e xilitol-desidrogenase deveriam apresentar especificidades de cofator correspondentes (apenas NAD(H) ou NADP(H)), o que equivaleria a uma única etapa de conversão da D-xilose em xilulose (Figura 7), além de não poder ocorrer a entrada dos açúcares nas reações oxidativas da via das fosfopentoses, pois levaria à formação de biomassa e consequente diminuição da produção de etanol (KUYPER et al., 2004).

As características desejáveis para os microrganismos fermentadores de hidrolisados lignocelulósicos são: eficiente utilização de hexoses e pentoses, rápida taxa de fermentação, alta produção de etanol e tolerância aos inibidores presentes no meio, capacidade de fermentar em baixos valores de pH e altas temperaturas, baixa formação de subprodutos, alta viabilidade celular e baixa geração de calor durante a fermentação (PASHA; KUHAD; VENKATESWAR RAO, 2007).

Figura 7 – Fermentação alcoólica teórica de D-xilose com respectivo balanço redox em condições de ausência de oxigênio e xilose-redutase/xilitol-desidrogenase com especificidades de cofator correspondentes (equivalente à xilose-isomerase) (Adaptado de Kuyper et al., 2004).

2.4.2 A levedura *Candida shehatae*

A levedura *Candida shehatae* é capaz de crescer rapidamente em meio contendo D-xilose como fonte de carbono sob condições aeróbias, mas também é capaz de fermentar este açúcar, na ausência de oxigênio no meio, produzindo quantidades relativamente baixas de xilitol (JEFFRIES; ALEXANDRE, 1990). As células crescidas em meio contendo D-glicose, extrato de levedura e peptona apresentam formato globoso a ovoidal, (2,0 – 4,5) x (3,5 – 6,0) μm , e ocorrem isoladas, em pares ou em cadeias curtas (Figura 8) (MEYER; PAYNE; YARROW, 2000).

Figura 8 – Células de *Candida shehatae* CBS 7261 após 3 dias de cultivo em D-glicose, extrato de levedura e peptona a 25 °C (MEYER; PAYNE; YARROW, 2000).

Apresenta metabolismo do tipo *Crabtree* negativo e produz principalmente biomassa e dióxido de carbono quando não há limitação nutricional, mas pode produzir etanol quando as condições de oxigênio são limitantes (FROMANGER et al., 2010). O efeito *Crabtree* ocorre quando o etanol é produzido mesmo em condições aeróbias, devido à alta concentração de substrato no meio (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008), porém as leveduras *Crabtree* negativas não produzem etanol na presença de oxigênio, mesmo com o aumento da concentração de substrato.

Quando as células são crescidas em meio contendo D-glicose ou D-xilose estas apresentam um sistema de difusão facilitada, que pode transportar D-xilose e manose, mas não galactose ou L-arabinose; mas quando há o decréscimo da fonte de carbono ocorre a indução de múltiplos simportes, tornando-se capaz de transportar estas pentoses (SPENCER-MARTINS, 1994). Ocorre a presença de pseudohifas, que consistem de cadeias ramificadas de células alongadas com blastoconídeos globosos a ovoidais, e, em condições aeróbias, as colônias apresentam coloração branco/creme, cintilante e suave, com margens reticuladas (MEYER; PAYNE; YARROW, 2000).

2.4.3 A levedura *Spathaspora arborariae*

O clado *Spathaspora* compreende espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose isoladas de madeira em decomposição ou dos insetos a ela associados (CADETE et al., 2009). *Spathaspora passalidarum* foi a primeira espécie descrita deste gênero, isolada do besouro pertencente à família Passalidae *Odontotaenius disjunctus* (NGUYEN et al., 2006; NGUYEN; SUH; BLACKWELL, 2011). O nome *Spathaspora* vem das palavras gregas “*spatha*”, um tipo

de espada larga, e “*spora*”, que significa semente (NGUYEN et al., 2006). A reprodução assexuada ocorre por brotamento, as células vegetativas são frequentemente globosas e hifas septadas verdadeiras e pseudohifas estão presentes (NGUYEN et al., 2006). Ascospores surgem sem conjugação e contêm um único ascosporo alongado e afilado nas extremidades, com uma membrana ao redor de seu eixo (NGUYEN et al., 2006).

A levedura *Spathaspora arborariae*, uma nova espécie pertencente ao clado *Spathaspora*, foi recentemente isolada dos biomas Cerrado e Mata Atlântica, no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, a partir de madeira em decomposição (CADETE et al., 2009). Assim como *S. passalidarum*, esta espécie produz ascos não deiscentes contendo um único ascosporo alongado e de extremidades cônicas (Figura 9). Células crescidas por três dias a 25°C em extrato de levedura (0,5%) e D-glicose (2%) apresentam formato ovóide a elipsoidal (2–3 x 2–4 µm), com gemulação multilateral, e as colônias formadas em ágar extrato de malte apresentam coloração branca, butirácea e cintilante (CADETE et al., 2009).

Figura 9 – Células em brotamento e ascos de *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A com um único ascosporo alongado e de extremidades curvas em ágar V8 diluído após 3 dias a 20°C. (CADETE et al., 2009).

Esta espécie é capaz de assimilar e fermentar D-glicose, D-xilose, galactose e maltose, com desempenho mais eficiente para D-glicose e D-xilose, porém apresenta preferência pelo consumo de D-glicose, que ocorre anteriormente ao de D-xilose (CADETE et al., 2009; CUNHA-PEREIRA et al., 2011). Entretanto, a utilização preferencial de D-glicose não é algo incomum, devido aos fatores de inibição causados por sua presença no meio (SPENCER-MARTINS, 1994).

2.4.4 Fatores que interferem na fermentação de pentoses a etanol

Para uma eficiente fermentação dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico é necessário, além da escolha de uma linhagem microbiana adequada, que as condições fermentativas aplicadas contribuam para um melhor desempenho fermentativo. Dentre os fatores preponderantes para o processo fermentativo, destacam-se a disponibilidade de oxigênio no meio, a temperatura, o pH inicial, a suplementação do meio e o tipo de linhagem utilizada.

A disponibilidade de oxigênio está entre os fatores ambientais mais importantes para as leveduras fermentadoras de D-xilose, afetando drasticamente a produção e rendimento de etanol, assim como a acumulação de xilitol no meio (DU PREEZ, 1994). As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, podem utilizar o oxigênio quando este está disponível no meio, mas na sua ausência são capazes de fermentar (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A disponibilidade de oxigênio no meio e sua taxa de absorção pelas células são os parâmetros que determinam se o fluxo de carbono será direcionado para a formação de biomassa, de etanol ou de outros álcoois, tais como xilitol, arabitól, ribitol e glicerol (DU PREEZ, 1994).

De acordo com a disponibilidade de oxigênio, o piruvato proveniente da via glicolítica pode ser direcionado para o metabolismo fermentativo ou respiratório. No metabolismo respiratório, as duas moléculas de piruvato são convertidas em duas moléculas de acetil-CoA, as quais entrarão no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, onde ocorre uma série de reações de oxidação e redução, transferindo a energia potencial, na forma de elétrons, para coenzimas transportadoras, que os transferem para uma cadeia de transporte de elétrons, ocorrendo a liberação de energia para conduzir a síntese de ATP (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Já a fermentação não requer oxigênio, apesar de ser capaz de ocorrer em sua presença, e não necessita do uso do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ou da cadeia transportadora de elétrons, além de produzir quantidades menores de ATP, pois grande parte da energia original do composto metabolizado permanece nas ligações químicas dos produtos finais orgânicos, como o etanol (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A fermentação de D-xilose é mais eficiente na presença de quantidades limitantes de oxigênio, pois este é o aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, influenciando no equilíbrio redox da célula. Em condições limitantes de oxigênio, leveduras com atividade da

enzima xilose-redutase dependente de ambos NADH e NADPH podem regenerar o NAD⁺ consumido, produzindo etanol como principal produto (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Quanto maior a aeração do meio, menor a probabilidade de formação de xilitol (FROMANGER et al., 2010). Entretanto, uma intensiva aeração pode levar a uma competição pelo NADH glicolítico entre a respiração mitocondrial e a fermentação alcoólica, levando a uma redução do rendimento em etanol (KUYPER et al., 2004).

Em trabalho realizado por Yablochkova et al. (2004), a produção de etanol pela levedura *Candida shehatae*, cuja a enzima xilose-redutase é dependente de NAD(P)H, cultivada em condição de microaerofilia foi caracterizada por maior atividade da xilose-redutase ligada ao NADH, enquanto que seu cultivo em condições anaeróbias favoreceu a ligação da enzima ao NADPH. Quando a enzima xilose-redutase se liga ao NADPH, ocorre um acúmulo de NADH, que pode ser removido por meio da formação de xilitol (KUYPER et al., 2004). Entretanto, Hou (2012), em estudo sobre a fermentação anaeróbia de D-xilose por *Spathaspora passalidarum*, constatou que esta espécie é capaz de fermentar eficientemente D-xilose, com produção extremamente baixa de xilitol, quando comparada com a levedura *Scheffersomyces stipitis*, utilizada como controle.

A temperatura mais utilizada na produção de etanol por leveduras se encontra em torno de 30°C (ABBI; KUHAD; SINGH, 1996; DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986; FROMANGER et al., 2010; JEFFRIES; ALEXANDER, 1990), variando de acordo com cada linhagem microbiana, tipo de substrato e demais condições de cultivo.

As espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose são mesófilas, ou seja, apresentam faixa ótima de temperatura em valores medianos, e também pH ótimo em níveis baixos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Em estudo realizado por Du Preez, Bosch e Prior (1986), a produção de etanol por *C. shehatae* e *Pichia stipitis* foi severamente afetada por valores de pH de 2,5 e 6,5, enquanto que a concentração de etanol aumentou na faixa de pH entre 4 e 5,5. Meio acidificados com ácidos orgânicos, como o ácido acético, são mais inibitórios para o crescimento de leveduras do que aqueles acidificados com ácidos minerais, como o ácido fosfórico (WALKER, 2000). Alguns compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos também podem apresentar efeito inibitório dependente do pH, como no caso do ácido acético, que quando está em sua forma não-dissociada penetra pela membrana citoplasmática e se dissocia dentro da célula, onde o pH é mais elevado, e, desta forma, ocorre

o decréscimo do pH intracelular (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). O ácido acético é normalmente encontrado em hidrolisados, sendo proveniente dos grupos acetil presentes nas xilanas, além de ser um dos maiores inibidores do crescimento e produção de etanol em hidrolisados hemicelulósicos (DU PREEZ, 1994).

A composição do meio e condições de cultura exercem grande influência na fermentação de D-xilose (DU PREEZ, 1994). Os componentes básicos necessários ao crescimento dos microrganismos são carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, porém metais, fatores de crescimento e vitaminas também podem ser requeridos (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). O carbono é essencial para a síntese de todos os compostos orgânicos celulares, o nitrogênio e o enxofre são requeridos, principalmente, para a síntese de proteínas e o fósforo, juntamente com o nitrogênio, para a síntese de DNA, RNA e ATP (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). O nitrogênio é essencial para a fermentação, sua adição ao meio permite uma fermentação mais rápida, enquanto que a sua deficiência pode levar à lentidão ou até mesmo impedir que o processo fermentativo ocorra (BACH et al., 2011). A interação de aminoácidos ou uréia com minerais influencia na produção de etanol e a adição de suplementos minerais, como magnésio, ferro, manganês, cálcio, zinco, entre outros, pode, inclusive, duplicar o rendimento em etanol (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009).

A composição do meio a ser fermentado é considerada um importante fator para o aumento da produtividade do processo, pois a conversão de D-xilose a etanol é influenciada por fatores nutricionais, tais como vitaminas e fontes de nitrogênio (SILVA et al., 2012). A produtividade frequentemente aumenta até quando a concentração de substrato se torna inibitória (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996), pois altas concentrações de açúcar aumentam o estresse osmótico, reduzindo o crescimento e a fermentação (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). No caso da levedura *C. shehatae*, esta apresenta uma maior produtividade volumétrica em etanol na concentração de D-xilose em torno de 50g/L (ABBI; KUHAD; SINGH, 1996; DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). Silva e colaboradores (2012) avaliaram o efeito da suplementação com diferentes fontes de nitrogênio na conversão de D-xilose a etanol por *Pichia stipitis* e concluíram que o extrato de levedura exerceu maior influência no processo, principalmente quando utilizado na concentração de 3 g/L, individualmente ou em combinação com as outras fontes analisadas, $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ e uréia.

Os meios de cultura utilizados devem conter os nutrientes em concentrações que resultem na melhor produtividade do produto de interesse, sendo que as condições ótimas para o crescimento celular não são, necessariamente, as mesmas para a formação do produto (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008). Frequentemente são adicionados nutrientes complexos, como peptona e extrato de levedura no meio de fermentação, uma vez que estes são ricos em vitaminas e nitrogênio (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Entre as fontes de nitrogênio inorgânicas, o sulfato de amônio tem sido o mais utilizado, devido ao seu baixo custo, porém também há uma grande disponibilidade de fontes orgânicas complexas de nitrogênio, como o extrato de levedura (rico em vitaminas do complexo B e aminoácidos), licor da maceração do milho, farelo de soja (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008) e extrato de farelo de arroz, fonte de aminoácidos (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002). Há também fontes de nitrogênio conhecidas como ricas ou de fácil metabolismo, como a peptona e outros concentrados proteicos comerciais, porém estas fontes são repressoras de algumas enzimas, além de terem custo mais elevado (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

A eficiente conversão dos resíduos lignocelulósicos em etanol também está relacionada à tolerância das leveduras ao etanol acumulado durante a fermentação. Com o aumento da concentração de etanol no meio seu efeito inibitório também será ampliado. Alguns dos efeitos inibitórios causados pela presença do etanol são: inibição do crescimento e viabilidade celular, decréscimo do volume interno da célula e aumento da fluidez da membrana celular, com consequente diminuição de sua integridade estrutural (WALKER, 2000). A crescente procura por novas linhagens e espécies microbianas tem contribuído para a otimização da fermentação de resíduos lignocelulósicos, pois cada tipo de linhagem empregada, geneticamente modificada ou naturalmente fermentadora, possui características próprias e, portanto, possibilita a melhora e redução dos custos do processo.

3 OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o potencial fermentativo de novas leveduras fermentadoras de D-xilose na produção de etanol de segunda geração a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;

Específicos

- Avaliar as linhagens *C. shehatae* BR6-2AI, *C. shehatae* BR6-2AY, *C. shehatae* CG8-8BY e *C. shehatae* PT1-1BASP em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose);
- Avaliar as linhagens *C. shehatae* BR6-2AY e *C. shehatae* CG8-8BY, selecionadas anteriormente, em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;
- Estudar o efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sobre o desempenho fermentativo da linhagem *C. shehatae* CG8-8BY, selecionada anteriormente, e da levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A;
- Estudar o efeito dos parâmetros temperatura, pH e agitação na fermentação por *C. shehatae* CG8-8BY e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar, doado pela Usina Santa Fé, localizada na cidade de Nova Europa, São Paulo, foi seco ao sol e armazenado em sacos em local seco e arejado para posterior utilização. O bagaço *in natura* foi analisado quanto a sua composição química (teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas) de acordo com metodologia validada por Gouveia et al. (2009). Para esta determinação, os experimentos foram conduzidos em triplicata e o bagaço, previamente moído em moinho de facas MARCONI MA-680 a 20 *mesh*, foi extraído em extrator do tipo *soxlet* com água e etanol. O tempo de extração foi de 24 horas para cada solvente. Iniciando-se com a água, a qual foi renovada após 12 horas. Decorrido o período de 24 horas de extração com este solvente, iniciou-se extração com o etanol, utilizando-se o mesmo procedimento de renovação de solvente a cada 12 horas. A extração foi utilizada para remover compostos de baixa massa molecular e metabólitos secundários presentes na biomassa, como carboidratos solúveis (sacarose), flavonoides, terpenos, entre outros (RAMOS, 2003).

Inicialmente, amostras contendo 2 gramas de massa seca foram acondicionadas individualmente em béqueres de vidro e tratadas com 10 mL de H₂SO₄ a 72% (v/v) em banho termostatizado a 45 °C durante 7 minutos, sob contínua agitação (Figura 10). Em seguida, interrompeu-se a reação pela adição de 275 mL de água destilada e a suspensão foi transferida quantitativamente para frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, que foram fechados com papel alumínio e autoclavados a 121 °C por 30 minutos. Após este período, os frascos foram resfriados à temperatura ambiente e seu conteúdo filtrado em funis de vidro com papel filtro qualitativo *Whatman*® n° 1, previamente tarado. A fração líquida, o hidrolisado hemicelulósico, foi coletada em balões volumétricos de 500 mL, que tiveram seu volume completado com água destilada. O conteúdo dos balões foi homogeneizado e armazenado para a determinação das concentrações de celobiose, D-glicose, D-xilose, L-arabinose, ácido acético, ácido fórmico, furfural e hidroximetilfurfural (HMF), compostos gerados durante a hidrólise da biomassa lignocelulósica. A fração sólida foi armazenada para posterior análise.

Figura 10 – Hidrólise do bagaço *in natura* com H_2SO_4 a 72% (v/v) em banho termostatzado a 45 °C.

Alíquotas do hidrolisado obtido foram filtradas em filtro Sep-Pak C18 (Millipore) para posterior determinação das concentrações de açúcares e ácido acético e fórmico, realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Agilent Technology serie A1100 (EUA). Para a determinação da concentração de celulose, utilizou-se a equação:

$$\% C = \% Gli \times 0,90 + \% Cel \times 0,95 + \% HMF \times 1,20 + \% AF \times 3,09 \quad (1)$$

Onde: *C*: Celulose; *Gli*: Glicose; *Cel*: Celobiose; *HMF*: Hidroximetilfurfural; *AF*: Ácido fórmico.

Para a determinação da concentração de hemicelulose, utilizou-se a equação:

$$\% H = \% Xil \times 0,88 + \% Ara \times 0,88 + \% AA \times 0,72 + \% Fur \times 1,37 \quad (2)$$

Onde: *H*: Hemicelulose; *Ara*: Arabinose; *AA*: Ácido acético; *Fur*: Furfural.

Para a determinação da lignina solúvel, transferiu-se 5 mL do hidrolisado para balões volumétricos de 100 mL, onde foram adicionadas 40 gotas de solução de NaOH 6,5 M e o volume completado com água destilada e homogeneizado.

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida da absorbância a 280 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e analisada de acordo com a equação:

$$\begin{aligned} \text{Lignina Solúvel (g/L)} &= 0,04187 \times (A - \text{Adp}) - 0,0003279 \\ \text{Adp} &= (C_F \times \varepsilon_F + C_{HMF} \times \varepsilon_{HMF}) \end{aligned} \quad (3)$$

Onde: A: Absorbância da solução a 280 nm; Adp: Absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF) a 280 nm; C_F e C_{HMF} : Concentração de furfural e hidroximetilfurfural (determinadas por CLAE); ε_F e ε_{HMF} : Absortividades do furfural e do HMF (que valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $\text{Lg}^{-1} \text{cm}^{-1}$).

Paralelamente, o material sólido retido nos filtros foi lavado com 1,5 L de água destilada e transferido para pesa-filtros, previamente tarados, e seco em estufa a 100 °C até massa constante. Posteriormente, os filtros contendo o material sólido foram transferidos para cadinhos previamente tarados e tampados, que permaneceram em mufla de aquecimento elétrico durante 2 horas a 800 °C. Após seu resfriamento em dessecadores, tiveram sua massa novamente quantificada, para determinação do teor de cinzas:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{M_C}{M_A} \times 100 \quad (4)$$

Onde: M_C : Massa de cinzas (diferença entre a massa do cadinho com cinzas e a massa do cadinho vazio); M_A : Massa de amostra base, seca.

A lignina insolúvel foi determinada pela diferença entre as massas do resíduo seco e a massa de cinzas pela seguinte equação:

$$\%L_{Ki} = \frac{M_K - M_C}{M_A} \times 100 \quad (5)$$

Onde: $\%L_{Ki}$: Lignina Klason insolúvel; M_K : Massa seca de lignina insolúvel; M_C : Massa de cinzas; M_A : Massa da amostra base, seca.

4.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em reator de aço inox com capacidade para 40 litros de volume operacional (Figura 11), localizado no Departamento de Biotecnologia (LOT), da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). A reação de hidrólise ocorreu com ácido sulfúrico, H_2SO_4 , (98% p/p de pureza) como catalisador na relação

sólido/líquido de 1:10, na proporção de 100 mg de H_2SO_4 para cada 1 g de matéria seca, a 121 °C durante 10 minutos. Após a hidrólise, o hidrolisado hemicelulósico obtido foi filtrado para a separação da fase sólida (celulignina), armazenado em bombonas e mantido sob refrigeração em câmara fria à temperatura de aproximadamente 4 °C.

Figura 11 – Reator para a hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

4.3 Concentração e tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico foi concentrado cinco vezes em relação ao seu volume inicial para aumentar o teor de açúcares e reduzir a concentração de alguns compostos tóxicos voláteis. Este procedimento foi realizado em concentrador à vácuo SPPENCER SCIENTIFIC com capacidade volumétrica de 30 litros, operado à temperatura de 70 °C de forma descontínua. O hidrolisado foi armazenado novamente em bombonas e mantido sob refrigeração à 4 °C em câmara fria, para posterior utilização.

Após a caracterização, o hidrolisado foi destoxificado pelo método de alteração de pH e adsorção com carvão ativo (CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2005). Este procedimento consistiu da elevação do pH do hidrolisado pela adição de óxido de cálcio (CaO) até pH 7,0, seguido de sua redução para 5,5 com ácido fosfórico (H_3PO_4) PA 85%. Em seguida, adicionou-se 2,5 % (m/v) de carvão ativo em pó, mantendo-se sob agitação de 200 rpm em incubadora de bancada a 30 °C por 60 minutos. Após cada etapa de alteração de pH, assim como de adsorção com carvão ativo, o hidrolisado foi filtrado à vácuo com papel filtro quantitativo para a remoção do precipitado formado. O hidrolisado concentrado e tratado foi autoclavado a 111 °C por 15 minutos e novamente caracterizado quanto ao pH e concentração de açúcares e compostos tóxicos.

4.4 Processo Fermentativo

4.4.1 Microrganismos

Foram utilizadas quatro linhagens da levedura *Candida shehatae*, cedidas pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca do Centro de Estudos de Insetos Sociais da UNESP, Campus de Rio Claro, São Paulo, e também a levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A, fornecida pelo Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa do Laboratório de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A levedura *S. arborariae* UFMG-HM19.1A foi isolada a partir de madeira em decomposição e as linhagens *C. shehatae* BR6-2AI e *C. shehatae* BR6-2AY de água de bromélias, *C. shehatae* CG8-8BY de cogumelo e *C. shehatae* PT1-1BASP de *Euterpe* sp. (açazeiro). As culturas foram mantidas em ágar YPMG (3 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 3 g/L de extrato de malte, 10 g/L de glicose, 20 g/L de ágar) a 4 °C.

4.4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir de culturas estoque recém repicadas em ágar YPMG e incubadas em placas de Petri em estufa a 30 °C por 24 horas. Alçadas das colônias foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio de cultura YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 30 g/L de D-xilose). Este meio foi preparado a partir de soluções estoque concentradas de cada componente, autoclavadas a 111 °C por 15 minutos. As vidrarias utilizadas no preparo do inóculo foram autoclavadas a 121 °C durante 15 minutos. As soluções foram misturadas assepticamente, de forma a se obter as concentrações desejadas de cada composto.

O cultivo foi realizado em incubadora de bancada com agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C durante 24 horas. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 xg por 20 minutos, lavadas com água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e ressuspensas em água esterilizada. A partir desta suspensão, calculou-se o volume necessário para inocular o meio de fermentação para conferir uma concentração celular inicial de 0,5 g/L.

4.4.3 Avaliação das linhagens de *Candida shehatae*

O desempenho fermentativo das linhagens de *C. shehatae* foi determinado em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose), conforme descrito no item 3.4.2. Os ensaios fermentativos foram conduzidos em triplicata em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL, contendo 100 mL de meio, inoculado com 0,5 g/L de células, a 30 °C e 200 rpm durante 48 horas em incubadora de bancada, coletando-se amostras periodicamente em diferentes intervalos de tempo.

As linhagens que apresentaram melhor desempenho foram avaliadas em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico destoxificado, cuja D-xilose foi ajustada para aproximadamente 50 g/L e pH 5,0. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, inoculados com suspensão celular inicial de 0,5 g/L. Os frascos foram suplementados com 3 g/L de extrato de levedura (SILVA et al., 2012) e incubados a 30 °C, 150 rpm por 96 horas, com retirada periódica de amostras ao longo da fermentação.

4.4.4 Avaliação da fonte de nitrogênio na fermentabilidade de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Foi utilizado dois tipos de suplementação (Tabela 6), para o inóculo e para a fermentação, em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para as leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e nas condições de concentração inicial de D-xilose, suspensão celular inicial, pH, volume de meio, temperatura, agitação e tempo de acordo com o item 3.4.3.

Tabela 6 – Suplementações utilizadas no preparo do inóculo e na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

	Suplementação 1		Suplementação 2	
	COMPONENTE	(g/L)	COMPONENTE	(g/L)
Inóculo	Peptona	20,0	Extrato de farelo de arroz	20,0
	Extrato de levedura	10,0	Sulfato de amônio	2,0
Hidrolisado	Extrato de levedura	3,0	Cloreto de cálcio	0,1

4.4.5 Avaliação dos efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Avaliou-se os efeitos dos fatores temperatura, agitação e pH isoladamente, assim como de suas interações, na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para as leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A. Para esta avaliação, utilizou-se planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central, (Tabelas 7 e 8) e os resultados foram analisados estatisticamente pelo *software* MiniTab 14. Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, inoculados com suspensão celular inicial de 0,5 g/L e suplementados com extrato de farelo de arroz (20 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e CaCl_2 (0,1 g/L).

Tabela 7 – Níveis em valores reais e codificados para o planejamento fatorial completo 2^3 ,

Fatores	Níveis		
	- 1	0	+ 1
X_1 – Temperatura (°C)	25	30	35
X_2 – Agitação (rpm)	100	150	200
X_3 – pH	4,0	5,0	6,0

Tabela 8 – Planejamento fatorial completo do tipo 2^3 , com três repetições no ponto central, para avaliação do efeito dos parâmetros temperatura, agitação e pH na produção de etanol por *C. shehatae* CG8-8BY e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH
1	– 1	– 1	– 1	25	100	4,0
2	+ 1	– 1	– 1	35	100	4,0
3	– 1	+ 1	– 1	25	200	4,0
4	+ 1	+ 1	– 1	35	200	4,0
5	– 1	– 1	+ 1	25	100	6,0
6	+ 1	– 1	+ 1	35	100	6,0
7	– 1	+ 1	+ 1	25	200	6,0
8	+ 1	+ 1	+ 1	35	200	6,0
9	0	0	0	30	150	5,0
10	0	0	0	30	150	5,0
11	0	0	0	30	150	5,0

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar

A determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar foi realizada em balança analítica *Bel Engineering*, modelo MB 200, por exposição do material à radiação infravermelha sob temperatura de 105 °C por 30 minutos.

4.5.2 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, glicerol, xilitol e etanol

As amostras provenientes da caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar, do hidrolisado hemicelulósico e dos ensaios fermentativos foram filtradas em filtro *Sep-Pak C18*

(*Millipore*) para a determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, ácido fórmico, xilitol e etanol. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo *Agilent Technology*, serie A1100 (EUA), nas seguintes condições: coluna *Bio-Rad* AMINEX HPX-87H (300 x 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C, volume de injeção de 20 µL, detector de índice de refração *Agilent*, fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

4.5.3 Determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural

Para a determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural as amostras foram filtradas em membrana *Minisart* e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo Waters 2487/USA, nas condições: coluna RP 18 (200 X 4,6mm) mantida à temperatura de 25°C; volume de injeção de 20 µL; detector de ultra-violeta SPD-10a UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,8 ml/min.

4.5.4 Determinação da concentração celular

A concentração celular do inóculo foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B, comprimento de onda de 600 nm. A concentração de células (g/L) foi calculada de acordo com uma curva de calibração, que correlacionou a absorbância a 600 nm com o peso seco das células obtidas após cultivo de 24 horas em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose) empregado no preparo do inóculo.

4.5.5 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em aparelho pH-metro *Hanna* HI221.

4.5.6 Determinação dos parâmetros fermentativos

4.5.6.1 Fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$), expresso em g/g, foi calculado pela equação:

$$y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (6)$$

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

4.5.6.2 Produtividade volumétrica em etanol (Q_P)

A produtividade volumétrica de etanol (Q_P) expressa a concentração de etanol produzido por tempo (g/L.h), e foi calculada de acordo com a equação:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{(P_f - P_i)}{(t_f - t_i)} \quad (7)$$

Onde: P_f e P_i = concentração final e inicial de produto; t_f e t_i = tempo final e inicial de fermentação

4.5.6.3 Eficiência de fermentação ($\eta\%$)

A eficiência de fermentação ($\eta\%$), expressa em porcentagem, representa a razão entre o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) obtido experimentalmente e o fator de rendimento máximo teórico (0,51 g/g) (KUYPERS et al., 2004).

$$\eta(\%) = \frac{(Y_{P/S} \text{ obtido})}{(Y_{P/S} \text{ teórico})} \times 100 \quad (8)$$

4.5.6.4 Porcentagem de consumo de D-xilose (Y%)

Considerando-se que o principal açúcar presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é a D-xilose, verificou-se a porcentagem de seu consumo de acordo com a equação:

$$Y\% = \left(\frac{S_i - S_f}{S_i} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde: S_f e S_i = concentração final e inicial de D-xilose.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A composição química do bagaço de cana-de-açúcar *in natura* (Tabela 9) foi determinada conforme metodologia validada por Gouveia et al. (2009) para caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. O balanço de massa obtido apresentou um valor de 96,33%, dentro dos padrões aceitos (95-105%) por Gouveia e colaboradores para avaliar o nível de exatidão da metodologia.

Tabela 9 – Composição química (%) de amostras de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*.

Componente (%)	Presente estudo	Canilha et al. (2011)	Rocha et al. (2011)	Gouveia et al. (2009)	Brienzo, Siqueira e Milagres (2009)
Celulose	34,64	45	45,5	42,8	42,4
Hemicelulose	18,9	25,8	27,0	25,8	25,2
Lignina	27,61	19,1	21,1	22,1	19,6
Cinzas	6,41	1,0	2,2	1,4	1,6
Extrativos	8,77	9,1	4,6	6,1	n/a

n/a: não avaliado

Após o processo de extração, verificou-se que a biomassa apresentou 8,77% de extrativos, valor que não difere significativamente do relatado em outros trabalhos, pois Gouveia et al. (2009) e Canilha et al. (2011) encontraram 6,1% e 9,1% de extrativos, respectivamente; enquanto que Rocha et al. (2011) encontraram 4,6%, utilizando extração apenas com etanol.

A celulose e a hemicelulose são os substratos para a produção do etanol de segunda geração, sendo importante determinar a porcentagem que estas frações correspondem na biomassa, assim como a quantidade de lignina presente. É desejável que a biomassa apresente grandes quantidades destes polissacarídeos e pouca lignina, pois esta libera compostos fenólicos durante o processo de hidrólise, os quais atuam como inibidores do processo fermentativo, além de dificultar o acesso das enzimas celulolíticas à celulose presente na celulignina. Entretanto, mesmo que a biomassa apresente grandes quantidades de celulose e

hemicelulose, é necessário que o pré-tratamento utilizado seja eficaz para a solubilização e recuperação de seus açúcares.

5.2 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A principal vantagem do pré-tratamento com ácido diluído é a solubilização dos açúcares hemicelulósicos, porém este não é muito eficaz para a degradação da celulose (GÍRIO et al., 2010). O hidrolisado hemicelulósico obtido após a hidrólise com ácido sulfúrico diluído apresentou concentração total de açúcares fermentescíveis de aproximadamente 18,14 g/L. A concentração de D-xilose (16,0 g/L) foi superior à concentração de D-glicose, indicando que as condições aplicadas foram seletivas para a hemicelulose. Em estudo realizado por Mussato e Roberto (2004) com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, os autores obtiveram 16,4 g/L de D-xilose, embora D-glicose e L-arabinose estivessem presentes em maiores concentrações. O mesmo ocorreu com hidrolisado de palha de trigo, em trabalho realizado por Canilha, Carvalho e Silva (2004), que apresentou concentração de D-xilose de 18,11 g/L. Estes resultados podem estar relacionados às diferenças existentes entre a composição da hemicelulose de cada espécie vegetal, sendo que as condições de hidrólise aplicadas resultaram na liberação de quantidades similares de D-xilose, principal açúcar presente em xilanas.

Após a concentração do hidrolisado, realizada sob vácuo a 70 °C, a concentração dos açúcares aumentou proporcionalmente, enquanto que a concentração de ácido acético, furfural e HMF aumentou desproporcionalmente (Tabela 10). Este aumento desproporcional pode estar relacionado à volatilização parcial destes compostos durante a etapa de concentração do hidrolisado (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002; MUSSATO; ROBERTO, 2004). O ácido acético é considerado o principal ácido liberado durante a hidrólise de hemicelulose acetiladas (RAMOS, 2003), apresentando um efeito inibitório para o crescimento da maioria das leveduras (WALKER, 2000).

Tabela 10 – Concentrações de açúcares e compostos inibidores em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes		Concentração (g/L)		
		Hidrolisado <i>in natura</i>	Hidrolisado concentrado (FC=5)	Hidrolisado destoxificado
Açúcares (g/L)	D-xilose	16,0	81,44	52,0
	D-glicose	0,99	6,62	3,63
	L-arabinose	1,15	5,77	3,00
Compostos inibidores (g/L)	Ácido acético	1,05	2,92	1,35
	Furfural	0,42	7,89	0,001
	HMF	0,02	3,53	0,0001
pH		1,26	0,71	5,02

FC = Fator de concentração

A quantidade de D-xilose presente no hidrolisado concentrado foi ajustada para 60 g/L e, após a etapa de destoxificação, este apresentou teor de 52 g/L, com perda de cerca de 13% desta pentose, semelhante ao encontrado por Canilha, Carvalho e Silva (2005). Os açúcares totais (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) apresentaram redução de 14% e o ácido acético de aproximadamente 21%, sendo este percentual de perda ligeiramente menor do que o encontrado por Carvalho et al. (2005), que utilizaram condições semelhantes de hidrólise e concentração inicial de açúcares em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O hidrolisado *in natura* apresentou pH de 1,25, mas após o processo de concentração seu pH era de 0,71. Este aumento desproporcional pode estar relacionado ao aumento na concentração de íons H^+ resultantes do processo de hidrólise com ácido sulfúrico diluído e também à presença de ácido acético no meio (CANETTIERI; SILVA; FELIPE, 2002).

5.3 Processo Fermentativo

5.3.1 Avaliação do desempenho das linhagens de *Candida shehatae*

5.3.1.1 Avaliação de linhagens de *Candida shehatae* em meio YPX

Avaliou-se o desempenho fermentativo em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose) de quatro linhagens da levedura *Candida shehatae*: BR6-2AI, CG8-8BY, PT1-1BASP e BR6-2AY. A produção máxima de etanol para as linhagens estudadas foi obtida após 48 horas de fermentação, com a completa exaustão da D-xilose do meio.

Aproximadamente 90% desta pentose foram consumidos pelas leveduras em 24 horas, que apresentaram elevada produção de biomassa celular. Esta elevada formação de biomassa pode estar relacionada à velocidade de agitação utilizada, 200 rpm, que permite um maior suprimento de oxigênio para os microrganismos, estimulando o crescimento celular. Com uma elevada disponibilidade de oxigênio no meio, uma parte do metabolismo é direcionada para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de elétrons, disponibilizando maior quantidade de ATP e possibilitando um aumento na biomassa celular.

As leveduras *C. shehatae* BR6-2AY e *C. shehatae* CG8-8BY apresentaram as melhores produções de etanol, 19,32 g/L e 18,87 g/L, respectivamente, quando comparadas com as outras linhagens (Figura 12). O xilitol, um subproduto deste processo fermentativo foi produzido apenas pela linhagem *C. shehatae* PT1-1BASP e decresceu após 24 horas, associado ao aumento de biomassa celular, indicando que esta levedura pode ter utilizado este poliol como fonte de carbono.

Figura 12 – Concentrações de D-xilose, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com *Candida shehatae* BR6-2AI (a), *C. shehatae* CG8-8BY (b), *C. shehatae* PT1-1BASP (c) e *C. shehatae* BR6-2AY (d) em meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona, 50 g/L D-xilose). Biomassa (●); D-xilose (□); etanol (■); xilitol (▲)

Os parâmetros fermentativos obtidos para as linhagens *C. shehatae* BR6-2AY e *C. shehatae* CG8-8BY foram ligeiramente superiores às demais linhagens avaliadas (Tabela 11). Os rendimentos em etanol obtidos pelas quatro leveduras ($Y_{P/S}$ de 0,44 a 0,48 g/g) foram superiores ao alcançado em estudo realizado com *C. shehatae* ATCC 22984 ($Y_{P/S}$ = 0,327 g/g), que utilizou D-xilose como fonte de carbono (FROMANGER et al., 2010). Entretanto, estes autores demonstraram produtividade volumétrica em etanol (Q_P = 2,2 g/L.h) superior aos valores obtidos com o presente estudo (Q_P de 0,35 a 0,37 g/L.h), utilizando processo de batelada alimentada, possivelmente devido às diferenças no modo de condução dos experimentos. De mesmo modo, Du Preez e colaboradores (1986) obtiveram rendimento em

etanol de 0,37 g/g com *C. shehatae* CSIR-Y492 em fermentação realizada em biorreator com regime de batelada, contendo 50 g/L de D-xilose. Em estudo realizado por Abbi, Kuhad e Singh (1996), os autores obtiveram produção de etanol de 18,0 g/L, rendimento em etanol de 0,43 g/g e produtividade volumétrica de 0,28 g/L.h com *C. shehatae* NCL-3501 em meio com 50g/L de D-xilose.

Tabela 11 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose ($Y\%$), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para linhagens de *Candida shehatae* em meio YPX (10,0 g/L de extrato de levedura, 20,0 g/L de peptona, 30,0 g/L D-xilose).

	<i>C. shehatae</i> BR6-2AI	<i>C. shehatae</i> CG8-8BY	<i>C. shehatae</i> PT1-1BASP	<i>C. shehatae</i> BR6-2AY
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,45 $\pm$ 0,01	0,47 $\pm$ 0,016	0,44 $\pm$ 0,02	0,48 $\pm$ 0,019
Q_P (g/L.h)	0,35 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,009	0,36 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,015
η (%)	89 $\pm$ 1,71	93 $\pm$ 3,12	86 $\pm$ 3,37	95 $\pm$ 3,78
Y (%)	99 $\pm$ 0,17	99 $\pm$ 0,14	98 $\pm$ 0,07	99 $\pm$ 0,13
Concentração celular (g/L)	3,76	3,72	3,80	3,40
Concentração de etanol (g/L)	17,90	18,87	17,27	19,32
Concentração de xilitol (g/L)	–	–	1,17	–
Tempo de fermentação (h)	48	48	48	48

De acordo com os resultados, as linhagens *C. shehatae* CG8-8BY e *C. shehatae* BR6-2AY apresentaram a melhor produção de etanol. Considerando seus desempenhos fermentativos, estas linhagens foram selecionadas para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

5.3.1.2 Avaliação de linhagens de *Candida shehatae* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Avaliou-se o desempenho fermentativo das leveduras *C. shehatae* CG8-8BY e *C. shehatae* BR6-2AY em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, contendo concentração inicial de D-xilose de aproximadamente 50 g/L e suplementado com 3 g/L de extrato de levedura. O tempo total de fermentação foi de 96 horas, superior ao meio YPX (10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 50 g/L de D-xilose), devido à presença de compostos inibidores no hidrolisado, mesmo após o processo de destoxificação. Os resultados foram calculados de acordo com o tempo de fermentação onde houve maior produção de etanol para cada linhagem.

A linhagem *C. shehatae* CG8-8BY demonstrou produção máxima de etanol de 11,49 g/L após 72 horas, enquanto que a linhagem *C. shehatae* BR6-2AY produziu 10,96 g/L de etanol após 96 horas (Figura 13).

Figura 13 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com *Candida shehatae* CG8-8BY (a) e *C. shehatae* BR6-2AY (b) em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado suplementado com 3 g/L de extrato de levedura. Biomassa (●); D-glucose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲)

As duas linhagens produziram xilitol após 72 horas de fermentação. Este poliol é produzido devido à necessidade de regeneração dos cofatores, a fim de manter o equilíbrio redox da célula (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Quando a enzima xilose-redutase se liga ao NADPH, o excesso de NADH pode ser removido por meio da formação de xilitol (KUYPER et al., 2004). O acúmulo de xilitol é favorecido em condições de

microaeração. Com o aumento da biomassa celular, a disponibilidade de oxigênio no meio é reduzida (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986), sendo o oxigênio dissolvido o principal fator regulador na fermentação de D-xilose por leveduras, afetando a produção de etanol e de xilitol (DU PREEZ, 1994).

As linhagens avaliadas apresentaram consumo inicial de D-glicose, seguido de D-xilose. Isto pode estar relacionado ao fato do mecanismo de transporte desta pentose para o interior da célula ser ativado apenas quando há queda nos níveis de D-glicose no meio (SPENCER-MARTINS, 1994). A atividade das enzimas xilose-redutase e xilitol-desidrogenase, induzidas pela presença de D-xilose e xilitol, respectivamente, pode ser reprimida por D-glicose (HOU, 2012). Entretanto, em estudo realizado por Souto-Maior, Runquist e Hahn-Hägerdal (2009) com *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada para fermentar D-xilose foi demonstrado que concentrações baixas de D-glicose estimulam o consumo de D-xilose, devido ao aumento da atividade da via glicolítica. As linhagens não apresentaram consumo de L-arabinose.

As leveduras *C. shehatae* CG8-8BY e *C. shehatae* BR6-2AY apresentaram eficiência de fermentação de 58 e 40% após 72 e 96 horas de fermentação, respectivamente. A linhagem *C. shehatae* CG8-8BY obteve rendimento em etanol ($Y_{P/S} = 0,30$ g/g) e produtividade volumétrica ($Q_P = 0,15$ g/L.h) superior à *C. shehatae* BR6-2AY ($Y_{P/S} = 0,21$ g/g e $Q_P = 0,11$ g/L.h), como demonstrado na tabela 12. Shupe e Liu (2012), ao avaliar duas linhagens de *C. shehatae* em extrato de “sugar maple”, resultante de pré-tratamento com água quente (“hot-water”), obtiveram 8,87 g/L e 6,06 g/L de etanol após 4 e 7 dias de fermentação, respectivamente. Abbi, Kuhad e Singh (1996) reportaram valores de rendimento em etanol de 0,37 g/g e 0,47 g/g com *C. shehatae* NCL-3501 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Outro estudo com hidrolisado de palha de arroz demonstrou produção de etanol de 16 g/L ($Y_{P/S} = 0,32$ g/g e $Q_P = 0,19$ g/L.h), utilizando *C. shehatae* CICC 1766 (SUN; TAO, 2010). Chandel e colaboradores (2007a) encontraram rendimento em etanol de 0,30 g/g e produtividade volumétrica de 0,21 g/L.h com *C. shehatae* NCIM 3501, empregando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado pelo método de “overliming”.

Tabela 12 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para linhagens de *Candida shehatae* em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 3 g/L de extrato de levedura.

	<i>Candida shehatae</i> CG8-8BY	<i>Candida shehatae</i> BR6-2AY
$Y_{P/S}$ (g/g)	$0,30 \pm 0,0000863$	$0,21 \pm 0,01$
Q_P (g/L.h)	$0,15 \pm 0,005$	$0,11 \pm 0,004$
η (%)	$58 \pm 0,02$	$40 \pm 1,93$
Y (%)	$68 \pm 1,73$	$90 \pm 0,36$
Concentração celular (g/L)	3,77	4,24
Concentração de etanol (g/L)	11,49	10,96
Concentração de xilitol (g/L)	1,0	1,46
Tempo de fermentação (h)	72	96

Um dos principais inibidores dos processos fermentativos envolvendo hidrolisados hemicelulósicos é o ácido acético (DU PREEZ, 1994). Entretanto, as duas linhagens avaliadas foram capazes de metabolizar este ácido, nas baixas concentrações presentes no meio utilizado no presente estudo. Estes dados corroboram com os obtidos por Delgenes, Moletta e Navarro (1996), onde a linhagem *C. shehatae* ATCC 22984 apresentou capacidade de assimilar quantidades significativas de ácido acético em meio sintético contendo diferentes concentrações deste ácido. De mesmo modo, em estudo realizado por Sun e Tao (2010) foi verificada a tolerância da linhagem *C. shehatae* CICC 1766 a diferentes concentrações de ácido acético, obtendo-se produção de 11,9 g/L de etanol no ensaio com adição de 1,0 g/L deste ácido no meio de cultura.

De acordo com os resultados, a linhagem *C. shehatae* CG8-8BY demonstrou maior potencial de produção de etanol. Considerando seu desempenho fermentativo, esta linhagem foi selecionada para a utilização nas etapas posteriores do presente trabalho.

5.3.1.3 Avaliação da fonte de nitrogênio na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

A composição do meio a ser fermentado é considerada importante para a viabilidade econômica do processo fermentativo, pois os fatores nutricionais influenciam na conversão de

D-xilose a etanol por leveduras (SILVA et al., 2012). Avaliou-se a utilização de extrato de farelo de arroz, uma fonte de nitrogênio de baixo custo, na suplementação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol pelas leveduras *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A, conforme descrito na tabela 6, item 3.4.4. Os resultados foram calculados de acordo com o tempo de fermentação onde houve maior produção de etanol para cada linhagem.

A levedura *C. shehatae* CG8-8BY apresentou maior produção de etanol (17 g/L) ao final de 72 horas, utilizando hidrolisado hemicelulósico suplementado com 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1 g/L de CaCl_2 (Figura 14). Em contrapartida, esta mesma linhagem produziu 9,27 g/L de etanol após 72 horas, quando cultivada em hidrolisado hemicelulósico suplementado com 3 g/L de extrato de levedura. A composição do meio e condições de cultura exercem grande influência na fermentação de D-xilose (DU PREEZ, 1994). O farelo de arroz contém, aproximadamente, de 12 a 15% de proteínas, 21,13% de ácidos graxos, 5,6% de fibra, 43,12% de carboidratos e 8,97% de cinzas (JIAMYANGYUEN et al., 2005). Este subproduto do processo de moagem do arroz é uma complexa fonte de nitrogênio (2,4%, aproximadamente), rica em aminoácidos, principalmente a lisina, um aminoácido essencial (CANETTIERI et al., 2002; KAHN, 2009).

Figura 14 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa para ensaios fermentativos com *Candida shehatae* CG8-8BY em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado suplementado com 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1 g/L de CaCl_2 (0,1 g/L) (a); e suplementado com 3 g/L de extrato de levedura (b). Biomassa (●); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲)

Recentemente, Milessi et al. (2012) reportaram produção de etanol de aproximadamente 8,6 g/L com *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, suplementado com 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1 g/L de CaCl_2 . Shupe e Liu (2012) apresentaram produção de etanol de 8,87 g/L e 6,06 g/L por duas linhagens de *C. shehatae* em extrato de “sugar maple”, suplementado com 1,5 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de peptona, 2 g/L KH_2PO_4 e 1 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Sun e Tao (2010) observaram produção de 16,1 g/L de etanol por *C. shehatae* CICC 1766 em meio formulado com hidrolisado de palha de arroz, 3 g/L de extrato de levedura, 0,25 g/L de ureia, 0,25 g/L de CaCl_2 , 0,25 g/L de MgSO_4 e 2,5 g/L de KH_2PO_4 .

A levedura *S. arborariae* UFMG-HM 19.1A, quando cultivada em meio suplementado apenas com extrato de levedura, não apresentou consumo de substrato e, conseqüentemente, crescimento celular e produção de etanol, indicando que as condições de cultura foram desfavoráveis para a linhagem. Entretanto, esta levedura produziu 5,4 g/L de etanol após 96 horas em meio suplementado com extrato de farelo de arroz, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e CaCl_2 (Figura 15). Devido à ausência de crescimento celular em meio contendo 3 g/L de extrato de levedura, infere-se que esta linhagem necessita de maiores quantidades de nitrogênio e também de outros compostos minerais associados. A interação de aminoácidos ou ureia com minerais influencia no aumento de produção de etanol e a adição de suplementos minerais, como magnésio, ferro, manganês, cálcio, zinco, entre outros, pode duplicar o rendimento em etanol (SLININGER; GORSICH; LIU, 2009). Em estudo realizado por Cunha-Pereira et al. (2011) com *S. arborariae* UFMG-HM 19.1A em meio sintético suplementado com 3g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona foi observada produção de etanol de 15 g/L em 72 horas. Cadete et al. (2012b) reportaram produção entre 15 g/L e 18 g/L em 24 horas por linhagens de *S. passalidarum* em meio sintético. Estes mesmos autores também demonstraram produção de etanol entre 3,3 g/L e 13,1 g/L por outras espécies pertencentes ao clado *Spathaspora*.

Figura 15 – Concentrações de açúcares, etanol, xilitol e biomassa por *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L), CaCl_2 (0,1 g/L). Biomassa (•); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲)

Os ensaios com *C. shehatae* CG8-8BY em meio suplementado com extrato de farelo de arroz resultaram em um rendimento em etanol de 0,33 g/g, produtividade volumétrica de 0,21 g/L.h, eficiência de fermentação de 64% e consumo de D-xilose de 99% após 72 horas de fermentação (Tabela 13). Em contrapartida, quando esta levedura foi cultivada em meio suplementado com extrato de levedura o rendimento em etanol ($Y_{P/S} = 0,20$ g/g) e a produtividade volumétrica ($Q_P = 0,12$ g/L.h) foram inferiores, assim como a eficiência de fermentação (39,4%) e o consumo de D-xilose (68%). Milessi et al. (2012) obtiveram rendimento em etanol de 0,22 g/g e produtividade de 0,12 g/L.h com *S. stipitis* NRRL Y-7124 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Silva e colaboradores (2012) reportaram produção de 15,7 g/L de etanol e consumo de D-xilose de 47,3% após 48 horas por *P. stipitis* NRRL Y-7124 em meio contendo 90 g/L de D-xilose e suplementado com 3 g/L de extrato de levedura. Sun e Tao (2010) demonstraram rendimento em etanol de 0,32 g/g e produtividade volumétrica de 0,19 g/L.h com *C. shehatae* CICC 1766 em hidrolisado de palha de arroz.

A levedura *S. arborariae* UFMG-HM 19.1A demonstrou rendimento em etanol de 0,14 g/g, produtividade volumétrica de 0,04 g/L.h, com eficiência de fermentação de 21% e consumo de D-xilose de 60% em meio suplementado com farelo de arroz. Cadete e colaboradores (2009) obtiveram rendimento em etanol de 0,37 g/g com esta mesma linhagem

em meio sintético. Cunha-Pereira et al. (2011) encontraram valores de rendimento em etanol de 0,45 g/g e produtividade de 0,16 g/L.h com *S. arborariae* UFMG-HM 19.1A em hidrolisado de casca de arroz. Cadete et al. (2012b) reportaram valores de rendimento em etanol entre 0,12 e 0,34 g/g para outras espécies pertencentes ao clado *Spathaspora*.

Tabela 13 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação (η %), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com extrato de levedura (3 g/L) e suplementado com extrato de farelo de arroz (20g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g/L) e CaCl_2 (0,1 g/L).

	<i>C. shehatae</i> CG8-8BY		<i>S. arborariae</i> UFMG-HM 19.1A
	Extrato de levedura	Extrato de farelo de arroz	Extrato de farelo de arroz
$Y_{P/S}$ (g/g)	$0,20 \pm 0,0359$	$0,33 \pm 0,0201$	$0,14 \pm 0,0187$
Q_P (g/L.h)	$0,12 \pm 0,00961$	$0,21 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,002$
η (%)	$39,40 \pm 7,04$	$64 \pm 3,95$	$21,20 \pm 3,67$
Y (%)	$68 \pm 5,76$	$99 \pm 0,002$	$60,23 \pm 0,51$
Concentração celular (g/L)	1,81	2,27	7,27
Concentração de etanol (g/L)	9,27	17,0	5,38
Concentração de xilitol (g/L)	0,28	0,87	—
Tempo de fermentação (h)	72	72	96

5.3.1.4 Avaliação dos efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A

5.3.1.4.1 Efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por *Candida shehatae* CG8-8BY

A levedura *C. shehatae* CG8-8BY teve a produção de biomassa e etanol favorecida em pH 5,0 e 6,0, embora esta linhagem também tenha apresentado crescimento celular favorável em pH 4,0 e temperatura de 25 °C. Não houve crescimento celular e fermentação nos ensaios

2 (35 °C, 100 rpm, pH 4,0) e 4 (35 °C, 200 rpm, pH 4,0). Observou-se produção de xilitol nos ensaios fermentativos que apresentaram formação de biomassa, exceto nas condições de 25°C, 200 rpm e pH 4,0, correspondentes ao ensaio 3. A melhor produção de xilitol (8,0 g/L) por esta linhagem ocorreu em temperatura de 35 °C, agitação de 100 rpm e pH 6,0 (ensaio 6), superior à produção de etanol (6,0 g/L), nestas mesmas condições. De mesmo modo, o ensaio 1 (25 °C, 100 rpm e pH 4,0) apresentou produção de 6,32 g/L de xilitol.

A produção de xilitol pode ocorrer quando há presença de D-xilose no meio de cultura. Em leveduras, após a entrada deste açúcar nas células este é reduzido a xilitol pela enzima xilose-redutase e pode ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase ou excretado para o meio (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). A produção deste poliol está associada à manutenção do equilíbrio redox da célula. O excesso de xilitol pode ser removido pela aeração do meio, entretanto, uma aeração excessiva pode reduzir o rendimento em etanol, devido à competição entre fermentação alcoólica e respiração celular (KUYPER et al., 2004).

A maior produção de etanol (11,82 g/L) pela levedura *C. shehatae* CG8-8BY ocorreu após 96 horas, nas condições de 25 °C, 100 rpm e pH 6,0, referentes ao ensaio 5. Entretanto, esta linhagem apresentou produção de 11,12 g/L a 11,60 g/L de etanol nos ensaios 9 a 11 (30 °C, 150 rpm, pH 5,0), correspondentes ao ponto central do planejamento fatorial completo 2³. Em estudo realizado por Abbi, Kuhad e Singh (1996), com *C. shehatae* NCL-3501 em meio contendo concentração inicial de D-xilose de 50 g/L, os autores reportaram produção de 18,0 g/L de etanol. Silva e colaboradores (2012) obtiveram 15,7 g/L de etanol com *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 em meio contendo 90 g/L de D-xilose. Shupe e Liu (2012), demonstraram produção de 8,87 g/L e 6,06 g/L de etanol com duas linhagens de *C. shehatae* em extrato de “sugar maple”, contendo aproximadamente 36 g/L de D-xilose. Foi reportada por Sun e Tao (2010) produção de 16 g/L de etanol em hidrolisado hemicelulósico de palha-de-arroz com *C. shehatae* CICC 1766.

Figura 16 - Concentrações (g/L) de etanol e xilitol obtidas nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para *Candida shehatae* CG8-8BY.

A linhagem *C. shehatae* CG8-8BY consumiu de 45% (25 °C, 100 rpm e pH 4,0, ensaio 1) a 99,83% (30 °C, 150 rpm e pH 5,0, ensaio 11) da D-xilose presente no meio, no período entre 72 e 96 horas. A eficiência de fermentação para os ensaios fermentativos oscilou entre 1,65% (25 °C, 100 rpm e pH 4,0, ensaio 1) a 51,46% (25 °C, 100 rpm e pH 6,0, ensaio 5).

Os valores de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$ de 0,01 a 0,26 g/g) e de produtividade volumétrica (Q_P de 0,004 a 0,16 g/L.h) variaram de acordo com as condições experimentais utilizadas (Figura 17). Chandel e colaboradores (2007a) encontraram rendimento em etanol de 0,30 g/g e produtividade de 0,21 g/L.h com a linhagem *C. shehatae* NCIM 3501 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com pH de 5,5, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 30 °C. De mesmo modo, Sun e Tao (2010) reportaram valores similares ($Y_{P/S}$ = 0,32 g/g e Q_P = 0,21 g/L.h), utilizando *C. shehatae* CICC 1766 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com pH ajustado para 5,5, temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm. Igualmente, em hidrolisado de palha de arroz, Abbi, Kuhad e Singh (1996) demonstraram rendimento em etanol ($Y_{P/S}$ de 0,37 g/g a 0,47 g/g) e produtividade volumétrica (Q_P de 0,15 g/L.h a 0,22 g/L.h) variáveis em ensaios com *C. shehatae* NCL-3501. Fromanger et al. (2010) obtiveram rendimento em etanol de 0,327 g/g e produtividade de 2,2 g/L.h com a levedura *C. shehatae* ATCC 22984 em meio sintético, utilizando sistema de batelada alimentada. Outros ensaios de batelada em biorreatores com meio sintético resultaram em um

rendimento em etanol de 0,37 g/g, utilizando a linhagem *C. shehatae* CSIR-Y492 (DU PREEZ et al., 1986).

Figura 17 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{p/s}$ (g/g)] e produtividade volumétrica [Q_p (g/L.h)], obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para *Candida shehatae* CG8-8BY.

A tabela 14 demonstra a matriz do planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central, com as variáveis de entrada em nível codificado (X_1 , X_2 e X_3) e real (temperatura, agitação e pH), respectivamente, e suas respostas ($Y_{p/s}$ e Q_p). Também estão demonstradas a eficiência de fermentação, porcentagem de consumo de D-xilose e concentração final de células, etanol e xilitol. Os resultados foram calculados com base no tempo onde houve maior produção de etanol para cada ensaio fermentativo.

Tabela 14 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para *Candida shehatae* CG8-8BY obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	η (%)	Y (%)	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Tempo (h)
1	- 1	- 1	- 1	25	100	4,0	0,01	0,004	1,65	81,0	2,0	0,28	6,32	72
2	+ 1	- 1	- 1	35	100	4,0	0,00	0,00	*	*	0,55	*	*	96
3	- 1	+ 1	- 1	25	200	4,0	0,24	0,08	47,89	45,97	2,30	5,83	—	96
4	+ 1	+ 1	- 1	35	200	4,0	0,00	0,00	*	*	0,32	*	*	96
5	- 1	- 1	+ 1	25	100	6,0	0,26	0,16	51,46	91,94	3,29	11,82	2,82	96
6	+ 1	- 1	+ 1	35	100	6,0	0,21	0,08	42,0	61,18	1,98	6,0	8,0	72
7	- 1	+ 1	+ 1	25	200	6,0	0,22	0,13	43,63	99,74	6,69	10,17	1,81	72
8	+ 1	+ 1	+ 1	35	200	6,0	0,08	0,03	15,52	71,85	3,40	2,34	3,93	72
9	0	0	0	30	150	5,0	0,23	0,16	46,0	99,70	1,95	11,60	1,84	96
10	0	0	0	30	150	5,0	0,24	0,15	47,11	99,71	1,89	11,12	1,92	96
11	0	0	0	30	150	5,0	0,26	0,16	50,36	99,83	3,39	11,58	2,91	72

* Crescimento celular e fermentação ausentes

O diagrama de Pareto, apresentado na figura 18, demonstra os efeitos das variáveis e de suas interações sobre o fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para *C. shehatae* CG8-8BY. Observa-se que, em um nível de 90% de confiança para ambas as respostas, $Y_{P/S}$ e Q_P , o pH foi o fator mais significativo, seguido da temperatura e da interação entre agitação e pH. Para o fator de rendimento em etanol, também foi significativo a interação entre temperatura e agitação, enquanto que para a produtividade volumétrica, além dos fatores citados, a interação da temperatura com o pH também foi significativa. A agitação não apresentou significância para nenhuma das respostas.

Figura 18 - Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis e suas interações com nível de confiança de 90% ($p \leq 0,1$) para as variáveis resposta: fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] e produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] (a) por *Candida shehatae* CG8-8BY.

A análise de variância (ANOVA) para as respostas $Y_{P/S}$ e Q_P (Tabelas 15 e 16, respectivamente), também realizada com 90% de confiança, corrobora com os resultados demonstrados no diagrama de Pareto.

Tabela 15 – Análise de variância (ANOVA) para o fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] pela levedura *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,059666	0,0596660	0,0198887	150,84	0,007
Interações de 2ª ordem	3	0,035286	0,0352858	0,0117619	89,20	0,011
Interações de 3ª ordem	1	0,002469	0,0024689	0,0024689	18,72	0,049
Curvatura	1	0,028893	0,0288926	0,0288926	219,13	0,005
Erro residual	2	0,000264	0,0002637	0,0001319		
Erro puro	2	0,000264	0,0002637	0,0001319		
Total	10	0,126577				

DF = grau de liberdade; Seq SS = Soma sequencial dos quadrados entre os grupos (fatores); Adj SS = Soma dos quadrados com grupos (erro); Adj MS = quadrado médio; F = divisão do fator MS pelo erro MS; P = valor de $p \leq 0,1$.

Tabela 16 – Análise de variância (ANOVA) para a produtividade volumétrica [Q_p (g/L.h)] pela levedura *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,0221660	0,0221660	0,0073887	202,83	0,005
Interações de 2ª ordem	3	0,0050865	0,0050865	0,0016955	46,54	0,021
Interações de 3ª ordem	1	0,0004715	0,0004715	0,0004715	12,94	0,069
Curvatura	1	0,0194606	0,0194606	0,0194606	534,23	0,002
Erro residual	2	0,0000729	0,0000729	0,0000364		
Erro puro	2	0,0000729	0,0000729	0,0000364		
Total	10	0,0472575				

DF = grau de liberdade; Seq SS = Soma sequencial dos quadrados entre os grupos (fatores); Adj SS = Soma dos quadrados com grupos (erro); Adj MS = quadrado médio; F = divisão do fator MS pelo erro MS; P = valor de $p \leq 0,1$.

Os gráficos dos efeitos principais e de suas interações para o fator de rendimento em etanol (Figura 19) e produtividade volumétrica (Figura 20) demonstra um modelo não-linear. Os melhores resultados correspondem às condições de 30 °C, 150 rpm e pH 5,0, referentes ao

ponto central, sendo que, para os demais ensaios, a temperatura em seu nível inferior (25 °C) e o pH em seu nível superior (6,0) foram os fatores mais significativos.

Figura 19 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] por *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Figura 20 - Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] por *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Os resultados estão representados pelos gráficos de superfície de resposta, considerando as variáveis temperatura e pH para as respostas $Y_{P/S}$ (Figura 21) e Q_P (Figura 22), sendo as melhores respostas localizadas próximo ao ponto central.

Figura 21 – Superfície de resposta para o fator de rendimento em etanol [$Y_{p/s}$ (g/g)] com os fatores temperatura e pH para *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Figura 22 – Superfície de resposta para produtividade volumétrica [Q_p (g/L.h)] com os fatores temperatura e pH para *Candida shehatae* CG8-8BY, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

De acordo com os resultados, os melhores desempenhos fermentativos de produção de etanol foram obtidos com as condições referentes ao ponto central (30 °C, 150 rpm, pH 5,0), sendo que a variável agitação demonstrou pouca significância no processo. Embora a disponibilidade de oxigênio no meio esteja entre os fatores ambientais mais importantes para a produção de etanol (DU PREEZ, 1994), a variação da agitação (100, 150 e 200 rpm) utilizada no presente estudo foi insuficiente para exercer grande influência no processo fermentativo com a linhagem *C. shehatae* CG8-8BY. O crescimento celular não ocorreu nos ensaios 2 e 4, onde a temperatura estava em seu nível máximo (35 °C) e o pH em seu nível mínimo (4,0), indicando que esta interação é insuficiente para o desenvolvimento da linhagem.

5.3.1.4.2 *Efeitos da temperatura, agitação e pH na produção de etanol por Spathaspora arborariae UFM-HM 19.1A*

A levedura *S. arborariae* UFM-HM 19.1A não apresentou crescimento celular e produção de etanol nos ensaios com pH 4,0, exceto quando este estava associado com as condições de 25 °C e 100 rpm (ensaio 1), onde apresentou produção de 1,73 g/L de etanol. De acordo com os resultados, infere-se que o pH 4,0 seja desfavorável para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela linhagem estudada. A produção de biomassa oscilou entre 2,47 g/L (25 °C, 100 rpm, pH 4,0, ensaio 1) e 10,12 (35 °C, 200 rpm, pH 6,0, ensaio 8), de acordo com as condições experimentais utilizadas, indicando que esta levedura possui crescimento favorável em temperaturas mais elevadas. Cadete et al. (2009), ao descreverem a espécie, relataram que esta linhagem é capaz de crescer até uma temperatura de 37 °C. Nguyen et al. (2006) observaram que *S. passalidarum* NRRL Y-27907, espécie filogeneticamente relacionada, apresenta crescimento até 40 °C.

A maioria dos ensaios fermentativos apresentou produção máxima de etanol após 96 horas de fermentação (Figura 23). Os resultados foram analisados de acordo com o tempo em que ocorreu maior acúmulo de etanol em cada fermentação. Obteve-se produção máxima de 11,6 g/L de etanol com a linhagem *S. arborariae* UFM-HM 19.1A em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com pH 5,0, sob temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm (ensaio 11). Cadete e colaboradores (2012a) reportaram produção de etanol entre 15 e 18 g/L por linhagens de *S. passalidarum* após 24 horas de fermentação. Estes mesmos autores obtiveram concentrações de etanol entre 3,3 g/L e 13,1 g/L em meio sintético com três novas espécies pertencentes a este gênero, e de 7,2 g/L a 9,5 g/L com estas leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com pH 5,5, 30 °C e 200 rpm. Hou (2012) obteve aproximadamente 12 g/L de etanol com *S. passalidarum* ATCC MYA-4345 em meio sintético, com agitação de 120 rpm e temperatura de 32 °C. Cunha-Pereira et al. (2011) reportaram produção de 15 g/L de etanol por *S. arborariae* UFM-HM 19.1A após 72 horas de cultivo em meio sintético com pH 5,0, agitação de 180 rpm e temperatura de 28 °C.

Observou-se a formação de xilitol na maioria dos ensaios, com produção máxima de 9,35 g/L nas condições de 35 °C, 200 rpm e pH 6,0, correspondente ao ensaio 8. O acúmulo de

xilitol é favorecido em condições de baixa aeração do meio e com o aumento da biomassa celular a disponibilidade de oxigênio no meio é reduzida (DU PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1986). O oxigênio dissolvido é o principal fator regulador na fermentação de D-xilose por leveduras, afetando a produção de etanol e de xilitol (DU PREEZ, 1994).

Figura 23 - Concentrações (g/L) de etanol e xilitol obtidas nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para *Spathaspora arborariae* UFM-HM19.1A.

A linhagem *S. arborariae* UFM-HM 19.1A apresentou rendimento em etanol de 0,26 g/g e produtividade volumétrica de 0,15 g/L.h em ensaio conduzido nas condições de 30 °C, 150 rpm e pH 5,0, referente ao ponto central (ensaio 11). Em contrapartida, quando cultivada em meio de cultura com pH 6,0, agitação de 100 rpm e temperatura de 35 °C (ensaio 6) apresentou os menores valores dos parâmetros fermentativos ($Y_{P/S} = 0,01$ g/g e $Q_P = 0,001$ g/L.h). Cadete e colaboradores (2009), com esta mesma linhagem, obtiveram rendimento em etanol de 0,37 g/g, utilizando meio sintético com pH 5,0, 28 °C e 160 rpm. Cunha-Pereira et al. (2011) reportaram rendimento em etanol de 0,45 g/g e produtividade de 0,16 g/L.h por *S. arborariae* UFM-HM 19.1A em meio sintético com pH 5,0, 28 °C e 180 rpm. Outras espécies pertencentes ao clado *Spathaspora* demonstraram rendimentos em etanol ($Y_{P/S} = 0,12$ g/g a 0,34 g/g) variáveis em meio sintético (CADETE et al., 2012b).

O consumo de D-xilose foi de aproximadamente 100% nos ensaios 7 (200 rpm, 25 °C, pH 6,0), 8 (200 rpm, 35 °C, pH 6,0) e 10 (150 rpm, 30 °C, pH 5,0), com produção de biomassa

de 4,21 g/L a 10,12 g/L. O aumento da aeração do meio pode levar à diminuição da fermentação e aumento da respiração celular, com formação de biomassa (KUYPER et al., 2004). A maior eficiência de fermentação (51,1%) foi obtida no ensaio 11 (150 rpm, 30 °C, pH 5,0) após 96 horas (Tabela 17). Cunha-Pereira e colaboradores (2011) observaram consumo de D-xilose de 45% em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de 84% em meio sintético. Cadete et al. (2012a) reportaram consumo de D-xilose de 98% em 24 horas por linhagens de *S. passalidarum* em meio sintético e entre 55 e 86 %, após 48 horas, para três novas espécies pertencentes ao gênero *Spathaspora*. De modo geral, as condições experimentais utilizadas, nas quais ocorreu crescimento celular, demonstraram eficiente consumo de D-xilose por *S. arborariae* UFM-HM 19.1A.

Figura 24 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{p/s}$ (g/g)] e produtividade volumétrica [Q_p (g/L.h)], obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 para *Spathaspora arborariae* UFM-HM19.1A.

Tabela 17 – Fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)], produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)], eficiência de fermentação ($\eta\%$), consumo de D-xilose (Y%), concentração celular (g/L), concentração de etanol (g/L) e concentração de xilitol (g/L) para *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A obtidos nos ensaios (E1 a E11) do planejamento fatorial completo 2^3 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	Temperatura (°C)	Agitação (rpm)	pH	$Y_{P/S}$	Q_P	η (%)	Y (%)	Células (g/L)	Etanol (g/L)	Xilitol (g/L)	Tempo (h)
1	- 1	- 1	- 1	25	100	4,0	0,08	0,02	14,8	10,8	2,47	1,73	–	72
2	+ 1	- 1	- 1	35	100	4,0	0,00	0,00	*	*	0,41	*	*	96
3	- 1	+ 1	- 1	25	200	4,0	0,00	0,00	*	*	0,49	*	*	96
4	+ 1	+ 1	- 1	35	200	4,0	0,00	0,00	*	*	0,50	*	*	96
5	- 1	- 1	+ 1	25	100	6,0	0,19	0,07	37,47	56,16	4,46	5,1	2,37	96
6	+ 1	- 1	+ 1	35	100	6,0	0,01	0,001	1,16	81,1	5,51	0,06	1,84	72
7	- 1	+ 1	+ 1	25	200	6,0	0,15	0,07	29,1	99,58	8,84	8,0	1,13	96
8	+ 1	+ 1	+ 1	35	200	6,0	0,11	0,07	22,41	100,0	10,12	4,8	9,35	72
9	0	0	0	30	150	5,0	0,19	0,11	37,0	89,0	4,87	7,92	3,3	96
10	0	0	0	30	150	5,0	0,21	0,12	40,9	100	4,21	8,7	2,9	96
11	0	0	0	30	150	5,0	0,26	0,15	51,1	88,0	4,25	11,6	2,1	96

* Crescimento celular e fermentação ausentes

O diagrama de Pareto, apresentado na figura 25, demonstra os efeitos das variáveis e de suas interações sobre o fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) para *S. arborariae* UFM-HM 19.1A. De acordo com os resultados, observa-se que, em um nível de 90% de confiança, apenas o pH demonstrou significância para as respostas $Y_{P/S}$ e Q_P . O gênero *Spathaspora*, descoberto recentemente com a espécie *S. passalidarum*, (NGUYEN et al., 2006) possui características singulares, como a presença de ascos não deiscentes, contendo um único ascosporo alongado e curvilíneo nas extremidades (NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2009; CADETE et al., 2012b). Por ser um gênero novo, as espécies ainda necessitam de maiores estudos exploratórios, para que seja possível identificar os fatores que influenciam tanto positiva quanto negativamente em seu processo fermentativo. Apesar do diagrama de Pareto ter demonstrado que as variáveis e suas interações foram pouco significativas, percebe-se que o pH apresentou maior influência, haja vista que a linhagem não apresentou crescimento favorável nos ensaios com pH 4,0, em combinação com as demais condições de temperatura e agitação.

Figura 25 – Diagrama de Pareto com os efeitos estimados das variáveis e suas interações com nível de confiança de 90% ($p \leq 0,1$) para as variáveis resposta: fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] (a) e produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] (b) por *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A.

A análise de variância (ANOVA) para o fator de rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) (Tabelas 18 e 19, respectivamente), também realizada com 90% de confiança, corrobora com os resultados demonstrados no diagrama de Pareto.

Tabela 18 – Análise de variância (ANOVA) para o fator de rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] pela levedura *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,0293251	0,0293251	0,0097750	7,07	0,126
Interações de 2ª ordem	3	0,0114970	0,0114970	0,0038323	2,77	0,276
Interações de 3ª ordem	1	0,0007129	0,0007129	0,0007129	0,52	0,547
Curvatura	1	0,0506321	0,0506321	0,0506321	36,61	0,026
Erro residual	2	0,0027662	0,0027662	0,0013831		
Erro puro	2	0,0027662	0,0027662	0,0013831		
Total	10	0,0949333				

DF = grau de liberdade; Seq SS = Soma sequencial dos quadrados entre os grupos (fatores); Adj SS = Soma dos quadrados com grupos (erro); Adj MS = quadrado médio; F = divisão do fator MS pelo erro MS; P = valor de $p \leq 0,1$.

Tabela 19 – Análise de variância (ANOVA) para a produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] pela levedura *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Fonte	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Efeitos principais	3	0,0055427	0,0055427	0,0018476	3,78	0,216
Interações de 2ª ordem	3	0,0022924	0,0022924	0,0007641	1,56	0,413
Interações de 3ª ordem	1	0,0002554	0,0002554	0,0002554	0,52	0,545
Curvatura	1	0,0205504	0,0205504	0,0205504	42,00	0,023
Erro residual	2	0,0009785	0,0009785	0,0004893		
Erro puro	2	0,0009785	0,0009785	0,0004893		
Total	10	0,0296193				

DF = grau de liberdade; Seq SS = Soma sequencial dos quadrados entre os grupos (fatores); Adj SS = Soma dos quadrados com grupos (erro); Adj MS = quadrado médio; F = divisão do fator MS pelo erro MS; P = valor de $p \leq 0,1$.

Os gráficos dos efeitos principais e de suas interações para o fator de rendimento em etanol (Figura 26) e para a produtividade volumétrica em etanol (Figura 27) demonstram um modelo não-linear. Os melhores resultados foram com as condições referentes ao ponto central, sendo que, para os demais ensaios, a temperatura em seu nível inferior (-1) e o pH em seu nível superior (+1) foram os fatores mais significativos.

Figura 26 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta rendimento em etanol [$Y_{p/s}$ (g/g)] por *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Figura 27 – Gráfico dos efeitos principais (a) e de suas interações (b) para a variável resposta produtividade volumétrica [Q_p (g/L.h)] por *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Os resultados estão representados pelos gráficos de superfície de resposta, considerando as variáveis temperatura e pH para as respostas $Y_{P/S}$ (Figura 28) e Q_P (Figura 29), sendo as melhores respostas localizadas próximo ao ponto central.

Figura 28 – Superfície de resposta para o rendimento em etanol [$Y_{P/S}$ (g/g)] com os fatores temperatura e pH para *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

Figura 29 – Superfície de resposta para a produtividade volumétrica [Q_P (g/L.h)] com os fatores temperatura e pH para *Spathaspora arborariae* UFM-HM 19.1A, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três repetições no ponto central.

De acordo com os resultados, os melhores desempenhos fermentativos na produção de etanol foram obtidos com as condições referentes ao ponto central (30 °C, 150 rpm, pH 5), sendo que o pH foi o parâmetro mais significativo. A agitação demonstrou pouca significância no processo, possivelmente porque a variação utilizada (100, 150 e 200 rpm) foi insuficiente para exercer grande influência no processo fermentativo pela linhagem estudada.

6 CONCLUSÕES

As linhagens de *Candida shehatae* avaliadas neste estudo demonstraram evidenciado potencial para a fermentação de D-xilose a etanol. Dentre estas, a levedura *C. shehatae* CG8-8BY apresentou o melhor desempenho, com produção de 11,49 g/L de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar ($Y_{P/S} = 0,30$ g/g e $Q_P = 0,15$ g/L.h) e eficiência de fermentação de 59% , consumindo 95% da D-xilose do meio de cultura.

O extrato de farelo de arroz demonstrou ser uma fonte de nitrogênio promissora e de baixo custo na suplementação de hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol de segunda geração. As melhores produções de etanol pelas linhagens *C. shehatae* CG8-8BY (17,0 g/L, $Y_{P/S} = 0,33$ g/g, $Q_P = 0,21$ g/L.h) e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A (5,38 g/L, $Y_{P/S} = 0,14$ g/g, $Q_P = 0,04$ g/L.h) ocorreram quando as leveduras foram cultivadas em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz.

Entre os fatores pH, agitação e temperatura, avaliados de acordo com as condições do planejamento fatorial completo 2^3 , pode-se afirmar que o pH apresentou a maior influência para o rendimento em etanol e produtividade volumétrica pelas linhagens *C. shehatae* CG8-8BY e *S. arborariae* UFMG-HM19.1A, seguido da temperatura. O pH entre 5,0 e 6,0 foi preferencial para as duas linhagens avaliadas.

De acordo com o planejamento fatorial, as leveduras estudadas são tolerantes a uma ampla faixa de temperatura (25 a 35 °C), porém os melhores desempenhos fermentativos foram obtidos com a temperatura em valores medianos (30 °C).

Nas condições de 30 °C, 150 rpm e pH 5,0, referentes ao ponto central, a linhagem *C. shehatae* CG8-8BY obteve os melhores resultados (11,58 g/L de etanol, $Y_{P/S} = 0,26$ g/g e $Q_P = 0,16$ g/L.h), assim como *S. arborariae* UFMG-HM19.1A (11,6 g/L de etanol, $Y_{P/S} = 0,26$ g/g e $Q_P = 0,15$ g/L.h). As leveduras estudadas demonstraram potencial para a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. O aprimoramento dos parâmetros fermentativos, assim como o uso de linhagens microbianas eficazes e o conhecimento da composição química da biomassa vegetal, são fatores preponderantes para o desenvolvimento do processo de produção de etanol de segunda geração, contribuindo para um melhor desenvolvimento em larga escala.

REFERÊNCIAS

- ABBI, M.; KUHAD, R. C.; SINGH, A. Fermentation of xylose and rice straw hydrolysate to ethanol by *Candida shehatae* NCL-3501. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 20-23, 1996.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, p. 1515-1524, 2008.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- ANP – Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biocombustíveis. 2012. Disponível em: < <http://www.anp.gov.br/>>. Acesso em: jan. 2012.
- BACH, B. et al. Effect of nitrogen addition during alcoholic fermentation on the final content of biogenic amines in wines. **Annals of Microbiology**, v. 61, p.185-190, 2011.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.
- BALAT, M.; BALAT, H.; OZ, C. Progress in bioethanol processing. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 34, p. 551–573, 2008.
- BNDES; CGEE (Coord.). **Bioetanol de cana-de-açúcar**: energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro: BNDES, 2008.
- BRIENZO, M.; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F. Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicellulose extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 199-204, 2009.
- BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 399-403, 2004.

CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009. doi: 10.1111/j.1567-1364.2009.00582.x.

CADETE et al. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **Plos one**, v.7, n.8, p. 1-11, 2012a.

CADETE et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek**, 2012b. DOI 10.1007/s10482-012-9822-z

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Porto Alegre: ARTMED Ed., 2000.751p.

CANETTIERI, E. V; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 8, n. 3. p. 323-331, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Caracterização do hidrolisado de palha de trigo visando extração da xilose para a bioconversão em xilitol. In: VII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO – Universidade do Vale do Paraíba, 2004. **Anais...** 2004, p. 1221-1224.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Estratégias de preparação do inóculo para bioprodução de xilitol utilizando hidrolisado de palha de trigo. In: BRAZILIAN JOURNAL OF FOOD TECHNOLOGY, 5º SIPAL, p. 117-120, 2005.

CANILHA, L. et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de “desconstrução” da fibra vegetal. **Revista Analytica**, n. 44, p. 48-54, 2009.

CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, p. 1467-1475, 2011. doi: 10.1007/s10295-010-0931-2.

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

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. **Revista Analytica**, n. 18, p. 48-55, 2005.

CARVALHO, W. et al. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2191-2195, 2009.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947-1950, 2007a.

CHANDEL, A. K. et al. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, n. 1, p. 14-32, 2007b.

CHEN, W-H et al. Ethanol production from rice straw hydrolysates by *Pichia stipitis*. **Energy Procedia**, v. 14, p. 1261-1266, 2012.

CHEN, C-L. Lignins: occurrence in woody tissue, isolation, reactions and structure. In: LEWIN, M.; GOLDSTEIN, I.S. (Eds). **Wood structure and composition**. New York: Marcel Dekker, 1991.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012**. Brasília: CONAB, 2012.

CUNHA-PEREIRA, F. et al. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4218-4225, 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, p. 220-225, 1996.

DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 360-364, 1986.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factor affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 944-956, 1994.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Top production of sugarcane. 2011. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: fev. 2013.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FROMANGER, R. et al. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, p. 437-445, 2010.

GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GOLDEMBERG, J. The Brazilian biofuels industry. **Biotechnology for Biofuels**, 2008. doi:10.1186/1754-6834-1-6.

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.

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

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, p. 937-953, 2007. doi:10.1007/s00253-006-0827-2.

HERRERA, M. C. Cane, sugar and the environment. In: FAO INTERNATIONAL SUGAR CONFERENCE, 2000, Havana. **Proceedings...** FAO, 2000. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/003/w3647e/W3647E03.htm>>. Acesso em: nov. 2011.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbial And Cell Physiology**, v. 94, p. 205-214, 2012.

JEFFRIES, T. W.; ALEXANDER, M. A. Production of ethanol from xylose by *Candida shehatae* grown under continuous or fed-batch conditions. In: BIOTECHNOLOGY IN PULP AND PAPER MANUFACTURE: APPLICATIONS AND FUNDAMENTAL INVESTIGATIONS. Boston: Butterworth-Heinemann, 1990, cap. 29, p. 311-321. Disponível em: <<http://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1990/jeffr90a.pdf>>. Acesso em: out. 2011.

JIAMYANGYUEN, S.; SRIJESDARUK, V.; HARPER, W.J. Extraction of rice bran protein concentrate and its application in bread. **Songklanakarin J Sci Technol**, v. 27, p. 55–64, 2005

KAHLON, T.S. (2009) Rice bran: production, composition, functionality and food applications, physiological benefits. In: CHO, S.S.; SAMUEL, P. (Eds). **Fiber ingredients: food applications and health benefits**. Boca Raton: CRC Press, 2009

KUYPER, M. et al. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. **FEMS Yeast Research**, v. 4, p. 655-664, 2004.

MARTONE et al. Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture. **Current Biology**, v. 19, p. 169-175, 2009. doi: 10.1016/j.cub.2008.12.031.

MEYER, S. A; PAYNE, R. W.; YARROW, D. *Candida* Berkhout. In: KURTZMAN, P. C.; FELL, J. W. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study**. 4 ed. Amsterdam: Elsevier, 2000, p. 552-553.

MILESSI, T. S. S. et al. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate, 2012. **3 Biotech**. doi:10.1007/s13205-012-0098-9

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Avaliação de diferentes tipos de carvão ativo na destoxificação de hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 94-100, 2004.

NGUYEN, N. H. et al. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, p. 1232-1241, 2006.

NGUYEN, N. H.; SUH, S-O.; BLACKWELL, M. *Spathaspora* N.H. Nguyen, S.-O.Suh & M. Blackwell. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The Yeasts: a taxonomic study**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2011, cap. 22. p. 795-797.

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

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

PASHA, C.; KUHAD, R. C.; VENKATESWAR RAO, L. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS₃ strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1480-1489, 2007. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03375.x.

PEREIRA JR, N.; BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. Séries em Biotecnologia - Tecnologia de Bioprocessos.

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

ROCHA, G. J. M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003. doi:10.1007/s10295-003-0049-x

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SHUPE, A. M.; LIU, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. **Biomass & Bioenergy**, v. 39, p. 31-38, 2012.

SILVA, et al. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts: a review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 331-339, 1998.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. **Xylose fermentation. Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 66-80, 1988.

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

SOUTO-MAIOR, A. M.; RUNQUIST, D.; HAHN-HÄGERDAL, B. Crabtree-negative characteristics of recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 143, p. 119-123, 2009.

SPENCER-MARTINS, I. Transport of sugars in yeasts: implications in the fermentation of lignocellulosic materials. **Bioresource Technology**, v. 50, p. 51-57, 1994.

SUN, W-L; TAO, W-Y. Comparison of cell growth and ethanol productivity on different pretreatment of rice straw hemicelulose hydrolysate by using *Candida shehatae* CICC 1766. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 11, p. 1105-1109, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Mapa da produção. 2008. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: fev. 2013.

WALKER, G. M. **Yeast: physiology and biotechnology**. Scotland: John Wiley & Sons, 2000.

WALTER, A. et al. Perspectives on fuel ethanol consumption and trade. **Biomass & Bioenergy**, v.32, p. 730-748, 2008.

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

YABLOCHKOVA, E. N. et al. The Activity of Key Enzymes in Xylose-Assimilating Yeasts at Different Rates of Oxygen Transfer to the Fermentation Medium. **Microbiology**, v. 73, n. 2, p. 129-133, 2004.

APÊNDICES

Apêndice A – Fluxograma de atividades realizadas.

Apêndice B – Curvas de calibração da concentração celular de *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A em meio sintético, pelo método do peso seco em função da absorbância a 600 nm.

▪ *Candida shehatae* CG8-8BY

▪ *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A

APÊNDICE C – Variação de pH para linhagens de *Candida shehatae* em meio YPX (50 g/L de D-xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura) e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (HHBCA); e variação de pH para *C. shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A em HHBCA suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e suplementado com 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,1 g/L de CaCl_2 .

Meio YPX

Meio formulado com HHBCA

Candida shehatae CG8-8BY *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A

APÊNDICE D – Concentração de açúcares, biomassa, etanol e xilitol durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Candida shehatae* CG8-8BY para os ensaios 1 a 6 (a, b, c, d, e, f, respectivamente), de acordo com planejamento fatorial completo 2³, com três pontos centrais. Biomassa (●); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲).

APÊNDICE E – Concentração de açúcares, biomassa, etanol e xilitol durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Candida shehatae* CG8-8BY para os ensaios 7 a 11 (g, h, i, j, k, respectivamente), de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três pontos centrais. Biomassa (●); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲).

APÊNDICE F – Concentração de açúcares, biomassa, etanol e xilitol durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A para os ensaios 1 a 6 (a, b, c, d, e, f, respectivamente), de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três pontos centrais. Biomassa (●); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲).

APÊNDICE G – Concentração de açúcares, biomassa, etanol e xilitol durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *Spathaspora arborariae* UFMG-HM 19.1A para os ensaios 7 a 11 (g, h, i, j, k, respectivamente), de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três pontos centrais. Biomassa (●); D-glicose (◇); D-xilose (□); L-arabinose (△); etanol (■); xilitol (▲).

APÊNDICE H – Variação de pH para *Candida shehatae* CG8-8BY e *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A para os ensaios 1 a 11, de acordo com planejamento fatorial completo 2^3 , com três pontos centrais.

▪ *Candida shehatae* CG8-8BY

▪ *Spathaspora arborariae* UFMG-HM19.1A