

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

*João Paulo Alves Silva*

**Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis*  
empregando hidrolisado de palha de arroz**

Lorena  
2007

**João Paulo Alves Silva**

**Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis*  
empregando hidrolisado de palha de arroz**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de concentração: Conversão de biomassa

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Inês Conceição Roberto

Lorena  
2007

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 Universitária  
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Silva, João Paulo Alves

Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz / João Paulo Alves Silva ; orientadora Inês Conceição Roberto . -- 2006

144 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Biotecnologia 2. Produção de Etanol 3. Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz 4. *Pichia stipitis* 5. Suplementação nutricional 6. Aeração. I. Título.

574.6 - CDU

*Dedico esta dissertação aos meus pais, Luiz e Gilda, e à minha irmã Sharlley, pelo apoio incondicional.*

*À Livia, pelo amor, incentivo e confiança sempre.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a Deus por tudo por todos que de alguma forma me ajudaram a concluir este trabalho.*

*À todo o povo brasileiro, principalmente aos cidadãos excluídos por inúmeras razões do maior benefício que uma nação pode ofertar ao seu povo: Educação.*

*À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Inês Conceição Roberto, pela idéia inicial deste trabalho, pela orientação, confiança, paciência e pelo aprendizado que este período me proporcionou.*

*À FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.*

*À todos os professores, funcionários e alunos do laboratório e do Departamento de Biotecnologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.*

*À meus pais Gilda e Luiz, minha irmã Sharlley, meus avós Joaquim, Elza, Luiz e Carmen, e toda a minha família, pelo incentivo constante.*

*À Livia pelo amor, companheirismo, apoio e incentivo.*

*Aos amigos do laboratório: Rogério, Priscila, Taís, Aline, Francislene, Daniela G., Daniela C., Solange, Paulinho e Nicanor.*

*À Livia, Sharlley, Andréia, tia Graça, Barreto e Márcia, João Vicente e Érica, Lucinha, Birão, Joaquim e Kathleen, Juliano e Juliane, Raul e Márcia, pela amizade.*

## RESUMO

SILVA, J. P. A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007. 144 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

No presente trabalho foram estudados a necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para bioconversão a etanol pela levedura *Pichia stipitis*, e os efeitos da agitação e da razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ , em frascos agitados, sobre os parâmetros fermentativos deste processo. Os estudos da suplementação do hidrolisado para produção de etanol por bioconversão pela levedura *Pichia stipitis* avaliou a adição dos nutrientes: uréia (0 a 2,3 g/L)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0 a 1,0 g/L) e extrato de levedura (0 a 3,0 g/L). Este estudo mostrou que apenas a adição 3 g/L de extrato de levedura foi necessária para que o processo alcançasse bons resultados de conversão ( $Y_{P/S} = 0,29$  g/g) e produtividade em etanol ( $Q_P = 0,24$  g/L.h) não necessitando portanto da adição dos demais nutrientes. Comparado com o meio suplementado com todos os nutrientes, a suplementação com apenas 3 g/L de extrato de levedura, levou a um aumento de 14% na produtividade do processo. A avaliação da oxigenação em frascos agitados mostrou que a aeração foi um fator capaz de influenciar fortemente os parâmetros de fermentação ( $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ ). A condição de maior aeração favoreceu a produção de células e a condição de menor aeração favoreceu a conversão em etanol, porém com baixa produtividade, sendo a produtividade em etanol favorecida por condições intermediárias de aeração, correspondente a agitação de 200 rpm e a razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  de 2,5, onde foram alcançadas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ) de 0,36 g/g e 0,39 g/L.h, respectivamente, o que representa um aumento de cerca de 63% a produtividade e 24% a conversão em etanol, quando comparado com as condições de aeração utilizadas anteriormente. A cinética de fermentação de *Pichia stipitis* no hidrolisado empregando as condições de suplementação nutricional e aeração otimizadas mostrou que a máxima concentração de etanol alcançada para o hidrolisado suplementado foi cerca de 23,6 g/L após 48 horas, consumindo neste tempo 86 % dos açúcares presentes no meio. Comportamento semelhante foi observado para o meio sintético, onde, no mesmo tempo, a máxima concentração de etanol foi de 24,4 g/L, porém com completo consumo dos açúcares.

Palavras-chave: Etanol. *Pichia stipitis*. Suplementação nutricional. Aeração. Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

## ABSTRACT

SILVA, J. P. A. **Study of ethanol production by *Pichia stipitis* using rice straw hydrolysate**. 2007. 144 f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2007.

The present work studied the necessity of nutritional supplementation of rice straw hemicellulosic hydrolysate for ethanol bioconversion by *Pichia stipitis*, and the aeration (effects of agitation and  $V_{\text{flask}}/V_{\text{medium}}$  ratio) in agitated flasks, on the fermentative parameters of the process. The studies on the hydrolysate supplementation for ethanol production by *Pichia stipitis* yeast bioconversion evaluated the nutrients addition: urea (0 to 2.3 g/L),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0 to 10 g/L) and yeast extract (0 to 3.0 g/L). This study showed that only the addition of 3g/L yeast extract was enough to obtain good results for ethanol conversion ( $Y_{P/S} = 0.29$  g/g) and productivity ( $Q_P = 0.24$  g/L.h). By comparing to the medium supplemented with all the nutrients, the supplementation with only 3 g/L yeast extract increased 14% the process productivity. The evaluation of the oxygenation in agitated flasks showed that the aeration highly influenced the fermentative parameters ( $Y_{P/S}$  and  $Q_P$ ). The condition of higher aeration favored the cells production and the condition of lower aeration favored the ethanol conversion, but with low productivity. The ethanol productivity was favored by intermediary conditions of aeration, correspondent to 200 rpm agitation and 2.5  $V_{\text{flask}}/V_{\text{medium}}$  ratio, thus obtaining 0.36 g/g product conversion ( $Y_{P/S}$ ) and 0.39 g/L.h ethanol productivity ( $Q_P$ ). This means an increase of approximately 63% productivity and 24% ethanol conversion, when compared to the aeration conditions previously used. The kinetics of *Pichia stipitis* fermentation in the hydrolysate using the optimized conditions of nutritional supplementation and aeration rate showed that the maximum ethanol concentration for the supplemented hydrolysate was about 23.6 g/L after 48h, consuming 86% sugars present in the medium. Similar behavior was observed for the synthetic medium where, with the same time, the maximum ethanol concentration was 24.4 g/L, but with the complete sugars consumption.

**Key-words:** Ethanol, *Pichia stipitis*, nutritional supplementation, aeration, rice straw hemicellulosic hydrolysate.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
2.1	ETANOL.....	10
2.1.1	<i>Aspectos Relevantes</i> .....	10
2.1.2	<i>Métodos de produção de etanol</i> .....	11
2.2	MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	15
2.2.1	<i>Composição dos materiais lignocelulósicos</i> .....	15
2.2.2	<i>Hidrólise dos materiais lignocelulósicos</i> .....	18
2.2.3	<i>Palha de arroz</i> .....	20
2.3	METABOLISMO DE XILOSE EM LEVEDURAS .....	22
2.4	MICROORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL .....	24
2.5	FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOCONVERSÃO.....	27
2.6	SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE CULTURA.....	31
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO.....	36
4.1.1	<i>Matéria prima</i> .....	36
4.1.2	<i>Hidrólise ácida</i> .....	36
4.1.3	<i>Destoxificação</i> .....	36
4.1.4	<i>Concentração do hidrolisado</i> .....	37
4.1.5	<i>Tratamento do hidrolisado</i> .....	37
4.2	PROCESSO FERMENTATIVO .....	37
4.2.1	<i>Microrganismo</i> .....	37
4.2.2	<i>Preparo do inóculo</i> .....	37
4.2.3	<i>Avaliação da toxicidade do hidrolisado</i> .....	38
4.2.4	<i>Estudo da suplementação de nutrientes no hidrolisado</i> .....	39
4.2.5	<i>Efeito da agitação/aeração na produção de etanol</i> .....	41



4.2.6	<i>Cinética de fermentação nas condições otimizadas</i> .....	42
4.3	ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DOS EXPERIMENTOS.....	42
4.3.1	<i>Determinação do teor de umidade da palha de arroz</i> .....	42
4.3.2	<i>Determinação da concentração celular</i> .....	42
4.3.3	<i>Determinação dos teores dos açúcares, de ácido acético e de etanol</i> .....	43
4.3.4	<i>Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural e outros compostos fenólicos</i> .....	43
4.3.5	<i>Determinação dos compostos fenólicos totais</i> .....	43
4.3.6	<i>Determinação de pH</i> .....	43
4.4	METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	44
4.4.1	<i>Determinação dos parâmetros fermentativos</i> .....	44
4.4.1.1	Fator de conversão de D-xilose em etanol ( $Y_{P/S}$ ).....	44
4.4.1.2	Fator de conversão de D-xilose em células ( $Y_{X/S}$ ).....	44
4.4.1.3	Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ ).....	44
4.4.2	<i>Análise estatística</i> .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>45</b>
5.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ.....	45
5.2	ENSAIOS FERMENTATIVOS.....	49
5.2.1	<i>Avaliação da toxicidade do hidrolisado</i> .....	49
5.3	AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO HIDROLISADO.....	51
5.4	EFEITO DA AGITAÇÃO/AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL.....	77
5.5	CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS.....	96
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

No início da década de 70, com a crise mundial do petróleo, aliado ao fato deste ser uma fonte de energia não renovável, iniciou-se uma busca por fontes energéticas alternativas, com o intuito de diminuir o consumo de petróleo. Como resposta à esta crise foi criado no Brasil em 1975 o Programa Nacional do Álcool (PROÁLCOOL), o qual deu origem nos dias de hoje ao maior sistema de produção de energia comercial a partir de biomassa do mundo, através da substituição de cerca de 40% da gasolina por etanol. Assim o país tornou-se pioneiro no desenvolvimento de tecnologia para automóveis movidos a álcool hidratado, sendo o PROÁLCOOL ainda hoje, referência mundial.

As principais fontes de matéria prima utilizadas atualmente para a produção de etanol são a cana de açúcar, o amido de milho e o açúcar de beterraba. Estes produtos agrícolas têm grandes aplicações alimentícias, o que desperta um interesse por novas alternativas para a produção de etanol. Uma possível e promissora fonte de matéria prima para a produção de etanol e diversos outros produtos, através de bioconversão, são os materiais lignocelulósicos. Estes materiais representam uma abundante fonte de energia renovável em todo o mundo, disponível na forma de resíduos agrícolas e florestais. Estes resíduos são gerados e acumulados na natureza, o que resulta em sérios problemas de poluição ambiental. O desenvolvimento de tecnologias que visam o aproveitamento destes resíduos representa um importante avanço tecnológico.

Nos últimos anos, vários trabalhos têm sido realizados buscando viabilizar a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Entretanto, segundo a literatura científica, isso só será possível se todos os açúcares presentes nos hidrolisados forem fermentados com elevado rendimento e produtividade.

A xilose é o açúcar predominante no hidrolisado da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos, sendo o segundo mais abundante nestes materiais, o que faz da bioconversão da xilose em etanol um modo em potencial de reduzir os custos de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. A bioconversão de xilose em etanol é regulada por diversos fatores dos quais se destacam a concentração inicial de substrato, aeração, pH e nutrientes. Os estudos em meios sintéticos têm apresentado resultados promissores, frente a otimização dos diferentes fatores. Todavia, a utilização dos hidrolisados hemicelulósicos como substrato é afetada diferentemente devido à complexa composição química destes meios.

Um aspecto importante a ser considerado na bioconversão dos hidrolisados de biomassa é com relação à suplementação nutricional, uma vez que sob o ponto de vista industrial, a otimização dos níveis dos nutrientes pode representar uma redução no custo de formulação do meio e maior simplicidade do processo fermentativo. Muitas vezes o custo dos pré-tratamentos e da adição de nutrientes pode ser o condicionante da implementação de um processo à escala industrial.

O aproveitamento da fração hemicelulósica de biomassa vegetal para a obtenção de produtos de interesse industrial, constitui uma das principais linhas de pesquisa conduzidas pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP). Visando contribuir para o desenvolvimento destas pesquisas e dando continuidade ao estudo da obtenção de etanol por fermentação, o presente trabalho propõe-se a um estudo da produção de etanol por bioconversão da fração hemicelulósica do hidrolisado de palha de arroz, visando estabelecer condições adequadas ao processo fermentativo com ênfase na necessidade de suplementação de nutrientes ao hidrolisado.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ETANOL

#### 2.1.1 Aspectos Relevantes

O etanol é o produto químico orgânico de maior volume produzido industrialmente (RATNAM et al., 2005) e possivelmente o mais antigo produzido pela biotecnologia tradicional. Suas atuais aplicações incluem o uso em bebidas, como produto químico e como combustível (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). O estudo da fermentação de etanol tem ganhado importância devido ao aumento na demanda nos últimos anos como combustível automotivo e como complemento para gasolina (RATNAM et al., 2005; SUN; CHENG, 2005). Além de ser uma fonte de energia renovável, o etanol apresenta outras vantagens sobre a gasolina, por ser um combustível oxigenado que contém 35% de oxigênio, o que reduz a emissão de NO<sub>x</sub> e materiais particulados oriundos da combustão. A queima do etanol produzido por fermentação não leva a um aumento líquido de dióxido de carbono na atmosfera (DEMIRBAS, 2005; NILSSON, 2005). O uso de etanol como combustível apresenta ainda outras vantagens, como a redução da dependência do petróleo externo, a criação de empregos nas áreas rurais, a redução da poluição do ar e redução das alterações climáticas causadas pela emissão de dióxido de carbono.

A estimativa da produção mundial de etanol para 1998 foi de cerca de 33,3 bilhões de litros (BERG, 1998 apud DEMIRBAS, 2005), sendo os processos fermentativos responsáveis por cerca de 90% da produção mundial de etanol, e o restante, cerca de 10% do etanol, produzido por processos sintéticos (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Da produção mundial, em bilhões de litros, a América

---

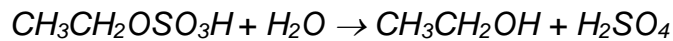
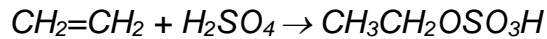
BERG, C. Towards a world ethanol market? First World Ethanol Conference: preparing for global competition. Ratzeburg. **F.O. Licht Commodity Analysis**, Germany, 1998.

produziu cerca de 22,3, a Ásia 5,7, a Europa 4,6, a África 0,5 e a Oceania 0,2. O Brasil se destaca como o maior produtor mundial, com uma produção 13,5 bilhões de litros, seguido pelos EUA, com uma produção de 6,4 bilhões de litros.

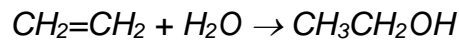
### 2.1.2 Métodos de produção de etanol

Os métodos de produção de etanol podem ser divididos em dois grandes grupos, os métodos de produção que utilizam vias sintéticas e os que se fundamentam em vias biotecnológicas de produção.

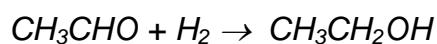
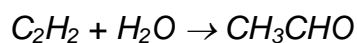
Dentre os processos por via sintética a hidratação do etileno é o processo mais antigo de produção de etanol, sendo conhecido há mais de cem anos. Este processo é realizado em três etapas, primeiramente o etileno reage com ácido sulfúrico em um reator de coluna para formar um mono-sulfato, que posteriormente é hidrolisado com água, formando etanol, sendo finalmente separado do ácido sulfúrico diluído.



Outro processo sintético é hidratação direta, onde um gás rico em etileno reage com água em um reator de leito fixo contendo catalisador, no qual o etanol é formado, sendo posteriormente recuperado em um sistema de destilação.

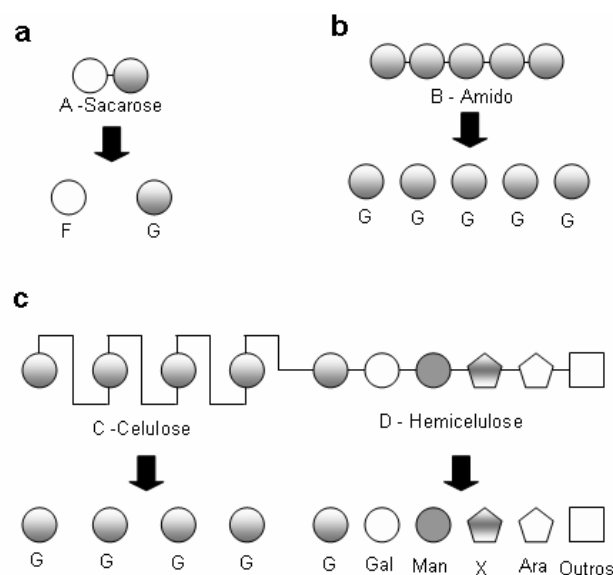


O etanol pode também ser produzido a partir do acetileno através de uma reação com água, tendo como catalisador o ácido sulfúrico e sulfato de mercúrio, onde é formado acetaldeído, o qual é reduzido facilmente por hidrogenação catalítica, produzindo etanol (MORRISON, 1983).



Os processos biotecnológicos são responsáveis pela grande maioria do etanol produzido atualmente. Cerca de 90% do etanol produzido em todo o mundo tem como matéria prima produtos agrícolas, sendo que a cana de açúcar e açúcar de beterraba correspondem a 60% deste total e o restante correspondente a grãos, principalmente amido de milho (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). Segundo estes autores, países como o Brasil, Índia e África do Sul têm como principal matéria prima para a produção de etanol a cana de açúcar, sendo utilizada a beterraba na França e o amido de milho nos Estados Unidos.

O etanol pode ser produzido através da fermentação direta de açúcares simples ou, a partir de polissacarídeos que podem ser convertidos em açúcares tais como amido e celulose. Desta forma, as fontes de carboidratos podem ser classificadas em três categorias: (1) açúcares simples: de cana de açúcar, de beterraba, de melão e frutas (Figura 2.1a); (2) amido: de grãos, batatas e raízes (Figura 2.1b); (3) celulose: de madeira, resíduos agrícolas, resíduos de papel e resíduos de colheita (Figura 2.1c).



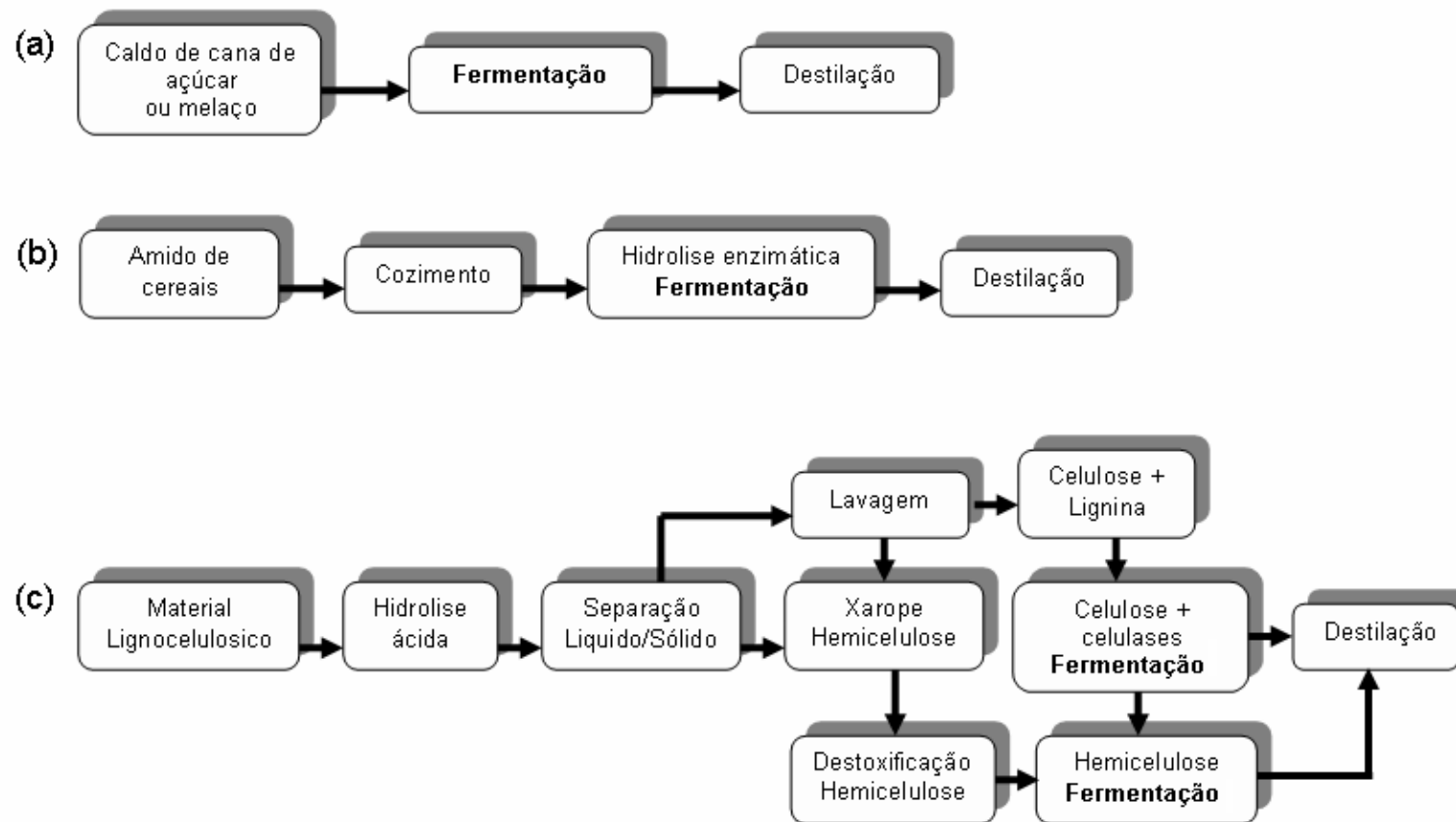
**Figura 2.1** - Fontes de carboidratos para a produção de etanol, (a) açúcar simples; (b) amido; (c) materiais lignocelulósicos. Os monossacarídeos obtidos após a hidrólise são representados por: G glicose, Gal galactose, F frutose Man manose, X xilose, Ara arabinose Outros L-rhamnose, L-fucose, ácidos urônicos (adaptado de ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

A produção de etanol geralmente é realizada em três etapas: (1) a obtenção da solução de açúcares fermentáveis, (2) a fermentação destes açúcares a etanol e (3) a separação e purificação de etanol, usualmente por destilação (DEMIRBAS, 2005).

Processos de transformação de açúcares em etanol são relativamente simples por não necessitarem de nenhuma etapa de hidrólise. Microrganismos como *Saccharomyces cerevisiae* podem utilizar diretamente a sacarose presente na solução de açúcar (por exemplo, caldo de cana ou melaço). Após a fermentação os microrganismos podem ser reutilizados e o excesso de biomassa celular seca pode ser usado na alimentação animal, e a vinhaça, subproduto da destilação, pode ser usada como fertilizante. Em processos que utilizam amido de cereais ou de milho é necessária a realização de uma etapa de hidrólise antes da fermentação, onde o amido é gelatinizado por cozimento e posteriormente sofre uma hidrólise enzimática onde são gerados monômeros de glicose, os quais são fermentados por microrganismos. Os processos de produção de etanol que utilizam estas matérias primas podem ser considerados bem estabelecidos (SANCHEZ et al., 2004).

Os processos que utilizam materiais lignocelulósicos envolvem etapas bem mais complexas que os processos de fermentação de açúcares simples e amido, pois além do emprego de condições mais severas no processo de hidrólise, pode haver também a necessidade de etapas adicionais como pré-tratamento e destoxificação (MOSIER et al., 2005).

Na Figura 2.2 são mostrados fluxogramas simplificados das etapas de produção de etanol a partir de (a) cana de açúcar, (b) amido de milho e (c) materiais lignocelulósicos.



**Figura 2.2** - Fluxograma simplificado da produção de etanol a partir de (a) cana de açúcar, (b) amido de milho e (c) materiais lignocelulósicos (adaptado de ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).



## 2.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

### 2.2.1 Composição dos materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos representam uma das fontes de energia renováveis mais abundantes do planeta, sendo seus principais componentes orgânicos a celulose, a hemicelulose e a lignina. As proporções destes variam de acordo com a espécie vegetal e outros fatores biológicos como diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie, tecidos especiais e condições de crescimento (GOLDSTEIN, 1981; WYMAN, 1999; FENGEL; WEGENER, 1989). A composição aproximada de alguns tipos de matérias lignocelulósicos está apresentada na Tabela 2.1.

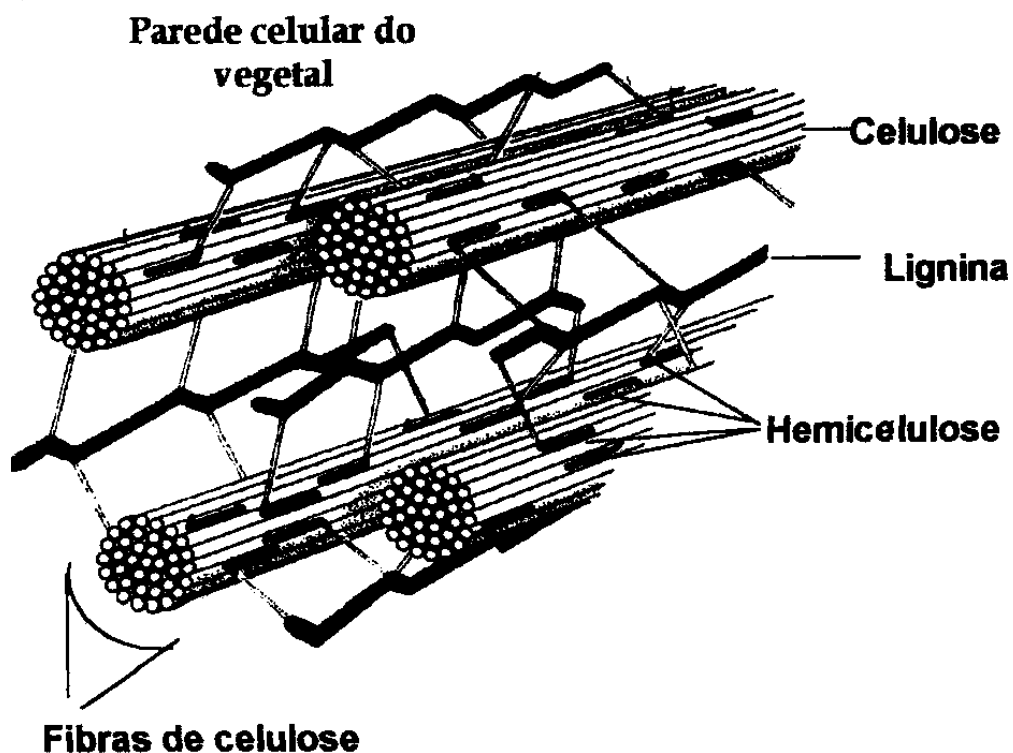
**Tabela 2.1** - Composição aproximada de alguns tipos de matérias lignocelulósicos (HOWARD et al., 2003; SAHA, 2003).

<b>Materiais Lignocelulósicos</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>
Madeira dura	40-55	24-40	18-25
Madeira mole	45-50	25-35	25-35
Casca de nozes	25-30	25-30	30-40
Sabugo de milho	45	35	15
Papel	85-99	0	0-15
Palha de trigo	30	50	15
Palha de arroz	32,1	24	18
Sementes de algodão	80-95	5-20	0
Fibra de milho	15	35	8
Bagaço de cana de açúcar	40	24	25

A parte do vegetal que forma a parede celular é a chamada estrutura lignocelulósica, a qual é constituída por uma estrutura dura e fibrosa composta basicamente por carboidratos (celulose e hemicelulose) os quais estão ligados a

uma estrutura contendo substâncias aromáticas, denominada lignina. A Figura 2.3 apresenta a estrutura simplificada da fibra de materiais lignocelulósicos.

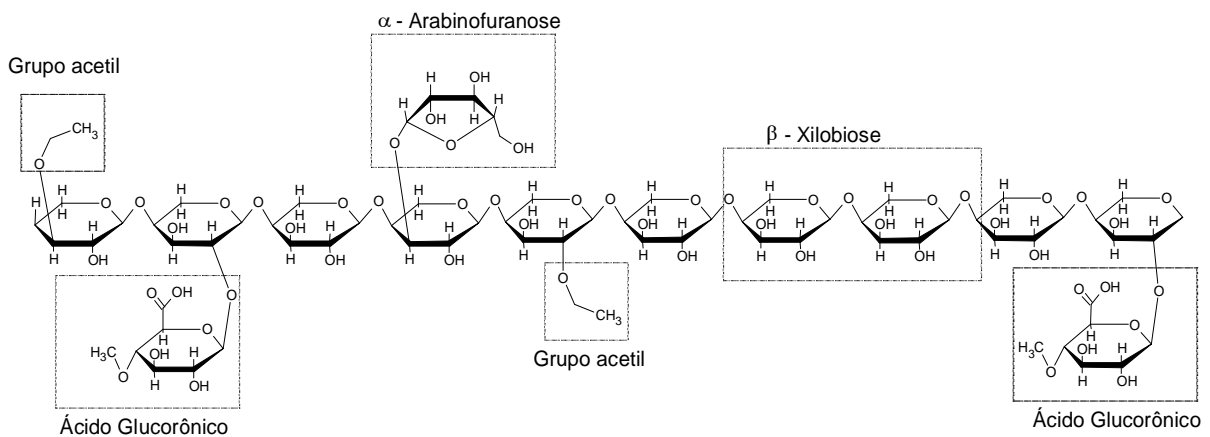
A celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais, desempenhando uma função estrutural nas células. Ela é encontrada na parede celular de plantas, na forma de fibras compostas por grande número de microfibras ordenadas paralelamente e ligadas entre si por pontes de hidrogênio. Estruturalmente a celulose é um homopolímero linear de alta massa molar e alta cristalinidade, formada por ligações  $\beta$ -1-4-glicosídica de repetidas unidades de D-glicose (GOLDSTEIN, 1981). A quebra das ligações das unidades de glicose da celulose, por hidrólise ácida ou enzimática, quando realizada completamente, resulta em glicose, entretanto um dos principais obstáculos para sua hidrólise deve-se a sua estrutura altamente cristalina (PARISI, 1989).



**Figura 2.3** - Estrutura simplificada da fibra de materiais lignocelulósicos (SHLESER, 1999).

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular, sendo responsável pela coesão entre as fibras, pela dureza dos compostos lignocelulósicos e atuando como barreira de proteção contra a degradação microbiana. A lignina é constituída por ligações poliméricas tridimensionais entre unidades de fenilpropano com diversos tipos de ligações entre os monômeros, resultando em uma estrutura polifenólica complexa a qual não pode ser convertida em açúcar fermentecível (GOLDSTEIN, 1981).

A hemicelulose é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante, estando presente em todas as camadas da parede celular dos vegetais, mas concentrado principalmente nas camadas primárias e secundárias, associado com a celulose e a lignina (BISARIA; GHOSE, 1981). A Figura 2.4 mostra a estrutura simplificada da hemicelulose.



**Figura 2.4** - Estrutura química parcial da hemicelulose (adaptado de FENGEL; WEGENER, 1989).

A hemicelulose, ao contrário da celulose, apresenta variações quanto a sua composição e estrutura, sendo constituída de polímeros heterogêneos com cadeias lineares com algumas ramificações laterais. Constituído principalmente por duas pentoses (D-xilose e L-arabinose), por três hexoses (D-glicose, D-manose e D-

galactose), além de ácidos D-glucorônicos e grupos acetilas (FENGEL; WEGENER, 1989).

Na estrutura da hemicelulose podem ser identificados três grupos de polímeros bem definidos: as xilanas, as mananas e as galactanas. As xilanas são constituídas de moléculas de D-xilose unidas por ligações  $\beta$ -1-4, formando uma fração linear, e por ramificações de L-arabinose, ácidos glucurônico e arabinoglucurônico (KUHAD; SING, 1993). A hemicelulose é mais susceptível a hidrólise que a celulose e a lignina, o que se deve a sua estrutura amorfa e sua menor massa molar (GOLDSTEIN, 1981).

Além dos três principais componentes, a parede celular da biomassa vegetal apresenta outros constituintes, em menor proporção, que são classificados como extrativos (ácidos graxos, resinas, taninos, etc.) e não-extrativos (sílica, oxalatos, carbonatos, etc.) que variam suas composições de acordo com cada espécie de material (KUHAD; SINGH, 1993).

### **2.2.2 Hidrólise dos materiais lignocelulósicos**

Na literatura são propostos diferentes métodos que podem ser empregados na separação dos principais frações orgânicas dos materiais lignocelulósicos, incluindo a extração alcalina (XIAO; SUN; SUN, 2001), a hidrólise ácida (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003), a extração com solventes orgânicos (NAVAEE-ARDEH; MOHAMMADI-ROVSHANDEH; POURJOOZI, 2004) e a explosão a vapor (HAMELINCK; HOOIJDONK; FAAIJ, 2005). Segundo Sun e Chend (2005), a hidrólise ácida, empregando ácido diluído, é um dos processos mais utilizados para a separação da hemicelulose do material lignocelulósico devido à sua eficiência e baixo custo.

A obtenção seletiva dos compostos da biomassa lignocelulósica é favorecida pelo fato da hemicelulose ser muito mais susceptível a hidrólise que a celulose, o que é um fator muito importante, visto que os açúcares obtidos na hidrólise da hemicelulose (xilanas), na maioria D-xilose, não são metabolizados por todos os microrganismos, diferentemente da D-glicose o principal açúcar obtido pela hidrólise da celulose (LEE; Mc CASKEY, 1983).

Segundo Jeffries et al. (1985) a maior susceptibilidade da hemicelulose deve-se à estrutura ramificada das xilanas e ao seu grau de cristalinidade inferior ao da celulose, as ligações glicosídicas entre os monômeros de xilose na hemicelulose são menos estáveis que as ligações glicosídicas entre os monômeros de glicose na celulose, o que propicia uma separação mais fácil das pentoses dos materiais lignocelulósicos através de hidrólise ácida. A hidrólise empregando ácido diluído é capaz de hidrolisar completamente a hemicelulose em cerca de 5 a 10 minutos para uma temperatura de 160°C, ou de 30 a 60 minutos para uma temperatura de 140°C (McMILLAN , 1994).

Segundo Lee et al. (1978) um melhor aproveitamento dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos é obtido quando a hidrólise ácida é realizada em dois estágios. No primeiro estágio, o qual envolve condições mais brandas de temperatura e de concentração de ácido, é favorecida a hidrólise da hemicelulose com elevado rendimento em açúcar e baixa formação de produtos de degradação. Segundo Lee e Mc Caskey (1983), ocorre devido ao fato das reações de hidrólise serem muito mais rápidas que as reações de degradação. No segundo estágio, a celulignina resultante, é submetida a condições mais drásticas de hidrólise, envolvendo temperaturas e concentrações de ácido mais elevadas, sendo nesta etapa hidrolisada a glicose.

Durante o processo de hidrólise, além dos açúcares, são formados diversos compostos tóxicos, provenientes da degradação dos açúcares hidrolisados e de segmentos de lignina, os quais apresentam efeito inibitório do metabolismo microbiano, sendo a fermentação deste hidrolisado não destoxificado, caracterizada por uma cinética lenta, com rendimentos e produtividades limitados, o que faz com que a etapa de destoxificação do hidrolisado seja uma etapa crucial para a utilização de biomassa lignocelulósica como matéria prima em processos de bioconversão (McMILLAN, 1994; FENGEL; WENEGER, 1989).

A utilização de hidrolisados lignocelulósicos como substrato em processos de fermentação depende de um tratamento prévio de destoxificação, além da neutralização até o pH de fermentação, para que se tornem mais susceptível à ação microbiana (MILLATI; NIKLASSON; TAHERZADEH, 2002; NIGAM, 2001a).

### **2.2.3 Palha de arroz**

A palha de diversos cereais representa um dos maiores subprodutos da atividade agrícola nos países em desenvolvimento (KIM; DALA, 2004). Dentre as palhas geradas em grandes quantidades, a de arroz vem sendo freqüentemente relatada como uma das mais abundantes (SUN et al., 2000). De acordo com Kadam, Forrest e Jacobson (2000), mais de 50 países contribuem com uma produção anual de cerca de 100 milhões de toneladas de arroz, correspondendo a uma produção de cerca de 135 milhões de toneladas de palha de arroz, pois de acordo com esse autor, para cada tonelada de arroz produzido, sobram como resíduo cerca de 1,35 toneladas de palha.

A palha de arroz é um material lignocelulósico fibroso, que difere da maioria dos resíduos devido ao seu alto conteúdo de dióxido de sílica ( $\text{SiO}_2$ ), o qual lhe confere um alto grau de resistência contra microrganismos patogênicos, porém, dificulta seu

processo de degradação. Seu conteúdo de cinzas em peso seco pode variar de 13 a 20% em função do estado de conservação da palha após a colheita. As cinzas geralmente contém cerca de 75% de  $\text{SiO}_2$ , 10% de  $\text{K}_2\text{O}$ , 3% de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , 3 % de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , 1,3% de  $\text{CaO}$  e pequenas quantidades de Mg, S e Na (KADAM; FORREST; JACOBSON, 2000).

No Brasil, a estimativa de produção de arroz com casca para a safra de 2005, segundo dados do IBGE (2005), é de aproximadamente 12,7 milhões de toneladas, sendo o estado do Rio Grande do Sul o maior produtor, com uma produção estimada em 5,4 milhões de toneladas. Desta forma pode-se estimar uma produção de cerca de 17 milhões de toneladas de palha no Brasil para o ano de 2005.

Recentemente vários trabalhos têm destacado o uso da palha de arroz na alimentação animal (ELSEED, 2005; PI; WU; LIU, 2005; BANIK; NANDI, 2004; SELIM et al., 2004; SANGNARK; NOOMHORM, 2004; WEIMER et al., 2003), na produção de papel (NAVAEE-ARDEH; MOHAMMADI-ROVSHANDEH; POURJOOZI, 2004), na produção de carvão ativo (OH; PARK, 2002; YUN; PARK; PARK, 2001), como material de construção (YANG et al., 2004) e na produção de combustível por via química (PÜTÜN; APAYDIN; PUTUN, 2004). Entretanto a palha de cereais é um resíduo rico em carboidratos o que a torna uma matéria prima potencial para diversos processos de bioconversão, como a produção de proteína animal (MONKS et al., 2002), etanol (LEE, 1997) e xilitol (MUSSATTO; ROBERTO, 2004a).

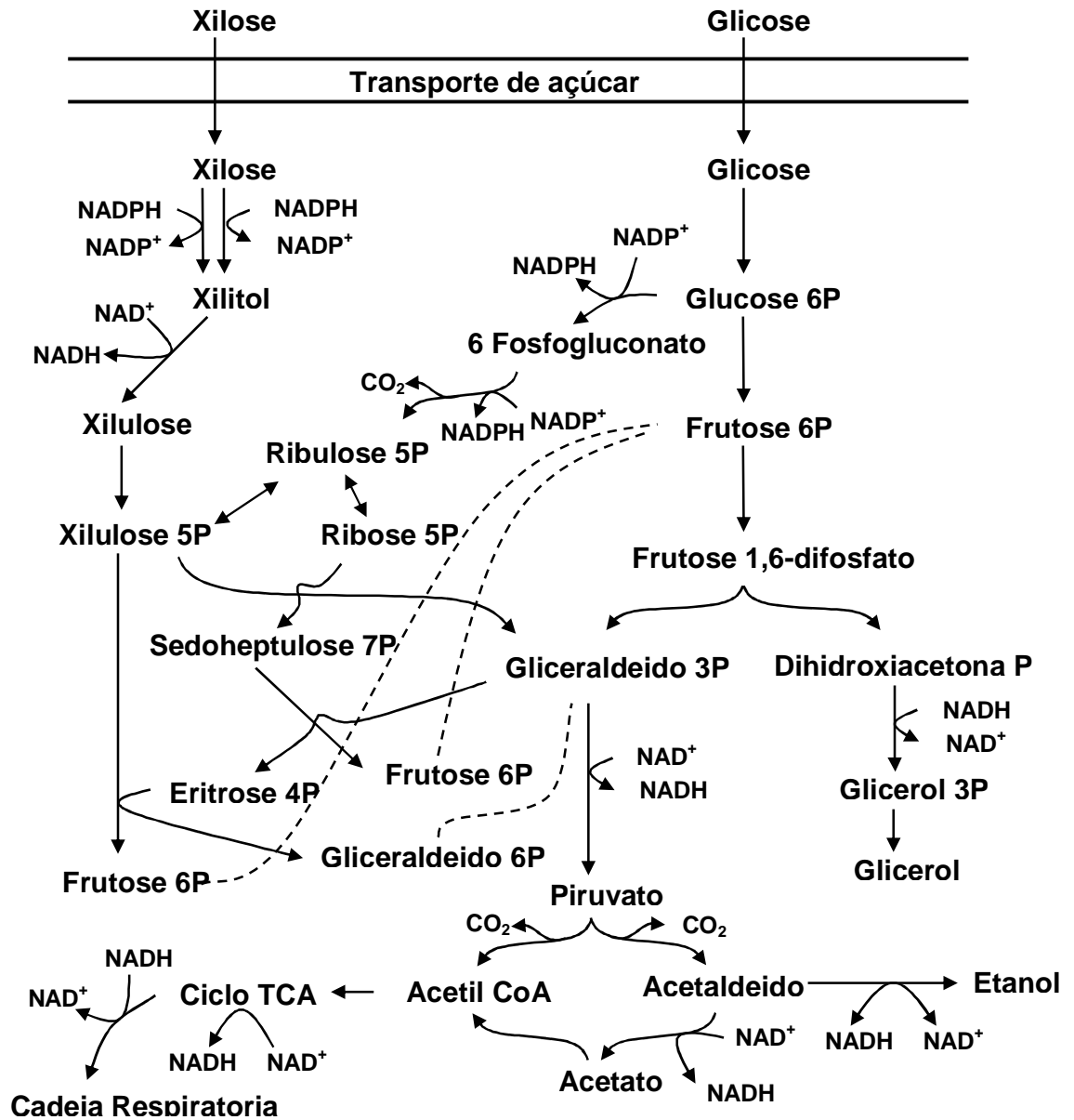
A utilização deste material lignocelulósico em processos de bioconversão é de grande importância, pois pode contribuir para a solução de problemas ambientais como causados pela queima, ou ainda permanência de grande quantidade deste resíduo no solo, causando alterações em ecossistemas (ABOUL-EL-ENIN; FADEL; MACKILL, 1999; SUN et al., 2000; WYMAN, 1999; XIAO; SUN; SUN, 2001).

### 2.3 METABOLISMO DE XILOSE EM LEVEDURAS

A utilização de xilose por leveduras é possível graças a capacidade que alguns destes microrganismos apresentam de sintetizar as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Na Figura 2.5 é mostrado um esquema proposto por Hahn-Hagerdal et al. (1994) que representa a principal via metabólica envolvida na fermentação de xilose por leveduras.

Uma vez no interior da célula, a xilose passa por duas reações de oxi-redução sendo convertida a xilitol e em seguida a xilulose, a qual sofre uma fosforilação para xilulose 5-fosfato. A conversão da xilose a xilitol é feita pela enzima xilose redutase (XR), que é a primeira enzima desta via metabólica, sendo esta reação dependente da coenzima NADH ou NADPH (JEFFRIES, 1983). O xilitol formado pode então ser excretado ao meio ou ser oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, com a participação de  $\text{NAD}^+$  como coenzima (SLININGER et al., 1987). A xilulose produzida é fosforilada pela enzima xilulose quinase, formando xilulose 5-fosfato, que é metabolizada na via das fosfopentoses (WEBB e LEE, 1992). Os metabólitos resultantes da via das fosfopentoses, frutose-6P e gliceraldeído-3P, são metabolizados na glicolise (via Embden Meyerhof Parnas - EMP) sendo levados a piruvato, o qual pode ser oxidado pelo Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, sendo neste processo, reoxidado o NADH resultantes da oxidação do gliceraldeído 3P.





**Figura 2.5** - Via metabólica utilizada na fermentação de xilose por leveduras (HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

## 2.4 MICRORGANISMOS PRODUTORES DE ETANOL

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo mais freqüentemente utilizado na produção industrial de etanol devido a sua capacidade de crescimento em meio de alta concentração de açúcar e seu alto rendimento de etanol (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004). Entretanto, esta levedura é capaz de fermentar apenas hexoses, sendo incapazes de produzir etanol a partir de pentoses, como a xilose, que é um dos principais constituintes dos materiais lignocelulósicos (HAMACHER et al., 2002; NAKAMURA; SAWADA; INOUE, 2001).

Com o interesse na utilização de biomassa lignocelulósica como fonte de matéria prima surge a necessidade do estudo de microrganismos que sejam capazes de converter pentoses, como as leveduras dos gêneros *Candida*, *Pichia*, *Schizosaccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Pachysolen*, os fungos filamentosos *Fusarium*, *Mucor*, *Monilia* e *Paecilomyces* e as bactérias *Clostridium*, *Bacillus*, *Bacteróides*, *Thermoanaerobacter* e *Erwinia*, que são capazes de produzir etanol a partir de pentoses. Dentre estes microrganismos destacam-se a *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Fusarium oxysporum*, que resultam em altos rendimentos (>0,45g de etanol/g xilose) e produtividades razoáveis (>0,17 g/h) (MILLATI; EDEBO; TAHERZADEH, 2004; HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

Uma outra alternativa para a produção de etanol a partir de pentose é o emprego de microrganismos recombinantes, o qual vem sendo muito estudado (DAVIS et al., 2005; JIN; LAPLAZA; JEFFRIES, 2004; ELIASSON et al., 2000). Existem duas linhas de pesquisa de microrganismos recombinantes, a primeira visa à modificação do metabolismo dos tradicionais microrganismos produtores de etanol (*Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis*) para permitir que estes fermentem xilose e arabinose. A segunda, visa introduzir genes para a produção de

etanol em microrganismos que tem a capacidade de metabolizar pentoses, como a *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Erwinia* (DUMSDAY et al., 1997; SAHA, 2003).

Embora a eficiência dos microrganismos recombinantes seja grande, muitas vezes seu uso em processos industriais não é viável visto que, estes geralmente não são suficientemente estáveis e em muitos casos dependem de meios de cultura bastante complexos, o que pode encarecer o processo (DUMSDAY et al., 1997). Desta maneira, leveduras como a *Pichia stipitis* mostram-se mais interessantes industrialmente por fermentar xilose rapidamente com alto rendimento na produção de etanol e aparentemente não produz xilitol (NIGAM, 2001a; NIGAM, 2002; SANCHEZ et al., 2004). Além do mais a *Pichia stipitis* praticamente não requer a adição de vitaminas para a fermentação de xilose e é capaz de fermentar uma grande variedade de açúcares incluindo celobiose (NIGAM, 2001a; NAKAMURA; SAWADA; INOUE, 2001; EKEN-SARAÇOGLU; ARSLAN, 2000).

ROBERTO et al. (1991), comparou em seu trabalho quatro leveduras, *Candida utilis*, *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida tropicalis* para diferentes concentrações de xilose em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar. Dentre estas leveduras, *Pichia stipitis* foi apresentada maior eficiência na conversão de xilose em etanol, cerca de 0,38 g/g. Em diversos trabalhos, *Pichia stipitis* tem apresentado resultados promissores na conversão de xilose em etanol a partir de hidrolisados de biomassa lignocelulósica (NIGAM, 2001a; NIGAM, 2002; ROBERTO et al., 1991; HAHN-HAGERDAL et al., 1994).

A conversão e produtividade em etanol de *Pichia stipitis* e outras leveduras são apresentadas na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** - Parâmetros para a produção de etanol.

Microrganismo	<sup>a</sup> Substrato g/L	<sup>b</sup> Meio	<sup>c</sup> Nutrientes g/L	Yp/s g/g	Qp g/L .h	Autor
<i>Pichia stipitis</i> (Adaptada)	X 45; G 6,4; A 6,9	HAPT	EL 1; A 2; B 4; C 0,5	0,41	0,54	Nigam, 2001a
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	X 45; G 6,4; A 6,9	HAPT	EL 1; A 2; B 4; C 0,5	0,35	0,30	Nigam, 2001a
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	X 54; G 3,5; A 4,5	HAWH	EL 1; A 2 D 1; C 0,25	0,35	0,18	Nigam, 2002
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	X 54; G 3,5; A 4,5	M. S.	EL 1; A 2 D 1; C 0,25	0,44	1,04	Nigam, 2002
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	X 25; G 50	M. S.	EL 5; EM 3; P 5	0,47	0,88	Taniguchi et al., 1997
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	X 100	HABCA	EL 3; A 3; B 18,8 C 1,1	0,38	0,46	Roberto et al., 1991
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NCIM 3090	G 400	AMP	NS	0,325	1,29	Ratnam et al., 2005
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 1200 e <i>Candida shehatae</i> ATCC 22984 co-imobilizadas	G 35; X 15	M. S.	B 10	0,48	0,37	Lebeau, Jouenne e Junter, 1998
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	X 90	M. S.	B 18,75; A 3; C 1,13; EL 3	0,37	0,91	Roberto et al., 1994
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	X 35,9; G 0,05	HHSM	EL 10; P 1,2; F 0,18; U 6,4	0,34	0,108	Eken-Saraçoğlu e Arslan, 2000
<i>Cândida shehatae</i> NRRL Y-17024	X 29,1; G 0,05	HHSM	EL 10; P 1,2; F 0,18; U 6,4	0,26	0,056	Eken-Saraçoğlu e Arslan, 2000
<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124	X 26,7; G 3,0; M 6,5	HHM	EL 3; P 5; B 2; A 1; C 0,5	0,25	0,10	Nigam, 2001b
<i>Pichia stipitis</i> (Adaptada)	X 26,7; G 3,0; M 6,5	HHM	EL 3; P 5; B 2; A 1; C 0,5	0,40	0,21	Nigam, 2001b
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	X 20; G 40	M.S.	EL 5; B 13; C 1; E 0,7; P 10	0,3	0,53	Nakamura; Sawada e Inoue, 2001

(a) X –xilose; G – glicose; A – arabinose; M – maltose. (b)MS – Meio sintético; HAPT - Hidrolisado ácido de palha de trigo; HAWH -Hidrolisado ácido de water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*); HABCA - Hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar; AMP - Açúcar mascavo de Palmeira (*Borassus flabellifer*); HHSM -Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho; HHM - Hidrolisado hemicelulósico de madeira;(c) EL – extrato de levedura; EM – extrato de malte; P – peptona; U - uréia; A – (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; B – KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; C- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; D – (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub>; E – K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; F – NaHPO<sub>4</sub>; NS – não suplementado.

## 2.5 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOCONVERSÃO

A bioconversão de pentoses em etanol é um processo complexo influenciado por vários fatores como condições de cultivo, tipo de meio de fermentação, cepa utilizada, entre outros. Diversos estudos vêm sendo conduzidos buscando melhorar o processo de produção biotecnológica de etanol a partir de pentoses, através da compreensão e da otimização das condições de processo empregadas e dos diferentes microrganismos utilizados.

Nos processos de bioconversão o pH é um importante fator, sendo capaz de exercer grande influência. du-Preez (1994) reportou que o rendimento em etanol pela levedura *Pichia stipitis* CBS 7126 foi fortemente afetado por variações de pH entre 2,5 e 6,5, sendo o pH ótimo entre 4,0 e 5,5. Slininger e Bothast (1990) relataram que para fermentação de xilose por *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 a faixa de pH ótimo encontra-se entre 4 e 7, não sendo, nesta faixa, observada grande influência da variação do pH sobre os parâmetros fermentativos, e sendo o pH 4,5 o mais recomendável, por minimizar a possibilidade de contaminação. Entretanto, por estar próximo do limite inferior da faixa ótima de fermentação, seria desejável o uso de um controle automático de pH. Resultados semelhantes aos relatados por estes autores foram descritos por Roberto et al. (1994), onde a variação do pH inicial entre 4,0 e 6,0 exerceu pouca influência sobre os parâmetros fermentativos avaliados, obtendo-se nesta faixa valores de  $Y_{p/s}$  entre 0,34 e 0,37 g/g,  $Y_{x/s}$  entre 0,11 e 0,14 g/g e produtividades em torno de 0,90 g/L.h. É importante salientar que pode haver variações entre os valores ou faixas de pH ótimo, devido aos diferentes meios de fermentação empregados, condições de cultivo ou ainda diferentes cepas.

A temperatura é um dos mais importantes parâmetros que podem interferir na atividade dos microrganismos. Em geral, a temperatura ótima de produção de etanol para espécies de levedura capazes de utilizar pentoses, como *Pichia* e *Candida*, encontram-se na região de 30 a 32 °C, embora esta faixa de temperatura ótima de processo possa variar dependendo da cepa, do tipo de substrato e ainda da concentração de açúcar (DU-PREEZ, 1994). Uma avaliação da faixa de temperatura capaz de favorecer o processo de bioprodução de etanol a partir de xilose foi descrito por Slininger e Bothast (1990), que em seus estudos observaram que a máxima produtividade e concentração de etanol obtidas pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, a partir de 40 g/L de xilose, ocorreu na faixa de temperatura entre 23 e 30 °C, variando pouco nesta região, e quando a concentração inicial de xilose foi elevada para 150 g/L, esta faixa foi deslocada para temperaturas entre 27 e 33 °C. du-Preez; Bosch; Prior (1986) relataram que para leveduras como *Pichia stipitis* CBS 7126 e *Candida shehatae* CBS 2779 a máxima velocidade específica de crescimento, produtividade específica e produtividade volumétrica em etanol ocorre em 30 °C, sendo observado nesta temperatura um curto tempo de fermentação, e que para *Pichia stipitis*, o coeficiente de conversão em etanol permanece constante, com um valor de 0,42 g/g, até 33 °C, havendo um decréscimo para 0,29 g/g quando a temperatura foi elevada para 36 °C.

Um importante aspecto a ser considerado no processo de produção de etanol a partir de xilose é o efeito da concentração de substrato sobre o rendimento do produto. Segundo Roberto et al. (1991), que estudou a produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela levedura *Pichia stipitis* CBS 5773, a conversão em etanol não foi afetada com uma concentração inicial de xilose entre 20 e 99 g/L, permanecendo nesta faixa praticamente constante

e próximo de  $Y_{P/S} = 0,38$  g/g, entretanto, para concentrações iniciais de xilose próximas a 145 g/L, foi observada uma redução da conversão em etanol para cerca de  $Y_{P/S} = 0,27$  g/g. Estes autores observaram também que a produtividade volumétrica de etanol foi favorecida pelo aumento da concentração inicial de xilose até 76 g/L, onde foi observada uma produtividade de 0,68 g/L.h, sendo que a partir desta concentração, a produtividade foi inibida pelo aumento da concentração inicial de xilose, decrescendo para 0,46 g/L.h em 99 g/L de xilose inicial. Resultados semelhantes foram observados por du-Preez; Bosch; Prior (1986) onde a máxima produtividade em etanol para levedura *Pichia stipitis* CBS 7126, cerca de 0,85 g/L.h, foi alcançada com uma concentração inicial de xilose de 50 g/L, havendo uma queda superior a 50 % quando utilizado 100 g/L de xilose inicial. A conversão em etanol mostrou não ser afetada pela concentração inicial de xilose em uma faixa de concentração de 10 até 70 g/L.

A tolerância das leveduras a etanol é um parâmetro que pode variar muito entre as cepas sendo também muito influenciada pelas condições de cultivo, especialmente pela temperatura. O efeito inibidor do etanol tem sido atribuído a fatores como o acúmulo de acetaldeído e acetato nas células, a alterações nas membranas celulares, e ainda em alguns casos ao efeito do etanol sobre osmose celular (HAHN-HAGERDAL et al., 1994), sendo considerado as alterações na estruturas da membrana celular e nos mecanismos de transporte os principais efeitos do etanol (du-Preez; Bosch; Prior, 1987). Em geral, o crescimento celular das leveduras parece ser mais sensível à inibição causada pelo etanol, que a formação de produto (DU-PREEZ; DRIESSEL; PRIOR, 1989). Hahn-Hagerdal et al. (1994) observaram que quando xilose foi assimilada a 30 °C, o crescimento da levedura *Pichia stipitis* CBS 7126 foi inibido por concentrações de etanol entre 32 e 34 g/L, e

com a redução da temperatura, houve o aumento da tolerância a etanol, sendo a concentração máxima de etanol precedente a total inibição do crescimento, 65 g/L a 25 °C para *Pichia stipitis* CBS 5773. Segundo du-Preez; Bosch; Prior (1987), para a levedura *Pichia stipitis* CBS 7126, a máxima tolerância a etanol ocorreu na faixa de temperatura entre 16 e 22 °C, sendo observado crescimento celular até uma concentração aproximada de 60 g/L de etanol, decrescendo esta tolerância a 32 °C para 27,5 g/L e a 10 °C para 47,5 g/L de etanol. Outro ponto relevante é que o etanol produzido pelas células durante a fermentação é significativamente mais tóxico que o etanol adicionado ao meio de cultura, este fenômeno vem sendo atribuído ao acúmulo de etanol intracelular, juntamente com a baixa permeabilidade do etanol do exterior para o interior das células (DU-PREEZ; BOSCH; PRIOR, 1987).

Segundo du-Preez (1994) a aeração é um fator que exerce grande importância na fermentação de xilose por leveduras, visto que o nível de aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre o crescimento e a formação de produto, sendo portanto, capaz de afetar drasticamente conversão em produto, em células e a produtividade. Taniguchi et al. (1997) reportou que a fermentação de xilose é muito dependente do nível de oxigenação empregado ao meio, sendo que em cultivo anaeróbio, *Pichia stipitis* (CBS 5773) consumiu uma quantidade insignificante de xilose não sendo capaz de produzir etanol nestas condições. Segundo Nigam (2001c) níveis insuficientes de aeração na produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 levam a um consumo lento de xilose, por outro lado, níveis excessivos de aeração reduzem o rendimento devido a oxidação do produto ou ao crescimento celular elevado, sendo um nível de aeração adequado um parâmetro importante para atingir elevados valores de conversão. Grootjen et al. (1991) observou no cultivo da levedura *Pichia stipitis* CBS 5773 em meio contendo xilose, a



existência de uma relação linear entre o fornecimento de oxigênio e as conversões em células e em etanol, sendo que a conversão em células aumentou com o aumento do fornecimento de oxigênio, e a conversão em produto mostrou uma correlação negativa, reduzindo a conversão com o aumento da oxigenação. Resultados semelhantes foram reportados por Roberto et al. (1994) que na avaliação do efeito na taxa de aeração na fermentação de xilose por *Pichia stipitis* CBS 5773, observou que condição de maior aeração estudada proporcionou a maior conversão em células ( $Y_{X/S}=0,50$  g/g) e a menor conversão em etanol ( $Y_{P/S}=0,13$  g/g), e na condição de menor aeração ocorreu a menor conversão em células ( $Y_{X/S}=0,01$  g/g), entretanto a maior conversão em produto assim como a maior produtividade ocorreram em uma condição intermediária de aeração.

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

## **2.6 SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO MEIO DE CULTURA**

A produtividade de qualquer processo de bioconversão é influenciada pelos parâmetros ambientais do processo e pela composição do meio de fermentação, (SUNITHA; LEE; OH, 1999). Sendo assim, a otimização da composição do meio de cultura é uma maneira em potencial de aumentar a produtividade de um processo (PHAM et al., 1998). Além disto, o estabelecimento das condições de fermentação e composição do meio é de crucial importância para o desenvolvimento de um processo eficiente de produção de etanol (RATMAN et al., 2005).

Em geral, fontes de nitrogênio e vários sais minerais têm sido utilizadas na suplementação nutricional de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de etanol (NIGAM, 2002; MIYAFUJI et al., 2003). Entretanto quando hidrolisados hemicelulósicos são utilizados como meio de cultura, a necessidade de suplementação pode ser minimizada, desde que eles contenham, além do substrato, também componentes que são essenciais para o crescimento das células (PREZIOSI-BELLOY; NOLLEAU; NAVARRO, 2000; CANETTIERI et al., 2001). Levando em conta que o custo do meio de cultura é um fator muitas vezes decisivo em processos de bioconversão, é muito importante definir a necessidade mínima a suplementação nutricional para a bioconversão do hidrolisado (MUSSATO; ROBERTO, 2005).

Slininger et al. (2006) estudou a influência da fonte de nitrogênio e de minerais sobre a produção de etanol a partir de xilose pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. Em seus estudos verificou que o nutriente  $MgSO_4$  teve grande influência sobre o crescimento celular e sobre o acúmulo de etanol e que na ausência de uma fonte de nitrogênio não foi observada produção de etanol. Aminoácidos utilizados como única fonte de nitrogênio mostraram-se suficientes para manter o crescimento celular assim como uma produção elevada de etanol. Entretanto, quando uréia foi utilizada como única fonte de nitrogênio, a produtividade de biomassa e etanol permaneceu próximo a zero, mesmo quando minerais foram adicionados. A adição de aminoácidos melhorou a produtividade em etanol, sendo estes mais que uma fonte simples de amino-nitrogênio ( $-NH_2$ ), pois quando uréia foi utilizada como única fonte de nitrogênio, o acúmulo de etanol foi a metade do observado para o meio suprido apenas com aminoácidos. Entretanto, a otimização da fonte de nitrogênio mostrou que os melhores resultados de produtividade e acúmulo de etanol foram obtidos

quando empregado como fonte de nitrogênio uma proporção de 80 % de uréia e 20 % de aminoácidos (de um total de 0,15 M de nitrogênio).

Diferentes fontes de nitrogênio e outros nutrientes podem ser empregados na suplementação de meios de cultura para fermentação de pentoses. Amartey e Jeffries (1994), compararam diferentes fontes de nitrogênio e outros nutrientes, tais como: extrato de malte, extrato de levedura, peptona, sais ( $MgSO_4$  e  $KH_2SO_4$ ) e CSL (Corn Steep Liquor, um subproduto da fabricação de amido de milho) para a bioconversão de xilose em etanol por *Pichia stipitis* CBS 6054. Estes autores observaram que os melhores resultados obtidos em crescimento celular e produção de etanol foram para os meios contendo CSL, mesmo quando utilizado como única fonte de nutrientes, tendo estes autores concluído que CSL pode ser usado como uma fonte barata de nitrogênio e outros nutrientes para fermentação de xilose por *Pichia stipitis* CBS 6054.

Em geral, a otimização da composição de meios de fermentação é realizada através do método tradicional no qual se estuda uma única variável por vez, fixando as demais variáveis em um determinado nível. Este método além de consumir tempo é ineficiente em muitos casos, pois não permite completo entendimento do sistema observado (MANTHA; BASHA; PANDA, 1998; PHAM et al., 1998).

A metodologia estatística de planejamento fatorial vem sendo amplamente empregada na avaliação dos efeitos das variáveis e na otimização de parâmetros de composição de meios de fermentação (SUNITHA; RAO; AYYANNA, 1998; RAO; KIM; RHEE, 2000; PINTADO; GONZÁLEZ; MURADO, 1997). Esta metodologia possibilita o estudo de diversas variáveis com um reduzido número de experimentos, e ainda permite verificar os efeitos individuais dos fatores e suas interações (ROBERTO et al., 1995; SUNITHA; LEE; OH, 1999; LIU; TZENG, 1998).

RATNAM et al. (2005) afirma que a metodologia de superfície de resposta possibilita uma precisa determinação dos valores da concentração dos constituintes do meio e das condições de fermentação para maximizar a produção de etanol. Em seus estudos RATNAM et al. (2005), utilizou a metodologia de superfície de resposta para quantificar os efeitos das variáveis: concentração de açúcar, concentração de nitrogênio, EDTA, temperatura, pH e tempo de fermentação sobre a produção de etanol a partir do xarope de sacarose de uma palmeira nativa da Índia (*Borassus flabellifer*) com *Saccharomyces cerevisiae*. Os valores encontrados para as condições otimizadas de composição do meio de condições de fermentação foram: temperatura 26,2 °C, pH 8,4, tempo de fermentação de 4,2 dias com 398,5 g/L de substrato (sacarose), 3,1 g/L de uréia e 0,51 g/L de EDTA; onde foi obtida a máxima concentração de etanol, 129,4 g/L.

### 3 OBJETIVOS

#### Geral:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a necessidade de suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e a influência das condições de aeração, sobre o processo de bioprodução de etanol pela levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124.

#### Específicos:

Avaliar a influência dos nutrientes uréia,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e extrato de levedura sobre os parâmetros fermentativos do processo de bioprodução de etanol a partir do hidrolisado, pela levedura *Pichia stipitis*. Propor, baseado nestes resultados, a condição de suplementação que favoreça a produtividade e o rendimento em etanol.

Investigar o efeito da agitação e da relação volume de frasco volume de meio, sobre a produção de etanol em frascos agitados e, propor com base nestes estudos a condição de aeração que favoreça este processo.

Avaliar o perfil cinético de produção de etanol nas condições propostas de nutrição e aeração, comparando resultados obtidos em hidrolisado com fermentação em meio sintético nas mesmas condições.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do GMBIO do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

### **4.1 OBTENÇÃO E TRATAMENTO DO HIDROLISADO**

#### **4.1.1 Matéria prima**

A palha de arroz foi obtida de plantação de arroz da região de Lorena/SP, foi seca ao Sol e moída em moinho de martelo, pesada, ensacada e estocada até a realização da hidrólise.

#### **4.1.2 Hidrólise ácida**

A hidrólise ácida da palha de arroz foi realizada em um reator de aço inoxidável (AISI 316) com volume útil de 350 L, aquecido indiretamente por resistência elétrica através de uma camisa de óleo. A reação foi realizada a 120 °C por cerca de 30 minutos, a uma agitação de 50 rpm e pressão manométrica de 180 KPa, tendo uma proporção de ácido sulfúrico concentrado (98%p/p) de 100 mg/g de matéria seca e uma relação de matéria seca/solução ácida de 1:10 (ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003).

#### **4.1.3 Destoxificação**

A destoxificação do hidrolisado de palha de arroz foi realizada no mesmo reator utilizado para hidrólise. O processo foi realizado a 45°C por cerca de 30 minutos, empregando 3% de Carvão Ativo, segundo o descrito por Mussatto e Roberto (2004b).

#### **4.1.4 Concentração do hidrolisado**

O hidrolisado hemicelulósico destoxificado foi submetido a um processo de concentração sob vácuo em concentrador (confeccionado em aço inox) com capacidade de 30 litros, a uma temperatura de 65°C, tendo concentrado o hidrolisado em aproximadamente seis vezes. O hidrolisado concentrado foi estocado a 4 °C, para posterior utilização.

#### **4.1.5 Tratamento do hidrolisado**

Antes da utilização como meio de fermentação, o hidrolisado de palha de arroz, destoxificado e concentrado teve o seu pH elevado com NaOH (pastilhas) até pH 5,5. Após a alteração de pH, o hidrolisado foi centrifugado a 1000 xg por 15 minutos para remoção de sólidos.

### **4.2 PROCESSO FERMENTATIVO**

#### **4.2.1 Microrganismo**

Para a bioconversão do hidrolisado hemicelulósico a etanol, foi utilizada a levedura *Pichia stipitis* NRRL Y-7124, fornecida pela USDA de Peoria, Illinois. A cultura foi mantida repicada em tubos de ensaio contendo agar, extrato de malte inclinado e conservada a 4°C.

#### **4.2.2 Preparo do inóculo**

Foi utilizado o meio de cultura mostrado na Tabela 4.1. Para a obtenção do inóculo foram utilizadas soluções concentradas de cada composto, as quais foram preparadas separadamente e esterilizadas em autoclave, a 121°C por 20 minutos, com exceção da xilose que foi autoclavada a 112°C por 15 minutos. As soluções foram então misturadas assepticamente de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

**Tabela 4.1** – Composição do meio sintético utilizado para crescimento do inóculo.

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	30,0
Uréia	2,3
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1
Extrato de levedura	3,0

Todos os inóculos foram preparados transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito na Tabela 4.1, e incubadas em agitador rotatório a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 h oras. Após este tempo as células foram separadas por centrifugação a 1100 xg por 20 minutos e ressuspensas em água destilada de forma a se obter uma suspensão celular concentrada de cerca de 50 g/L. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular inicial de 1g/L.

#### 4.2.3 Avaliação da toxicidade do hidrolisado

Para avaliar um possível efeito inibitório do hidrolisado e determinar a concentração na qual a fermentação pudesse ser conduzida em experimentos futuros foram feitos ensaios em diferentes concentrações de hidrolisado (Tabela 4.2). Os ensaios foram conduzidos em frascos erlenmeyers de 125 mL, com 50 mL de meio de fermentação, sem a adição de nutrientes e com 1 g/L de inóculo. Os frascos foram incubados em agitador rotatório por 48 horas, a 150 rpm e a 30 °C.

**Tabela 4.2** – Diluições do hidrolisado para o ensaio de toxicidade.

Ensaio	Volume (mL)			Concentração de Xilose estimada (g/L)
	Hidrolisado	Água	Final	
1	40,9	9,1	50	91
2	31,8	18,2	50	71
3	22,7	27,3	50	50
4	13,6	36,4	50	30



#### **4.2.4 Estudo da suplementação de nutrientes no hidrolisado**

O efeito da adição dos nutrientes (Uréia,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e extrato de levedura) assim como as possíveis interações entre eles, no processo de bioconversão de xilose a etanol, foram estudados como determina a metodologia de planejamento experimental, conforme a matriz mostrada na Tabela 4.3. Os níveis codificados e reais dos fatores estudados são mostrados na Tabela 4.4.

O meio utilizado para fermentação foi preparado com hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado a 45°C por cerca de 30 minutos, empregando 3% de Carvão Ativo, segundo o descrito no item 4.1.3, o qual foi concentrado e teve o pH corrigido para 5,5 (pH de fermentação). Foram utilizadas concentrações de açúcares totais de 60 g/L, sendo a concentração dos demais nutrientes determinada pelo planejamento experimental.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram incubados em agitador rotatório, à temperatura de 30°C, sob agitação de 150 rpm. As amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento das fermentações.

**Tabela 4.3** – Planejamento fatorial do tipo  $2^4$ , com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado com nutrientes, na produção de etanol a partir de *Pichia stipitis*.

Ensaio	Nível das variáveis		
	Uréia	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Extrato de levedura
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0

**Tabela 4.4** – Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Uréia (g/L)	0	1,15	2,3
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (g/L)	0	0,5	1
Extrato de levedura (g/L)	0	1,5	3

#### 4.2.5 Efeito da agitação/aeração na produção de etanol

A partir das condições otimizadas de suplementação de nutrientes realizada nas etapas anteriores, foi estudado o efeito das variáveis agitação e relação volume do frasco/volume do meio de fermentação, sobre a produção de etanol. Os ensaios foram realizados através de um planejamento fatorial, conforme mostrado na Tabela 4.5. Na Tabela 4.6 são mostrados os níveis e valores dos fatores estudados no planejamento fatorial  $2^4$  com ponto central.

**Tabela 4.5** - Planejamento fatorial do tipo  $2^2$ , com triplicata no ponto central, para a avaliação do efeito da agitação/ aeração, na produção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico.

Ensaio	Variáveis	
	Agitação (rpm)	$V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$
1	+1	+1
2	-1	+1
3	+1	-1
4	-1	-1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

**Tabela 4.6** - Níveis e valores dos fatores estudados no planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Agitação (rpm)	100	150	200
$V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$	2,5	3,75	5

#### **4.2.6 Cinética de fermentação nas condições otimizadas**

Para avaliar a cinética de fermentação foram realizados ensaios nas condições otimizadas de suplementação nutricional e aeração/agitação. Os ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio, agitados a 200 rpm e 30 °C, sendo o meio inoculado com uma concentração inicial celular de 1g/L. O acompanhamento cinético da fermentação do hidrolisado não suplementado e do meio sintético composto por 60 g/L de xilose e 3g/L de extrato de levedura, nas mesmas condições do hidrolisado suplementado, foram também avaliados.

### **4.3 ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DOS EXPERIMENTOS**

#### **4.3.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz**

O teor de umidade da palha de arroz foi determinado através de secagem de amostra da palha em estufa a 105 °C até peso constante. O valor em percentual foi calculado dividindo-se a diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra pelo peso inicial, multiplicando-se o resultado por 100.

#### **4.3.2 Determinação da concentração celular**

A concentração celular foi determinada pela medida das absorbâncias das amostras diluídas em espectrofotômetro Beckmen, utilizando o meio de cultivo sem células como branco. Os valores de concentração foram calculados através da equação das curvas de calibração entre o peso seco e absorbância, a 600 nm, obtidas para o microrganismo em questão. Foram determinadas curvas em meio sintético e em meio à base de hidrolisado.

#### **4.3.3 Determinação dos teores dos açúcares, de ácido acético e de etanol**

As concentrações de D-glicose, D-xilose, L-arabiose, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Waters equipado com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo de 0,8 mL/min; volume de amostra de 20 µL.

#### **4.3.4 Determinação dos teores de furfural e hidroximetilfurfural e outros compostos fenólicos**

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural e outros compostos fenólicos foram determinadas por cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Waters equipado com detector UV e coluna RP18, nas seguintes condições: temperatura de 25 °C; eluente: acetonitrila e água na proporção de 1:9 com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume de amostra de 20 µL.

#### **4.3.5 Determinação dos compostos fenólicos totais**

A concentração total dos compostos fenólicos foi quantificada colorimetricamente pelo método de Folin-Ciocalteau (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) usando a vanilina como padrão de calibração.

#### **4.3.6 Determinação de pH**

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, em um aparelho MICRONAL modelo B474, com correção de temperatura.

## 4.4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

### 4.4.1 Determinação dos parâmetros fermentativos

#### 4.4.1.1 Fator de conversão de D-xilose em etanol ( $Y_{P/S}$ )

O fator de conversão de D-xilose em etanol ( $Y_{P/S}$ ), expresso em g/g, foi calculado através da seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \left( \frac{\Delta P}{-\Delta S} \right) = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)}$$

Onde:  $P_i$  e  $P_f$  = concentração inicial e final de etanol.  $S_i$  e  $S_f$  = Concentração inicial e final de substrato (xilose, glicose e arabinose).

#### 4.4.1.2 Fator de conversão de D-xilose em células ( $Y_{X/S}$ )

O fator de conversão de D-xilose em células ( $Y_{X/S}$ ), expresso em g/g, foi calculado através da seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \left( \frac{\Delta X}{-\Delta S} \right) = \frac{(X_f - X_i)}{(S_i - S_f)}$$

Onde:  $X_i$  e  $X_f$  = concentração inicial e final de células.  $S_i$  e  $S_f$  = Concentração inicial e final de substrato (xilose, glicose e arabinose).

#### 4.4.1.3 Produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ )

A produtividade volumétrica em etanol ( $Q_p$ ), expressa em g/L.h, foi calculada através da equação a seguir:

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

Onde:  $P_i$  e  $P_f$  = concentração inicial e final de etanol.  $t_i$  e  $t_f$  = tempo inicial e final da fermentação.

### 4.4.2 Análise estatística

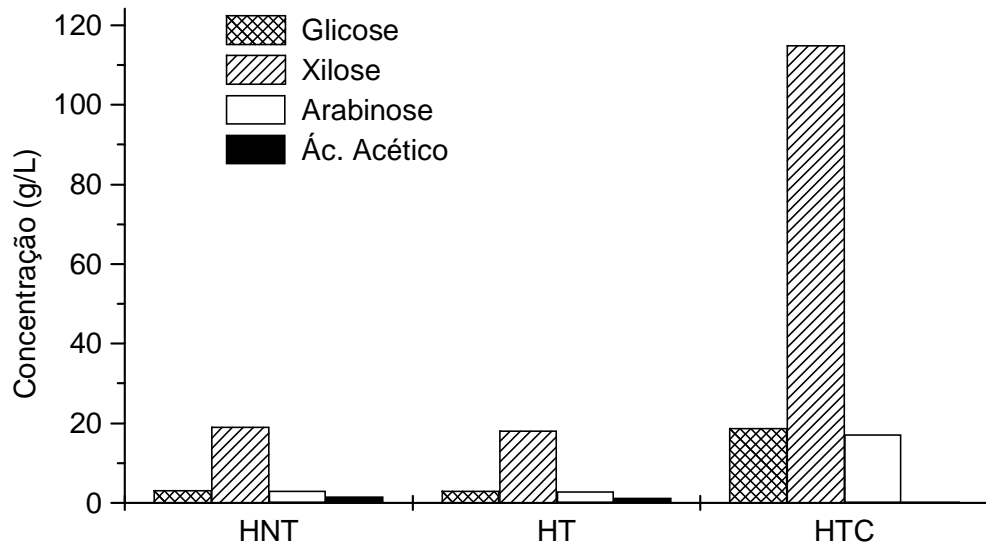
A análise estatística dos experimentos foi realizada utilizando-se os programas STATGRAFICS versão 6,0, Design-Expert versão 5.0 e Statistica versão 6.0.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ

Na obtenção do hidrolisado hemicelulósico foram empregados 13,3 kg de palha de arroz seca (15 kg de palha com  $11,1 \pm 0,6$  % de umidade), sendo o volume total de solução ácida no reator de 133 L, obtendo-se no final da hidrólise um volume de 78 L de hidrolisado. O balanço de massa do processo mostrou que aproximadamente 24 L de hidrolisado ficaram retidos na celulignina resultante da hidrólise, o restante do volume de líquido, cerca de 30 L, provavelmente foi perdido por evaporação durante a descompressão do reator, onde foi observada uma grande projeção de vapor do interior do reator. A massa de palha seca obtida após a hidrólise foi cerca de 7,0 kg. A análise de sólidos totais do hidrolisado obtido permitiu estimar uma massa de sólidos solúveis de aproximadamente 4,7 kg, deste modo o balanço de massa mostra uma perda de cerca de 1,6 kg de palha, a qual ou permaneceu retida no interior do reator, ou se perdeu durante a filtração do hidrolisado, na limpeza do filtro.

Na Figura 5.1 são mostradas as concentrações dos principais componentes do hidrolisado obtido após os processos de hidrólise da palha de arroz, destoxificação e concentração do hidrolisado.



**Figura 5.1** - Concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético para o hidrolisado não tratado (HNT), hidrolisado tratado (HT) e hidrolisado tratado e concentrado (HTC).

A concentração do hidrolisado destoxificado foi feita em um evaporador a vácuo com capacidade de 30L, a uma temperatura de 65 °C. Neste processo o hidrolisado foi concentrado cerca de seis vezes. Como pode ser observado na Figura 5.1, a concentração de açúcares no hidrolisado, glicose, xilose e arabinose, aumentou de 3,0, 18,2 e 2,9 g/L para 18,7, 114,9 e 17,1 g/L, respectivamente. O processo de concentração levou a uma redução de 75 % da concentração de ácido acético, o que já era esperado, visto que o acetato em pH baixo apresenta-se na forma de ácido acético molecular, sendo portanto volátil.

A concentração total de açúcares obtida na hidrólise (hidrolisado não concentrado), cerca de 25 g/L, assim como a proporção entre eles, aproximadamente 1:6:1 para glicose, xilose e arabinose, respectivamente, foram bem próximas ao reportado por outros trabalhos da literatura que empregaram hidrólise ácida com ácido diluído como os de Mussatto e Roberto (2004a), Sanches et al. (2004) e Roberto, Mussatto e Rodrigues, (2003). Sanches et al. (2004)



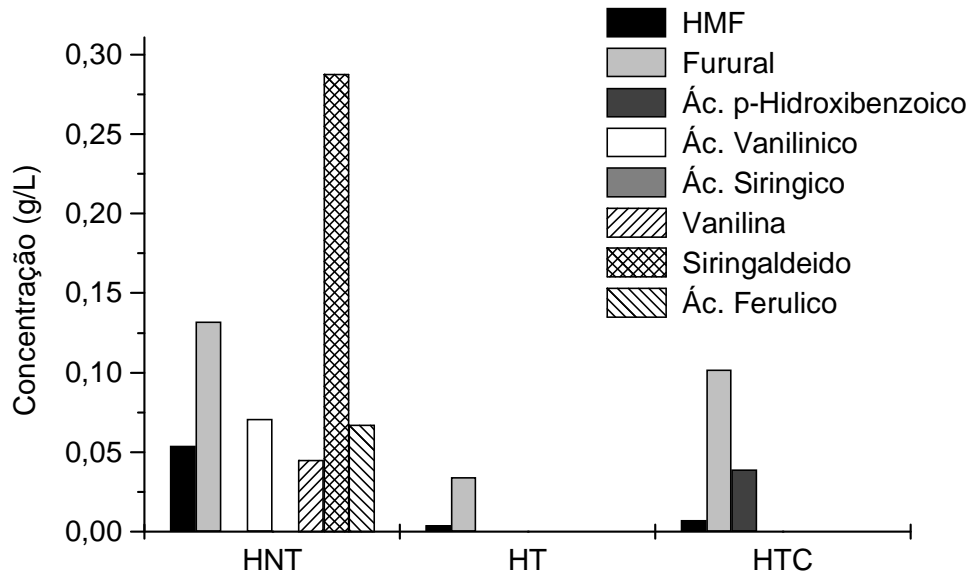
obtiveram um hidrolisado de palha de “Paja Brava”, contendo cerca de 24,7 g/L de açúcares totais, na proporção de 1:8,3:1 de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, sendo a reação realizada a 180 °C, por 5 minutos na presença de 0,5 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Apesar das condições de hidrólise terem sido diferentes, a concentração final e a proporção entre as principais frações de açúcares foram muito semelhantes as do presente trabalho.

A destoxificação do hidrolisado foi realizada no mesmo reator empregado para a hidrólise. Este processo foi realizado segundo descrito por Mussatto e Roberto (2004b), onde foi empregado uma concentração de 3% m/v de carvão ativo em relação ao volume de hidrolisado, a 45 °C por 30 minutos e agitação de 50 rpm.

Na Figura 5.2 são mostradas as concentrações de furfural, hidroximetilfurfural (HMF), e outros compostos tóxicos, presentes no hidrolisado não tratado, hidrolisado tratado e hidrolisado tratado e concentrado. Observa-se na Figura 5.2 que o hidrolisado não tratado apresentou uma concentração de HMF, furfural, ác. vanilínico, vanilina, siringaldeído e ácido ferúlico de (mg/L) 54, 132, 71, 45, 288 e 67, respectivamente. O processo de destoxificação promoveu a remoção completa do ácido vanilínico, vanilina, siringaldeído e ácido ferúlico, e a remoção parcial de HMF e furfural reduzindo suas concentrações em 92 e 74 %, respectivamente. O processo de concentração do hidrolisado levou a um aumento da concentração de furfural de 75 % e de HMF de 200 %, sendo notada também a presença de ácido p-hidroxibenzóico, no hidrolisado concentrado. Comparando as concentrações de todos os compostos fenólicos e aromáticos identificados no hidrolisado não tratado (HNT) e no hidrolisado tratado e concentrado (HTC), foi constatada uma redução de cerca de 77 % na concentração total destes.

Semelhantes às concentrações de açúcares, as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural observadas foram similares às reportadas por outros autores. Nos trabalhos de Mussatto e Roberto (2004a), Roberto, Mussatto e Rodrigues (2003) e Sanches et al. (2004), onde as hidrólises foram realizadas nas condições citadas a pouco, as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural variaram de 0,05 a 0,30 g/L e 0,03 a 0,09 g/L, respectivamente. As concentrações de ambos os compostos encontradas neste trabalho, estão dentro destas faixas, sendo portanto os resultados encontrados coerentes com os retratados na literatura.

O hidrolisado não tratado e o hidrolisado tratado concentrado apresentaram uma concentração de compostos fenólicos totais (determinada pelo método de Folin-Ciocalteu) de cerca de  $2,6 \pm 0,5$  e  $0,8 \pm 0,2$  g/L, respectivamente. Concentrações, estas, muito acima da soma dos compostos determinados por cromatografia (Figura 5.2), o que sugere que grande parte dos compostos fenólicos presentes não puderam ser identificados. A concentração de fenóis totais presentes no hidrolisado tratado concentrado foi cerca de 69 % menor que as apresentadas pelo hidrolisado não tratado, mesmo o primeiro estando cerca de seis vezes mais concentrado, o que mostrou que o processo de destoxificação foi capaz de remover grande parte dos compostos fenólicos. A redução na concentração de compostos fenólicos totais ocorrida, cerca 69%, foi muito próxima a observada para a soma das concentrações dos compostos identificados por cromatografia, cerca de 77 %.



**Figura 5.2** - Concentrações dos principais compostos tóxicos, para o hidrolisado não tratado (HNT), hidrolisado tratado (HT) e hidrolisado tratado e concentrado (HTC).

## 5.2 ENSAIOS FERMENTATIVOS

### 5.2.1 Avaliação da toxicidade do hidrolisado

Para determinar uma concentração na qual fosse possível realizar os ensaios do planejamento, foram feitas fermentações empregando diferentes diluições do hidrolisado, conforme mostrado na Tabela 4.2.

Os experimentos foram realizados em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação (hidrolisado diluído sem a adição de nutrientes), e incubados em agitador rotatório sob agitação de 150 rpm, a temperatura de 30 °C, com 1 g/L de inóculo, por 48 horas. A concentração, inicial e final dos substratos, células e produto, assim como a conversão em células e em produto e a produtividade dos ensaios são mostrados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Concentração inicial (i) e final (f) (após 48 horas) de substrato (S), células (X) e produto (P), conversão em célula ( $Y_{X/S}$ ) e produto ( $Y_{P/S}$ ), e produtividade ( $Q_P$ ) dos ensaios de toxicidade do hidrolisado.

Ensaio	*S <sub>i</sub> (g/L)	*S <sub>f</sub> (g/L)	X <sub>i</sub> (g/L)	X <sub>f</sub> (g/L)	**P (g/L)	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Q <sub>p</sub> (g/L.h)
1	115	117	1,25	1,74	0	0,00	0,00	0,00
2	87	90	1,33	1,61	0	0,00	0,00	0,00
3	62	28	1,36	2,99	16	0,47	0,05	0,34
4	43	6	1,38	3,60	14	0,38	0,06	0,29

\* A concentração de substrato avaliada é a soma da concentração de todos os açúcares presentes no hidrolisado. \*\* O produto avaliado é o etanol.

Com os resultados apresentados na Tabela 5.1 pode-se observar que o consumo dos açúcares, o crescimento celular e a produção de etanol só ocorreram para diluições de hidrolisado superiores a duas vezes (ensaio 3 e 4), onde foram alcançadas, respectivamente, conversões em produto da ordem de 0,47 e 0,38 g/g, conversões em células de 0,05 e 0,06 g/g, e produtividade em etanol de 0,34 e 0,29 g/L.h.

Para concentrações maiores de hidrolisado, ensaios 1 e 2, o metabolismo da levedura *Pichia stipitis* foi inibido, mesmo tendo o processo de destoxificação removido grande parte dos inibidores. De acordo com Oliva et al. (2005) a efetividade do processo de destoxificação do hidrolisado não depende apenas da remoção dos compostos inibidores, mas também das características da cepa do microrganismo empregado.

Para contornar o problema da toxicidade apresentada pelo hidrolisado, optou-se por prosseguir os estudos utilizando uma menor concentração de xilose no hidrolisado, o que reduziria a concentração dos inibidores e, portanto seus impactos.

### 5.3 AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL DO HIDROLISADO

Devido à baixa fermentabilidade de *Pichia stipitis* em hidrolisado contendo concentrações de açúcares próximas a 90 g/L, conforme mostrado no item anterior, os ensaios de bioconversão visando avaliar a suplementação nutricional foram conduzidos em hidrolisado contendo cerca de 60 g/L de açúcares totais.

Foi realizado um planejamento fatorial  $2^3$  com quatro repetições no ponto central, para avaliar o efeito da concentração de uréia (0 a 2,3 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0 a 1 g/L) e extrato de levedura (0 a 3 g/L) sobre os parâmetros de fermentação  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Q_p$ .

Todos os experimentos foram realizados em frascos de 125 mL, contendo 50 mL de meio de fermentação. Os frascos foram inoculados com 1 g/L de células e incubados em agitador rotatório sob agitação de 150 rpm, a temperatura de 30 °C, por 120 horas, sendo as amostras retiradas periodicamente para quantificação da concentração de açúcares, células e etanol.

O planejamento fatorial consistiu de 12 diferentes experimentos. Os níveis dos nutrientes, as concentrações de substrato, células e produto e as respostas avaliadas, conversão em etanol e em células, e a produtividade em etanol, estão mostrados na Tabela 5.2. Estes dados são mostrados também na forma de gráficos na Figura 5.3, onde são mostradas as cinéticas de consumo de substrato, crescimento celular e formação de produto, para cada ensaio do planejamento fatorial, até o tempo de 120 horas.

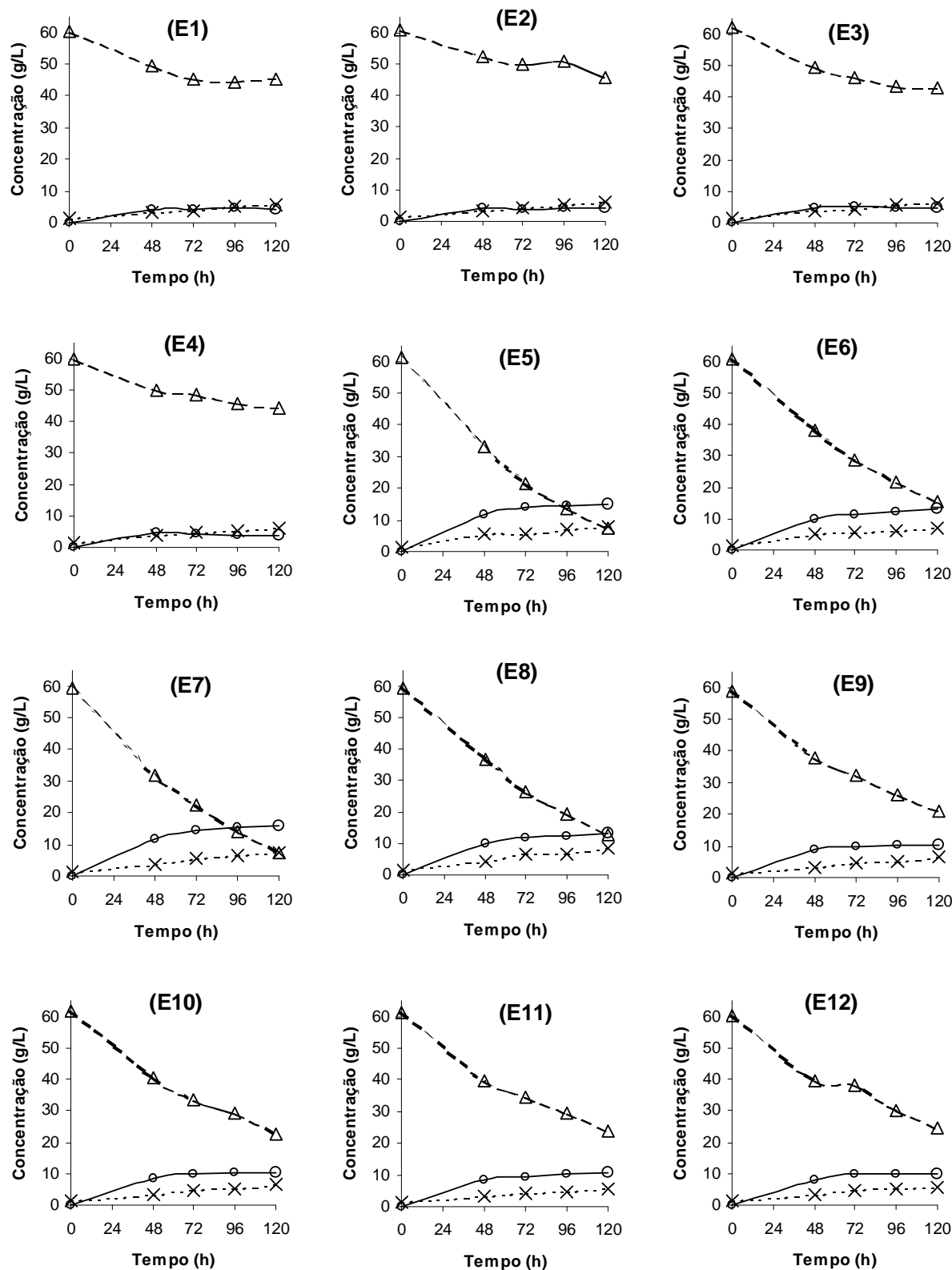
Os resultados obtidos nos ensaios do planejamento mostraram que a levedura foi capaz de produzir etanol em todas as condições estudadas, mesmo sem a adição de nutrientes (Tabela 5.2), o que sugere a presença de alguns nutrientes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

**Tabela 5.2** - Planejamento fatorial do tipo 2<sup>3</sup>, com quatro repetições no ponto central, para a avaliação da importância dos nutrientes na conversão do hidrolisado em etanol (Y<sub>p/s</sub>) e em células (Y<sub>x/s</sub>) e produtividade em etanol para 48 horas (Q<sub>p</sub>), por *Pichia stipitis*. E concentrações finais e iniciais de xilose (S), células (X) e produto (P) utilizados para calcular os parâmetros.

Ensaio	Nível das variáveis			Substrato (g/L)					Etanol (g/L)					Células (g/L)					Respostas avaliadas		
	A	B	C	S <sub>0</sub>	S <sub>48</sub>	S <sub>72</sub>	S <sub>96</sub>	S <sub>120</sub>	P <sub>0</sub>	P <sub>48</sub>	P <sub>72</sub>	P <sub>96</sub>	P <sub>120</sub>	X <sub>0</sub>	X <sub>48</sub>	X <sub>72</sub>	X <sub>96</sub>	X <sub>120</sub>	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Q <sub>p</sub> (g/L.h)
1	-1	-1	-1	60,4	49,6	45,1	44,6	45,3	0,0	4,4	4,4	4,5	4,3	1,2	3,4	3,6	4,4	5,6	0,28	0,22	0,09
2	+1	-1	-1	60,8	52,4	50,1	50,7	45,8	0,0	4,1	4,0	4,5	4,3	1,3	3,2	4,2	5,0	6,0	0,31	0,32	0,09
3	-1	+1	-1	62,2	49,4	46,2	43,3	43,0	0,0	4,8	5,3	4,7	4,9	1,3	3,7	4,3	5,4	6,2	0,26	0,23	0,10
4	+1	+1	-1	59,7	49,9	48,3	45,8	44,1	0,0	4,8	4,2	4,0	3,8	1,3	3,7	4,6	5,4	6,3	0,27	0,31	0,10
5	-1	-1	+1	61,1	33,0	21,7	13,7	7,3	0,0	11,7	14,0	14,4	15,2	1,6	5,6	5,4	7,0	8,0	0,29	0,11	0,24
6	+1	-1	+1	61,0	37,9	28,5	21,5	15,5	0,0	10,0	11,3	12,2	13,2	1,6	5,4	5,6	6,1	7,1	0,29	0,11	0,21
7	-1	+1	+1	59,2	31,8	22,5	14,0	7,3	0,0	11,6	14,4	15,3	15,9	1,4	3,8	5,6	6,3	7,6	0,32	0,12	0,24
8	+1	+1	+1	59,5	36,8	26,2	19,1	12,7	0,0	10,1	11,7	12,5	13,1	1,4	4,2	6,4	6,7	8,4	0,28	0,15	0,21
9	0	0	0	59,0	37,9	32,1	26,3	21,2	0,0	8,9	9,7	10,2	10,4	1,3	3,3	4,6	5,0	6,5	0,29	0,13	0,19
10	0	0	0	61,7	40,5	33,4	29,0	22,8	0,0	8,7	9,8	10,6	10,5	1,4	3,2	4,6	5,3	6,4	0,29	0,13	0,18
11	0	0	0	61,1	39,9	34,5	29,5	24,1	0,0	8,6	9,2	10,4	10,7	1,4	3,5	4,4	4,5	5,5	0,30	0,11	0,18
12	0	0	0	60,4	39,4	38,1	30,3	24,4	0,0	8,2	10,0	9,8	9,9	1,4	3,4	4,7	5,0	5,8	0,29	0,12	0,17

A = Uréia; B = MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; C = Extrato de levedura. Y<sub>p/s</sub>, Y<sub>x/s</sub> foram calculados por linearização [S]x[P] e [X]x[P], até a concentração máxima de produto.

Q<sub>p</sub> calculado para 48 horas.



**Figura 5.3** - Acompanhamento cinético do crescimento de células (-x-), consumo de substrato (-Δ-) e produção de etanol (-o-), nos ensaios fermentativos do planejamento fatorial para avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

O ponto no qual foi observado a maior produção de células, 8,4 g/L (ensaio 8), foi aquele em que todos os nutrientes estavam presentes no nível mais elevado, o que indica uma influência positiva da adição destes sobre o crescimento celular, entretanto, este ensaio não foi o que apresentou maior acúmulo de etanol (13,1 g/L), o que mostra que, diferentemente do crescimento celular, alguns dos nutrientes estudados podem ter um efeito negativo sobre a produção de etanol.

Nos primeiros quatro ensaios (Figura 5.3, E1 a E4), os quais foram realizados sem a adição de extrato de levedura, foi observado um lento consumo de substrato, havendo um consumo de apenas 17 % nas primeiras 48 horas de fermentação, e atingindo a 25 % após as 120 horas. A produção de etanol para estes ensaios atingiu um acúmulo médio de cerca de 4,5 g/L em 48 horas, permanecendo praticamente inalterado até o tempo final. Embora o consumo de substrato e a formação de produto tenham sido lentos, houve crescimento celular durante toda a fermentação, resultando em uma concentração final de células de aproximadamente 6 g/L, após 120 horas de cultivo.

Nos ensaios de 5 a 8 (Figura 5.3, E5 a E8), os quais foram suplementados com 3 g/L de extrato de levedura, foi observado um rápido consumo de substrato, sendo mais acentuado nos ensaios 5 e 7 (realizados na ausência de uréia), e um crescimento celular ligeiramente maior ao observado nos ensaios sem extrato de levedura, chegando a uma concentração média de 7,8 g/L de células em 120 horas. O consumo médio de substrato observado nestes quatro ensaios foi superior a 43 % em 48 horas, chegando ao fim das 120 horas a um consumo superior a 88 % para os ensaios 5 e 7 (realizados sem a adição de uréia), e cerca de 77 % para os ensaios 6 e 8 (realizados com a adição de 2,3 g/L de uréia). A produção de etanol, no tempo de 48 horas, nos ensaios de 5 a 8 foi em média duas vezes maior que a

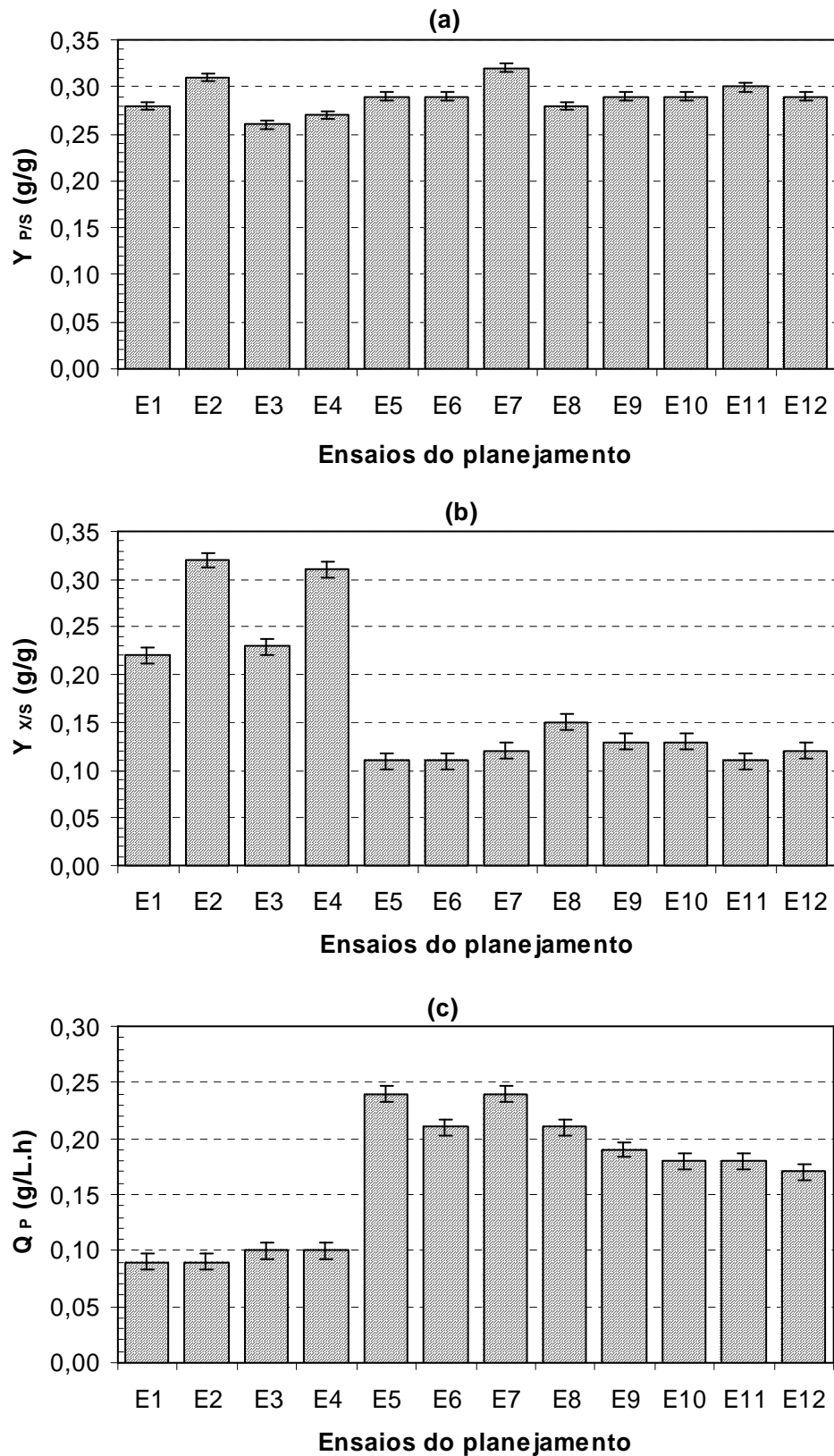


alcançada nos ensaios de 1 a 4, no mesmo tempo. Os ensaios 5 e 7 apresentaram um maior acúmulo de etanol, atingindo ambos uma concentração de cerca de 15,5 g/L em 120 horas, sendo seguidos pelos ensaios 6 e 8, os quais alcançaram cerca de 13,2 g/L, no mesmo tempo.

O consumo de substrato, a formação de produto e o crescimento celular observados nos ensaios do ponto central (Figura 5.3, E9 a E12), tiveram comportamento intermediário aos observados para os ensaios realizados na ausência (ensaios de 1 a 4) e na presença (ensaios de 5 a 8) de 3 g/L de extrato de levedura, apresentando, após 120 horas de fermentação, um consumo médio de substrato de cerca de 60 %, com uma concentração final de células de 6 g/L e um acúmulo de aproximadamente 10,5 g/L de etanol.

Estes resultados mostram que a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com extrato de levedura foi o fator mais relevante para o processo de bioconversão de seus açúcares a etanol. Revelaram ainda que a adição de uréia ao meio de fermentação, quando extrato de levedura estava presente, teve ligeira influência negativa sobre o processo. A princípio nenhuma diferença expressiva foi notada entre os ensaios realizados com adição ou na ausência de  $MgSO_4$ , sendo portanto mais adequado uma avaliação estatística de seus possíveis efeitos.

As respostas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em células ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ), avaliadas no planejamento fatorial, são mostradas na Figura 5.4 na forma de gráficos de barra.



**Figura 5.4** – Conversão em produto (a) e conversão em células (b), produtividade em etanol (c) dos diferentes ensaios do planejamento fatorial do estudo da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Podemos observar na Figura 5.4a, que os valores de conversão em produto obtidos nos diferentes ensaios do planejamento não apresentaram grandes variações entre eles, o que indica que nenhum dos nutrientes estudados foi capaz de influir de maneira significativa sobre este parâmetro, entretanto o mesmo não ocorreu com as outras duas respostas avaliadas.

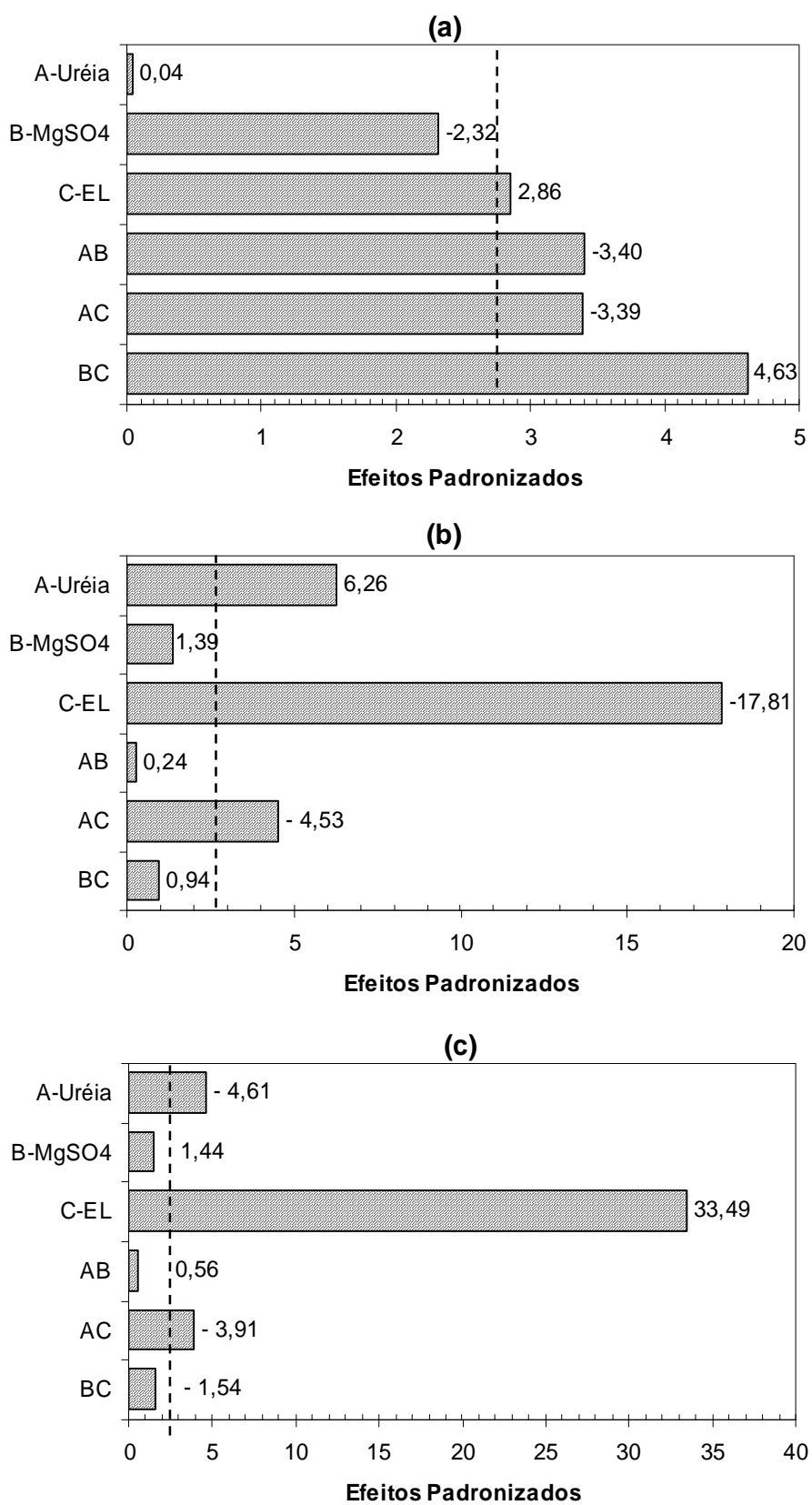
Para a resposta conversão em células, Figura 5.4b, os maiores valores foram observados para os ensaios de 1 a 4, os quais foram realizados na ausência de extrato de levedura, destacando-se dentre estes os ensaios 2 e 4, realizados na presença de uréia. Entretanto se observarmos a resposta produtividade (Figura 5.4c) e a cinética de fermentação (Figura 5.3) veremos que estes quatro primeiros ensaios, foram os que apresentaram menor produtividade e cinética de fermentação lenta. As maiores produtividades em etanol foram observadas para os ensaios realizados na presença de extrato de levedura (Figura 5.4, E5 a E12), destacando-se entre eles os ensaios 5 e 7 (na ausência de uréia), os quais atingiram uma produtividade em etanol de aproximadamente 0,24 g/L.h. Igualmente ao observado na cinética de fermentação, os parâmetros fermentativos mostraram que fator mais influente sobre o processo de bioconversão dos açúcares, do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a etanol por *Pichia stipitis*, foi a suplementação com extrato de levedura, que mostrou ter influência positiva sobre a produtividade. A adição de uréia apresentou uma influência bem menos pronunciada que a suplementação com extrato de levedura, tendo uma influência positiva sobre a conversão em células, o que pode ser observado comparando os ensaios 1 e 3 (sem uréia) com os ensaios 2 e 4 (com uréia). Na Figura 5.4c, entretanto, a suplementação com uréia mostrou interferir de maneira negativa sobre a

produtividade em etanol, o que pode ser observado comparando nesta figura, os ensaios 6 e 8 (com uréia) com os ensaios 5 e 7 (sem uréia).

A influência da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sobre os parâmetros fermentativos  $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , no processo de bioprodução de etanol por *Pichia stipitis*, foi estudada de maneira mais detalhada, através de ferramentas estatísticas, sendo apresentado a seguir.

Nos gráficos de Pareto (Figuras 5.5, a, b e c), são mostradas as análises da estimativa dos efeitos para  $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $Q_P$ , respectivamente, nos quais foram considerados significativos os termos cujos valores de  $t_{\text{calculado}}$  (representada pelas barras do gráfico de Pareto) fossem maiores que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  (representado pela linha pontilhada do gráfico). Para distribuição de Student, a 95% de confiança e erro puro com 4 graus de liberdade,  $t_{\text{tabelado}} = 2,78$ .

A pouca variação dos valores da resposta conversão em produto, observada em todos os ensaios do planejamento, demonstra que a adição dos nutrientes estudados não teve grande influência sobre este parâmetro. Entretanto no gráfico de Pareto (Figura 5.5a), observou-se que para a conversão em produto, apenas as variáveis principais A (uréia) e B ( $\text{MgSO}_4$ ) não mostraram efeitos significativos. A variável concentração de C (extrato de levedura) e as interações AB, AC e BC, apresentaram significância, o que torna necessário que os efeitos principais A e B também façam parte do modelo ajustado, o que será melhor avaliado adiante, através da análise da variância dos efeitos.



**Figura 5.5** - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: conversão em produto (a), conversão em células (b) e produtividade em etanol (c).

Conforme apresentado nos gráficos de Pareto, Figuras 5.5 (a) e (b), para as respostas conversão em células ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ), respectivamente, apenas as variáveis A (uréia) e C (extrato de levedura) e sua interação AC tiveram efeitos significativos. Ao contrário do relatado por Slininger et al. (2006), no presente trabalho, a adição de  $MgSO_4$  (variável B) não demonstrou ter influência sobre a produtividade em etanol. Entretanto, no presente trabalho foi utilizado hidrolisado e não meio sintético, e o fato da adição de  $MgSO_4$  não ter sido significativo pode ser atribuído a possível presença deste mineral no hidrolisado em quantidades suficientes para a levedura, tornando desnecessária sua adição e consequentemente, ocultando sua real importância.

A significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos  $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , no processo de bioprodução de etanol foi confirmada através da análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente). Os termos considerados significativos foram os mesmos observados nos gráficos de Pareto e o coeficiente de correlação alcançado foi superior a 0,90 para as três respostas, o que demonstra a relevância das variáveis estudadas.

A resposta  $Y_{P/S}$ , não apresentou curvatura significativa, o que indica que um modelo linear poderia descrever seu comportamento diante das variáveis estudadas. As respostas  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , apresentaram curvatura significativa, o que indica que poderiam ser melhor explicadas através de modelos quadráticos. Apesar da resposta  $Q_P$  ter apresentado curvatura significativa, sua contribuição sobre a explicação desta resposta foi muito pequena (2,6 %), diferentemente da resposta  $Y_{X/S}$ , cuja curvatura mostrou ter grande contribuição (21,6 %).

**Tabela 5.3** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ).

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	Curvatura	0,0000	1	0,00005	1,00	0,3743	1,6
	A	0,0000	1	0,00000	0,00	0,9665	0,0
	B	0,0002	1	0,00024	5,37	0,0813	8,5
	C	0,0004	1	0,00037	8,16	0,0461 *	12,9
	AB	0,0005	1	0,00053	11,58	0,0272 *	18,4
	AC	0,0005	1	0,00052	11,50	0,0275 *	18,3
	BC	0,0010	1	0,00097	21,40	0,0098 *	34,0
	Erro	0,0002	4	0,00005			6,3
$R^2 = 0,93$	Total	0,0029	11				

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.4** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em células ( $Y_{X/S}$ ).

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	Curvatura	0,0140	1	0,0140	107,38	0,0005 *	21,6
	A	0,0052	1	0,0052	39,16	0,0033 *	8,1
	B	0,0003	1	0,0003	1,94	0,2363	0,4
	C	0,0420	1	0,0420	317,34	<0,0001 *	64,7
	AB	0,0000	1	0,0000	0,06	0,8210	0,0
	AC	0,0027	1	0,0027	20,56	0,0105 *	4,2
	BC	0,0001	1	0,0001	0,88	0,4006	0,2
	Erro	0,0005	4	0,0001			0,8
$R^2 = 0,98$	Total	0,0649	11				

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.5** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol ( $Q_P$ ).

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Q_P$ (g/L.h)	Curvatura	0,0010	1	0,0010	31,57	0,0049 *	2,6
	A	0,0007	1	0,0007	21,29	0,0099 *	1,8
	B	0,0001	1	0,0001	2,06	0,2243	0,2
	C	0,0350	1	0,0350	1121,3	<0,0001 *	93,6
	AB	0,0000	1	0,0000	0,31	0,6053	0,0
	AC	0,0005	1	0,0005	15,31	0,0173 *	1,3
	BC	0,0001	1	0,0001	2,38	0,1976	0,2
	Erro	0,0001	4	0,0000			0,3
$R^2 = 0,99$	Total	0,0374	11				

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Apesar das respostas  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$  terem apresentado curvatura significativa, foi realizada a análise de variância dos efeitos principais e suas interações, para ajuste em modelos lineares, para estas respostas e para  $Y_{P/S}$ , as quais são mostradas nas Tabelas 5.6, 5.7 e 5.8, para  $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , respectivamente. Os coeficientes de correlação alcançados para  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  foram superiores a 0,90, não havendo uma grande redução da correlação com a retirada da curvatura, o que pode ser atribuído a baixa contribuição desta. Entretanto, a resposta  $Y_{X/S}$  apresentou uma considerável redução no coeficiente de correlação, o que se deve a grande contribuição apresentada pela curvatura (superior a 20 %).

Para a resposta  $Y_{P/S}$ , os termos significativos foram os mesmos observados na tabela 5.3, o que já era esperado, visto que a curvatura não demonstrou significância estatística. Para ambas as respostas  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , nas quais a curvatura foi significativa, após retirada desta apenas a variável C (extrato de levedura) apresentou significância, tendo esta variável sozinha uma contribuição de 93 % na explicação do comportamento de  $Q_P$  e cerca de 64 % no de  $Y_{X/S}$ .

Por terem apresentado curvatura significativa, seria aconselhável a construção de modelos quadráticos para explicar as respostas  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ . Porém, sua construção exigiria a realização de um número maior de experimentos, que resultaria a modelos mais complexos, o que não seria conveniente, visto que a otimização de  $Y_{X/S}$  não está diretamente envolvida com a produção de etanol, tendo esta resposta uma importância secundária comparada com  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ . No caso da resposta  $Q_P$  tanto a curvatura quanto as variáveis que apresentaram significância, A (uréia) e a interação AC, tiveram uma contribuição muito pequena, além de que, como podemos ver na figura 5.5 (c), o efeito da variável A e de sua interação AC foram ambos negativos, sendo por isso sua ausência provavelmente o melhor ajuste para maximizar  $Q_P$ .



**Tabela 5.6** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ), desprezando a curvatura.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	<b>A</b>	0,0000	1	0,00000	0,00	0,9660	0,0
	<b>B</b>	0,0002	1	0,00024	5,37	0,0682	8,5
	<b>C</b>	0,0004	1	0,00037	8,16	0,0356 *	12,9
	<b>AB</b>	0,0005	1	0,00053	11,59	0,0192 *	18,4
	<b>AC</b>	0,0005	1	0,00052	11,51	0,0194 *	18,3
	<b>BC</b>	0,0010	1	0,00097	21,40	0,0057 *	34,0
	Erro	0,0002	5	0,00005			
$R^2 = 0,92$	Total	0,0029	11				

A = Uréia; B=  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C= Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.7** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em células ( $Y_{X/S}$ ), desprezando a curvatura.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	<b>A</b>	0,0052	1	0,00523	1,76	0,2422	8,0
	<b>B</b>	0,0003	1	0,00026	0,09	0,7799	0,4
	<b>C</b>	0,0424	1	0,04237	14,25	0,0130 *	64,6
	<b>AB</b>	0,0000	1	0,00001	0,00	0,9612	0,0
	<b>AC</b>	0,0027	1	0,00274	0,92	0,3808	4,2
	<b>BC</b>	0,0001	1	0,00012	0,04	0,8500	0,2
	Erro	0,0149	5	0,00297			
$R^2 = 0,77$	Total	0,0656	11				

A = Uréia; B=  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C= Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.8** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol ( $Q_P$ ), desprezando a curvatura.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Q_P$ (g/L.h)	<b>A</b>	0,0007	1	0,00066	2,99	0,1442	1,8
	<b>B</b>	0,0001	1	0,00006	0,29	0,6134	0,2
	<b>C</b>	0,0348	1	0,03480	157,62	< 0,0001 *	93,6
	<b>AB</b>	0,0000	1	0,00001	0,04	0,8420	0,0
	<b>AC</b>	0,0005	1	0,00048	2,15	0,2022	1,3
	<b>BC</b>	0,0001	1	0,00007	0,33	0,5879	0,2
	Erro	0,0011	5	0,00022			
$R^2 = 0,97$	Total	0,0372	11				

A = Uréia; B=  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C= Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Outro ponto relevante é que a variável C (extrato de levedura) foi capaz de explicar sozinha mais de 93 % da variação da resposta  $Q_P$ , e devido a sua grande importância, a curvatura significativa provavelmente está relacionada com esta variável.

Com base nos termos significativos, para as respostas avaliadas, modelos lineares foram ajustados para descrever a conversão de açúcares em produto e em células e a produtividade em etanol, os quais foram avaliados através da análise da variância de regressão para os modelos, apresentados nas Tabelas 5.9, 5.10 e 5.11, respectivamente.

Através da análise de variância da regressão do modelo (ANOVA) verificou-se que as respostas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ) apresentaram coeficiente de correlação ( $R^2$ ) superiores a 0,92. Observa-se também que para ambas as respostas os modelos propostos foram significativos não apresentando falta de ajuste a um nível de significância de 0,05 (95% de confiança), o que os valida, possibilitando representá-los por meio de superfícies de resposta.

O modelo obtido para o fator de conversão em células foi significativo a um nível de 0,05 de significância, entretanto apresentou falta de ajuste significativa e um coeficiente de correlação muito baixo (inferior a 0,70), não sendo adequado portanto para descrever o comportamento de  $Y_{X/S}$ . Para este caso o comportamento desta resposta foi representado em um diagrama de cubo, para uma melhor visualização dos efeitos das variáveis sobre ela.

**Tabela 5.9** - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ), obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Y_{P/S}$ (g/g)	Modelo	0,0026	6	0,00044	9,67	0,0124
	Resíduo	0,0002	5	0,00005		
	Falta de ajuste	0,0001	2	0,00004	0,71	0,5591
	Erro puro	0,0002	3	0,00005		
$R^2 = 0,92$	Total	0,0029	11			

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.10** - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da conversão em células ( $Y_{X/S}$ ), obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Y_{X/S}$ (g/g)	Modelo	0,042366	1	0,042366	18,241	0,0016
	Resíduo	0,023226	10	0,002323		
	Falta de ajuste	0,022921	7	0,003274	32,166	0,008
	Erro puro	0,000305	3	0,000102		
$R^2 = 0,64$	Total	0,065592	11			

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

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

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Q_P$ (g/g)	Modelo	0,0348	1	0,0348	145,75	< 0,0001
	Resíduo	0,002388	10	0,000239		
	Falta de ajuste	0,002264	7	0,000323	7,8282	0,0594
	Erro puro	0,000124	3	4,13E-05		
$R^2 = 0,93$	Total	0,037188	11			

A = Uréia; B =  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; C = Extrato de levedura; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Com base nos resultados obtidos com a análise de variância, os modelos matemáticos para descrever as respostas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ), dentro da região estudada, puderam ser apresentados na forma das Equações 5.1 e 5.2, respectivamente.

$$Y_{P/S} = 0,29 + 0,00011 A - 0,0055 B + 0,0068 C - 0,0081 AB - 0,0081 AC + 0,011 BC \quad (\text{Equação 5.1})$$

$$Q_P = 0,17 + 0,066 C \quad (\text{Equação 5.2})$$

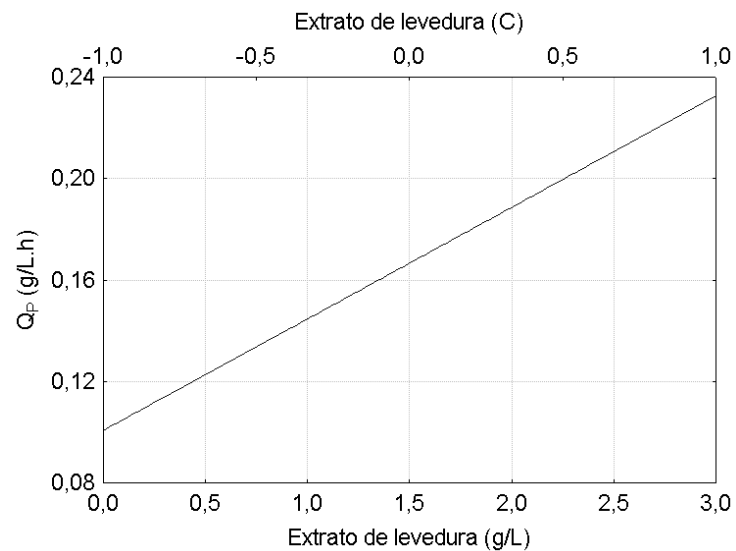
A equação 5.1 possibilita a obtenção de superfície de resposta para  $Y_{P/S}$  (Figuras 5.8, 5.9, 5.10) e a equação 5.2 por se tratar de uma equação dependente de uma única variável foi representada na forma de gráfico  $Q_P \times C$  (extrato de levedura), mostrado na Figura 5.6.

A Figura 5.6 mostra a representação gráfica da relação entre a produtividade em etanol e a concentração de extrato de levedura. Como visto anteriormente, na análise da variância (Tabela 5.8), a produtividade em etanol foi influenciada apenas pela adição de extrato de levedura, sendo esta influência positiva e muito acentuada, como o sugerido pelo gráfico de Pareto (Figura 5.5c), e pela contribuição apresentada por este termo na Tabela 5.5. A suplementação do meio de fermentação com 3 g/L de extrato de levedura (nível +1) levou a um aumento de cerca de duas vezes e meia no valor de  $Q_P$ , subindo de aproximadamente 0,10 g/L.h, na ausência de extrato de levedura, para 0,24 g/L.h, na presença deste.

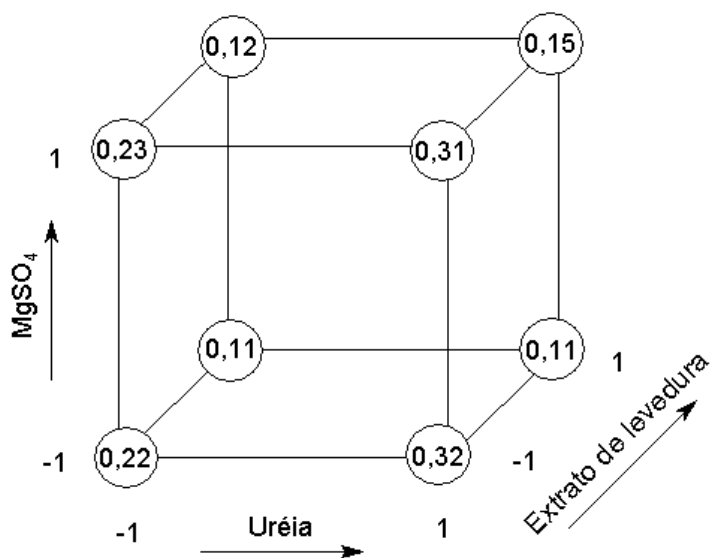
A Figura 5.7 mostra um diagrama de cubo, onde estão representadas as variáveis em seus diferentes níveis e, o valor da conversão em células observada para cada combinação das três variáveis. O aumento da concentração de extrato de levedura teve uma influência negativa sobre a conversão em células, para qualquer

combinação das demais variáveis, sendo esta influência a mais pronunciada de todo o diagrama. O aumento da concentração de uréia teve um efeito positivo acentuado na conversão em células, notado apenas na ausência de extrato de levedura (nível -1). No diagrama de cubo, nenhum efeito da variação na concentração de  $MgSO_4$  sobre a conversão em células pôde ser notado de forma clara, dentro da faixa de concentração observada.

A máxima conversão em células estimada pelo modelo, cerca de 0,31 g/g, foi observada para os níveis -1 e +1, para as variáveis concentração de extrato de levedura e uréia, respectivamente, independente do nível da variável  $MgSO_4$ . Estes níveis corresponderam a ausência de extrato de levedura e concentração de 2,3 g/L de uréia. Na presença de extrato de levedura (nível +1) foram observadas as menores conversões em células, estando em média em torno de 12 g/g, sendo este valor inferior a metade do valor médio de conversão celular observado nos níveis em que não havia extrato de levedura (nível -1), que foi de cerca de 0,27 g/g. Os dados obtidos mostraram que as condições em que se alcançam as maiores conversões em células são aquelas em que contrariamente se tem as menores produtividades tanto em células quanto em produto. Nestas condições, a alta conversão em células está ligada a um baixo consumo de substrato, causado possivelmente por deficiências nutricionais e não a um crescimento celular elevado.



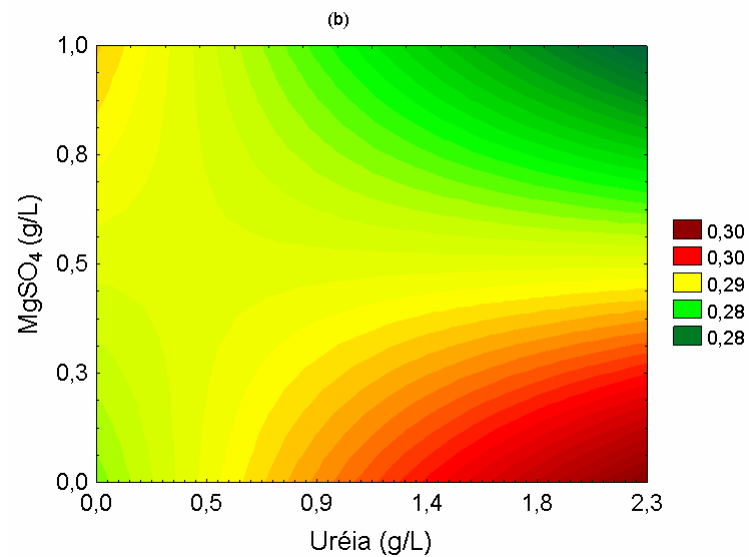
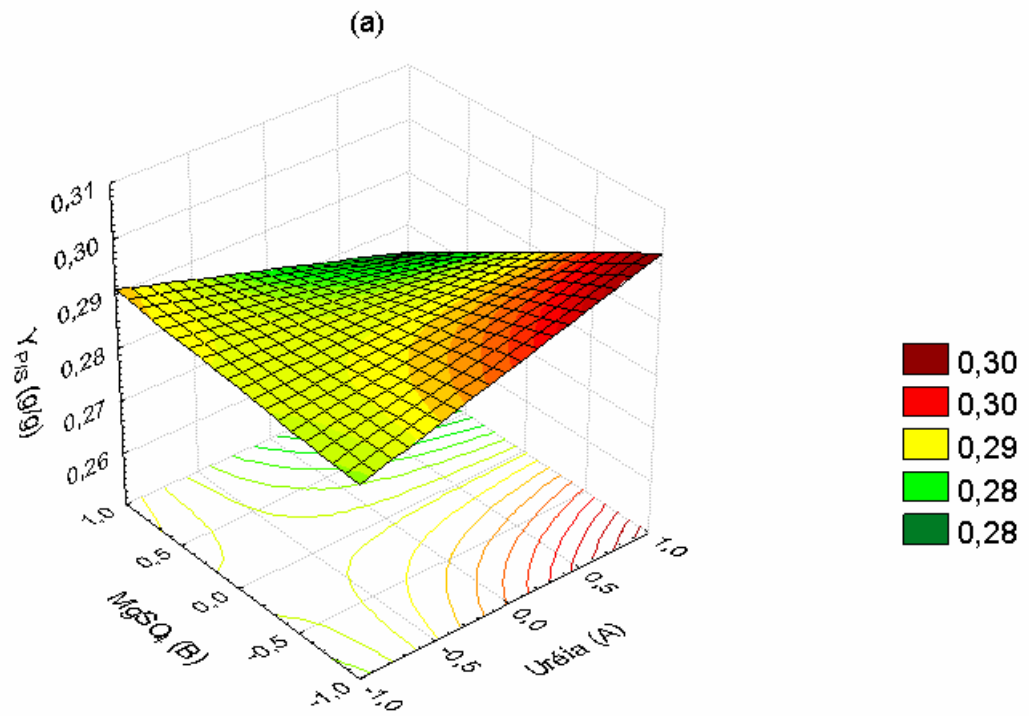
**Figura 5.6** - Gráfico que expressa a relação estimada entre a produtividade em etanol ( $Q_p$ ) e a concentração de extrato de levedura, em valores (eixo inferior) e em níveis (eixo superior).



**Figura 5.7** - Diagrama de cubo que mostra a conversão de xilose em células ( $Y_{x/s}$ ), estimada para cada combinação das variáveis: concentração de Extrato de levedura, de  $MgSO_4$  e de uréia.

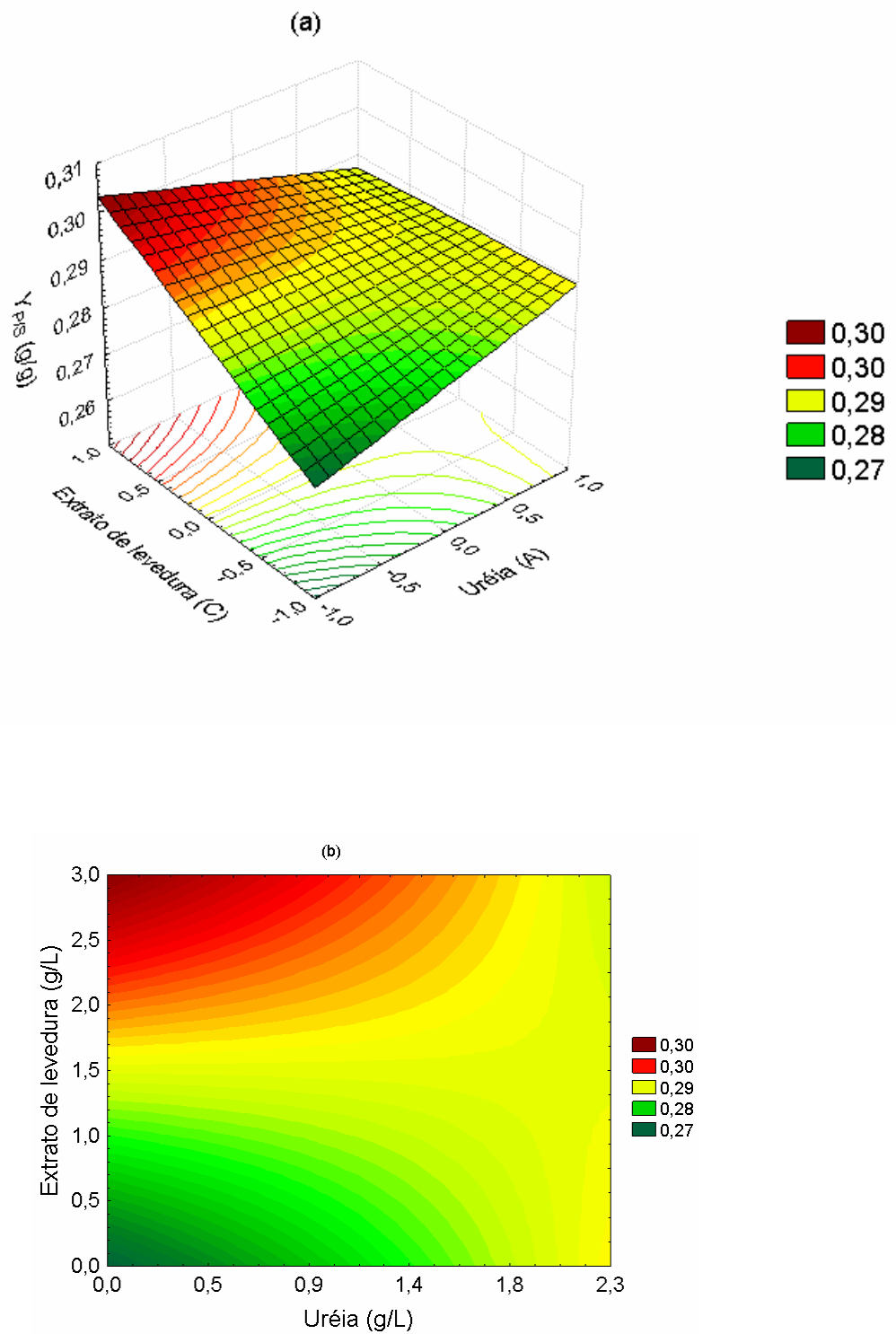
Na Figura 5.8 são mostradas através de superfície de resposta (a) e curva de nível (b) a relação entre a conversão em produto e a concentração de  $\text{MgSO}_4$  e de uréia, sendo a variável concentração extrato de levedura de fixada no nível zero. O aumento da concentração de uréia apresentou influência positiva sobre a conversão, na ausência de  $\text{MgSO}_4$  (nível -1), e na presença deste (nível +1), uma influência negativa. Da mesma forma, o aumento da concentração de  $\text{MgSO}_4$  teve um efeito positivo, na ausência de uréia (nível -1), e negativo na presença (nível +1 de uréia). O aumento de ambas as variáveis isoladas tiveram efeitos positivos, e quando juntas apresentaram um efeito negativo sobre a conversão, o que mostra de forma clara a presença de uma interação negativa entre elas. A maior conversão estimada, cerca de 0,30 g/g, foi prevista para os níveis +1 e -1 de uréia e  $\text{MgSO}_4$ , respectivamente, correspondente a ausência de  $\text{MgSO}_4$  e a 2,3 g/L de uréia. Entretanto, a diferença entre a conversão esperada neste ponto foi muito próxima da esperada para a ausência de ambas as variáveis (níveis -1 e -1), que foi de 0,29 g/g.

Na Figura 5.9 são mostradas através de superfície de resposta (a) e curva de nível (b) a relação entre a conversão em produto com a concentração de extrato de levedura e de uréia, sendo a variável concentração de  $\text{MgSO}_4$  fixada no nível zero. O aumento da concentração de uréia teve efeito positivo sobre a conversão, na ausência de extrato de levedura (nível -1), assim como o aumento da concentração de extrato de levedura, na ausência de uréia (nível -1), teve efeito positivo. Entretanto, de maneira semelhante ao observado na Figura 5.8, quando juntas, o aumento de ambas teve um efeito negativo sobre a conversão, o que mostra uma interação negativa destas variáveis. A maior conversão estimada, cerca de 0,30 g/g, foi prevista para os níveis -1 e +1 de uréia e extrato de levedura, respectivamente, correspondente a ausência de uréia e a 3 g/L de extrato de levedura.



**Figura 5.8** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a conversão de açúcares do hidrolisado em produto com a concentração de uréia e MgSO<sub>4</sub>, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável concentração de extrato de levedura foi fixada no nível zero (1,5 g/L).

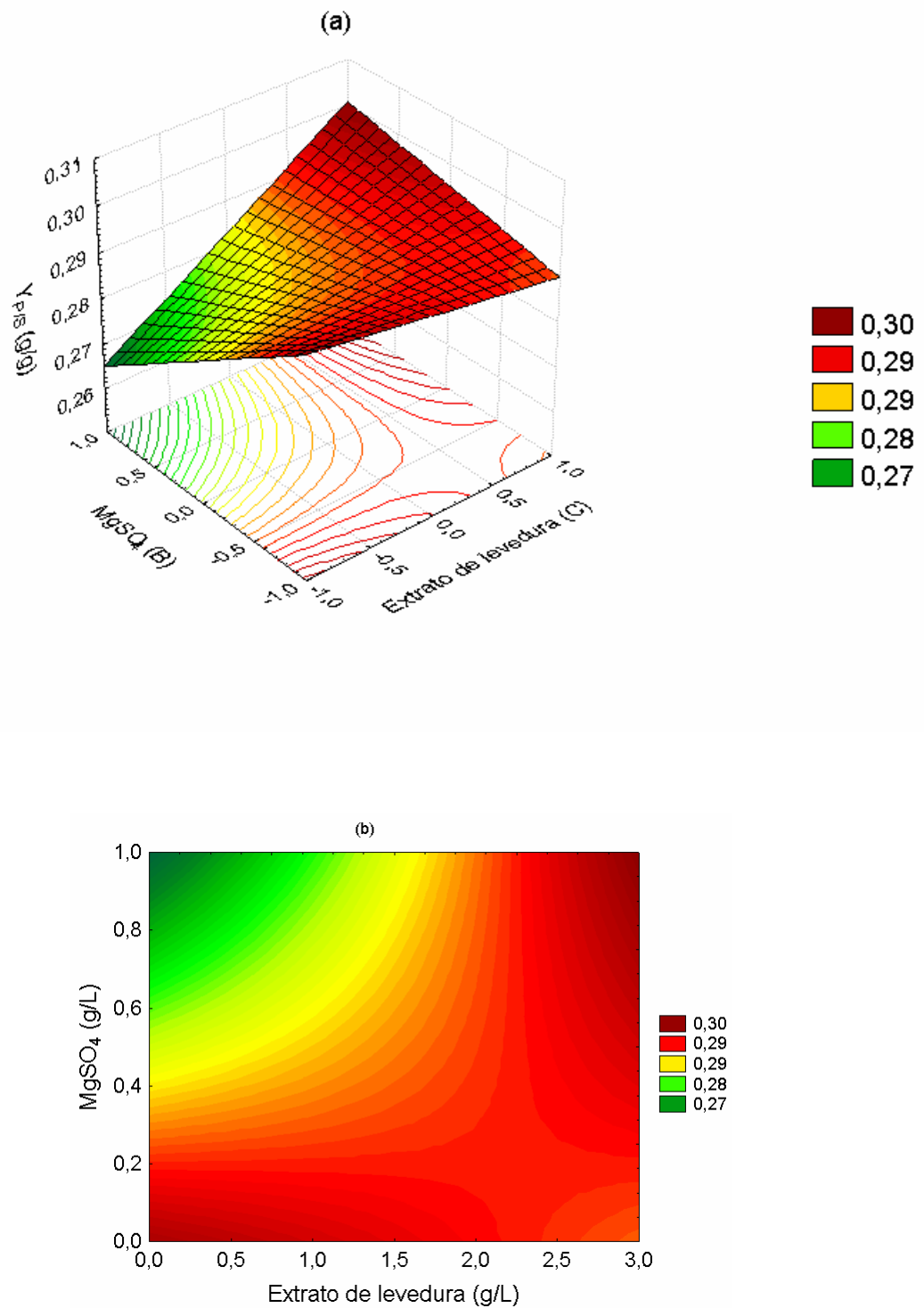




**Figura 5.9** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a conversão de açúcares do hidrolisado em produto com a concentração de extrato de levedura e uréia, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável concentração de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  foi fixada no nível zero (0,5 g/L).

Na Figura 5.10 são mostradas através de superfície de resposta (a) e curva de níveis (b) a relação entre a conversão em produto com a concentração de extrato de levedura e de  $MgSO_4$ , sendo a variável concentração de uréia fixada no nível zero. O aumento da concentração de  $MgSO_4$  teve efeito negativo acentuado sobre a conversão, na ausência de extrato de levedura (nível -1), entretanto, na presença deste, foi observado um comportamento contrario, tendo o aumento da variável  $MgSO_4$  um efeito positivo muito discreto, elevando a conversão de 0,29 g/g para 0,30 g/g. A variação da concentração de extrato de levedura mostrou pouca influência sobre a conversão em produto, na ausência de  $MgSO_4$ , e uma influência positiva acentuada na presença deste.

A maior conversão estimada, cerca de 0,30 g/g, foi prevista para duas diferentes condições, na ausência de ambas as variáveis (-1 e -1 para  $MgSO_4$  e extrato de levedura), e na presença de ambas em seus níveis mais elevados (+1), correspondente a 1 e 3 g/L de  $MgSO_4$  e extrato de levedura, respectivamente. Apesar da conversão estimada para ambas as combinações serem próximas, a produtividade alcançada nestas condições foram muito diferentes, cerca de 0,09 e 0,24 g/L.h (Tabela 5.2), para a primeira e segunda condição, respectivamente. Assim sendo, a condição mais interessante é aquela em que estão presentes  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  e extrato de levedura, e conseqüentemente a ausência de uréia, visto que esta demonstrou ter interação negativa, tanto com extrato de levedura quanto com  $MgSO_4$ . Apesar da adição de  $MgSO_4$  ser significativa, e apresentar um interação positiva com extrato de levedura, na prática o impacto causado por sua adição sobre a conversão foi pequeno, elevando a conversão em produto de 0,29 a 0,30 g/g, e sem levar a nenhum aumento de  $Q_p$ , o que torna sua adição desnecessária.



**Figura 5.10** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a conversão de açúcares do hidrolisado em produto com a concentração de extrato de levedura e MgSO<sub>4</sub>, em níveis codificados (a) e em valores reais (b). A variável concentração de uréia foi fixada no nível zero (1,15 g/L).

A suplementação com extrato de levedura mostrou ter grande influência na produtividade em etanol, sendo a adição de 3 g/L deste capaz de dobrar os valores deste parâmetro. Entretanto, sua adição não demonstrou influência sobre a conversão em produto, visto que foram previstas elevadas conversões mesmo em sua ausência. Os valores desta resposta foram relativamente próximos em todas as condições do planejamento observadas, variando entre 0,26 e 0,32 g/g. Isto mostra que o mecanismo de conversão dos açúcares do hidrolisado a etanol não foi prejudicado significativamente pela falta de extrato de levedura, sendo afetado apenas a velocidade deste mecanismo. Este resultado reforça a idéia de que o hidrolisado contenha fontes de nitrogênio na forma de aminoácidos que possam ser utilizados pela levedura, porém, em quantidade não suficiente para dispensar a adição de extrato de levedura.

Diferente do presente trabalho, Mussatto e Roberto (2005), que estudaram a necessidade de suplementação nutricional de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, verificaram que não houve a necessidade da adição de nutrientes, e que portanto, o hidrolisado consistiu de uma fonte de xilose e nutrientes suficiente para este processo de bioconversão. Apesar dos hidrolisados utilizados serem de mesma natureza (hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz), os resultados encontrados por estes autores, não se repetiram no presente trabalho, o que se deve provavelmente a diferença nos microrganismos envolvidos nos estudo, visto que diferentes microrganismos apresentam diferentes necessidades nutricionais.

O estudo da suplementação nutricional mostrou que, a adição de nutrientes pode interferir significativamente nos parâmetros fermentativos  $Y_{p/s}$  e  $Q_p$ . Dentre as variáveis estudadas, a condição proposta com base nos modelos obtidos que leva a

uma maximização da produção de etanol, foi o emprego e extrato de levedura no meio de fermentação em uma concentração de 3 g/L, e a não utilização de uréia e  $\text{MgSO}_4$ . A conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ) e a produtividade em etanol ( $Q_p$ ) estimadas pelo modelo, para esta condição otimizada são 0,29 g/g e 0,24 g/L.h, respectivamente.

Com este estudo da suplementação nutricional do meio de fermentação, o processo de bioconversão do hidrolisado a etanol, com hidrolisado suplementado nas condições otimizadas (adição de 3 g/L de extrato de levedura), obteve um aumento de produtividade de cerca de 165%, quando comparado com o hidrolisado não suplementado, e de cerca de 14 %, quando comparado com o hidrolisado suplementado com todos os nutrientes ( 2,3 g/L de uréia, 1 g/L de  $\text{MgSO}_4$  e 3 g/L de extrato de levedura). Sendo assim este estudo permitiu, além do aumento da produtividade, reduzir a adição de nutrientes ao meio de fermentação, simplificando significativamente sua composição.

Vários trabalhos da literatura que relatam o emprego da levedura *P. stipitis* na bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes materiais, utilizam meios de fermentação suplementado com diversos nutrientes, como os mostrados na Tabela 5.12. Estes trabalhos retratam a complexidade e o grande número de nutrientes que, muitas vezes, são utilizados na suplementação de hidrolisados hemicelulósicos para a fermentação de etanol, pela levedura *Pichia stipitis*. No presente trabalho, foi possível reduzir a quantidade de nutrientes para a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, contribuindo assim para simplificação da composição do meio de fermentação.

**Tabela 5.12** - Produção de etanol a partir de hidrolisados suplementados com diferentes nutrientes.

Material	Composição do hidrolisado	Nutrientes adicionados (g/L)	Microrganismos e parâmetros fermentativos	Referência
Sabugo de milho	hidrolisado hemicelulósico com 35,9 g/L de açúcares totais	6,4 de uréia, 1,2 de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,18 de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 10 de extrato de levedura e traços dos minerais $\text{CaO}$ , $\text{ZnO}$ , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{MgO}$ , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{H}_3\text{BO}_3$ .	<i>Pichia stipitis</i> , em 96 horas de fermentação produziu 10,4 g/L de etanol, Yp/s 0,34 g/g e Qp 0,11 g/L.h	Eken-Saraçoglu e Arslan (2000)
"Paja Brava"	hidrolisado hemicelulósico 24,7 g/L de açúcares totais	0,47 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 12,8 de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,51 de $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,47 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,94 de extrato de levedura.	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124, em 68 horas de fermentação produziu 5,5 g/L de etanol, Yp/s 0,22 g/g e Qp 0,0,8 g/L.h	Sanchez et al. (2004)
Licor sulfite de uma industria de polpa de celulose	56,7 g/L de açúcares totais	2,5 de extrato de levedura, 2 de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e traços de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Pichia stipitis</i> adaptada, em 60 horas de fermentação produziu 20,2 g/L de etanol, Yp/s 0,41 g/g e Qp 0,44 g/L.h	Nigam (2001c)
Madeira	hidrolisado hemicelulósico com 39 g/L de açúcares totais	3 de extrato de levedura, 5 de peptona, 2 de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,5 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e traços de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	<i>Pichia stipitis</i> adaptada, em 86 horas de fermentação produziu 13,8 g/L de etanol, Yp/s 0,38 g/g e Qp 0,16 g/L.h	Nigam (2001b)
Palha de arroz	hidrolisado hemicelulósico com 60 g/L de açúcares totais	3 de extrato de levedura.	<i>Pichia stipitis</i> NRRL Y-7124, em 48 horas de fermentação produziu 11,6 g/L de etanol, Yp/s 0,32 g/g e Qp 0,24 g/L.h	Presente trabalho

#### 5.4 EFEITO DA AGITAÇÃO/AERAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL

O efeito da agitação/aeração no processo de bioconversão do hidrolisado hemicelulósico em etanol foi avaliado segundo um planejamento fatorial  $2^2$  com três repetições no ponto central, tendo como resposta os parâmetros de fermentação  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Q_p$ . Os ensaios foram realizados em frascos agitados, variando-se a razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  (2,5 a 5) e a agitação (100 a 200). Nesta etapa, o meio de fermentação foi composto por hidrolisado contendo cerca de 60 g/L de açúcares totais, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura, conforme condições definidas anteriormente.

Todos os experimentos foram realizados em frascos de 250 mL, contendo de 50 a 100 mL de meio de fermentação. Os frascos foram inoculados com 1 g/L de células, incubados em agitador rotatório, a temperatura de 30 °C, por 120 horas, sendo as amostras retiradas a cada 24 horas. Os níveis e as variáveis utilizados nos experimentos são mostrados na Tabela 3.5 do item materiais e métodos.

O planejamento fatorial consistiu de 7 diferentes experimentos. Os níveis das variáveis, as concentrações de substrato, células e produto e as respostas avaliadas, conversão em etanol e em células, e a produtividade em etanol, estão mostrados na Tabela 5.13.

Observando os resultados dos ensaios do planejamento, Figura 5.11, verifica-se que a levedura foi capaz de acumular etanol em todas as condições de aeração estudadas no planejamento.

**Tabela 5.13** - Planejamento fatorial do tipo  $2^2$ , com três repetições no ponto central, para a avaliação aeração/agitação na conversão do hidrolisado em etanol ( $Y_{p/s}$ ) e em células ( $Y_{x/s}$ ) e produtividade em etanol para 48 horas ( $Q_p$ ), por *Pichia stipitis*. E concentrações finais e iniciais de xilose (S), células (X) e produto (P) utilizados para calcular os parâmetros.

Ensaio	Nível		Substrato (g/L)							Produto (g/L)					Células (g/L)					Respostas avaliadas			
	A	B	S <sub>0</sub>	S <sub>24</sub>	S <sub>48</sub>	S <sub>72</sub>	S <sub>96</sub>	S <sub>120</sub>	P <sub>0</sub>	P <sub>24</sub>	P <sub>48</sub>	P <sub>72</sub>	P <sub>96</sub>	P <sub>120</sub>	X <sub>0</sub>	X <sub>24</sub>	X <sub>48</sub>	X <sub>72</sub>	X <sub>96</sub>	X <sub>120</sub>	Y <sub>p/s</sub> (g/g)	Y <sub>x/s</sub> (g/g)	Q <sub>p</sub> (g/L.h)
1	-1	-1	64,7	53,4	46,1	38,4	37,1	31,0	0,0	5,3	9,4	11,6	13,3	13,9	1,2	1,6	2,6	3,3	3,7	4,1	0,43	0,09	0,20
2	+1	-1	62,6	47,4	29,2	22,3	15,1	8,3	0,0	8,5	13,3	15,5	15,8	15,8	1,2	3,2	5,1	5,9	6,5	7,1	0,29	0,11	0,28
3	-1	+1	63,6	39,0	22,5	11,9	8,1	8,0	0,0	11,7	18,5	21,0	20,8	20,0	1,3	3,4	5,4	6,9	7,7	7,7	0,37	0,12	0,39
4	+1	+1	65,2	39,2	22,5	15,5	10,9	7,6	0,0	10,2	14,1	13,9	14,1	11,2	1,2	4,6	7,2	9,1	10,8	11,3	0,22	0,18	0,29
5	0	0	66,3	45,5	30,3	21,0	13,7	8,1	0,0	10,6	14,2	17,4	17,7	19,0	1,3	3,3	5,5	6,9	7,7	7,8	0,32	0,12	0,30
6	0	0	62,9	43,7	29,3	20,3	12,6	7,9	0,0	9,6	13,6	14,9	15,8	15,3	1,2	3,2	5,6	7,0	7,8	8,2	0,28	0,13	0,28
7	0	0	64,9	43,4	28,7	21,9	13,5	8,1	0,0	9,6	13,9	16,6	17,4	16,4	1,2	3,2	5,5	6,9	6,9	7,5	0,31	0,11	0,29

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação.  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  foram calculados por linearização [S]x[P] e [X]x[P], até a concentração máxima de produto.  $Q_p$  calculado para 48 horas.

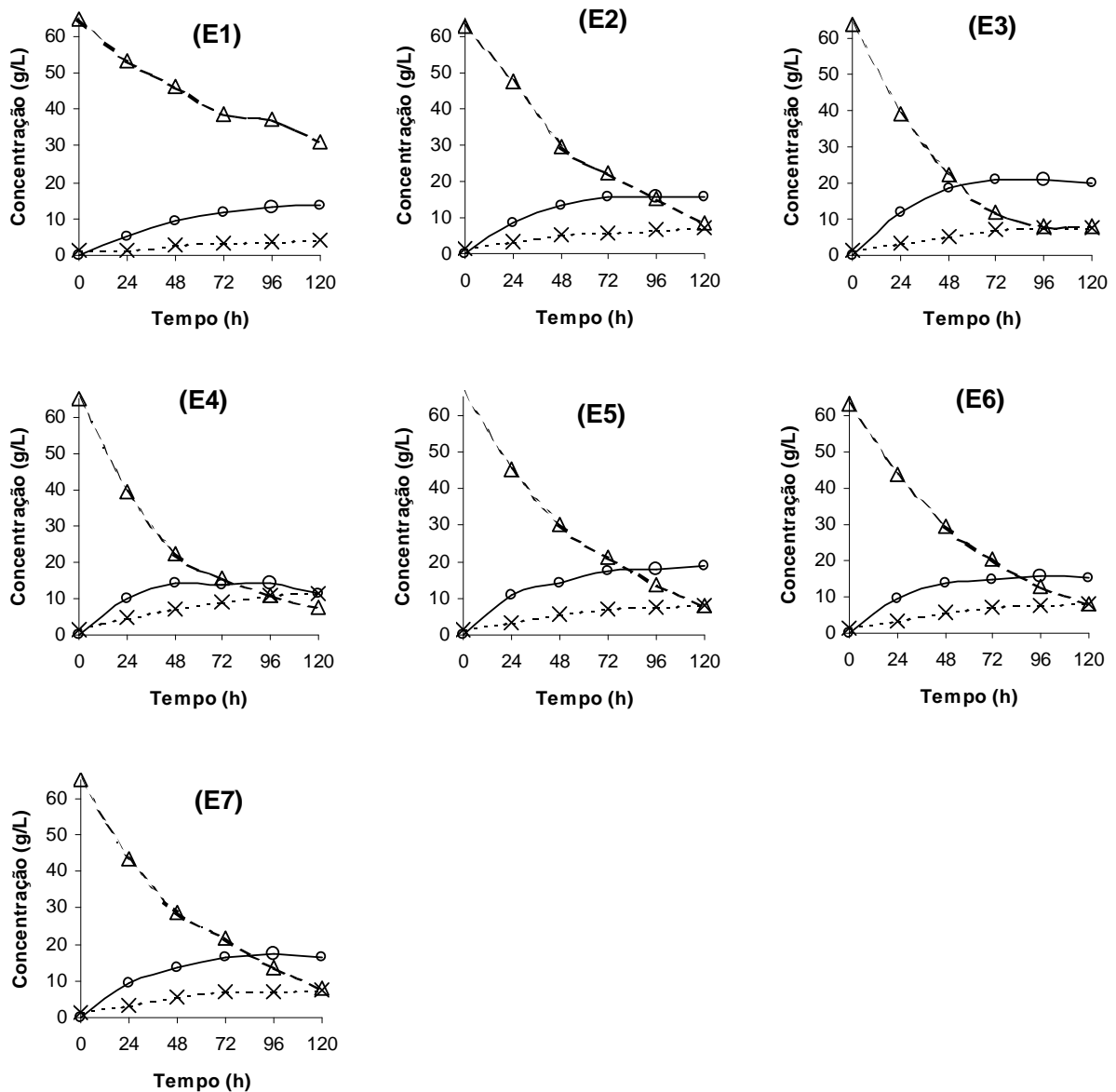


No primeiro ensaio do planejamento, Figura 5.11 E1, foi observada uma cinética de fermentação lenta, com consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol consideravelmente inferiores aos observados nos demais ensaios, tal comportamento pode ser atribuído a condição de baixa aeração em que foi conduzido. Neste ensaio foi observado um consumo de substrato de apenas 15% em 48 horas, e atingindo no final das 120 horas de fermentação um consumo de cerca de 50 %, resultando em uma concentração final de células de 4 g/L e um acúmulo de etanol de aproximadamente 14 g/L.

O comportamento observado no segundo ensaio do planejamento, Figura 5.11 E2, foi muito próximo ao observado para os pontos centrais (Figura 5.11, de E5 a E7), o que indica uma condição de aeração semelhante entre eles. Para estes ensaios foi observado um consumo de aproximadamente 50 % do substrato em um tempo de 48 horas, chegando a 87 % ao final do processo. A máxima concentração de etanol para este ensaio foi observada para o tempo de 72 horas, na qual houve um acúmulo de cerca de 16 g/L de etanol, concentração esta que permaneceu praticamente constante até o fim da fermentação. Comportamento semelhante foi observado também para a concentração celular, que após as 72 horas chegou a um valor próximo a 7 g/L, variando pouco depois de então.

Os ensaios 3 e 4 (Figura 5.11 E3 e E4) foram os que apresentaram o mais rápido consumo de substrato de todas as condições estudadas no planejamento, chegando a um consumo de cerca de 65 % do substrato em 48 horas, e 87 % em 96 horas, não sendo observada alterações significativas após este tempo. O ensaio 4 (Figura 5.11 E4) foi o que apresentou maior crescimento celular, atingindo uma concentração 11 g/L no fim das 120 horas, o que já era esperado, pois as condições deste ensaio foram as de maior aeração. A máxima concentração de etanol

alcançada foi de cerca de 14 g/L, em 48 horas de fermentação, permanecendo praticamente inalterada até o tempo de 120 horas, onde houve um pequeno decréscimo, provavelmente devido ao esgotamento dos açúcares fermentáveis.



**Figura 5.11** - Acompanhamento cinético do crescimento de células (-x-), consumo de substrato (-Δ-) e produção de etanol (-o-), nos ensaios fermentativos do planejamento fatorial para estudo da influência da agitação e da razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ .

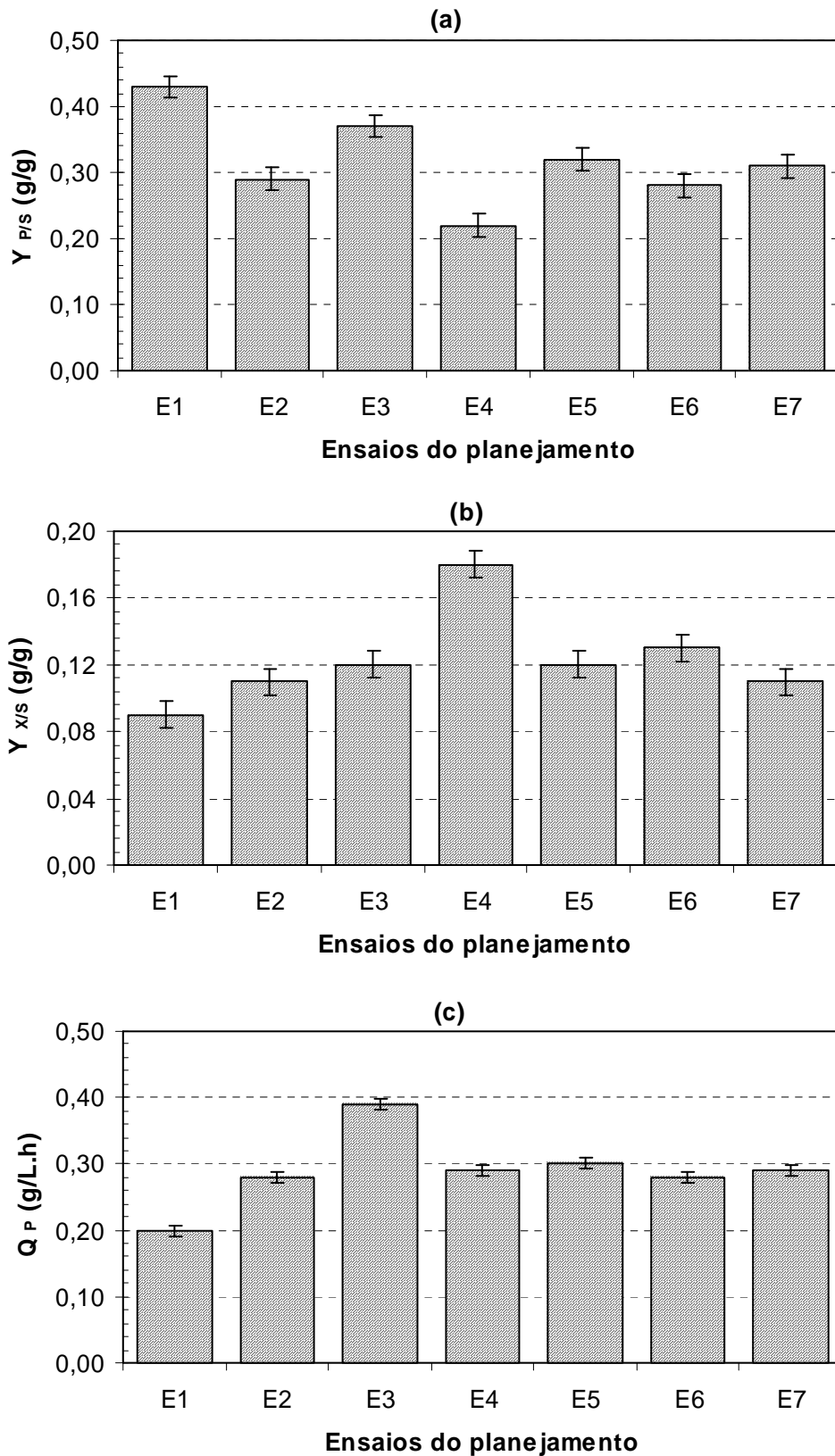
O ensaio 3 (Figura 5.11 E3) foi o que apresentou maior produção de etanol, chegando a uma concentração de aproximadamente 21 g/L em 72 horas, o que mostra que o processo de bioconversão foi favorecido por uma condição de aeração intermediária às condições máximas e mínimas estudadas neste trabalho. Apesar da diferença entre a máxima concentração de etanol obtida neste ensaio com as dos demais, a evolução da concentração celular observada foi muito semelhante ao dos ensaios 2 e dos pontos centrais (Ensaio 2 e de 5 a 7).

Na Figura 5.12 são apresentadas, na forma de gráfico de barras, as respostas: conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e em células ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ), avaliadas no planejamento fatorial.

Na Figura 5.12a, podemos observar que na condição de menor aeração ocorreu a maior conversão em produto (Figura 5.12a, ensaio 1) e a menor conversão em células (figura 5.12b, ensaio 1) e a menor produtividade em etanol (Figura 5.12 c, ensaio 1). Na condição de maior aeração foi observada a menor conversão em produto (Figura 5.12a, ensaio 4) e a maior conversão em células (Figura 5.12b, ensaio 4), resultados semelhantes são reportados por Grootjen et al. (1991). Estes resultados mostram que o aumento dos valores das variáveis estudadas (agitação e razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ), ou seja, o aumento da aeração, teve um efeito negativo sobre a conversão em produto, e um efeito positivo sobre a conversão em células, o que mostra a importância da condição de oxigenação sobre a produção de etanol. Diferentemente do observado para conversão em produto e em células, as condições que proporcionaram maior produtividade em etanol foram as do Ensaio 3 (Figura 5.12c), as quais encontram-se em uma condição intermediária de aeração, o que dificulta uma análise direta de seus efeitos, assim sendo, a influência das

variáveis investigadas, sobre esta resposta, podem ser melhor avaliada empregando-se análise estatística dos dados.

Os efeitos da agitação e da razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  foram avaliados mais cuidadosamente através de análise estatística empregando metodologia de superfícies de resposta, os resultados obtidos estão apresentados a seguir.

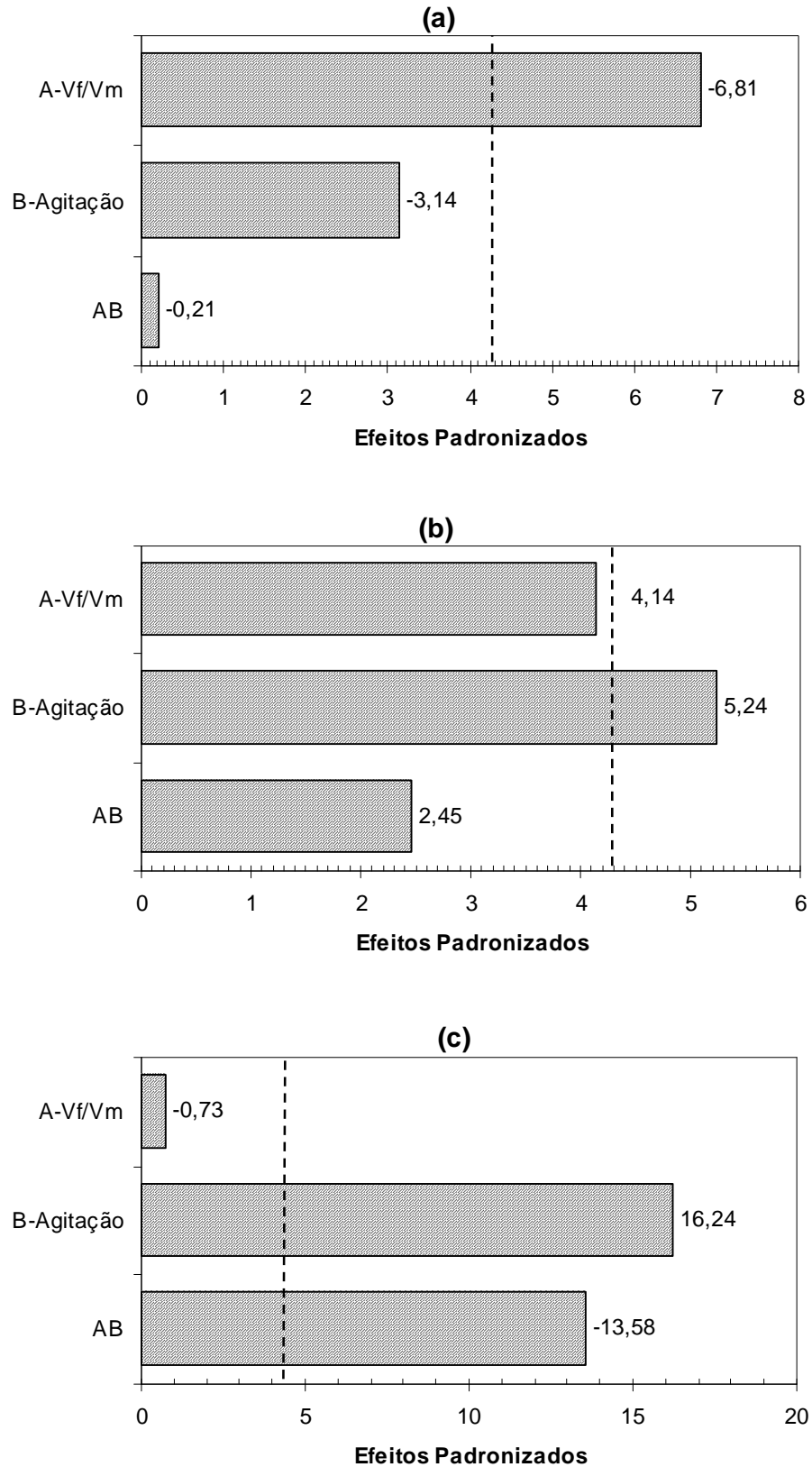


**Figura 5.12** - Conversão em produto (a) e conversão em células (b) e produtividade em etanol (c), dos diferentes ensaios do planejamento fatorial para o estudo da influência da agitação e da razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ .

Nos gráficos de Pareto (Figuras 5.13, a, b e c), são mostradas as estimativas dos efeitos, para  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $Q_p$ , respectivamente. São significativos os termos cujos valores de  $t_{\text{calculado}}$  (representado pelas barras no gráfico de Pareto) apresentam-se superiores ao valor de  $t_{\text{tabelado}}$  (representado pela linha tracejada do gráfico), para distribuição de Student, a 95% de confiança e erro puro com 2 graus de liberdade ( $t = 4,30$ ).

Em uma análise prévia através do gráfico de Pareto observou-se que para a conversão em produto ( $Y_{p/s}$ ) apenas a variável principal A ( $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ) foi significativa a um nível de 0,05 de significância. Da mesma forma, para a resposta conversão em células ( $Y_{x/s}$ ) apenas o efeito principal B (Agitação) foi significativo, não apresentando significância o efeito principal A e seu efeito de interação AB. Para a produtividade em etanol ( $Q_p$ ) apenas a variável B e sua interação AB, apresentaram efeitos significativos, mesmo não sendo significativo, o efeito principal A foi mantido no modelo por possuir interação significativa.

Para confirmar a significância estatística dos efeitos principais e de suas interações sobre os parâmetros fermentativos  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Q_p$  no processo de bioprodução de etanol foi feita a análise da variância dos efeitos (Tabelas 5.14, 5.15 e 5.16, respectivamente). Os termos considerados significativos foram os mesmos observados nos gráficos de Pareto e o coeficiente de correlação alcançado foi superior a 0,95 para as três respostas, o que demonstra a relevância das variáveis estudadas. Para as respostas  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Q_p$  um modelo linear poderia descrever a influência dos fatores estudados, visto que nenhuma das três apresentou curvatura significativa.



**Figura 5.13** - Estimativa dos efeitos (ao nível de 95 % de confiança) através dos gráficos de Pareto das variáveis respostas: conversão em produto (a), conversão em células (b) e produtividade em etanol (c).

**Tabela 5.14** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ).

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	Curvatura	0,0013	1	0,00131	3,02	0,2243	4,9
	A	0,0200	1	0,02004	46,31	0,0209 *	75,6
	B	0,0043	1	0,00428	9,89	0,0880	16,1
	AB	0,0000	1	0,00002	0,04	0,8565	0,1
	Erro	0,0009	2	0,00043			3,3
$R^2 = 0,96$	Total	0,0265	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.15** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em células ( $Y_{X/S}$ ).

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	Curvatura	0,0000	1	0,0000	0,01	0,9455	0,0
	A	0,0014	1	0,0014	17,15	0,0536 *	32,6
	B	0,0022	1	0,0022	27,48	0,0345 *	52,2
	AB	0,0005	1	0,0005	6,02	0,1336	11,4
	Erro	0,0002	2	0,0001			3,8
$R^2 = 0,96$	Total	0,0042	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

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

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Q_P$ (g/L.h)	Curvatura	0,0000	1	0,0000	0,05	0,842	0,0
	A	0,0000	1	0,0000	0,53	0,5425	0,1
	B	0,0108	1	0,0108	263,79	0,0038 *	58,5
	AB	0,0076	1	0,0076	184,49	0,0054 *	40,9
	Erro	0,0001	2	0,0000			0,4
$R^2 = 0,99$	Total	0,0185	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.



Nas Tabelas 5.17, 5.18 e 5.19, são apresentadas a análise de variância dos efeitos para as respostas  $Y_{P/S}$ ,  $Y_{X/S}$  e  $Q_P$ , onde foram retirados os efeitos não significativos e a curvatura. Para a resposta  $Y_{P/S}$ , após a retirada da curvatura e do efeito de interação AB, o efeito principal B, considerado anteriormente não significativo, passou a apresentar significância a um nível de 0,05, o que ocorre devido ao aumento dos graus de liberdade do erro, pois ao desconsiderar os termos curvatura e AB, tanto a variação quanto os graus de liberdade relativos a estes termos são somados ao erro. O mesmo ocorreu com o efeito principal A para a resposta  $Y_{X/S}$ , que após a retirada da curvatura e do efeito AB, passou a apresentar significância a um nível de 0,05, como o mostrado na Tabela 5.18.

A partir dos termos significativos (análise de variância dos efeitos, Tabelas 5.17 a 5.19) foram ajustados modelos lineares para descrever a conversão em etanol e em células e a produtividade em etanol, os quais foram avaliados através da análise da variância de regressão para os modelos, apresentados nas Tabelas 5.20, 5.21 e 5.22, respectivamente.

Através da análise de variância dos modelos (ANOVA) foi verificado que as respostas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ) apresentaram coeficiente de correlação ( $R^2$ ) superiores a 0,90, e a conversão em células ( $Y_{X/S}$ ) apresentou um  $R^2$  de aproximadamente 0,85. Esta análise sugeriu que, a um nível de significância de 0,05, os modelos para conversão em produto e em célula, e para produtividade em etanol foram adequadas para descrever o comportamento observado, visto que todos eles foram significativos, e não apresentaram falta de ajuste significativas, o que os valida, e possibilita representá-los por meio de superfícies de resposta.

**Tabela 5.17** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ), desprezando os efeitos não significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{P/S}$ (g/g)	A	0,020041	1	0,020041	36,585	0,0038 *	75,6
	B	0,004277	1	0,004277	7,8086	0,0491 *	16,1
	Erro	0,002191	4	0,000548			8,3
$R^2 = 0,91$	Total	0,02651	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.18** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a conversão em células ( $Y_{X/S}$ ), desprezando os efeitos não significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Y_{X/S}$ (g/g)	A	0,001358	1	0,001358	8,5503	0,0431 *	32,6
	B	0,002175	1	0,002175	13,695	0,0208 *	52,2
	Erro	0,000635	4	0,000159			15,2
$R^2 = 0,84$	Total	0,004168	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.19** - Análise de variância dos efeitos principais e de interações dos fatores sobre a produtividade em etanol ( $Q_P$ ), desprezando os efeitos não significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p	Contribuição (%)
$Q_P$ (g/L.h)	A	0,0000	1	0,0000	0,77	0,4437	0,1
	B	0,0108	1	0,0108	385,80	0,0003 *	58,5
	AB	0,0076	1	0,0076	269,83	0,0005 *	40,9
	Erro	0,0001	3	0,0000			0,5
$R^2 = 0,99$	Total	0,0185	6				

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B = Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.20** - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ), obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Y_{P/S}$ (g/g)	Modelo	0,0243186	2	0,0121593	22,197	0,0068
	Resíduo	0,0021912	4	0,0005478		
	Falta de ajuste	0,0013257	2	0,0006629	1,5318	0,395
	Erro puro	0,0008654	2	0,0004327		
$R^2 = 0,91$	Total	0,0265098	6			

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B= Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.21** - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da conversão em células ( $Y_{X/S}$ ), obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Y_{X/S}$ (g/g)	Modelo	0,003533	2	0,0017665	11,123	0,0232
	Resíduo	0,0006353	4	0,0001588		
	Falta de ajuste	0,000477	2	0,0002385	3,0127	0,2492
	Erro puro	0,0001583	2	7,916E-05		
$R^2 = 0,84$	Total	0,0041683	6			

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B= Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

**Tabela 5.22** - Análise de variância da regressão para o modelo representativo da produtividade em etanol ( $Q_P$ ), obtido com base nos termos significativos.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Q_P$ (g/g)	Modelo	0,0184	3	0,0061237	218,8	0,0005
	Resíduo	0,00008	3	0,000028		
	Falta de ajuste	0,000002	1	0,000002	0,0512	0,842
	Erro puro	0,00008	2	0,000041		
$R^2 = 0,99$	Total	0,0184552	6			

A = Razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ ; B= Agitação; SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática.

Baseados nos resultados da análise de variância, modelos matemáticos que descrevem as respostas conversão em produto ( $Y_{P/S}$ ) conversão em células ( $Y_{X/S}$ ) e produtividade em etanol ( $Q_P$ ), dentro da região estudada, puderam ser apresentados na forma das Equações 5.3 e 5.5, respectivamente.

$$Y_{P/S} = 0,32 - 0,071 A - 0,033 B \quad (\text{equação 5.3})$$

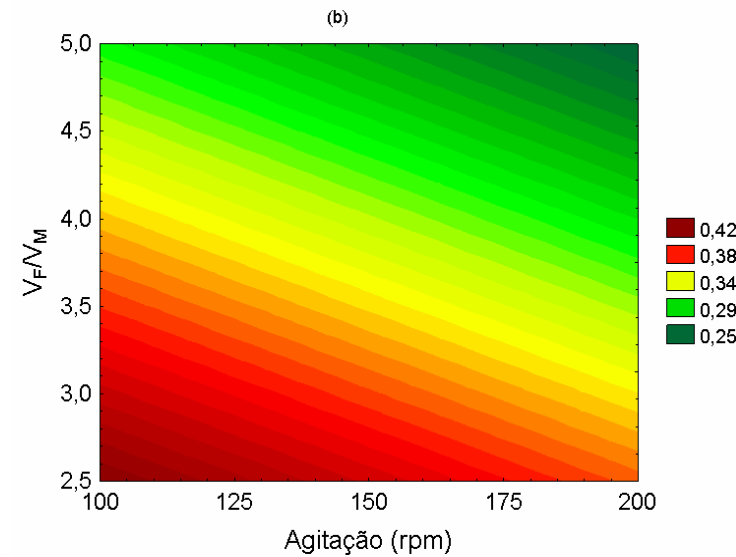
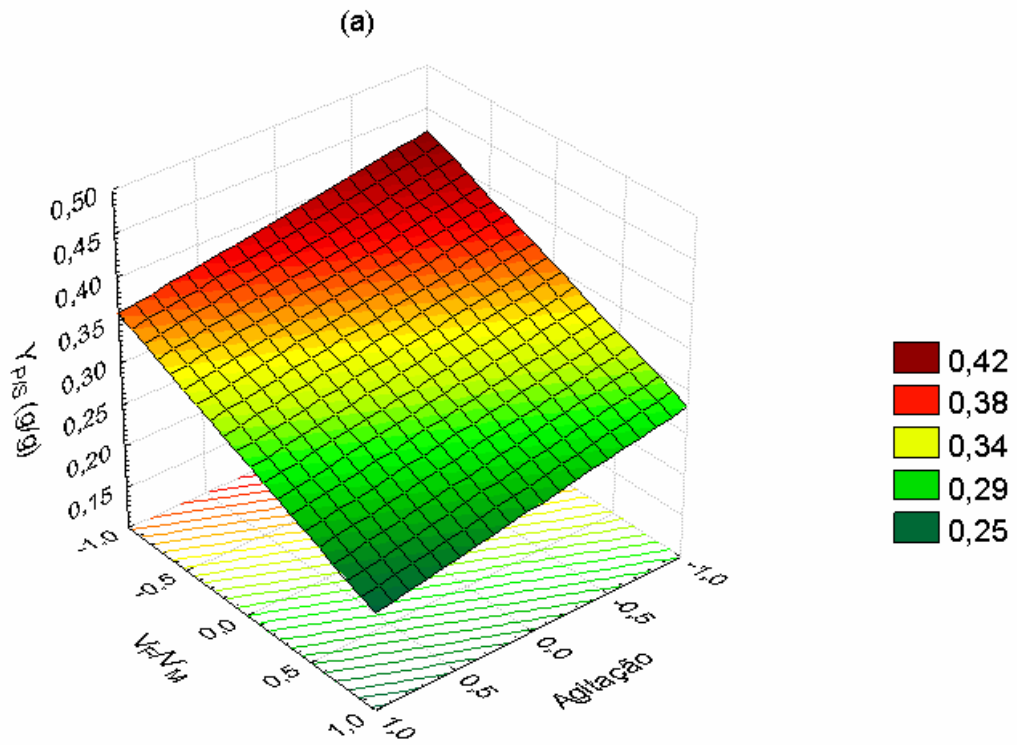
$$Y_{P/S} = 0,12 + 0,018 A + 0,023 B \quad (\text{Equação 5.4})$$

$$Q_P = 0,29 - 0,0023 A + 0,052 B - 0,043 AB \quad (\text{Equação 5.5})$$

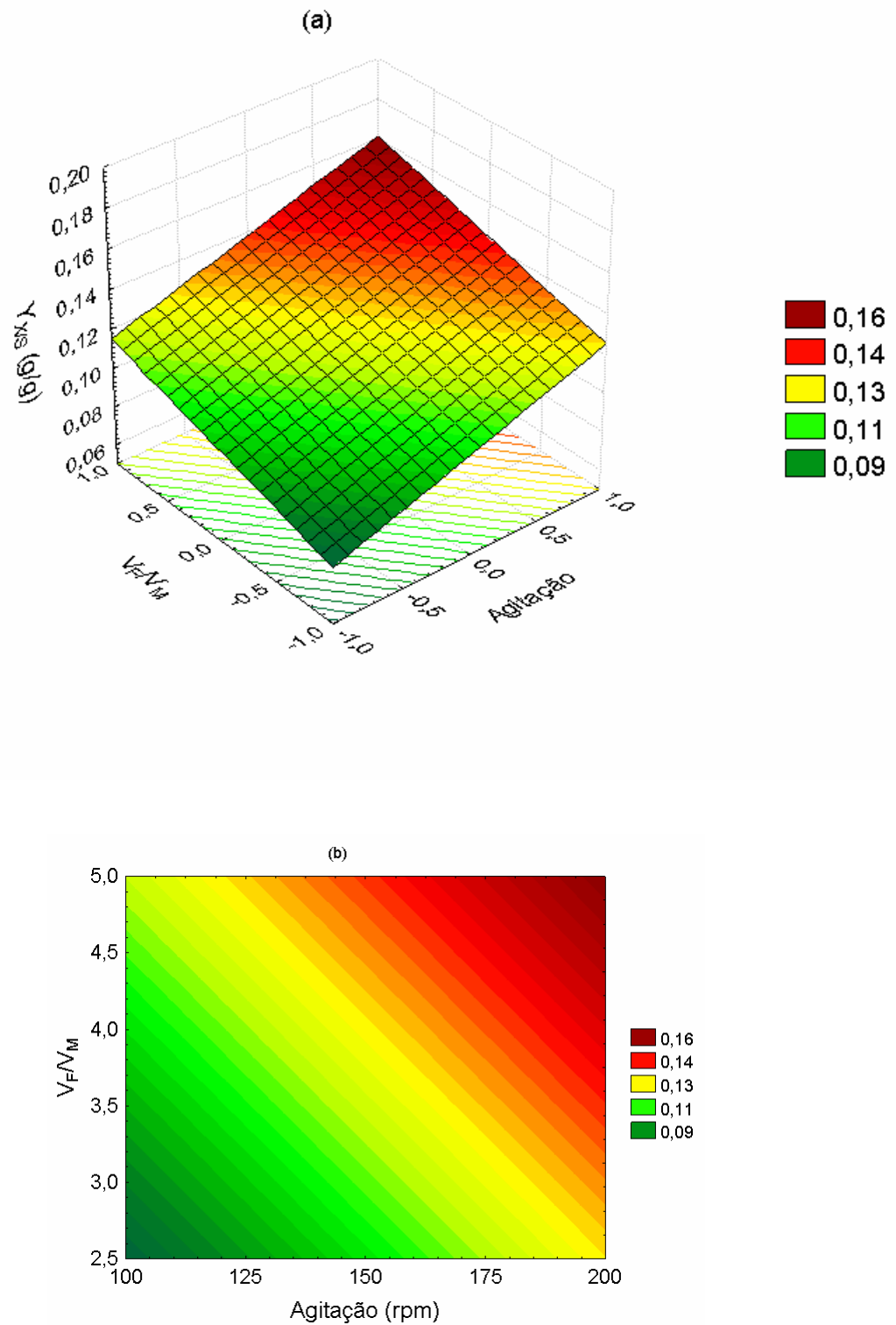
As equações 5.3, 5.4 e 5.5 possibilitam a obtenção de superfícies de resposta para as respostas  $Y_{P/S}$  (Figura 5.14),  $Y_{X/S}$  (Figura 5.15) e  $Q_P$  (Figura 5.16), respectivamente, dentro da região estudada.

A Figura 5.14, relaciona a conversão em etanol com a relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, segundo o modelo descrito pela equação 5.3. Nesta Figura podemos observar que o aumento do valor de ambas as variáveis têm uma influência negativa sobre a conversão de substrato em etanol, tendo a variação na relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ , um efeito mais pronunciado que a agitação, na faixa estudada. A máxima conversão estimada, cerca de 0,42 g/g, foi obtida no nível -1 de ambas as variáveis, correspondente a uma agitação de 100 rpm com uma relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  de 2,5, ou seja, em uma condição de aeração mínima.

A Figura 5.15 relaciona a conversão em células com a relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, segundo o modelo descrito pela equação 5.4. Ao contrário do observado na conversão em etanol, para a conversão em células o aumento do valor de ambas as variáveis mostrou ter uma influência positiva sobre a conversão. A máxima conversão em células estimada, cerca de 0,16 g/g, foi obtida no nível +1 de ambas as variáveis, correspondente a uma agitação de 200 rpm com uma relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  de 5, ou seja, na condição de maior aeração.



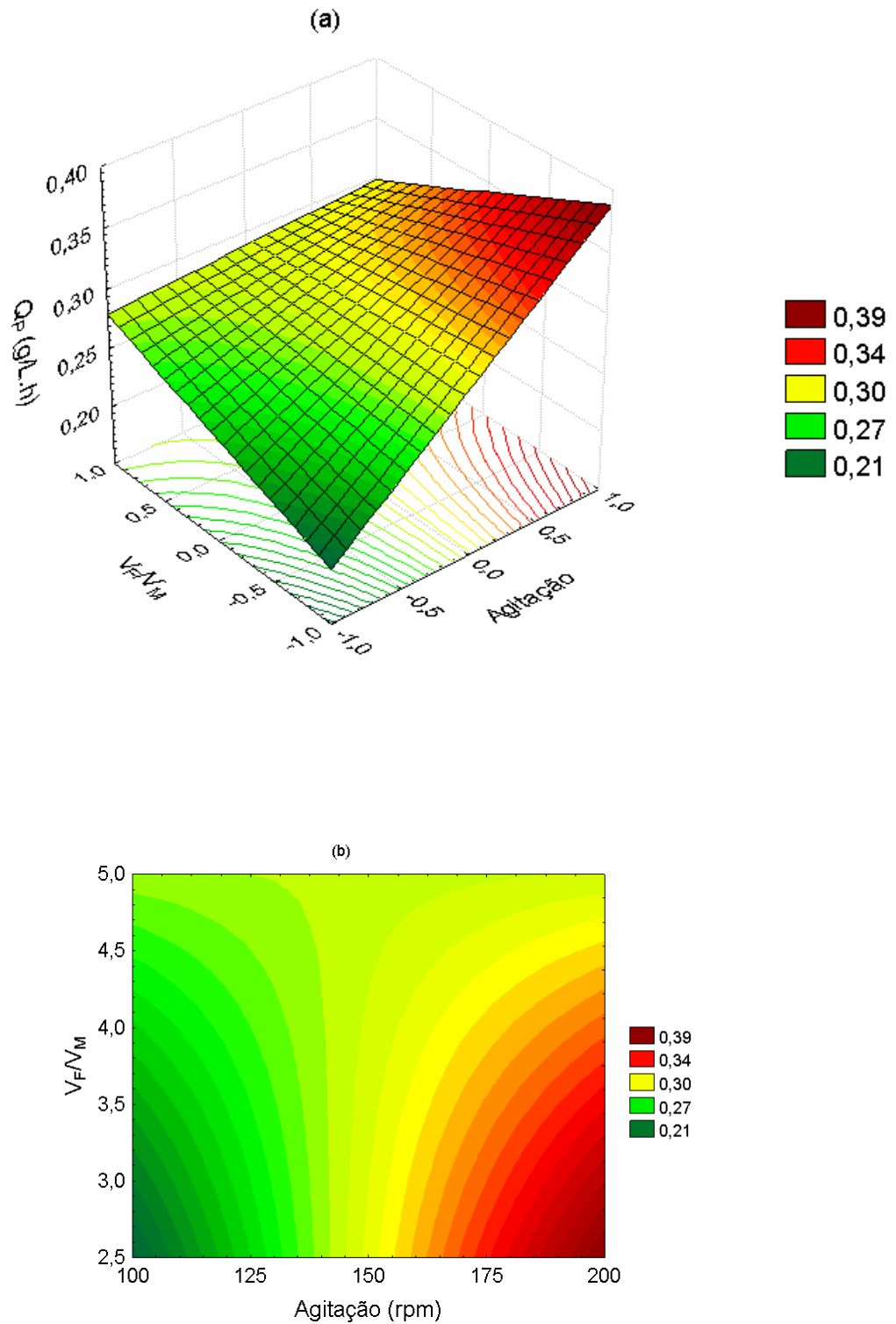
**Figura 5.14** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a conversão de substrato em etanol com relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, em níveis codificados (a) e em valores reais (b).



**Figura 5.15** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a conversão de substrato em células com relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, em níveis codificados (a) e em valores reais (b).

O aumento da conversão em células e a redução da conversão em etanol no ponto de maior agitação e maior relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  já eram esperados, visto que condições de maior aeração favorecem a produção de células e prejudicam a conversão a etanol (DU-PREEZ, 1994). Resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Roberto et al. (1994), no qual foi estudado o efeito da aeração sobre a produção de etanol a partir de xilose por *P. stipitis* CBS 5773 em frascos agitados, foi verificado que o aumento da aeração favoreceu o crescimento celular em detrimento da formação de etanol. Segundo Delegenés, Moletta e Navarro (1989), que também observaram que o aumento da aeração favoreceu a produção de células em detrimento da produção de etanol por *P. stipitis*, o rendimento em etanol foi maximizado em condições anaeróbias, pois o fluxo de piruvato segue preferencialmente pela rota fermentativa, entretanto nestas condições as produtividades caem drasticamente.

A Figura 5.16 relaciona a produtividade em etanol com a relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, segundo o modelo descrito pela equação 5.5. Nesta Figura podemos observar que o aumento da agitação tem uma influência positiva acentuada sobre a produtividade, quando a razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  está fixada no nível -1, e quando esta razão está fixada no nível +1, a variação da agitação não mostrou efeito significativo sobre a produtividade. A razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  mostrou ter efeito positivo sobre a produtividade em níveis de agitação próximos a -1, tendo um comportamento contrário em nível de agitação mais elevados, próximos a +1. A máxima produtividade em etanol, cerca de 0,39 g/L.h, foi observada para o nível +1 de agitação e -1 da razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$ , condição esta que corresponde a uma agitação de 200 rpm e com uma relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  igual a 2,5.



**Figura 5.16** - Superfície de resposta (a) e curva de nível (b), que relaciona a produtividade em etanol com a relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  e agitação, em níveis codificados (a) e em valores reais (b).



O estudo da aeração em frascos agitados mostrou que, a agitação e a relação  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  são fatores capazes de interferir significativamente nos parâmetros fermentativos  $Y_{p/s}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Q_p$ , o que já era esperado, visto que alguns autores como du-Preez (1994) afirmam que a aeração é o fator ambiental mais importante na fermentação de xilose por leveduras, afetando tanto a conversão quanto a produtividade em etanol, de maneiras drásticas, pois o nível de aeração determina a divisão do fluxo de carbono da xilose entre o crescimento e a formação de produto.

Dentro da faixa de variação estudada, a condição proposta com base nos modelos obtidos que leva a uma maximização da produção de etanol, foi uma agitação de 200 rpm, com uma razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  de 2,5. Segundo o modelo obtido, a conversão ( $Y_{p/s}$ ) e a produtividade em etanol ( $Q_p$ ) estimadas para estas condições, foram de 0,36 g/g e 0,39 g/L.h, respectivamente.

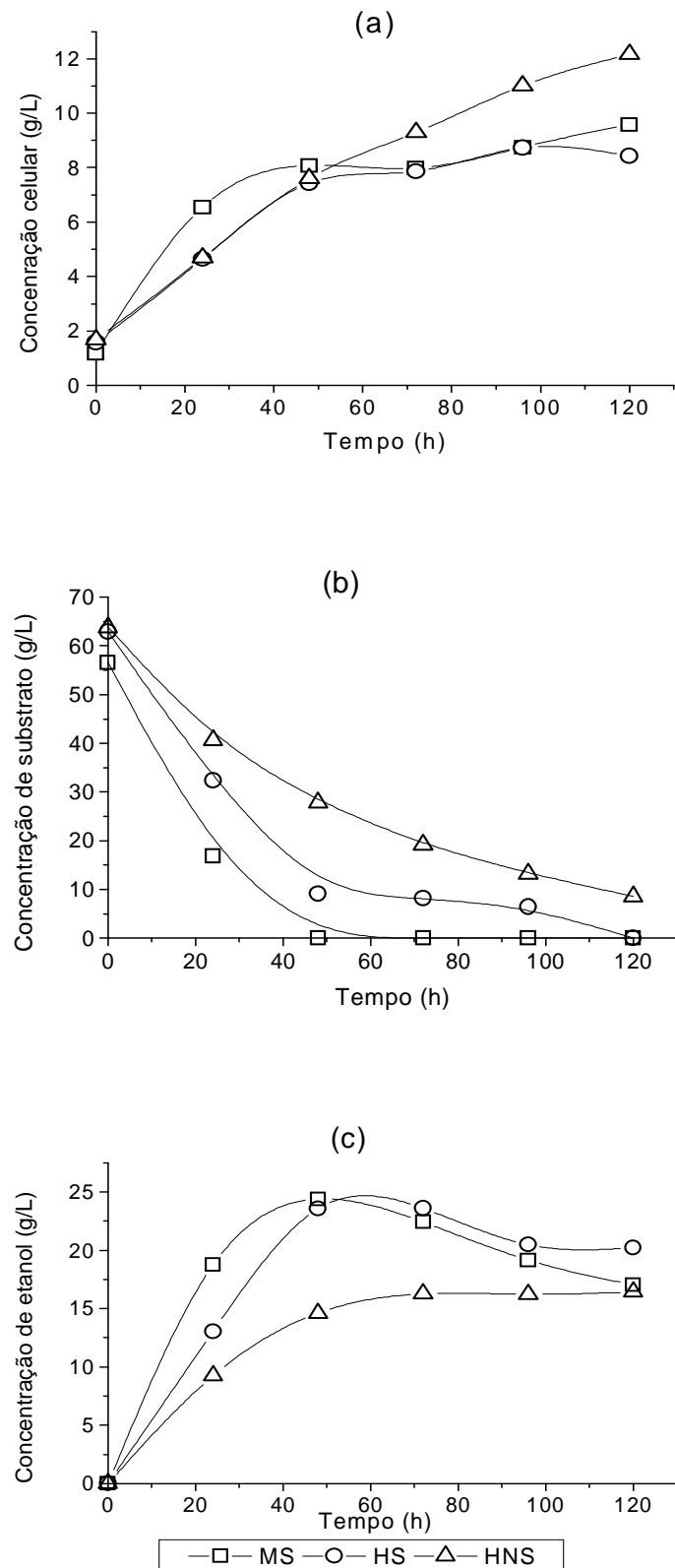
Com o presente estudo da aeração em frascos agitados foi obtido um ganho de produtividade, no processo de bioconversão do hidrolisado a etanol, de cerca de 63%, e um aumento de conversão de 24%, quando comparado com as condições de aeração empregadas anteriormente.

## 5.5 CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

O acompanhamento cinético do processo de bioconversão do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a etanol, pela levedura *P. stipitis* NRRL Y-7124, foi realizado nas condições otimizadas de agitação/aeração (frascos de 250 mL, contendo 100 mL de meio de fermentação e agitados a 200 rpm) e composição do meio de fermentação (adição de 3 g/L de extrato de levedura). O acompanhamento cinético da fermentação do hidrolisado não suplementado e do meio sintético composto por 60 g/L de xilose e 3g/L de extrato de levedura foi também avaliado.

Na Figura 5.17 são mostrados os gráficos da concentração de células, de substrato e de produto, para o meio sintético, hidrolisado e hidrolisado suplementado. Os pontos experimentais foram ajustados a modelos polinomiais, sendo os dados do ajuste, utilizados para interpretação cinética do processo.

A determinação da concentração celular foi prejudicada pela floculação da levedura, ocorrida após o tempo de 48 horas, em todos os meios de fermentação avaliados, sendo mais intensa para o hidrolisado suplementado.



**Figura 5.17** - Acompanhamento cinético do crescimento de células (a), consumo de substrato (b) e produção de etanol (c), na fermentação, por *Pichia stipitis*, de meio sintético (-□-), hidrolisado suplementado (-○-) e hidrolisado não suplementado (-△-), a 30 °C, 200 rpm.

A máxima concentração de etanol alcançada para o hidrolisado suplementado, cerca de 23,6 g/L foi obtida no tempo de 48 horas, consumindo neste tempo 86 % dos açúcares presentes no meio. Resultado semelhante foi obtido empregando meio sintético, sendo a máxima concentração de etanol neste tempo de 24,4 g/L, muito próxima à alcançada com hidrolisado suplementado. Entretanto, neste caso, toda a xilose foi consumida em 48 horas. Após este tempo a concentração de etanol no meio de fermentação diminuiu gradativamente, em ambos os casos, sendo ligeiramente mais acentuada para o meio sintético. Esta redução na concentração de etanol pode ser atribuída a um possível consumo pela levedura, diante da escassez de açúcares no meio de fermentação. A hipótese de tal consumo é reforçada pela discreta retomada do crescimento celular que ocorreu juntamente com o consumo de etanol (Figura 5.17a).

A determinação da concentração celular foi prejudicada pela floculação da levedura, ocorrida após o tempo de 48 horas, em todos os meios de fermentação avaliados, sendo mais intensa a floculação, para o hidrolisado suplementado.

O cultivo realizado em hidrolisado não suplementado atingiu em 48 horas uma concentração de 14,6 g/L, consumindo cerca de 56% dos açúcares presentes, sendo tanto o consumo de açúcares quanto a produção de etanol significativamente menores que os alcançados com hidrolisado suplementado. Após 48 horas, a concentração de etanol não apresentou declínio, como no meio sintético e no hidrolisado suplementado. Entretanto, após este tempo foi observada uma estagnação na produção de etanol, não havendo variação significativa desta concentração após 72 horas (Figura 5.17c).

Na Tabela 5.23 são apresentados os parâmetros fermentativos do cultivo da levedura *P. stipitis* em meio sintético, hidrolisado e hidrolisado suplementado, para

tempo de 48 horas, nas condições de suplementação e aeração otimizadas. A bioconversão do hidrolisado suplementado apresentou valores de produtividade ( $Q_p$ ), conversão em etanol ( $Y_{p/s}$ ) e conversão em células ( $Y_{x/s}$ ) (0,49 g/L.h, 0,44 g/g e 0,11 g/g, respectivamente) muito próximas as alcançadas em meio sintético (0,51 g/L.h, 0,43 g/g e 0,12 g/g, respectivamente). Estes resultados são coerentes com dados encontrados na literatura, como nos trabalhos de Roberto et al. (1991) ( $Q_p = 0,55$  g/L.h,  $Y_{p/s} = 0,38$  g/g e  $Y_{x/s} = 0,10$  g/g), Nigam (2001a) ( $Q_p = 0,44$  g/L.h e  $Y_{p/s} = 0,41$  g/g) e ), Nigam (2001c) ( $Q_p = 0,47$  g/L.h e  $Y_{p/s} = 0,43$  g/g).

Apesar da fermentação em hidrolisado não suplementado ter apresentado uma conversão em etanol próxima as obtidas no hidrolisado suplementado, aproximadamente 0,41 g/g, sua produtividade (0,30 g/L.h) foi cerca de 39 % inferior. Isto mostra que a principal contribuição da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico para o processo de bioconversão foi o aumento na velocidade de produção, e não no aumento da conversão. Comportamento semelhante foi observado no item 5.1 no qual constam os resultados referentes à avaliação dos efeitos da suplementação nutricional do hidrolisado. A conversão em etanol apresentada para todos os pontos do planejamento foi relativamente próxima (Tabela 5.2), entretanto as fermentações apresentaram grandes variações na produtividade em etanol. Isto pode indicar que todos os nutrientes necessários ao processo de bioconversão estejam presentes no hidrolisado, porém em quantidades insuficientes, o que permitiria que os mecanismos utilizados fossem os mesmos, tendo portanto, a mesma conversão, mas com velocidades distintas.

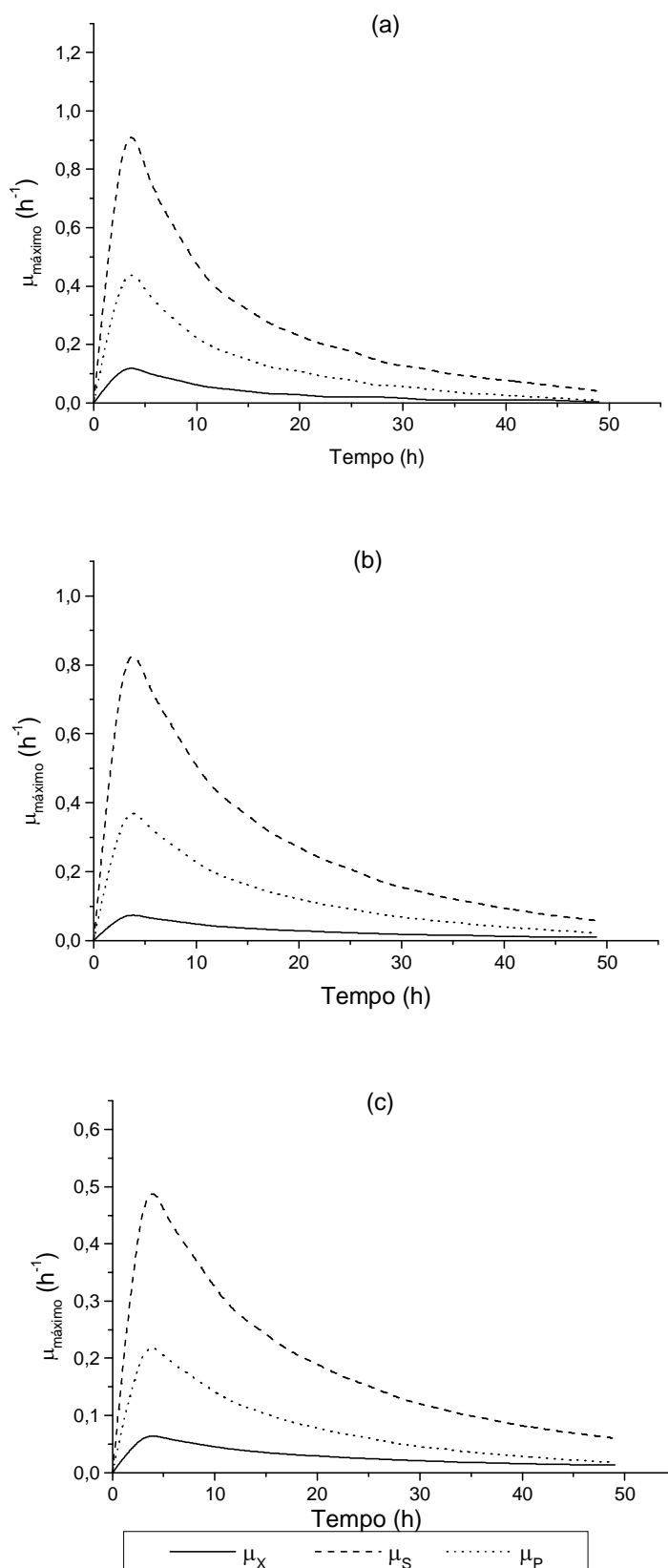
As velocidades específicas máximas de consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produção de etanol ( $\mu_p$ ) apresentadas pelo hidrolisado suplementado (0,95 h<sup>-1</sup> e 0,42 h<sup>-1</sup>, respectivamente), foram bem próximas as observadas em meio sintético (1,08 h<sup>-1</sup> e

0,52 h<sup>-1</sup>, respectivamente), porém, ligeiramente menores. Observando as velocidades máximas de consumo de açúcares e produção de etanol obtidas para o hidrolisado sem suplementação ( $\mu_s = 0,55 \text{ h}^{-1}$  e  $\mu_p = 0,25 \text{ h}^{-1}$ ), nota-se que tais valores foram bem menores que os observados para meio sintético e hidrolisado suplementado, tendo praticamente a metade do valor de ambas as velocidades. Entretanto a máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_x$ ) foi praticamente a mesma para o hidrolisado e para o hidrolisado suplementado (0,07 h<sup>-1</sup> e 0,08 h<sup>-1</sup>, respectivamente), sendo estas praticamente a metade da observada para o meio sintético (0,14 h<sup>-1</sup>).

**Tabela 5.23** - Parâmetros fermentativos do cultivo da levedura *Pichia stipitis* em meio sintético, hidrolisado e hidrolisado suplementado, nas condições otimizadas.

Parâmetros	Meio sintético	Hidrolisado suplementado	Hidrolisado
Tempo de fermentação (h)	48	48	48
Consumo de substrato (%)	100,0	85,5	56,3
Concentração de etanol (g/L)	24,4	23,6	14,6
Q <sub>p</sub> (g/L.h)	0,51	0,49	0,30
Y <sub>p/s</sub> (g/g)	0,43	0,44	0,41
Y <sub>x/s</sub> (g/g)	0,12	0,11	0,17
$\mu_x$ (máximo) (h <sup>-1</sup> )	0,14	0,08	0,07
$\mu_s$ (máximo) (h <sup>-1</sup> )	1,08	0,95	0,55
$\mu_p$ (máximo) (h <sup>-1</sup> )	0,52	0,42	0,25

Na Figura 5.18 são mostrados o comportamento da velocidade específica de crescimento de células ( $\mu_x$ ), consumo de substrato ( $\mu_s$ ) e produção de etanol ( $\mu_p$ ) em função do tempo, na fermentação, por *Pichia stipitis*, em meio sintético (a), hidrolisado (c) e hidrolisado suplementado (b). Para os três meios de fermentação o comportamento observado foi muito semelhante, variando apenas o valor máximo das velocidades específicas.

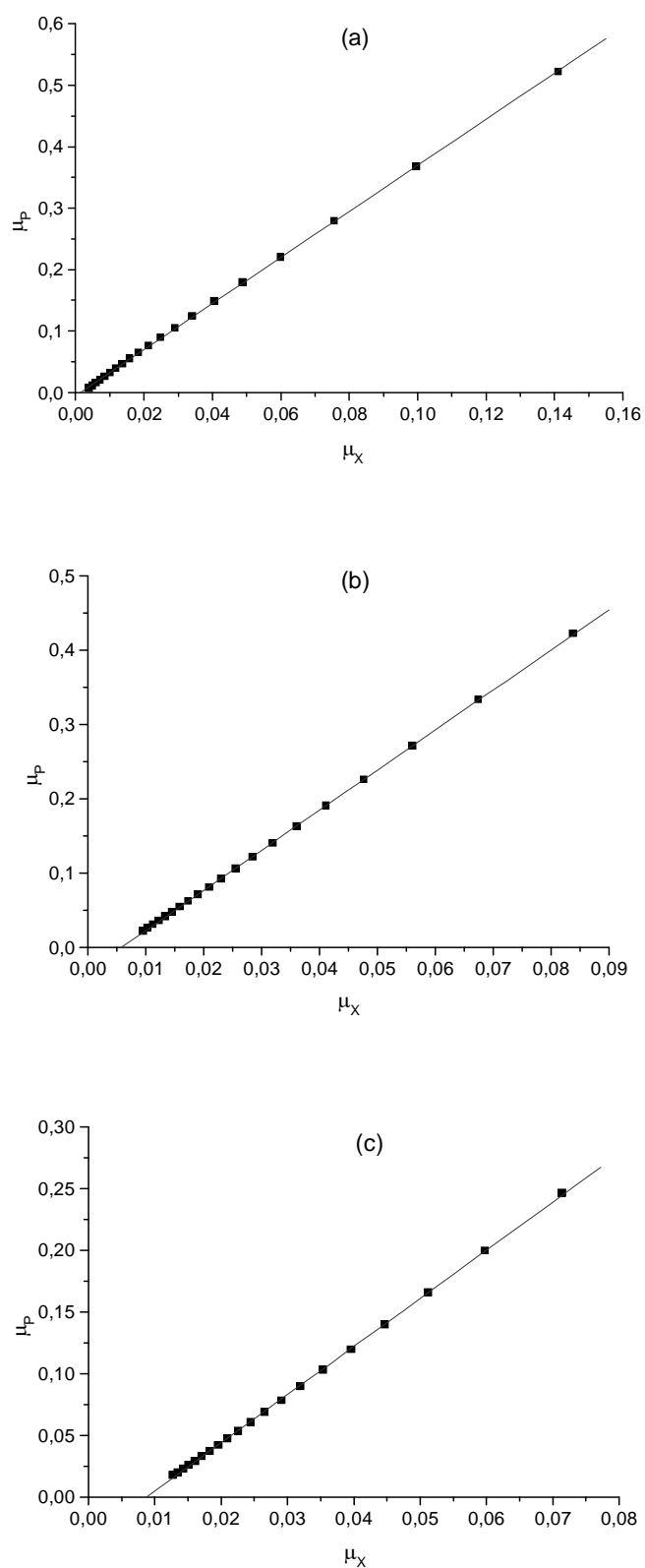


**Figura 5.18** - Velocidade específica de crescimento de células ( $\mu_X$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e produção de etanol ( $\mu_P$ ), na fermentação, por *Pichia stipitis*, de meio sintético (a), hidrolisado suplementado (b) e hidrolisado (c), a 30 °C, 200 rpm, até 48 horas.

Observando a Figura 5.18 vemos que nos três diferentes meios de fermentação, a velocidade específica de crescimento de células, consumo de substrato e produção de etanol, atingiram um valor máximo no início da fermentação, próximo de três horas, caindo gradativamente, a partir de então, até o tempo final observado de 48 horas. A semelhança entre as curvas de velocidade específica de crescimento e velocidade específica de formação de produto, observadas em todos três meios de fermentação, sugerem que há uma correlação entre as mesmas.

Para verificar a correlação entre a velocidade específica de crescimento e velocidade específica de formação de produto para as cinéticas de fermentação em meio sintético, hidrolisado e hidrolisado suplementado, foram feitos gráficos de  $\mu_x$  por  $\mu_p$ , que são mostrados na Figura 5.19. Para os três meios de fermentação observados foram encontrados elevados coeficientes de correlação, superiores a 99,9 %, o que demonstra que, para os três casos, a produção de etanol foi associada ao crescimento celular, para as condições aplicadas neste trabalho. Estes resultados concordam com os observados por du-Preez, Driessel e Prior (1989) que verificaram que a produção de etanol foi um processo associado ao crescimento.





**Figura 5.19** - Velocidade específica de crescimento de células ( $\mu_x$ ), por velocidade específica de formação de produto (etanol) ( $\mu_p$ ), na fermentação, por *Pichia stipitis*, de meio sintético (a), hidrolisado suplementado (b) e hidrolisado (c), a 30 °C, 200 rpm, até 48 horas.

## 6 CONCLUSÕES

O processo de destoxificação foi capaz de remover grande parte dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (HHPA).

O hidrolisado concentrado (fator de concentração de 6 vezes) apresentou efeito inibidor sobre o metabolismo microbiano, dificultando sua fermentação, sendo, por isso, necessário sua diluição até uma concentração de açúcares totais de cerca de 60 g/L.

O estudo da suplementação nutricional, do HHPA, mostrou que os melhores resultados em termos de conversão e produtividade em etanol, foram obtidos em meio suplementado apenas com 3 g/L de extrato de levedura. Este estudo permitiu, além de simplificar significativamente a composição do meio (reduzindo o número de nutrientes adicionados), elevar a produtividade em 14%, quando comparado com o meio suplementado com todos os nutrientes.

O estudo da aeração/agitação, em frascos agitados, mostrou que a razão  $V_{\text{frasco}}/V_{\text{meio}}$  de 2,5 sob agitação de 200 rpm foi a condição que proporcionou os melhores resultados de conversão e produtividade em etanol, sendo observado um aumento de cerca de 63% na produtividade, e de 24% na conversão em etanol.

A bioconversão do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz em etanol, nas condições otimizadas de suplementação de nutrientes e de aeração, apresentou um comportamento cinético semelhante ao observado em meio sintético, nas mesmas condições.

A metodologia estatística de planejamento e otimização de experimentos foi uma ferramenta eficaz na melhoria da bioprodução de etanol empregando o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz pela levedura *P. stipitis*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUL-EL-ENIN, O. H.; FADEL, J. G.; MACKILL, D. J. Differences in Chemical Composition and Fiber Digestion of Rice Straw With and Without Anhydrous Ammonia from 53 Rice Varieties. **Animal Feed and Technology**, v. 79, p. 129-136, 1999.
- AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, v. 16, nº 2, p. 211-214, 1994
- BANIK, S.; NANDI, R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. **Industrial Crops and Products**, v. 20, p. 311-319, 2004.
- BISARIA, V. S.; GHOSE, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 90-103, 1981.
- DAVIS, L.; JEON, Y. J.; SVENSON, C.; ROGERS, P.; PEARCE, J.; PEIRIS, P. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 29, p. 49-59, 2005.
- DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. N. Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 34, p. 398-402, 1989.
- DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A renewable motor fuel from biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-337, 2005.
- 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 Microb. Technol.**, v. 8, p. 360-364, 1986.
- DU PREEZ, J. C.; BOSCH, M.; PRIOR, B. A. Temperature profiles of growth and ethanol tolerance of the xylose-fermenting yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 25, p. 521-525, 1987.

- DU PREEZ, J. C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. Ethanol tolerance of *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* strains in fed-batch cultures at controlled low dissolved oxygen levels. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 30, p. 53-58, 1989.
- DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 944-952, 1994.
- DUMSDAY, G.J.; JONES, K.; STANLEY, G.A.; PAMMENT, N.B. Recombinant organisms for ethanol production from hemicellulosic hydrolyzates – A Review of Recent Progress. **Australasian Biotechnology**, v. 7, n. 4, p. 285-295, 1997.
- EKEN-SARAÇOĞLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 855-858, 2000.
- ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, F.; HAHN-HÄGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XYS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and environmental Microbiology**, v. 66, n. 8, p. 3381-3386, 2000.
- ELSEED, A. M. A. F. Effect of supplemental protein feeding frequency on ruminal characteristics and microbial N production in sheep fed treated rice straw. **Small Ruminant Research**, v. 57, p. 11-17, 2005.
- FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 610 p.
- GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from Biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981, 309 p.
- GROOTJEN, D. R. J.; JANSEN, M. L.; VAN DER LANS, R. G. J. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Reactors in series for the complete conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbiology technology**, v. 13, p. 828-833, 1991.

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

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

HAMELINCK, C.N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. **Biomass and Bioenergy**, v. 28, p. 384-410, 2005.

HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology, issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, p. 602-619, 2003.

IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: <[www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias)> . Acesso em: abril de 2005.

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

JEFFRIES, T. W.; LIGHTFFOT, E. N.; FADY, J. H; Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachsolon tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 171-176, 1985.

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

KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. Rice Straw a Lignocellulosic Resource: Collecting, Processing, Transportation, and Environmental Aspects. **Biomass and Bioenergy**. V. 18, p. 369-389, 2000.

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

- KUHAD, R.C.; SING, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.
- LEBEAU, T.; JOUENNE, T.; JUNTER, G. A. Continuous alcoholic fermentation of glucose/xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 50, p. 309-313, 1998.
- LEE, Y. Y.; LIN, C. M.; JOHNSON, T.; CHAMBERS, R. P. Seletive hydrolysis of hardwood hemicellulose by acids. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, v. 8, p, 75-88, 1978.
- LEE, Y.Y.; McCASKEY, T.A. Hemicellulose hydrolysis and fermentation of resulting pentose to ethanol. **Tappi Journal**, v.66, n.5, p. 102-107, 1983.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, p. 1-24, 1997.
- LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**. v. 18, p. 413-418, 1998.
- MANTHA, D.; BASHA, Z. A.; PANDA, T. Optimization of medium composition by response surface methodology for the production of tartaric acid by *Gluconobacter suboxydans*. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 285-288, 1998.
- McMILLAN, J.D. Pretreatment of Biomass. **American Chemical Society Symposium**. v. 566, p.292-324, 1994.
- MILLATI, R.; EDEBO, L.; TAHERZADEH, M. J. Performance of *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xilose, and wood hydrolyzates. **Enzime and Microbial Technology**, 2004.
- MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J. Effect of pH, time and temperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 515-522, 2002.

- MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysate with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Technology**, v. 32, p. 396-400, 2003.
- MONKS, P. L.; FERREIRA, O. G. L.; GOULART, E. Q.; TERRES, A. L. S. Potencial forrageiro do arroz irrigado (*Oryza sativa L.*) após a colheita dos grãos. **Agrociência**, v. 8, n. 1, p. 67-70, 2002.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica**. 8. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbernkian, 1983.
- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MUSSATTO, 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. 094-100, 2004a.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004b.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 497-502, 2005.
- NAKAMURA, Y.; SAWADA, T.; INOUE, E. Mathematical model for ethanol production from mixed sugars by *Pichia stipitis*. **J. of Chemical Technol. and Biotechnol**, v. 76, p. 586-592, 2001.
- NAVAEE-ARDEH, S.; MOHAMMADI-ROVSHANDEH, J.; POURJOOZI, M. Influence of straw cooking conditions in the soda-ethanol-water pulping on the mechanical properties of produced paper sheets. **Bioresour Technol**, v. 92, p. 65-69, 2004.

- NIGAM, J. N. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, p. 17-27, 2001a.
- NIGAM, J.N. Development of xilose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **J. of Applied Microbiology**, v. 90, p. 208-215, 2001b.
- NIGAM, J.N. Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia stipitis*. **J. of Ind. Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 145-150, 2001c.
- NIGAM, J.N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xilose-fermenting yeast. **J. of Biotechnology**, v. 97, p. 107-116. 2002.
- NILSSON, A. **Control of fermentation of lignocellulosic hydrolysate.** Disponível em: <[www.chemeng.lth.se/exjobb/010.pdf](http://www.chemeng.lth.se/exjobb/010.pdf)>. Acesso em: novembro de 2005.
- OH, G. H.; PARK, C. R. Preparation and characteristics of rice-straw-based porous carbons with high adsorption capacity. **Fuel**, v. 81, p. 327-336, 2002.
- OLIVA, J. M.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, I; NEGRO, M. J.; GONZÁLEZ, A.; BALLESTEROS, M. Application of Fenton's reaction to steam explosion prehydrolysates from poplar biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 887-889, 2005.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.38, p. 53-87, 1989.
- PHAM, P. L.; TAILLAMDIER, P.; DELMAS, M.; STREHAIANO, P. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus sp.* Using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 185-190, 1998.



- PI, Z. K.; WU, Y. M.; LIU, J. X. Effect of pretreatment and pelletization on nutritive value of rice straw-based total mixed ration, and growth performance and meat quality of growing Bôer goats fed on TMR. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 81-88, 2005.
- PINTADO, J.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Interactions between pretreatment and nutrient concentrations of citric acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 544-549, 1997.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 239-243, 2000.
- PÜTÜN, A. E.; APAYDIN, E.; PÜTÜN, E. Rice straw as a bio-oil source via pyrolysis and steam pyrolysis. **Energy**, v. 29, p. 2171-2180, 2004.
- RAO, K. J.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 639-647, 2000.
- RATNAM, B.V.V.; RAO, S.S.; RAO, M. D.; RAO, M. N.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of ethanol from palmyra jaggery using response surface methodology. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 399-404, 2005.
- ROBERTO, I. C.; LACIS, L. S.; BARBOSA, M. F. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Pichia stipitis* for the Production of Ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21, 1991.
- ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SOUZA, C. M. A.; FELIPE, M. G. A.; SATO, S.; CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, Middlesex, v. 16, n. 11, p. 1211-1216, 1994.

- ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.
- ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M.; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1223-1228, 1995.
- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 30, p. 279-291, 2003.
- SANCHES, G.; PILCHER, L.; ROSLANDER, C.; MODIG, T.; GALBE, M.; LINDEN, G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 249-256, 2004.
- SANGNARK, A.; NOOMHORM, A. Chemical, physical and baking properties of dietary fiber prepared from rice straw. **Food Research International**, v. 37, p. 66-74, 2004.
- SELIM, A. S. M.; PAN, J.; TAKANO, T.; SUZUKI, T.; KOIKE, S.; KOBAYASHI, Y.; TANAKA, K. Effect of ammonia treatment on physical strength of straw, distribution of straw particles and particles-associated bacteria in sheep rumen. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p.117-128, 2004.
- SINGLETON, V.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteus Reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SHLESER, R. **Ethanol Production in Hawaii**. Disponível em: <<http://www.hawaii.gov/dbeat/ert/ethanol>>. Acesso em: junho de 1999.
- SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: properties and process consideration for ethanol production from D-xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, p. 5-15, 1987.

- SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J. Optimum pH and Temperature Conditions for Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 727-731, 1990.
- SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-Xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v 72, p 1285-1296, 2006.
- SUN, R. C.; TOMKINSON, J.; MA, P. L.; LIANG, S. F. Comparative study of hemicelluloses From Rice Straw by Alkali and Hydrogen Peroxide Treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p. 111-122, 2000.
- SUN, Y.; CHENG, J.J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.
- SUNITHA, K.; LEE, J. K.; OH, T. K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**. v. 21, p. 477-481, 1999.
- SUNITHA, K.; RAO, M. V. S.; AYYANNA, C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-Glutamic acid by the co immobilized whole cells. **Bioprocess Engineering**, v. 18, p. 353-359, 1998.
- TANIGUCHI, M.; TOHMA, T.; ITAYA, T.; FUJII, M. Ethanol production from a mixture of glucose and xylose by co-culture of *Pichia stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 364-370, 1997.
- WEBB, S. R.; LEE, H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v. 8, p. 685-697, 1990.
- WEIMER, P.J.; MERTENS, D.R.; PONNAMPALAM, E.; SEVERIN, B. F.; DALE, B. E. FIBEX-treated rice straw as a feed ingredient for lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 103, p. 41-50, 2003

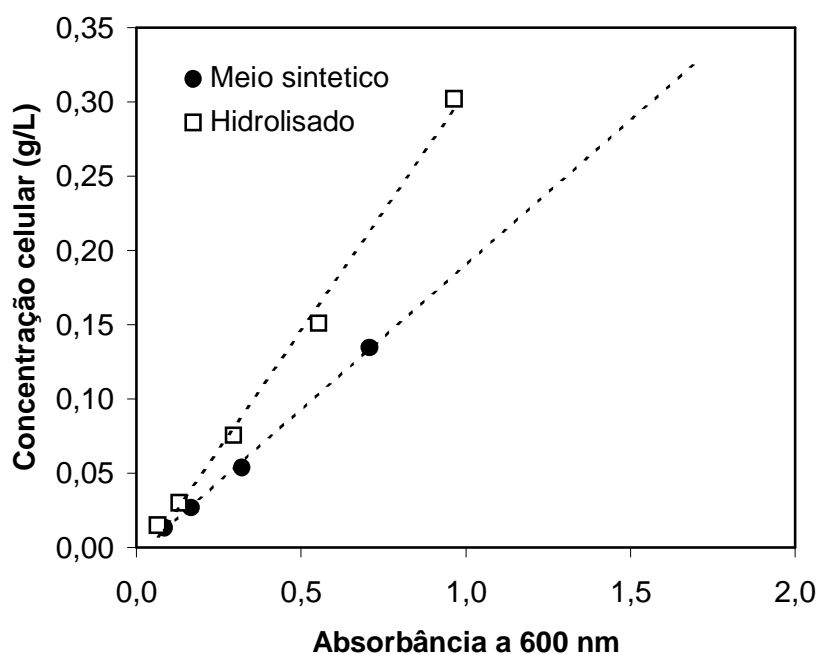
- WYMAN, C. E. Biomass Ethanol: Technical Progress, Opportunities, and Commercial Challenges. **Annu Rev. Energy Environ**, v. 24, p. 189-226, 1999.
- XIAO, B.; SUN, X. F.; SUN, R. C. Chemical, structural, and thermal characterizations of alkali-soluble lignins and hemicelluloses, and cellulose from maize stems rye straw, and rice straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 74, p. 307-319, 2001.
- YANG, H. S.; KIM, D. J.; LEE, Y. K.; KIM, H. J.; JEON, J. Y.; KANG, C. W. Possibility of using waste tire composites reinforced with rice straw as construction materials. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 61–65, 2004.
- YUN, H. C.; PARK, Y. H.; PARK, C. R. Effects of pre-carbonization on porosity development of activated carbons from rice straw. **Carbon**, v. 39, p. 559-567, 2001.
- ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 56, p. 17-34, 2001.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A1 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO

#### Curva de calibração de biomassa

Encontra-se a seguir as curvas obtidas para a calibração da concentração celular, pelo método de peso seco em função da absorbância a 600 nm. Foram realizadas calibrações no meio a base de hidrolisado e em meio sintético, com células lavadas com água destilada.



**Figura A.1** Curva de calibração de biomassa para meio a base de hidrolisado e meio sintético.

Curva de calibração meio sintético:  $C \text{ (g/L)} = 0,196 * \text{Abs} - 0,0054 \text{ (R}^2=0,9979)$

Curva de calibração hidrolisado:  $C \text{ (g/L)} = 0,319 * \text{Abs} - 0,0131 \text{ (R}^2=0,9946)$

### Curvas de calibração de açúcares, ácido acético e etanol

Apresentam-se a seguir as curvas obtidas para a calibração das concentrações dos açúcares celobiose, glicose, xilose e arabinose e para ácido acético e etanol. Na Tabela A.1 são mostrados os açúcares, ácidos orgânicos e álcoois, seus tempos de eluição, as equações que relacionam a concentração (C) com as áreas obtidas nos cromatogramas e o coeficiente de correlação ( $R^2$ ) para cada equação.

**Tabela A.1** Curva de calibração de açúcares, ácido acético e etanol.

Componente	Tempo (minutos)	Equações	Correlação
Celobiose	7,04	$C \text{ (g/L)} = -0,00175 + 8,74E-07 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99998$
Glicose	8,50	$C \text{ (g/L)} = -0,00697 + 8,98E-07 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99999$
Xilose	9,18	$C \text{ (g/L)} = -0,00446 + 8,78E-07 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99997$
Arabinose	10,11	$C \text{ (g/L)} = 0,00243 + 9,18E-07 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99992$
Xilitol	11,05	$C \text{ (g/L)} = 0,00619 + 9,05E-07 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99995$
Ác. acético	14,33	$C \text{ (g/L)} = 0,01880 + 1,89E-06 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99988$
Etanol	19,82	$C \text{ (g/L)} = 0,01902 + 2,16E-06 * \text{Área}$	$R^2 = 0,99988$

**Condições de operação:**

Coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300x7,8 mm);

Temperatura: 45°C;

Eluente: ácido sulfúrico 0,01N;

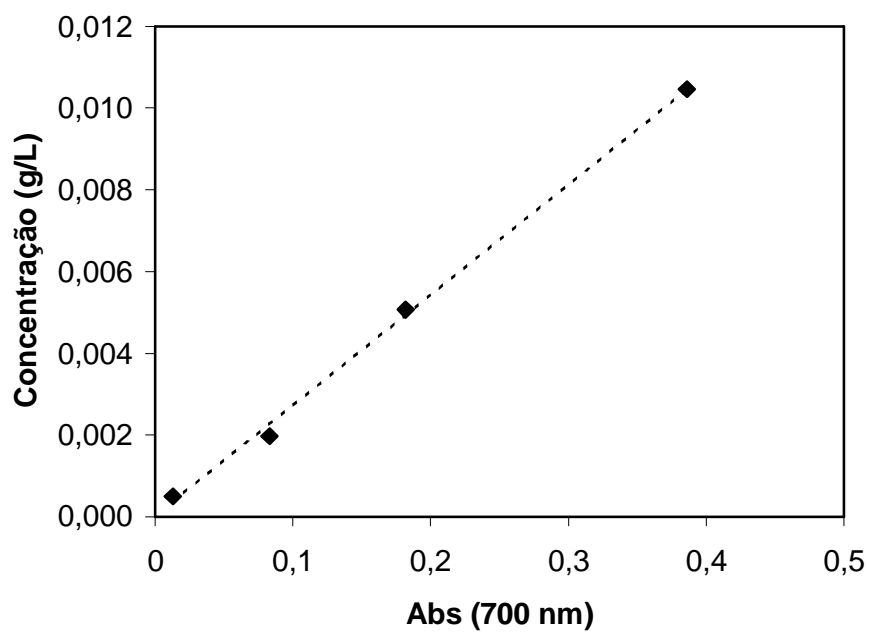
Fluxo: 0,8 mL/ min;

Volume de amostra: 20 $\mu$ L;

Detector: índice de refração.

### Curvas de calibração de fenóis totais

A seguir é apresentada a curva obtidas para a calibração da concentração de compostos fenólicos totais.



**Figura A.2** Curva de calibração de fenóis totais.

$$C \text{ (g/L)} = 0,0271 * \text{Abs} - 6E-06$$

$$R^2 = 0,9981$$

## APÊNDICE A2 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO HIDROLISADO

São apresentados a seguir por meio de tabelas, os valores obtidos para todos os ensaios para a avaliação da toxicidade do hidrolisado. A concentração celular foi determinada pelo método de peso seco, e a concentração de açúcares e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – WATERS). Foi também avaliado o valor de pH no meio, por potenciometria.

**Tabela A.2** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da toxicidade do hidrolisado.

Ensaio	Início ( 0 horas)						Fim (48 horas)					
	Gli.	Xil.	Ara.	Etanol	X <sub>i</sub>	pH	Gli.	Xil.	Ara.	Etanol	X <sub>f</sub>	pH
1	14,7	87,9	12,8	0,0	1,25	4,48	15,2	89,0	13,1	0,0	1,74	4,13
2	11,3	66,3	9,7	0,0	1,33	4,49	11,6	67,9	10,1	0,0	1,61	4,36
3	8,3	47,2	6,7	0,0	1,36	4,39	0,0	20,4	7,2	16,4	2,99	4,27
4	5,8	32,2	5,0	0,0	1,38	4,47	0,0	1,9	4,3	14,0	3,60	4,20

Gli.: glicose (g/L); Xil.: xilose (g/L); Ara.: arabinose (g/L); Etanol (g/L); X: concentração celular (g/L).

### Ensaio:

Ensaio 1: Hidrolisado com 90 g/L de Xilose sem nutrientes.

Ensaio 2: Hidrolisado com 70 g/L de Xilose sem nutrientes.

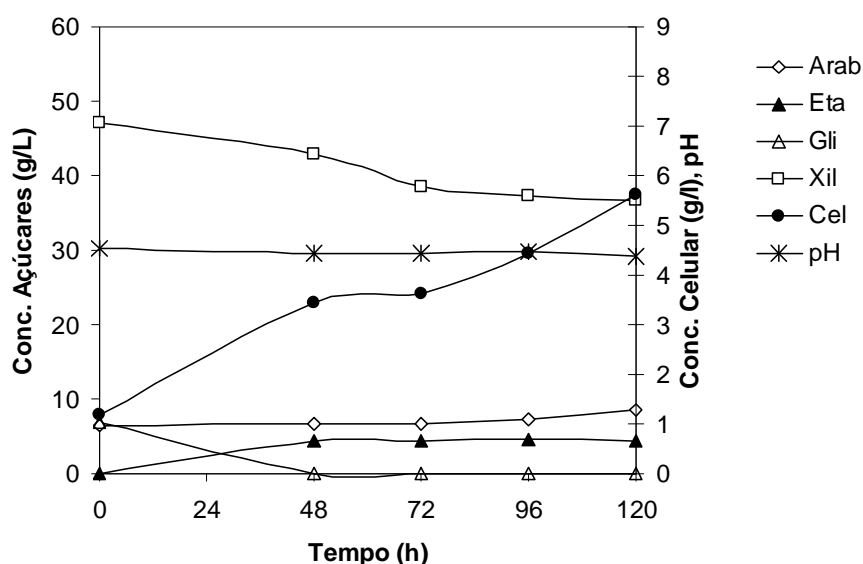
Ensaio 3: Hidrolisado com 50 g/L de Xilose sem nutrientes.

Ensaio 4: Hidrolisado com 30 g/L de Xilose sem nutrientes.



### APÊNDICE A3 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup> PARA A AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO NUTRICIONAL

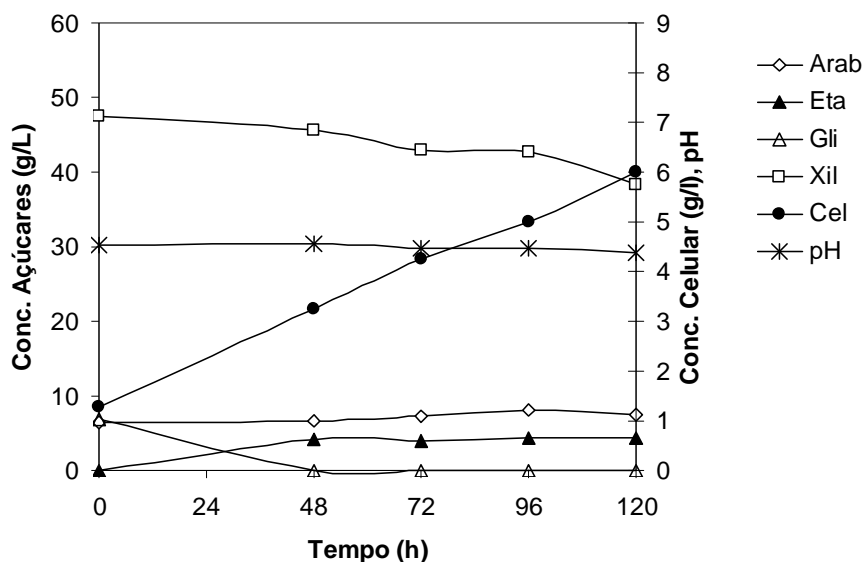
Nesta seção encontram-se representados por meio de curvas e tabelas, os valores obtidos para todos os ensaios de planejamento fatorial efetuado para a avaliação da suplementação nutricional. A concentração celular foi determinada pelo método de peso seco, e a concentração de açúcares e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – WATERS). Foi também avaliado o valor de pH no meio, por potenciometria.



**Figura A.3** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 1).

**Tabela A.3** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 1).

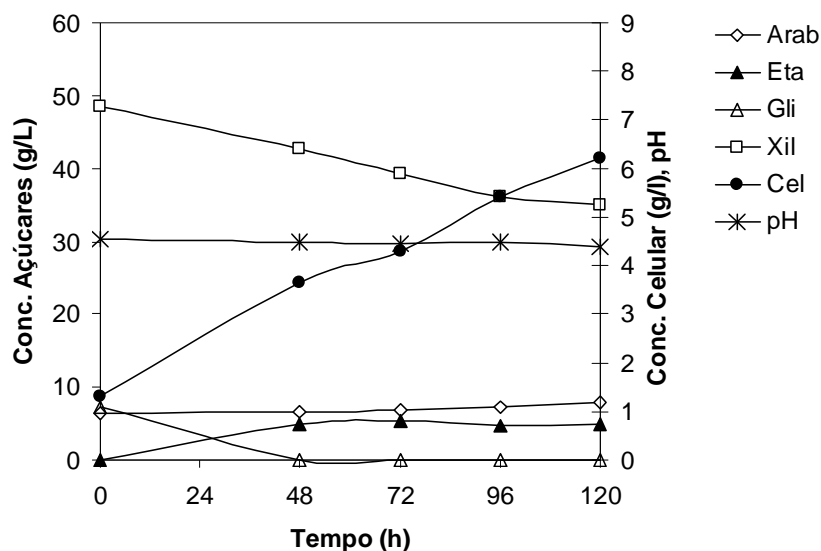
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,1	6,4	0,0	1,18	4,54
48	0,0	43,0	6,6	4,4	3,44	4,43
72	0,0	38,5	6,7	4,4	3,63	4,45
96	0,0	37,2	7,4	4,5	4,43	4,46
120	0,0	36,8	8,5	4,3	5,64	4,38



**Figura A.4** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 2).

**Tabela A.4** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 2).

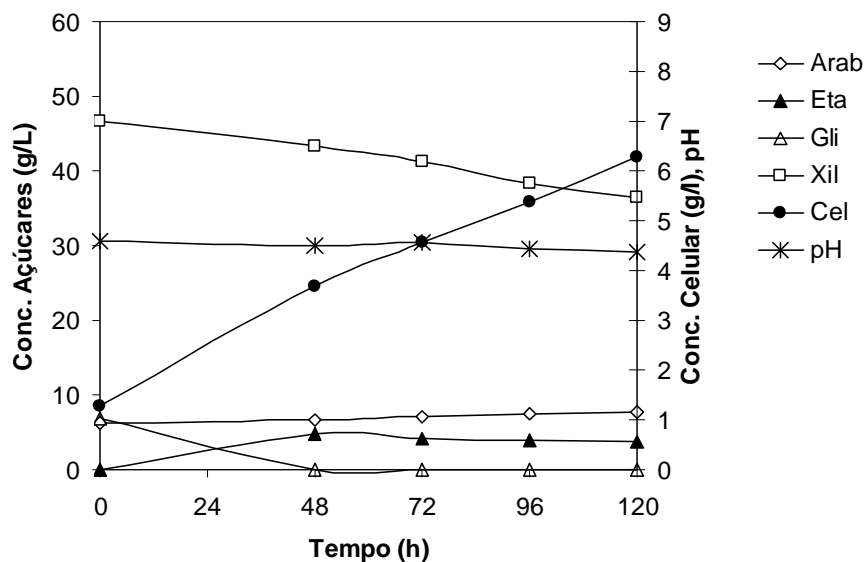
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,4	6,4	0,0	1,29	4,53
48	0,0	45,7	6,7	4,1	3,25	4,56
72	0,0	42,9	7,2	4,0	4,24	4,46
96	0,0	42,6	8,0	4,5	5,00	4,48
120	0,0	38,3	7,4	4,3	5,99	4,37



**Figura A.5** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 3).

**Tabela A.5** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 3).

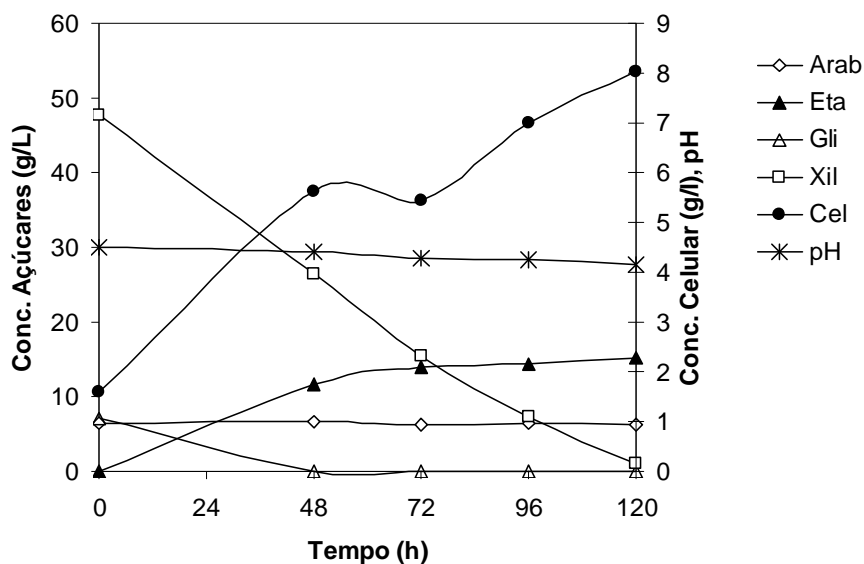
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,2	48,5	6,5	0,0	1,30	4,55
48	0,0	42,8	6,6	4,8	3,66	4,50
72	0,0	39,3	6,9	5,3	4,30	4,44
96	0,0	36,0	7,3	4,7	5,42	4,50
120	0,0	35,0	8,0	4,9	6,21	4,39



**Figura A.6** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 4).

**Tabela A.6** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 4).

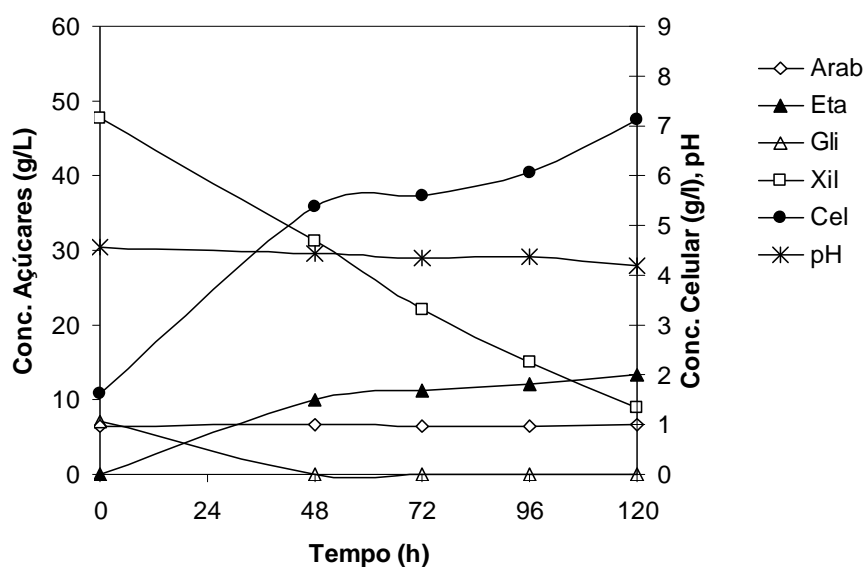
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	6,9	46,6	6,3	0,0	1,27	4,58
48	0,0	43,4	6,6	4,8	3,70	4,51
72	0,0	41,3	7,0	4,2	4,56	4,56
96	0,0	38,3	7,5	4,0	5,38	4,45
120	0,0	36,4	7,7	3,8	6,28	4,39



**Figura A.7** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 5).

**Tabela A.7** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 5).

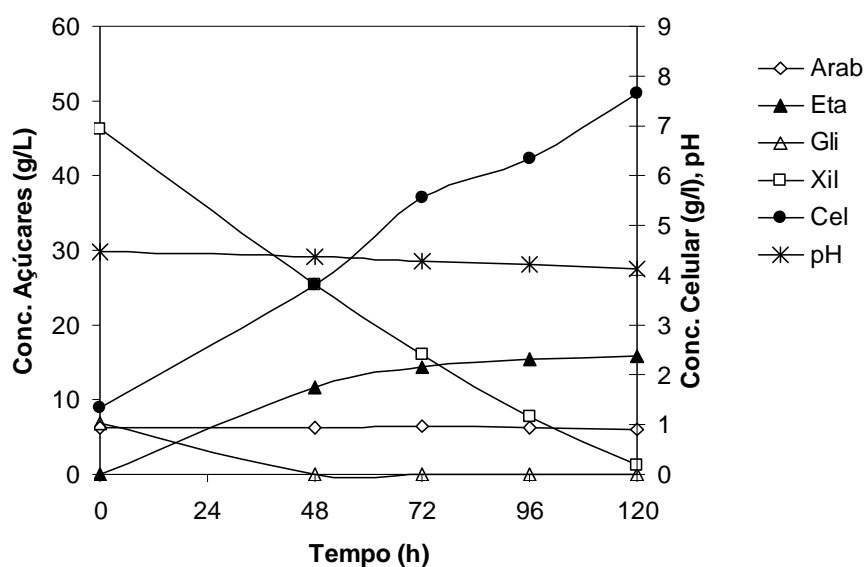
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,6	6,5	0,0	1,59	4,51
48	0,0	26,4	6,7	11,7	5,64	4,41
72	0,0	15,4	6,3	14,0	5,45	4,28
96	0,0	7,3	6,4	14,4	7,01	4,26
120	0,0	1,0	6,3	15,2	8,03	4,15



**Figura A.8** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 6).

**Tabela A.8** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 6).

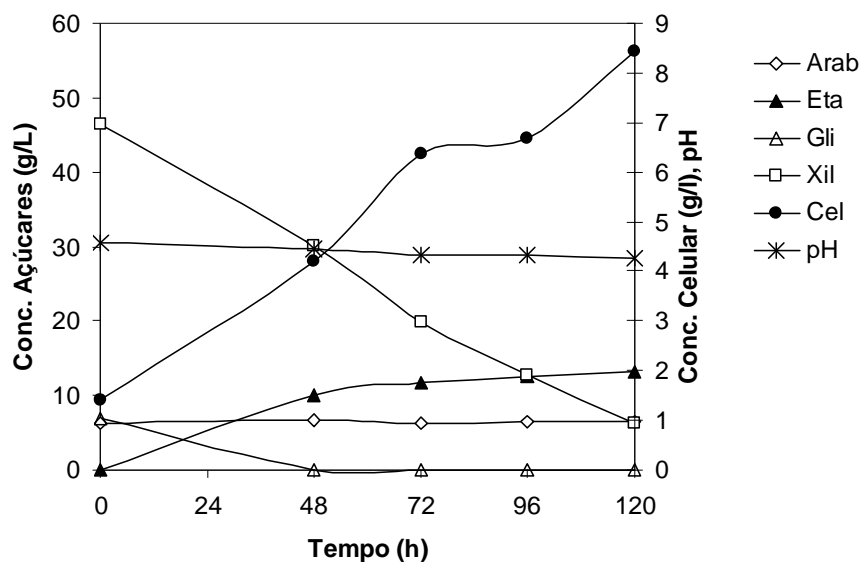
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,6	6,4	0,0	1,62	4,57
48	0,0	31,3	6,7	10,0	5,38	4,44
72	0,0	22,1	6,5	11,3	5,61	4,33
96	0,0	15,0	6,5	12,2	6,05	4,36
120	0,0	8,9	6,6	13,2	7,14	4,2



**Figura A.9** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 7).

**Tabela A.9** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 7).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	6,8	46,2	6,2	0,0	1,35	4,47
48	0,0	25,5	6,3	11,6	3,82	4,38
72	0,0	16,1	6,4	14,4	5,58	4,29
96	0,0	7,7	6,3	15,3	6,34	4,22
120	0,0	1,2	6,1	15,9	7,65	4,14

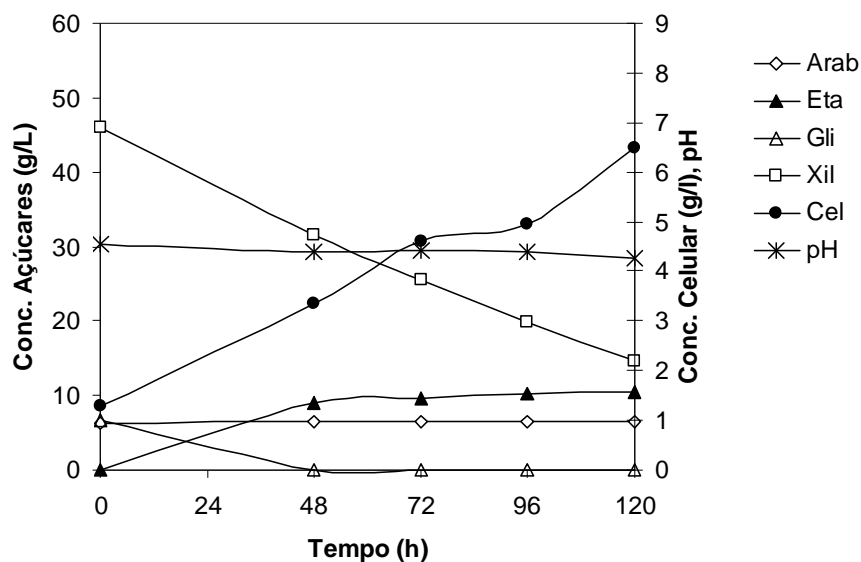


**Figura A.10** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 8).

**Tabela A.10** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 8).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	6,9	46,4	6,3	0,0	1,41	4,57
48	0,0	30,2	6,6	10,1	4,21	4,46
72	0,0	19,9	6,3	11,7	6,37	4,34
96	0,0	12,7	6,4	12,5	6,69	4,32
120	0,0	6,2	6,4	13,1	8,45	4,26

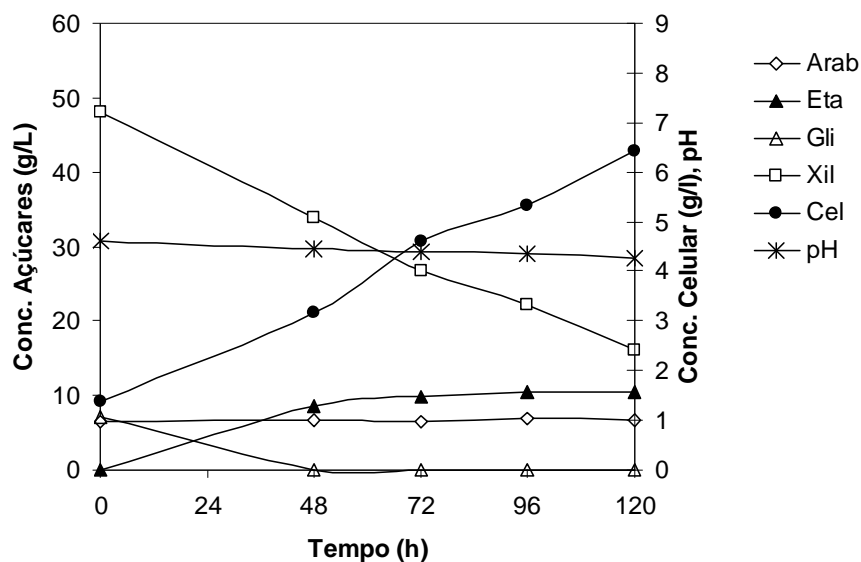




**Figura A.11** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 9).

**Tabela A.11** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 9).

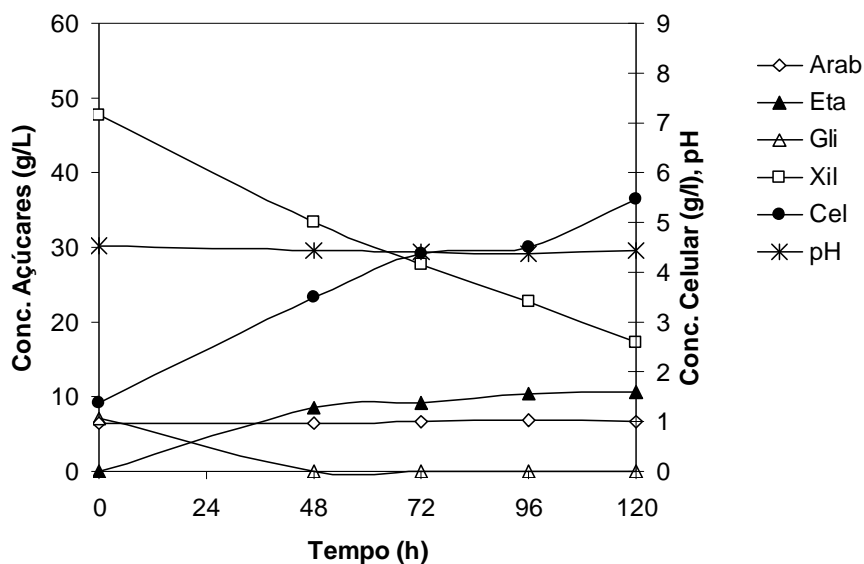
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	6,8	46,0	6,2	0,0	1,30	4,54
48	0,0	31,5	6,4	8,9	3,34	4,39
72	0,0	25,6	6,5	9,7	4,62	4,42
96	0,0	19,8	6,5	10,2	4,97	4,38
120	0,0	14,6	6,6	10,4	6,50	4,25



**Figura A.12** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 10).

**Tabela A.12** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 10).

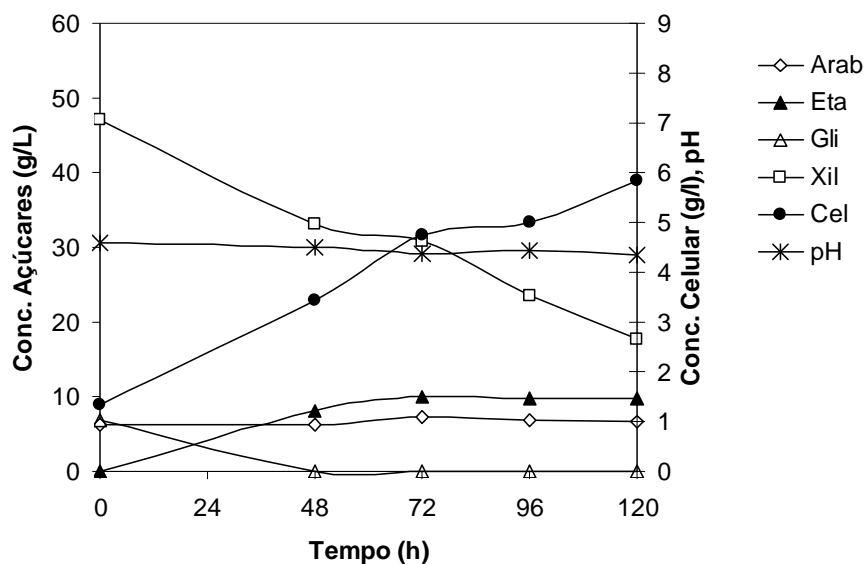
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,1	48,1	6,5	0,0	1,37	4,61
48	0,0	33,9	6,7	8,7	3,15	4,45
72	0,0	26,8	6,5	9,8	4,62	4,39
96	0,0	22,1	6,8	10,6	5,32	4,36
120	0,0	16,2	6,6	10,5	6,44	4,25



**Figura A.13** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 11).

**Tabela A.13** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 11).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,7	6,4	0,0	1,37	4,54
48	0,0	33,4	6,5	8,6	3,50	4,44
72	0,0	27,8	6,8	9,2	4,36	4,41
96	0,0	22,7	6,8	10,4	4,49	4,38
120	0,0	17,4	6,7	10,7	5,48	4,45



**Figura A.14** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 12).

**Tabela A.14** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação (Ensaio 12).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	6,9	47,1	6,3	0,0	1,35	4,59
48	0,0	33,0	6,3	8,2	3,44	4,49
72	0,0	30,9	7,2	10,0	4,75	4,37
96	0,0	23,5	6,9	9,8	5,00	4,45
120	0,0	17,7	6,6	9,9	5,83	4,34

## APÊNDICE A4 – REGRESSÕES PARA CÁLCULO DO FATOR DE CONVERSÃO EM ETANOL E EM CÉLULAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>3</sup>

Encontram-se nesta seção as regressões lineares dos valores de  $\Delta P$  ou  $\Delta X$  em função de  $(-\Delta S)$ , para o cálculo do fator de conversão em etanol e em células, respectivamente, em cada ensaio realizado. Os valores para os fatores de conversão são fornecidos pelos coeficientes angulares das equações lineares:

$$\text{Conversão em etanol:} \quad \Delta P = a + Y_{P/S} (-\Delta S)$$

$$\text{Conversão em células:} \quad \Delta X = a + Y_{X/S} (-\Delta S)$$

**Tabela A.15** Cálculo do fator de conversão em etanol dos ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação.

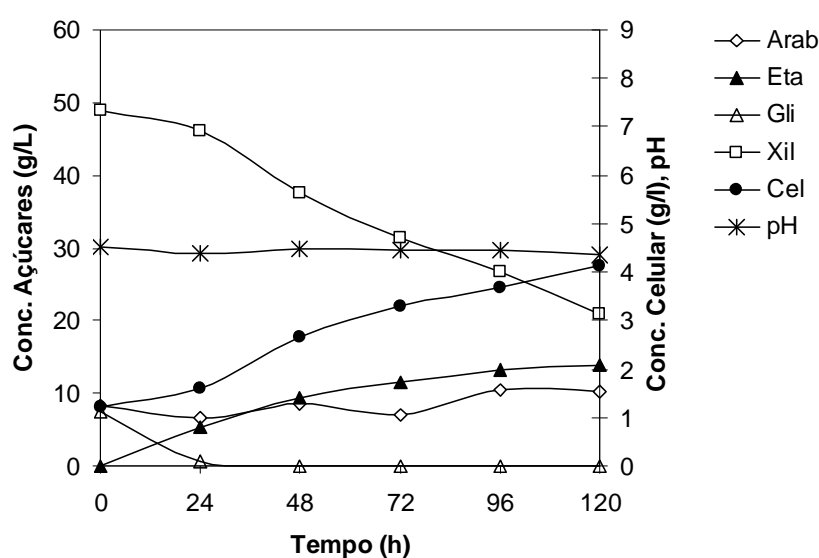
Ensaio	S					P					Y <sub>P/S</sub>	R <sup>2</sup>
	0	48	72	96	120	0	48	72	96	120		
1	60,4	49,6	45,1	44,6	45,3	0,0	4,4	4,4	4,5	4,3	<b>0,28</b>	0,92
2	60,8	52,4	50,1	50,7	45,8	0,0	4,1	4,0	4,5	4,3	<b>0,31</b>	0,82
3	62,2	49,4	46,2	43,3	43,0	0,0	4,8	5,3	4,7	4,9	<b>0,26</b>	0,88
4	59,7	49,9	48,3	45,8	44,1	0,0	4,8	4,2	4,0	3,8	<b>0,27</b>	0,71
5	61,1	33,0	21,7	13,7	7,3	0,0	11,7	14,0	14,4	15,2	<b>0,29</b>	0,92
6	61,0	37,9	28,5	21,5	15,5	0,0	10,0	11,3	12,2	13,2	<b>0,29</b>	0,93
7	59,2	31,8	22,5	14,0	7,3	0,0	11,6	14,4	15,3	15,9	<b>0,32</b>	0,94
8	59,5	36,8	26,2	19,1	12,7	0,0	10,1	11,7	12,5	13,1	<b>0,28</b>	0,91
9	59,0	37,9	32,1	26,3	21,2	0,0	8,9	9,7	10,2	10,4	<b>0,29</b>	0,90
10	61,7	40,5	33,4	29,0	22,8	0,0	8,7	9,8	10,6	10,5	<b>0,29</b>	0,92
11	61,1	39,9	34,5	29,5	24,1	0,0	8,6	9,2	10,4	10,7	<b>0,30</b>	0,94
12	60,4	39,4	38,1	30,3	24,4	0,0	8,2	10,0	9,8	9,9	<b>0,29</b>	0,86

**Tabela A.16** Cálculo do fator de conversão em células dos ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação da necessidade de suplementação nutricional do meio de fermentação.

Ensaio	S					X					Y <sub>X/S</sub>	R <sup>2</sup>
	0	48	72	96	120	0	48	72	96	120		
1	60,4	49,6	45,1	44,6	45,3	1,2	3,4	3,6	4,4	5,6	<b>0,22</b>	0,80
2	60,8	52,4	50,1	50,7	45,8	1,3	3,2	4,2	5,0	6,0	<b>0,32</b>	0,94
3	62,2	49,4	46,2	43,3	43,0	1,3	3,7	4,3	5,4	6,2	<b>0,23</b>	0,94
4	59,7	49,9	48,3	45,8	44,1	1,3	3,7	4,6	5,4	6,3	<b>0,31</b>	0,98
5	61,1	33,0	21,7	13,7	7,3	1,6	5,6	5,4	7,0	8,0	<b>0,11</b>	0,95
6	61,0	37,9	28,5	21,5	15,5	1,6	5,4	5,6	6,1	7,1	<b>0,11</b>	0,95
7	59,2	31,8	22,5	14,0	7,3	1,4	3,8	5,6	6,3	7,6	<b>0,12</b>	0,98
8	59,5	36,8	26,2	19,1	12,7	1,4	4,2	6,4	6,7	8,4	<b>0,15</b>	0,98
9	59,0	37,9	32,1	26,3	21,2	1,3	3,3	4,6	5,0	6,5	<b>0,13</b>	0,96
10	61,7	40,5	33,4	29,0	22,8	1,4	3,2	4,6	5,3	6,4	<b>0,13</b>	0,96
11	61,1	39,9	34,5	29,5	24,1	1,4	3,5	4,4	4,5	5,5	<b>0,11</b>	0,99
12	60,4	39,4	38,1	30,3	24,4	1,4	3,4	4,7	5,0	5,8	<b>0,12</b>	0,94

## APÊNDICE A4 - RESULTADOS DOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>2</sup> PARA AVALIAÇÃO DA AGITAÇÃO E DA RAZÃO $V_{\text{frasco}} / V_{\text{meio}}$

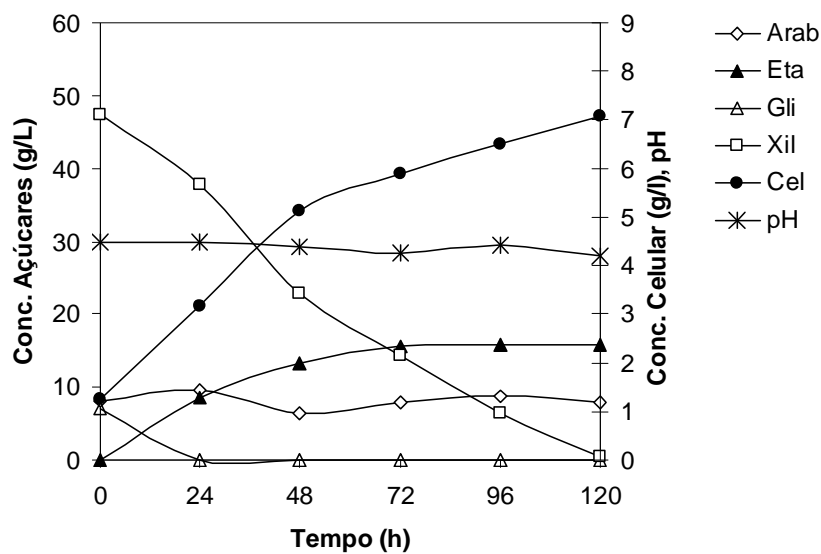
Nesta seção encontram-se representados por meio de curvas e tabelas, os valores obtidos para todos os ensaios de planejamento fatorial efetuado para a avaliação do efeito da aeração. A concentração celular foi determinada pelo método de peso seco, e a concentração de açúcares e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – WATERS). Foi também avaliado o valor de pH no meio, por potenciometria.



**Figura A.15** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 1).

**Tabela A.17** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 1).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,4	48,9	8,4	0,0	1,23	4,52
24	0,7	46,2	6,5	5,3	1,59	4,39
48	0,0	37,6	8,5	9,4	2,64	4,49
72	0,0	31,4	7,1	11,6	3,31	4,46
96	0,0	26,7	10,4	13,3	3,70	4,46
120	0,0	20,9	10,2	13,9	4,14	4,36

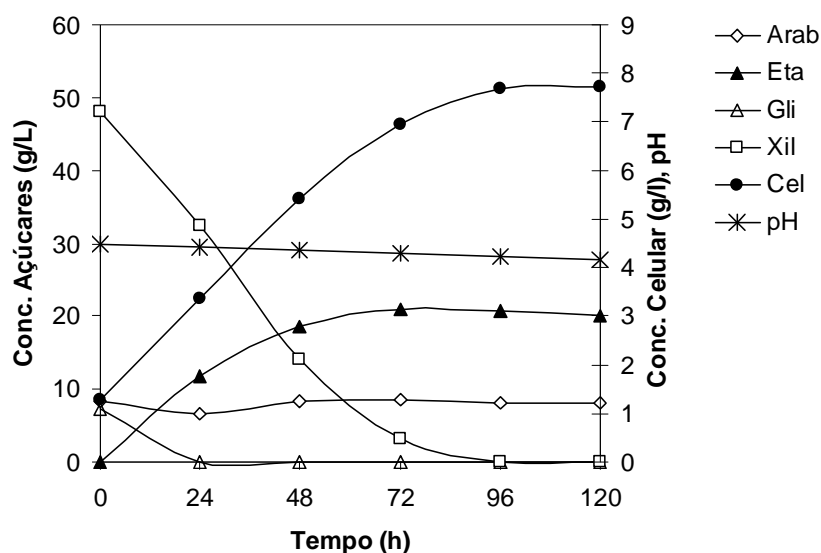


**Figura A.16** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 2).

**Tabela A.18** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 2).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	47,4	8,2	0,0	1,25	4,49
24	0,0	37,9	9,5	8,5	3,19	4,49
48	0,0	22,8	6,4	13,3	5,13	4,38
72	0,0	14,3	7,9	15,5	5,89	4,27
96	0,0	6,5	8,7	15,8	6,50	4,42
120	0,0	0,4	7,9	15,8	7,07	4,19

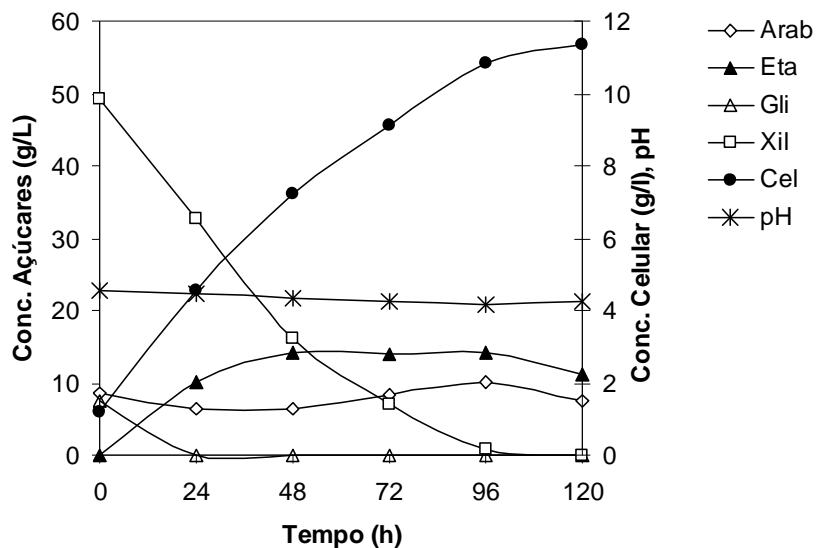




**Figura A.17** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 3).

**Tabela A.19** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 3).

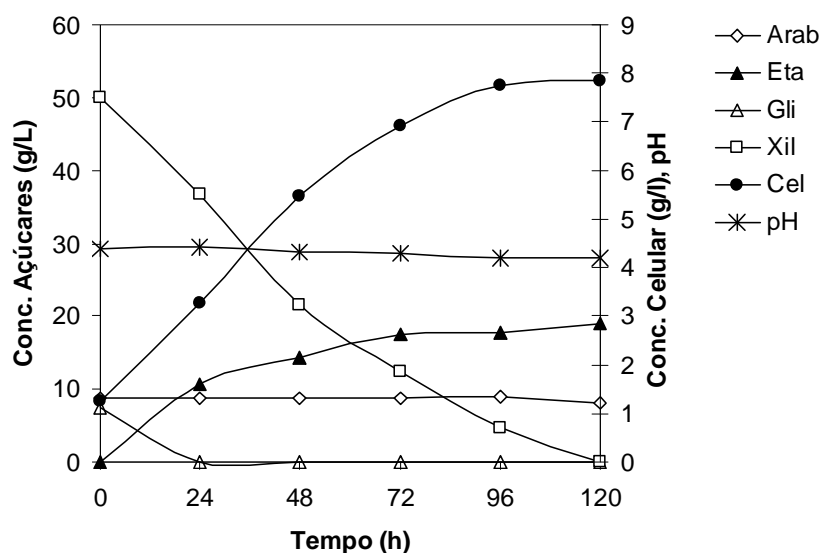
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,3	48,0	8,3	0,0	1,27	4,47
24	0,0	32,4	6,6	11,7	3,38	4,42
48	0,0	14,1	8,4	18,5	5,42	4,34
72	0,0	3,3	8,6	21,0	6,95	4,28
96	0,0	0,0	8,1	20,8	7,68	4,23
120	0,0	0,0	8,0	20,0	7,71	4,17



**Figura A.18** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 4).

**Tabela A.20** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 4).

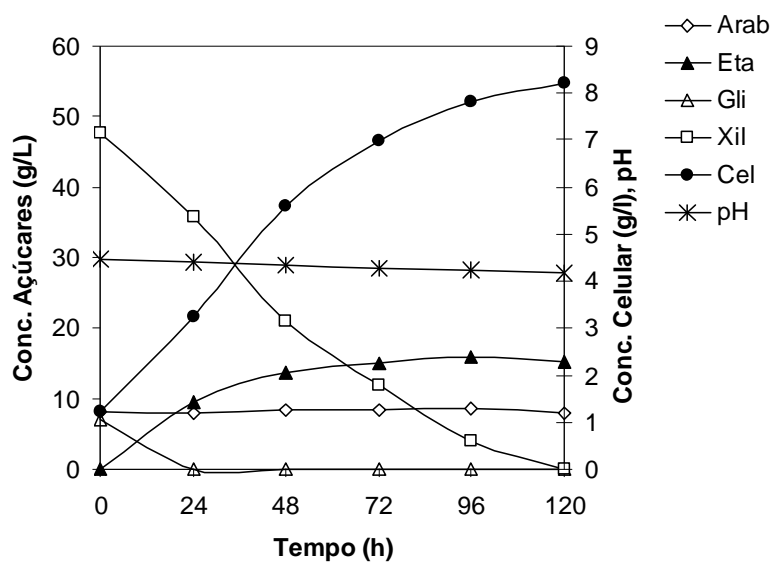
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,5	49,2	8,5	0,0	1,21	4,56
24	0,0	32,7	6,6	10,2	4,56	4,47
48	0,0	16,1	6,4	14,1	7,23	4,34
72	0,0	7,1	8,4	13,9	9,11	4,25
96	0,0	0,8	10,1	14,1	10,84	4,18
120	0,0	0,0	7,6	11,2	11,35	4,24



**Figura A.19** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 5).

**Tabela A.21** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 5).

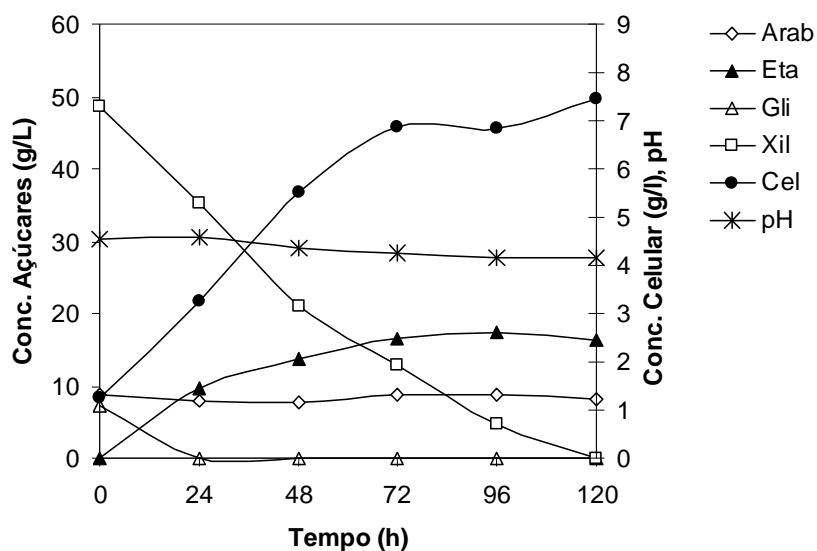
Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,6	50,0	8,8	0,0	1,26	4,38
24	0,0	36,7	8,7	10,6	3,28	4,43
48	0,0	21,5	8,8	14,2	5,48	4,33
72	0,0	12,3	8,7	17,4	6,92	4,29
96	0,0	4,6	9,1	17,7	7,74	4,19
120	0,0	0,0	8,1	19,0	7,84	4,18



**Figura A.20** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 6).

**Tabela A.22** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 6).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,1	47,6	8,2	0,0	1,23	4,46
24	0,0	35,8	7,9	9,6	3,25	4,39
48	0,0	21,0	8,3	13,6	5,61	4,35
72	0,0	11,9	8,4	14,9	6,98	4,28
96	0,0	3,9	8,7	15,8	7,81	4,22
120	0,0	0,0	7,9	15,3	8,19	4,16



**Figura A.21** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 7).

**Tabela A.23** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração (Ensaio 7).

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,4	48,7	8,8	0,0	1,25	4,54
24	0,0	35,3	8,0	9,6	3,25	4,58
48	0,0	21,0	7,8	13,9	5,51	4,37
72	0,0	13,0	8,9	16,6	6,88	4,26
96	0,0	4,7	8,8	17,4	6,85	4,16
120	0,0	0,0	8,1	16,4	7,46	4,15

## APÊNDICE A5 – REGRESSÕES PARA CÁLCULO DO FATOR DE CONVERSÃO EM ETANOL E EM CÉLULAS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>2</sup>

Encontram-se nesta seção as regressões lineares dos valores de  $\Delta P$  ou  $\Delta X$  em função de  $(-\Delta S)$ , para o cálculo do fator de conversão em etanol e em células, respectivamente, em cada ensaio realizado. Os valores para os fatores de conversão são fornecidos pelos coeficientes angulares das equações lineares:

Conversão em etanol:  $\Delta P = a + Y_{P/S} (-\Delta S)$

Conversão em células:  $\Delta X = a + Y_{X/S} (-\Delta S)$

**Tabela A.24** Cálculo do fator de conversão em etanol dos ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração.

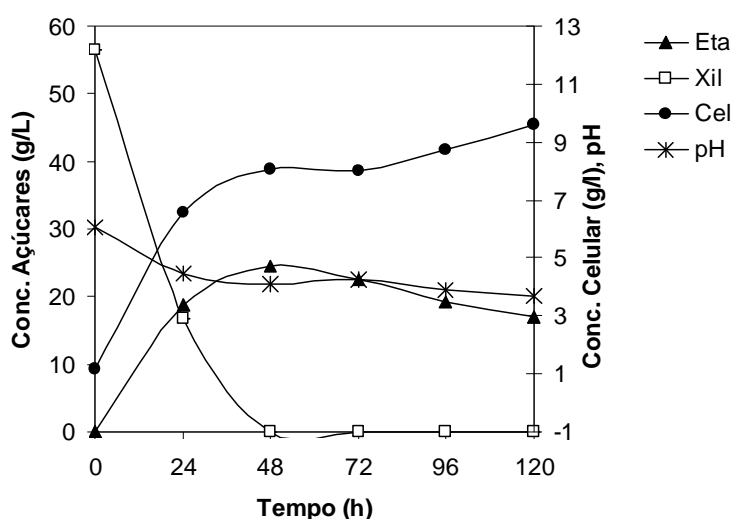
Ensaio	S						P						Y <sub>P/S</sub>	R <sup>2</sup>
	0	24	48	72	96	120	0	24	48	72	96	120		
1	64,7	53,4	46,1	38,4	37,1	31,0	0,0	5,3	9,4	11,6	13,3	13,9	<b>0,43</b>	0,98
2	62,6	47,4	29,2	22,3	15,1	8,3	0,0	8,5	13,3	15,5	15,8	15,8	<b>0,29</b>	0,91
3	63,6	39,0	22,5	11,9	8,1	8,0	0,0	11,7	18,5	21,0	20,8	20,0	<b>0,37</b>	0,96
4	65,2	39,2	22,5	15,5	10,9	7,6	0,0	10,2	14,1	13,9	14,1	11,2	<b>0,22</b>	0,79
5	66,3	45,5	30,3	21,0	13,7	8,1	0,0	10,6	14,2	17,4	17,7	19,0	<b>0,32</b>	0,95
6	62,9	43,7	29,3	20,3	12,6	7,9	0,0	9,6	13,6	14,9	15,8	15,3	<b>0,28</b>	0,90
7	64,9	43,4	28,7	21,9	13,5	8,1	0,0	9,6	13,9	16,6	17,4	16,4	<b>0,31</b>	0,93

**Tabela A.25** Cálculo do fator de conversão em células dos ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, para avaliação do efeito da aeração.

Ensaio	S						X						Y <sub>x/s</sub>	R <sup>2</sup>
	0	24	48	72	96	120	0	24	48	72	96	120		
1	64,7	53,4	46,1	38,4	37,1	31,0	1,2	1,6	2,6	3,3	3,7	4,1	<b>0,09</b>	0,96
2	62,6	47,4	29,2	22,3	15,1	8,3	1,2	3,2	5,1	5,9	6,5	7,1	<b>0,11</b>	1,00
3	63,6	39,0	22,5	11,9	8,1	8,0	1,3	3,4	5,4	6,9	7,7	7,7	<b>0,12</b>	0,98
4	65,2	39,2	22,5	15,5	10,9	7,6	1,2	4,6	7,2	9,1	10,8	11,3	<b>0,18</b>	0,97
5	66,3	45,5	30,3	21,0	13,7	8,1	1,3	3,3	5,5	6,9	7,7	7,8	<b>0,12</b>	0,99
6	62,9	43,7	29,3	20,3	12,6	7,9	1,2	3,2	5,6	7,0	7,8	8,2	<b>0,13</b>	0,99
7	64,9	43,4	28,7	21,9	13,5	8,1	1,2	3,2	5,5	6,9	6,9	7,5	<b>0,11</b>	0,97

## APÊNDICE A6 - CINÉTICA DE FERMENTAÇÃO NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS

Nesta seção encontram-se representados por meio de curvas e tabelas, os valores obtidos para todos os ensaios cinéticos das fermentações realizadas nas condições otimizadas. A concentração celular foi determinada pelo método de peso seco, e a concentração de açúcares e etanol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – WATERS). Foi também avaliado o valor de pH no meio, por potenciometria.

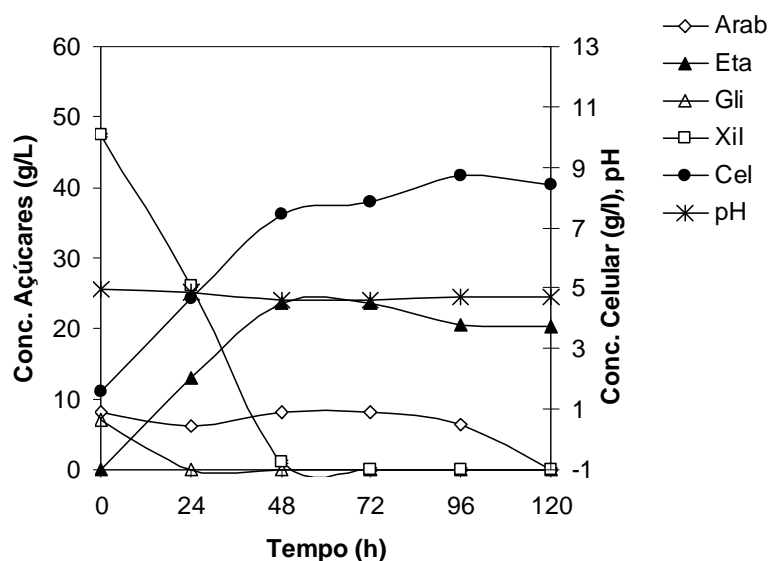


**Figura A.22** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio sintético, nas condições otimizadas de nutrição e aeração.

**Tabela A.26** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* em meio sintético, nas condições otimizadas de nutrição e aeração.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0		56,7		0,0	1,20	6,02
		56,3		0,0	1,14	6,13
24		17,1		18,2	6,65	4,43
		16,5		19,3	6,44	4,46
48		0,0		24,7	8,30	4,02
		0,0		24,1	7,87	4,15
72		0,0		22,6	8,19	4,34
		0,0		22,3	7,78	4,13
96		0,0		19,8	8,96	3,84
		0,0		18,5	8,54	3,91
120		0,0		17,7	9,72	3,7
		0,0		16,4	9,45	3,69

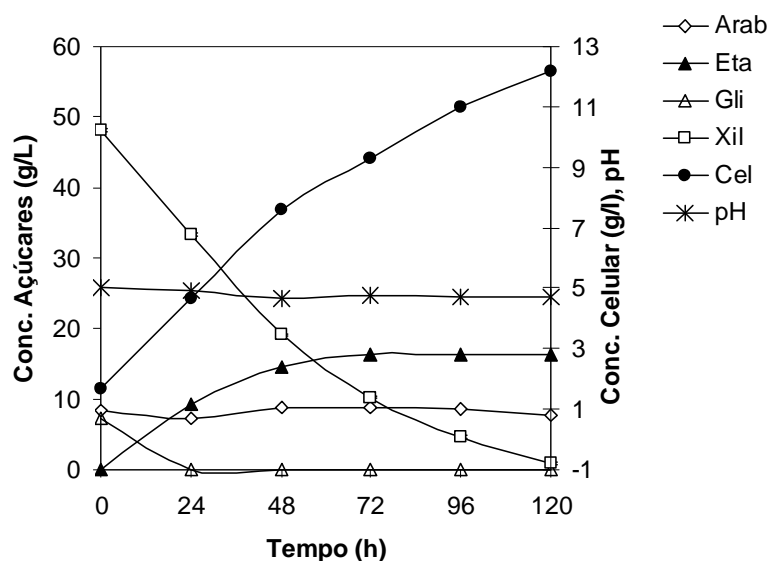




**Figura A.23** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas condições otimizadas de nutrição e aeração.

**Tabela A.27** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, nas condições otimizadas de nutrição e aeração.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,0	46,5	8,2	0,0	1,57	4,96
	7,3	48,3	8,3	0,0	1,60	4,95
24	0,0	26,8	6,4	12,8	4,62	4,77
	0,0	25,4	6,1	13,3	4,68	4,97
48	0,0	1,2	8,2	23,6	7,65	4,68
	0,0	0,8	8,1	23,5	7,20	4,51
72	0,0	0,0	8,0	22,8	7,97	4,65
	0,0	0,0	8,4	24,4	7,74	4,58
96	0,0	0,0	6,4	20,4	8,76	4,76
	0,0	0,0	6,4	20,6	8,70	4,68
120	0,0	0,0	0,0	20,0	8,57	4,71
	0,0	0,0	0,0	20,4	8,29	4,68



**Figura A.24** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, sem a adição de nutrientes e nas condições otimizadas de aeração.

**Tabela A.28** Ensaio fermentativo da produção de etanol por *Pichia stipitis* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, sem a adição de nutrientes e nas condições otimizadas de aeração.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Etanol (g/L)	Células (g/L)	pH
0	7,4	48,9	8,5	0,0	1,70	5,01
	7,1	47,2	8,3	0,0	1,67	5,03
24	0,0	34,8	8,3	9,0	4,72	4,99
	0,0	31,9	6,2	9,5	4,65	4,88
48	0,0	20,2	9,0	14,5	7,81	4,67
	0,0	18,0	8,6	14,7	7,39	4,65
72	0,0	11,3	9,0	16,0	9,21	4,79
	0,0	9,2	8,9	16,6	9,37	4,75
96	0,0	5,3	8,7	15,9	10,96	4,72
	0,0	3,9	8,7	16,6	11,06	4,71
120	0,0	1,4	8,8	16,0	12,49	4,76
	0,0	0,4	6,6	16,9	11,82	4,63