UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

ELIZABETH GONÇALVES DA SILVA

FERMENTAÇÃO DE LICOR DE HEMICELULOSE ADVINDO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE COM AS LEVEDURAS Scheffersomyces stipitis E Pachysolen tannophilus PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

GOIÂNIA/GO

2019



² A assinatura deve ser escaneada.

Versão atualizada em setembro de 2017.

ELIZABETH GONÇALVES DA SILVA

FERMENTAÇÃO DE LICOR DE HEMICELULOSE ADVINDO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE COM AS LEVEDURAS Scheffersomyces stipitis E Pachysolen tannophilus PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da universidade Federal de Goiás como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Processos Químicos e Biotecnológicos.

Orientadora: Prof. Dr.^a Inti Doraci Cavalcanti Montaño.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano

Suarez.

Goiânia-GO

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, Elizabeth Gonçalves da FERMENTAÇÃO DE LICOR DE HEMICELULOSE ADVINDO DO PRÉ-TRATAMENTO HIDROTÉRMICO DO BAGAÇO DE MALTE COM AS LEVEDURAS Scheffersomyces stipitis E Pachysolen tannophilus PARA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G [manuscrito] / Elizabeth Gonçalves da Silva 2019. 116 f.: il.
Orientador: Profa. Dra. Inti Doraci Cavalcanti Montaño; co orientador Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Quimica, Goiânia, 2019. Bibliografia. Inclui siglas, abreviaturas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.
1. Etanol 2G. 2. Hemicelulose. 3. Scheffersomyces stipitis. 4. Pachysolen tannophilus. 5. Xilose. I. Montaño, Inti Doraci Cavalcanti , orient. II. Título.
CDU 66.0



23070.027622/2019-75 0854857



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE QUÍMICA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 34 da sessão da Defesa de Dissertação de Elizabeth Gonçalves da Silva, que confere o título de Mestra em Engenharia Química, na área de concentração em Desenvolvimento de Processos.

Ao/s trinta de agosto de dois mil e dezenove, a partir da(s) \$h30min, no Auditório I do IQ II, realizou-se a sessão pública da Defesa de Dissertação intitulada "Fermentação de Licor de Hemicelulose Advindo do Pré-Tratamento Hidrotérmico do bagaço de Malte com as Leveduras Scheffersomyces stipitis e Pachysolen tannophilus para Produção de Etanol 2G". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Prof⁸. Dr³. Inti Doraci Cavalcanti Montano (IQ/UFG), com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez (IQ - UFG), coorientador, Prof⁸. Dr⁴. Fernanda Ferreira Freitas (IQ - UFG), membro titular interno e Prof. Dr. Fabrícia Paula de Faria (ICB - UFG), membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Prof⁸. Dr⁴. Inti Doraci Cavalcanti Montano (IQ/UFG), presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) trinta de agosto de dois mil e dezenove.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Referência: Processo nº 23070.027622/2019-75

SEI nº 0854857

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, proteção e pelas oportunidades que Ele coloca em meu caminho e a Nossa Senhora que passa na frente de todos os meus obstáculos e abre novos caminhos.

À minha família: mãe, irmãos e sobrinhos, pelo amor, palavras de ânimo e força. Em especial a minha mãe pelo apoio incondicional em todas as minhas decisões, pela dedicação, paciência e preocupação comigo neste período.

À minha orientadora Dr.^a Inti Doraci Cavalcanti Montano e co-orientador Dr. Carlos Alberto Galeano Suarez pela oportunidade e confiança deste projeto, orientação, ensinamentos e dedicação.

Ao professor Dr. Gabriel Luis Castiglioni pela paciência e dedicação com o meu projeto, pelas sugestões de melhorias e por ceder espaço, utensílios de laboratório e as análises do HPLC. À professora Dr.ª Fernanda Ferreira Freitas por ceder sua incubadora rotatória no intuito de acelerar minhas pesquisas. E ao colega de laboratório Alex pelo apoio nas análises de cinética de crescimento e pela amizade.

Aos professores e alunos do Departamento de Engenharia Química da Univerdade Federal de São Carlos – UFSCar, por ceder o laboratório e o biorreator para que os experimentos com controle de Oxigênio Dissolvido ocorressem.

Ao programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Goiás pelas condições dadas para o desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade de crescimento pessoal, acadêmico e profissional, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG) pelo apoio financeiro por meio da bolsa de estudos.

RESUMO

O etanol é considerado uma importante fonte de energia alternativa, que contribui para amenizar os problemas energéticos e o aquecimento global provocado pelo acúmulo de CO₂ oriundo da queima de combustíveis fósseis. Neste sentido, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos, conhecido como etanol de segunda geração (2G), vem se destacando por apresentar vantagens ambientais e econômicas. Entretanto, a viabilidade econômica desse processo depende do aproveitamento de todas as frações fermentescíveis presentes nos diferentes materiais lignocelulósicos em estudo, permitindo a conversão tanto da celulose (C6) quanto da hemicelulose (C5) em etanol. Após a etapa de hidrólise desses materiais gera-se como principais açúcares, glicose e xilose, respectivamente. A xilose não é fermentada pela Saccharomyces cerevisiae (levedura muito utilizada na produção de etanol 1G), no entanto, Scheffersomyces stipitis e Pachysolen tannophilus são considerados bons biocatalisadores para o combustível 2G. Este trabalho avaliou o consumo de xilose e os metabólitos produzidos em diferentes tipos de meio de fermentação (YPX, MMX e licor do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte suplementado) em sistema aeróbio e com limitação de oxigênio. Utilizando duas leveduras fermentadoras de pentose, a S. stipitis e P. tannophilus, como uma alternativa viável industrialmente para a produção de bioetanol em licor hemicelulósico do bagaço de malte, a fim de determinar entre as duas cepas citadas, uma levedura com elevada seletividade etanol/xilitol a partir da fermentação deste licor, através da conversão de xilose. Os cultivos foram realizados em frascos agitados de 500 mL de volume preenchido com 200 mL de meio inoculado a 200 rpm com temperatura de 30 °C; e em eppendorfs de 2 mL contendo 1,5 mL do meio inoculado a 100 rpm e 30 °C. Em cultivos com condições de aerobiose concentrações celulares de até 10,64 g/L foram atingidas com a cepa P. tannophilus no meio YPX comparado com a concentração celular de 5,42 g/L da cepa S. stipitis em meio YPX porém em limitação de oxigênio. Ao final do processo foram avaliados os parâmetros cinéticos de cada levedura nos diferentes meios de cultivo e os valores para velocidade específica máxima, fator de conversão xilose em células, fator de conversão xilose em etanol e em xilitol foram $\mu_{máx} = 0,21 \text{ h}^{-1}$ para a S. stipitis em meio YPX em condições de aerobiose, $Y_{x/s} = 0,56$ para *P. tannophilus* no meio

YPX em condições de aerobiose, Y_{P/S etanol} = 0,26 para S. stipitis em meio YPX com limitação de oxigênio, Y_{P/S xilitol} = 0,55 para *S. stipitis* em meio MMX com limitação de oxigênio. Porém para o meio pesquisado, o licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com componentes do MMX com ureia a 1,5 g/L, obteve melhores respostas para S. stipitis em relação a crescimento celular e produção de etanol em condições de aerobiose, já para a produção de etanol em condições de limitação de oxigênio obteve melhor rendimento a P. tannophilus, bem como para o fator de produção de xilitol nas duas condições de oxigenação estudadas. Portanto para melhor produção de etanol a levedura S. stipitis foi a que teve um maior Y_{P/S(etanol)} = 0,1 em condições aeróbias, e para a produção de xilitol a cepa P. tannophilus é a mais eficaz alcançando Y_{P/S(xilitol)} = 0,46 em condições de limitação de oxigênio. Já com o uso do meio LHBMS com ureia a 6 g/L a S. stipitis apresentou similaridade com os fatores de conversão da ureia (1,5 g/L) nas condições de oxigênio estudada, aumentando apenas o acúmulo de etanol principalmente em limitação de oxigênio, alcançando a 3,9 g/L. Neste meio para a P. tannophilus o rendimento não foi plausível, prevalecendo o meio com menor concentração de fonte de nitrogênio, pois este favoreceu à produção de ácido acético, inibindo o metabolismo celular dessa levedura.

Palavras-chave: Etanol 2G. Hemicelulose. *Scheffersomyces stipitis. Pachysolen tannophilus.* Xilose.

ABSTRACT

Ethanol is considered an important alternative energy source that contributes to alleviate energy problems and global warming caused by the accumulation of CO₂ from burning fossil fuels. In this sense, the production of ethanol from lignocellulosic materials, known as second generation ethanol (2G), has stood out for presenting environmental advantages and economical. However, the economic viability of this process depends on the utilization of all fermentable fractions present in the different lignocellulosic materials under study, allowing the conversion of both cellulose (C6) and hemicellulose (C5) into ethanol. After the hydrolysis step of these materials is generated as main sugars, glucose and xylose, respectively. Xylose is not fermented by Saccharomyces cerevisiae (yeast widely used in 1G ethanol production), however Scheffersomyces stipitis and Pachysolen tannophilus are considered good biocatalysts for 2G fuel. This work evaluated xylose consumption and metabolites produced in different types of fermentation media. (YPX, MMX and hydrothermal pretreatment liquor from brewer's spent grain supplemented) in aerobic system and with oxygen limitation. Using two pentose fermenting yeasts, S. stipitis and P. tannophilus, as an industrially viable alternative for the production of bioethanol in brewer's spent grain hemicellulosic liquor, in order to determine between the two strains cited, a yeast with high ethanol/xylitol selectivity from the fermentation of this liquor through the conversion of xylose. The crops were performed in shaken flasks 500 mL volume filled with 200 mL of inoculated media at 200 rpm with a temperature of 30 °C; and in 2 mL eppendorfs containing 1.5 mL of the inoculated media at 100 rpm and 30 °C. In cultures with aerobic conditions cell concentrations up to 10.64 g/L were achieved with the P. tannophilus strain in YPX media compared with the cell concentration of 5.42 g/L of the S. stipitis strain in YPX media but in oxygen limitation. At the end of the process were evaluated the kinetic parameters of each yeast in the different culture media and the values for maximum specific speed, xylose conversion factor in cells, xylose conversion factor in ethanol and xylitol were $\mu_{max} = 0.21 \text{ h}^{-1}$ to S. stipitis in the YPX media under aerobic conditions, $Y_{x/s} = 0.56$ to *P. tannophilus* in the YPX media under aerobic conditions, $Y_{P/S(etanol)} = 0,26$ to S. stipitis in the YPX media under oxygen limitation, Y_{P/S(xylitol)} = 0,55 to S. stipitis in the MMX media under oxygen limitation. But for the researched environment, hemicellulose liquor from brewer's spent grain supplemented with MMX components with 1.5 g/L urea obtained better responses for *S. stipitis* in relation to cell growth and ethanol production under aerobic conditions, already for ethanol production under conditions of oxygen limitation obtained better yield to *P. tannophilus*, as well as to the production factor of xylitol in the two oxygenation conditions studied. Therefore for better ethanol production the *S. stipitis* yeast had the highest $Y_{P/S(ethanol)} = 0,1$ under aerobic conditions, and for xylitol production the *P. tannophilus* strain is the most effective reaching $Y_{P/S(xylitol)} = 0,46$ under conditions of oxygen limitation. With the use of LHBMS media with urea at 6 g/L *S. stipitis* presented similarity with the conversion factors of urea (1.5 g/L) in the studied oxygen conditions, increasing only the accumulation of ethanol mainly in limitation of oxygen, reaching 3.9 g/L. In this media for *P. tannophilus* the yield was not plausible, prevailing the media with lower concentration of nitrogen source, because it favored the production of acetic acid, inhibiting the cellular metabolism of this yeast.

Keywords: 2G Ethanol. Hemicellulose. *Scheffersomyces stipitis. Pachysolen tannophilus*. Xylose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conversão de etanol de primeira geração. Mostram-se as etapas do processo de produção do biocombustível desde o pré-tratamento da matéria-prima até a separação em etanol e derivados.24 Figura 2 - Conversão de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica. Mostram-se as etapas do processo até a separação de produtos...25 Figura 3 - (a) Grão de cevada. (b) Bagaço de malte......27 Figura 6 - Formação da cadeia de celulose pela união de unidades β – d - glicose. 31 Figura 10 - (a) Precursores primários da lignina. (b) Estrutura molecular da lignina. 35 Figura 11 - Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina Figura 12 - Rota metabólica da xilose em leveduras......42 Figura 13 – Fermentação de diversos meios de cultivo utilizando as leveduras S. Figura 14 – Biorreator minifors 2 utilizado nas fermentaçãoes das leveduras S. stipitis e *P. tannophilus* a partir do LHBMS com controle de oxigênio dissolvido......58 Figura 15 - Crescimento aeróbio da cepa S. stipitis no meio YPX, MMX e Licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com componentes do MMX.63 Figura 16 - Crescimento aeróbio da cepa *P. tannophilus* no meio YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com componentes do MMX....64 Figura 17 – Consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio MMX em condições aeróbias.66 Figura 18 - Consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio YPX em condições aeróbias.66 Figura 19 - Consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado em condições aeróbias......67

Figura 20 - Consumo de xilose e produtos obtidos por *P. tannophilus* em meio MMX em condições aeróbias.68 Figura 21 - Consumo de xilose e produtos obtidos por *P. tannophilus* em meio YPX em condições aeróbias.69 Figura 22 - Consumo de xilose e produtos obtidos por *P. tannophilus* em meio licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado em condições aeróbias..........70 Figura 23 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da S. stipitis em meio MMX com limitação de oxigênio......73 Figura 24 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da S. stipitis em meio YPX com limitação de oxigênio.....74 Figura 25 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da S. stipitis em meio licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com limitação de oxigênio......75 Figura 26 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da P. tannophilus Figura 27 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da P. tannophilus em meio YPX com limitação de oxigênio.77 Figura 28 - Consumo de xilose e produtos obtidos da fermentação da P. tannophilus em meio licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com limitação de Figura 29 - Crescimento celular da fermentação no biorreator a partir do meio LHBMS sob 30 °C e um pH de 5,5, sob três condições de concentração de oxigênio dissolvido das cepas (a) S. stipitis (b) P. tannophilus......81 Figura 30 – Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 10 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de Figura 31 – (A) CO_2 % e (B) O_2 %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 10 % de OD......84 Figura 32 - Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 5 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de oxigênio dissolvido......85

Figura 33 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 5 % de OD......86 Figura 34 – Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 1 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de Figura 35 - (A) CO_2 % e (B) O_2 %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para S. stipitis em biorreator com 1 % de OD......87 Figura 36 – Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para *P. tannophilus* em biorreator com 10 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de oxigênio dissolvido......88 Figura 37 – (A) CO_2 % e (B) O_2 %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para P. tannophilus em biorreator com 10 % de OD.89 Figura 38 - Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para P. tannophilus em biorreator com 5 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de oxigênio dissolvido......90 Figura 39 - (A) CO_2 % e (B) O_2 %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para P. tannophilus em biorreator com 5 % de OD.90 Figura 40 - Monitoramento dos parâmentros experimentais obtidos pelo sistema EVE ao longo da fermentação para P. tannophilus em biorreator com 1 % de OD. (A) Fluxo de ar, (B) Velocidade de agitação, (C) Temperatura e pH, (D) Concentração de oxigênio dissolvido......91 Figura 41 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, dos gases de escape obtidos pelo sistema HOBO ao longo da fermentação para P. tannophilus em biorreator com 1 % de OD.92 Figura 42 - Consumo de xilose e produtos obtidos do crescimento celular da S. stipitis e P. tannophilus no meio LHBMS em biorreator com condições de 10 %, 5 % e 1 % de OD......93 Figura 43 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio LHBMS com (NH₄)₂SO₄ a 4 g/L em condições aeróbias......95

celular, consumo de xilose e produtos Figura 44 - Crescimento obtidos por S. stipitis em meio LHBMS com (NH₄)₂SO₄ a 6 g/L em condições aeróbias......96 Figura 45 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio LHBMS com ureia a 4 g/L em condições aeróbias......96 Figura 46 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio LHBMS com ureia a 6 g/L em condições aeróbias......97 Figura 47 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por P. tannophilus em meio LHBMS com (NH₄)₂SO₄ a 4 g/L em condições Figura 48 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por *P. tannophilus* em meio LHBMS com (NH₄)₂SO₄ a 6 g/L em condições Figura 49 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por P. tannophilus em meio LHBMS com ureia a 4 g/L em condições Figura 50 - Crescimento celular, consumo de xilose e produtos obtidos por P. tannophilus em meio LHBMS com ureia a 6 g/L em condições aeróbias......100 Figura 51 - Consumo de xilose e produtos obtidos por S. stipitis em meio LHBMS com ureia a 6 g/L em condições de limitação de oxigênio.102 Figura 52 - Consumo de xilose e produtos obtidos por P. tannophilus em meio LHBMS com ureia a 6 g/L em condições de limitação de oxigênio......103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio GPY líquido e sólido47
Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo. 48
Tabela 3 - Valores de $\mu_{máx}$ (h ⁻¹) para as leveduras <i>S. stipitis</i> e <i>P. tannophilus</i> nos
meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado
(LHBMS) em condição aeróbia64
Tabela 4 - Valores de Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras S. stipitis e
P. tannophilus nos meios YPX, MMX e LHBMS em condições de aerobiose70
Tabela 5 - Valores de Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras S. stipitis e
P. tannophilus nos meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte
suplementado com componentes do MMX com condições de limitação de oxigênio.
Tabela 6 - Valores de Seletivadade (g/g) para as leveduras S. stipitis e P.
tannophilus obtidos da fermentação a partir do LHBMS80
Tabela 7 - Valores de $\mu_{máx}$ (h ⁻¹) para as leveduras <i>S. stipitis</i> e <i>P. tannophilus</i> no meio
LHBMS em 10 %, 5 % e 1 % de OD em fermentações realizadas em biorreator82
Tabela 8 - Valores de $\mu_{máx}$ (h ⁻¹), Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras
S. stipitis e P. tannophilus nos meios LHBMS com (NH ₄) ₂ SO ₄ (4 g/L e 6 g/L) e ureia
(1,5 g/L, 4 g/L e 6 g/L) em condições de aerobiose101
Tabela 9 - Valores de $\mu_{máx}$ (h ⁻¹), Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras
S. stipitis e P. tannophilus nos meios LHBMS com ureia (1,5 g/L e 6 g/L) em
condições de limitação de oxigênio104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1G	Primeira geração
2G	Segunda geração
A	Número de células
ADH	Álcool desidrogenase
AFEX	Ammonium Fibre explosion
AR	Açúcar Redutor
ATP	Trifosfato de adenosina
BNDS	Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social
С	Concentração do metabólito produzido ao final da fermentação
	(g _{produto} /L)
C1	Concentração do pré-inóculo
C ₁	Concentração do metabólito 1 produzido na fermentação (g _{produto} /L)
C2	Concentração final do meio do erlenmeyer já com a adição da levedura
	Ativada
C ₂	Concentração do metabólito 2 produzido na fermentação (g _{produto} /L)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
СоА	Coenzima A
D	Fator de diluição (inverso da diluição utilizada)
DNS	3,5-Dinitrossalicilato
D.O.	Densidade ótica
F6P	Fructose-6-fosfato
GA3P	Gliceraldeído-3-fosfato
IR	Infravermelho
LHBMS	Licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com
	componentes do meio MMX
MMX	Meio Mínimo
Ν	Concentração celular (células/mm ³)
NAD+	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido

OD	Oxigênio Dissolvido
р	Produtividade do metabólito produzido (g _{produto} /L.h)
Р	Concentração de produto (g _{produto})
P ₀	Concentração de produto no tempo zero (g _{produto})
PDC	Piruvato descarboxilase
рН	Potencial hidrogeniônico
PPG	Polipropilenoglicol
PPP	Pentose Phosphate Pathway
Proálcool	Programa Nacional do Álcool
qs	Quantidade suficiente
R ²	Coeficiente de determinação
S	Concentração de substrato (g _{substrato})
S ₀	Concentração de substrato no tempo zero (g _{substrato})
Smetabólito 1/metabólito 2	Seletividade do metabólito 1 em relação ao metabólito 2
Т	Tempo de fermentação (h)
t	Tempo referente à concentração de biomassa (h)
t ₀	Tempo referente à concentração de biomassa no tempo zero (h)
TLK	Transcetolases
UV	Ultravioleta
V	Volume da Câmara de Neubauer
V ₁	Alíquota do pré-inóculo a ser retirado (mL);
V ₂	Volume final da solução a ser preparada (mL).
Х	Concentração de biomassa (g _{células})
X ₀	Concentração de biomassa no tempo zero (g _{células})
X5P	Xilulose–5–fosfato
XDH	Xilitol desidrogenase
XI	Xilose isomerase
XKS	Xilulokinase endógena ou heteróloga
XR	Xilose redutase
Y _{P/S}	Fator de conversão de substrato a produto (g _{produto} /g _{substrato})
YPX	Meio complexo
Y _{X/S}	Fator de conversão de substrato em biomassa (g _{células} /g _{substrato})
μ _{máx}	Velocidade específica máxima de crescimento celular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1	DIFERENÇA ENTRE BIOCOMBUSTÍVEIS DE PRIMEIRA E SEGUND GERAÇÃO (2G)	۹ 23
3.2	BAGAÇO DE MALTE, FONTE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO	26
3.3	COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS	28
3.3.	Celulose	30
3.3.	2 Hemicelulose	32
3.3.	3 Lignina	35
3.4	PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	36
3.5	HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE	39
3.6	FERMENTAÇÃO DE D-XILOSE	41
3.7	Scheffersomyces stipitis	43
3.8	Pachysolen tannophilus	44
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO	46
4.1.	Meio de ativação das leveduras	46
4.1.	2 Meio de crescimento sólido	47
4.2	MEIOS DE CRESCIMENTO	47

4.2.1	Preparo do meio YPX	48
4.2.2	Preparo do meio MMX	49
4.2.3 su	Preparo do meio do licor da hemicelulose do bagaço de ma uplementado	lte 49
4.3	ANÁLISES	50
4.3.1	Quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois	50
4.3.2 [Densidade ótica e massa seca	50
4.3.3 (Quantificação de açúcar redutor pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)	51
4.3.4 \	∕iabilidade celular	52
4.4	ESTIMATIVA DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS	53
4.4.1 (Y	Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e substrato em produ $Y_{P/S}$) 53	uto
4.4.2	Seletividade	54
4.4.3	Velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{máx}$)	55
4.5	CRESCIMENTO AERÓBIO DAS LEVEDURAS <i>S. stipitis</i> E <i>P. tannophilus</i> EM SHAKER	55
4.6	FERMENTAÇÃO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO DAS CEPAS S. stipitis E P. tannophilus EM SHAKER	57
4.7	FERMENTAÇÃO DO LHBMS PELAS LEVEDURAS <i>S. stipitis</i> E <i>P. tannophilus</i> EM BIORREATOR	57
4.7.1	Preparação do pré-inóculo	59
4.7.2	Preparação do inóculo	59
4.7.3	Preparação do cultivo em biorreator	59
4.8	INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus A PARTIR DO LHBMS	60
5 R	ESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	FERMENTAÇÃO AERÓBIA DAS LEVEDURAS <i>S. stipitis</i> E <i>P. tannophilus</i> EM SHAKER	61
5.1.1	Produção de metabólitos durante o crescimento celular	65

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS107	
6 C	ONCLUSÃO105
5.5.2	Fermentação com limitação de oxigênio das leveduras S. stipitis e P.tannophilus em shaker101
5.5.1	Fermentação aeróbia das leveduras <i>S. stipitis</i> e <i>P. tannophilus</i> em shaker 94
5.4	INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO DASLEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus A PARTIR DO LHBMS94
5.4.7	Produção de metabólitos durante a fermentação realizada em reator92
5.4.6 di	Cultivo da cepa <i>P. tannophilus</i> em biorreator com 1 % de oxigênio ssolvido91
5.4.5 di	Cultivo da cepa <i>P. tannophilus</i> em biorreator com 5 % de oxigênio ssolvido
5.4.4 di	Cultivo da cepa <i>P. tannophilus</i> em biorreator com 10 % de oxigênio ssolvido
5.4.3	Cultivo da cepa S. stipitis em biorreator com 1 % de oxigênio dissolvido 86
5.4.2	Cultivo da cepa S. stipitis em biorreator com 5 % de oxigênio dissolvido 85
5.4.1	Cultivo da cepa S. stipitis em biorreator com 10 % de oxigênio dissolvido83
5.3	FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EMBIORREATOR COM REGIME DE BATELADA SIMPLES81
5.2	FERMENTAÇÃO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO DAS LEVEDURAS S.stipitis E P. tannophilus EM SHAKER72

1 INTRODUÇÃO

Até o final da década de 1970 a produção de biocombustíveis era insignificante, pois o etanol era utilizado em sua maioria apenas como matéria-prima das indústrias de bebidas. Contudo com a implantação pelo governo brasileiro, em 1975, do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) mudou significativamente a produção de biocombustíveis no país. Isto ocorreu devido à elevação dos preços do petróleo, que logo em seguida normalizaram provocando um período de estagnação de aproximadamente 15 anos. Após esse período a produção mundial de etanol voltou a crescer (ROSA; GARCIA, 2009).

Com a crescente preocupação das questões energéticas, ambientais, econômicas e de reduzir significativamente as emissões de gases tóxicos para a atmosfera, associadas à dependência do petróleo, os biocombustíveis tornaram-se uma eficiente solução de fontes renováveis de energia. Estima-se que a demanda global de biocombustíveis para o transporte rodoviário passará de 32,4 bilhões de galões em 2013 para 51,1 bilhões de galões até 2022 (NAVIGANT RESEARCH, 2014; SOUZA, 2011). Por isso estes biocombustíveis têm sido objetos de grandes pesquisas, em virtude do seu uso e de sua produção serem economicamente viáveis e sustentáveis, além de ser uma alternativa ao petróleo.

O termo biocombustível aplica tanto para os combustíveis líquidos quanto para os gasosos e são produzidos principalmente de biomassa. Dentre os principais biocombustíveis produzidos a partir destes recursos naturais, destaca-se o etanol, álcool etílico (C₂H₅OH) (FERREIRA, 2015). Atualmente o etanol é produzido praticamente usando milho ou cana-de-açúcar, considerado etanol de primeira geração (LOPES et al. 2016). O produzido a partir de biomassa lignocelulósica, resíduos de culturas agrícolas, é o considerado etanol de segunda geração (2G). Os dois processos possuem duas etapas principais, a geração de açúcares fermentáveis de biomassa e a fermentação para etanol (SILVA et al., 2018). Entretanto, a produção de etanol 2G enfrenta desafios relacionados à hidrólise da biomassa lignocelulósica que necessita de diferentes procedimentos e/ou enzimas, e por conter em seu hidrolisado açúcares de pentose (5C), hemicelulose e por serem liberados altos níveis de compostos tóxicos e ácidos durante o tratamento da lignocelulose. Todos esses desafios devem ser considerados e minimizados para gerar um processo de produção eficiente (NOGUÉ; KARHUMAA, 2014).

A biomassa lignocelulósica é considerada como a matéria-prima do futuro para a fabricação de etanol (SOUZA, 2011). Podem ser utilizadas para esta fabricação madeiras, gramíneas, qualquer material que contenha celulose ou hemicelulose (MATOS et al., 2018). Essa biomassa lignocelulósica é mais abundante que as culturas alimentares e são utilizadas sem causar interferência na economia alimentar (ROSSI et al., 2014). A biomassa é constituída de 20 % a 60 % de celulose, que pode ser convertida a glicose por ação enzimática, após o prétratamento para desarranjo do complexo lignocelulósico. Em seguida faz-se a hidrólise da celulose e da hemicelulose para um melhor aproveitamento dos resíduos agroindustriais, fornecendo carboidratos (hexoses e pentoses), que futuramente resulta em etanol por microrganismos fermentadores (SANTOS, 2012).

De acordo com Souza (2011), para obtenção de álcool é necessário inicialmente o preparo do substrato, a fermentação e finalmente a destilação. A primeira fase extrai os açúcares fermentescíveis, a fermentação transforma os açúcares em etanol e dióxido de carbono, e a destilação consiste na retirada e purificação de uma mistura hidroalcoólica.

Neste trabalho foi utilizado como fonte de material lignocelulósico para a produção de etanol um dos maiores resíduos da indústria cervejeira, o bagaço de malte. A produção de etanol com essa biomassa baseia-se no pré-tratamento do bagaço de malte para separação da lignina, celulose e hemicelulose. Chu e Lee (2007) afirmam que para obter altos rendimentos de etanol dos resíduos lignocelulósicos deve-se fazer uso eficiente tanto da glicose obtida da celulose quanto da xilose oriunda da hemicelulose.

Segundo Patiño Lagos (2015), o açúcar mais abundante após a glicose na biomassa lignocelulósica é a xilose, podendo ser fermentada por uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae*, porém com baixa eficácia da fermentação, pois essa levedura não tem a capacidade para utilizar as pentoses presentes na hemicelulose, como a xilose e arabinose.

Poucos são os microrganismos que possuem a capacidade de converter xilose em etanol, entre eles estão as leveduras *Pachysolen tannophilus* e

Scheffersomyces stipitis, identificadas com alto potencial de fermentação alcoólica das pentoses (MEI, 2018; BETANCUR; PEREIRA, 2010).

Em virtude destes fatos, esta dissertação visa trabalhar com a fração de hemicelulose do bagaço de malte. Serão utilizadas as leveduras *P. tannophilus* e *S. stipitis* para fermentar a xilose, com o objetivo de avaliar o efeito dos componentes inibidores contidos no licor do pré-tratamento sobre o crescimento e produção de metabólitos das leveduras estudadas. E determinar entre as cepas citadas, uma levedura com elevada seletividade etanol/xilitol no licor de hemicelulose do bagaço de malte.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar entre as cepas *Pachysolen tannophilus* e *Scheffersomyces stipitis,* uma levedura com elevada seletividade etanol/xilitol a partir da fermentação do licor de hemicelulose do bagaço de malte, através da conversão de xilose.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desempenho das duas cepas na fermentação em três diferentes meios de cultivo: meio complexo (YPX), mínimo (MMX) e licor de hemicelulose do bagaço de malte suplementado com meio mínimo (LHBMS), em condições aeróbias e micro-aeróbias;
- Verificar se há influência da fonte de nitrogênio no meio de fermentação para a produção de etanol / xilitol.

3 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

3.1 DIFERENÇA ENTRE BIOCOMBUSTÍVEIS DE PRIMEIRA E SEGUNDA GERAÇÃO (2G)

Segundo o Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social (BNDS) (2008) o desenvolvimento dos biocombustíveis aumentou e teve repercussão mundial em virtude da preocupação com o desenvolvimento de fontes energéticas renováveis e mais limpas, quando comparadas com os combustíveis fósseis.

Os combustíveis líquidos de primeira geração são produzidos principalmente de culturas alimentares como cereais, açúcares e sementes oleaginosas (SIMS et al., 2010). O etanol produzido a partir de açúcar pode ser oriundo da cana-de-açúcar e melaço, e também pode ser produzido do amido proveniente da mandioca, arroz e milho (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2018). Porém apresenta diversos problemas, ao utilizar como insumo grãos, por exemplo, milho ou canola, possuem impacto negativo nos preços de alimentos, considera-se que apenas o uso da cana-de-açúcar tenha rendimento e impactos positivos. Estes combustíveis de primeira geração (1G) são produzidos em sua maioria com a fermentação por variedades de leveduras convencionais (BIODIESELBR, 2008), como ilustrado na Figura 1.

Com exceção da cana-de-açúcar, a produção de etanol por meio do amido, do milho e da beterraba, apresenta desvantagem por serem melhores viabilizados na alimentação. E em virtude da cana-de-açúcar não ser uma opção viável para todas as regiões do planeta, países do hemisfério norte procuram por novas tecnologias que permitam a produção eficiente de um biocombustível, tanto em relação ao ambiental quanto ao econômico. Praticamente os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e até o lixo urbano apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (BNDS, 2008). Estes materiais lignocelulósicos podem ser resíduos de madeira por possuirem açúcares, bagaço de cana-de-açúcar, cascas, gramíneas, resíduos florestais, resíduos municipais, palha de milho, trigo, arroz, pele de mandarina, limão, laranja, dentre outros. O etanol produzido a partir de materiais lignocelulósicos é uma alternativa economicamente viável e não interfere com o suprimento alimentício (SRITRAKUL; NITISINPRASERT; KEAWSOMPONG, 2018).

FIGURA 1 – CONVERSÃO DE ETANOL DE PRIMEIRA GERAÇÃO. MOSTRAM-SE AS ETAPAS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DO BIOCOMBUSTÍVEL DESDE O PRÉ-TRATAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA ATÉ A SEPARAÇÃO EM ETANOL E DERIVADOS.



Fonte: Portal do biogás (2014).

O país considerado o maior produtor mundial de etanol, utilizando como matéria-prima o milho, é o Estados Unidos, o segundo maior produtor é o Brasil que utiliza a cana-de-açúcar. Na União Europeia o álcool é produzido a partir de batatas e beterrabas, no entanto é um processo menos produtivo (PATIÑO LAGOS, 2015).

Já os biocombustíveis de segunda geração ou bioetanol são produzidos a partir de matéria-prima da biomassa lignocelulósica que incluem os subprodutos

como palha de cereais, palha da cana-de-açúcar, sabugo do milho, bagaços, resíduos florestais, resíduos oriundos de componentes orgânicos sólidos municipais e matérias-primas como gramíneas vegetativas e outras culturas energéticas (SIMS et al., 2010; FERREIRA, 2015). Particularmente, o etanol celulósico ou etanol 2G é um combustível líquido que pode aproveitar uma diversidade de matérias-primas com alta biomassa lignocelulósica, geralmente resíduos de diversos processos agrícolas, para sua produção, configurando uma opção para o uso energético da biomassa, com amplas vantagens ambientais e econômicas, todavia com algumas dificuldades operacionais (PATIÑO LAGOS, 2015).

O etanol 2G tem uma grande relevância em relação ao etanol de primeira geração, pois as matérias-primas para sua produção não competem com a produção de alimentos (FERREIRA, 2015). Portanto, os combustíveis 2G utilizam como matéria-prima a biomassa vegetal não alimentar, cujo processo é representado abaixo na Figura 2.

FIGURA 2 - CONVERSÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO A PARTIR DE BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA. MOSTRAM-SE AS ETAPAS DO PROCESSO ATÉ A SEPARAÇÃO DE PRODUTOS.



Fonte: Adaptado de Patiño Lagos (2015).

A produção do etanol 2G acontece por meio de hidrólise, podendo ser ácida ou enzimática, para desintegrar a parede celular com a finalidade de utilizar os polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis (RUBIN, 2008).

De acordo com a GRANBIO (2014), que é uma empresa pioneira de biotecnologia industrial, a Bioflex 1 é a primeira indústria de etanol 2G em escala

comercial do Hemisfério Sul, localizada em São Miguel dos Campos, Alagoas. Ela começou a funcionar em setembro de 2014 e possui capacidade para produzir 82 milhões de litros do biocombustível por ano.

O ano de 2017 teve grande relevância para o setor de biocombustíveis no Brasil, com a promulgação da Lei nº 13.576, de 26 de dezembro de 2017, que dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio). Esta lei tem como um dos seus principais objetivos o de estabelecer o crescimento da produção e o uso de biocombustíveis no país. Por consequência, a RenovaBio contribui para a minimização de emissões de gases causadores do efeito estufa. O resultado destas ações empreendidas começou a ser colhido a partir de 2018, atraindo investimentos, crescimento econômico e geração de emprego e renda, consolidando um espaço ainda maior para os biocombustíveis no setor energético brasileiro (COELHO, 2018).

3.2 BAGAÇO DE MALTE, FONTE DE MATERIAL LIGNOCELULÓSICO

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo (CHEIRAN et al. 2019). Segundo Mussatto, Dragone e Roberto (2006), o bagaço de malte representa aproximadamente 85 % dos subprodutos totais gerados na fabricação da cerveja. O malte é obtido através da cevada, grão formado por casca, embrião e endosperma, tem sua casca como proteção externa para o grão, sendo constituída de material lignocelulósico. Ela passa por um processo de maltagem, mantida armazenada até a germinação, esse processo eleva o teor de enzimas dos grãos. No processo cervejeiro são removidos da cevada malteada apenas os nutrientes importantes para a fabricação do mosto, restando o bagaço do malte. A figura 3 abaixo ilustra o grão de cevada e o bagaço de malte oriundo do processo cervejeiro (DRAGONE, 2007).



FIGURA 3 - (a) GRÃO DE CEVADA. (b) BAGAÇO DE MALTE.

Fonte: adaptado de Dragone (2007).

Para Dragone (2007), o bagaço de malte é uma biomassa lignocelulósica rica por cerca de 20 a 30 % de proteínas e de 70 a 80 % de fibras, sendo que a hemicelulose, celulose e lignina são os principais componentes destas fibras.

Resumidamente, Garcia (2012) relata o processo da produção de malte conforme esquematizado na figura 4. A cevada passa pelo processo de maltagem para obtenção do malte, em seguida vai para moagem, para facilitar sua solubilização na água pela diminuição de tamanho que ocorre no processo seguinte de mosturação, sob diferentes temperaturas, para favorecer os processos enzimáticos, como a conversão do amido em açúcares fermentáveis (maltose e maltotriose) e não fermentáveis (dextrinas). Ao final do processo, ocorre a filtração, onde é separada a fração líquida, o mosto, visando à produção de cerveja, e a fração sólida representada pelo bagaço de malte.



FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DE BAGAÇO DE MALTE.

Fonte: Adaptado de Garcia (2012).

A composição química do bagaço de malte pode variar conforme o tipo de cevada utilizada, o tempo de colheita, condições de malteação e mosturação a que esta foi submetida e o tipo de adjuntos como arroz e milho, adicionados ao processo cervejeiro (GARCIA, 2012). É, portanto um material lignocelulósico contendo em média 17 % de celulose, 28 % de polissacarídeos não celulósicos, principalmente arabinoxilanos (hemicelulose) e 28 % de lignina (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

3.3 COMPOSIÇÃO DOS RESÍDUOS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente pelos compostos estruturais ou celulares, consistindo em celulose, lignina, hemicelulose e outros

constituintes menores. Estes incluem compostos orgânicos chamados de extrativos (ésteres, álcoois, esteróides e outros) e inorgânicos (sulfatos, oxalatos, carbonatos e silicatos de cálcio, potássio e magnésio, principalmente). A hemicelulose e celulose são estruturas rígidas e fibrosas, consistindo em cerca de 70 % da massa seca da biomassa lignocelulósica, entremeadas por uma macromolécula composta por álcoois aromáticos, a lignina, que se encontra unida por ligações covalentes e de hidrogênio (SANTOS, 2012; FERREIRA, 2015).

Para Rubin (2008) o principal componente da lignocelulose é a celulose, formada por uma cadeia de moléculas de glicose. As ligações de hidrogênio entre diferentes camadas dos polissacarídeos conferem a resistência da celulose cristalina à degradação. Em segundo vem a hemicelulose composta por pentoses e hexoses, como arabinose, galactose, glicose, manose e xilose. E por último a lignina formada por três álcoois fenólicos. Esses três componentes formam microfibrilas organizadas em macrofibrilas que conferem rigidez à parede celular da planta. Os componentes da lignocelulose são apresentados na Figura 5 a seguir.

Patiño Lagos (2015) apresenta dados que ratificam o quão viável é o reaproveitamento da biomassa lignocelulósica na produção de etanol 2G, citando que para a fabricação do etanol de primeira geração em 160 kg de sacarose obtémse 80 L de etanol, e do bagaço retira-se da parte da celulose em torno de 60 kg de glicose e 3 kg de galactose o que corresponde aproximadamente 30 L de etanol 2G, da fração hemicelulósica obtém-se aproximadamente 33 kg de xilose e 3kg de arabinose que corresponde cerca de 17 L de etanol 2G.



FIGURA 5 - ESTRUTURA DA LIGNOCELULOSE.

Fonte: Rubin (2008).

3.3.1 Celulose

Celulose é um polímero estruturado da celobiose cujo comprimento pode apresentar 10.000 unidades de glicose na cadeia da celulose presentes nas fibrilas (PATIÑO LAGOS, 2015). É a base estrutural das células das plantas, formada através de ligações de hidrogênio entre grupos hidroxila (OH), chamadas de ligações intramoleculares, quando as ligações são na mesma molécula, ou intermoleculares, quando as ligações ocorrem entre moléculas adjacentes. Estas posições das ligações e as pontes de hidrogênio que conferem à celulose rigidez, um polímero difícil de ser quebrado (VIEIRA, 2016; FERREIRA, 2015). As ligações intermoleculares são responsáveis pela rigidez e as ligações intramoleculares, pela formação de fibrilas, estruturas ordenadas que se associam resultando nas fibras de celulose (SILVA, 2010). A rigidez da parede celular das plantas é proveniente da celulose ($C_6H_{10}O_5$)_n. Esta característica é pertinente às microfibrilas dentro da estrutura da celulose, elas estão entrelaçadas com um diâmetro de aproximadamente 2 a 20 nm e um comprimento de 100 a 40.000 nm (AGARWAL; MACNAUGHTAN; FOSTER, 2017).

A celulose é formada pela união de moléculas de glicose através de ligações β-1,4-D-glicosídicas, organizada de moléculas grandes formadas pela junção de várias moléculas menores, compostas de um só monômero (glicose), classificado como polissacarídeo ou carboidrato (NADUPARAMBATH et al., 2017; ROSA; GARCIA, 2009), conforme apresentado na Figura 6 que apresenta a formação da molécula de celulose via eliminação de água.

FIGURA 6 - FORMAÇÃO DA CADEIA DE CELULOSE PELA UNIÃO DE UNIDADES β – D - GLICOSE.



Fonte: Morais, Nascimento e Melo (2005).

Cada molécula de celulose é constituída por mais de mil monômeros de glicose, dispostas de maneira desordenada e em outros pontos, ordenadamente, resultando nas micelas de estrutura cristalina. Entre as fibrilas, microfibrilas e fibrilas elementares encontram-se a hemicelulose e a lignina (SANTOS, 2012). Para que

seja obtida a glicose é necessário que haja hidrólise enzimática, com enzimas celulases, ou hidrólise química, utilizando ácidos como ácido sulfúrico, na fração celulósica (VIEIRA, 2016).

3.3.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolissacarídeo composto por hexoses (D-glicose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose, L-arabinose), ácido acético e ácido D-glucurônico. As pentoses e as hexoses são unidas através de ligações glicosídicas, frequentemente acetiladas, é uma estrutura hidrofílica que atua como adesivo entre a celulose e a lignina. São classificadas de acordo com os açúcares contidos na cadeia polimérica principal, podendo ser xilana, glucomanana e galactana. Geralmente esse heteropolissacarídeo é composto por mais de um tipo desses açúcares e varia de acordo com a planta. A xilana é a hemicelulose de maior proporção no bagaço, considerado o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, que consiste em moléculas de xilose unidas por ligação β -1,4 (PATIÑO LAGOS, 2015; VIEIRA, 2016; SANTOS, 2012).

As diversas ligações, ramificações e unidades monoméricas conferem complexidade à estrutura hemicelulósica. Os açúcares obtidos do material lignocelulósico referem-se ao enantiômero D (por exemplo, D-xilose) mesmo quando não citado será referido a este enantiômero (FERREIRA, 2015). A hemicelulose se organiza de diferentes estruturas, lineares, nas homoxilanas, e ramificadas, nas heteroxilanas (GRACIOLI, 2018).

As homoxilanas são homopolissacarídeos de xilose não ramificados, incluem as β -1,4-D-xilanas (Figura 7a), as β -1,3-D-xilanas (Figura 7b), e as β -1,3; 1,4-D-xilanas (Figura 7c). Estas últimas são pouco comuns em ambientes naturais, obtidas de alguns tipos de algas e plantas (GRACIOLI, 2018).





Fonte: Gracioli (2018).

A Figura 8 apresenta a estrutura molecular das cadeias de heteroxilanas, polissacarídeos de xilose ramificados, classificados em glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas e glucuronoarabinoxilanas, baseadas em seus constituites que podem ser de D-xilose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, ácidos D-glucurônico ou 4-O-metil-D-glucurônico, ácidos ferúlico e p-cumárico, ligados aos resíduos de L-arabinose, além de grupamentos acetil e outros em menor proporção. As heteroxilanas são mais abundantes encontradas nas paredes primárias de gramíneas e nas paredes secundárias de angiospermas (GRACIOLI, 2018).

A hemicelulose diferencia da celulose por ser amorfa, por apresentar baixa massa molecular, em torno de 100 a 200 unidades glicosídicas, facilitando de ser hidrolisada. Para remover a fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos é necessário aplicar alguns tipos de pré-tratamento como hidrólise ácida ou hidrotérmica, para desprender os açúcares das cadeias poliméricas, principalmente a xilose, que posteriormente é fermentada para a produção de etanol (VIEIRA, 2016; SILVA, 2010).

A hemicelulose é ligada à celulose por ligações de hidrogênio e por ligação covalente e não covalente com a lignina e outros polímeros da parede celular (SOUZA, 2011). Ela é responsável pela regulação do crescimento e desenvolvimento das plantas. São polissacarídeos formados por diferentes unidades de açúcares pertencentes aos grupos das pentoses, hexoses, ácidos hexourônicos e desoxiexoses (SANTOS, 2012). Estes componentes da fração hemicelulósica estão apresentados na Figura 9 abaixo.



FIGURA 8 - ESTRUTURA MOLECULAR DA HEMICELULOSE CADEIAS DE HETEROXILANAS.

Fonte: Gracioli (2018).



FIGURA 9 - COMPONENTES DA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA.

Fonte: Silva (2010).
A lignina é um complexo aromático macromolecular gerado pela polimerização de três álcoois fenil-propanos, p-cumarílico, coniferílico e sinapílico. (VIEIRA, 2016). Tem forma tridimensional, é constituída por unidades de *p*-propilfenol, com substituintes metoxila no anel aromático, ligadas por ligações do tipo éter e que estabelecem ligações cruzadas entre si (SILVA, 2010). Estas estruturas bioquímicas não tem relação com as moléculas de açúcar, portanto não é utilizada na produção de bioetanol por rotas fermentativas. Mesmo em pequena quantidade em relação à fração celulósica, a lignina retarda ou impede completamente o processo de sacarificação, importante para a produção de etanol 2G, por isso a necessidade de um pré-tratamento do material lignocelulósico (FERREIRA, 2015). A Figura 10 abaixo representa os três álcoois fenil-propanos e a estrutura da lignina.

FIGURA 10 - (a) PRECURSORES PRIMÁRIOS DA LIGNINA. (b) ESTRUTURA MOLECULAR DA LIGNINA.



Fonte: Adaptado de Silva (2010) e Ferreira (2015).

A proporção dos precursores primários resulta em diferentes tipos de ligninas, as formadas pelos álcoois coniferílico e p-cumarílico que apresentam

estruturas mais complexas do que as formadas pelos álcoois coniferílico e sinapílico. Os polímeros provenientes do álcool sinapílico são os principais responsáveis pela ligação com a fração hemicelulósica presente na biomassa lignocelulósica (SANTOS, 2012).

A lignina é muito energética, usada normalmente como combustível, pode ser utilizada na geração de calor e eletricidade necessários ao processo de produção de etanol, contudo pode ser alterada quimicamente com a finalidade de ser utilizada para outros fins, como agente quelante, para remoção de metais pesados de efluentes. Ainda pode ser usada para formação de diversos produtos, incluindo compostos fenólicos, aromáticos, ácidos dibásicos e metil, formado pela reação da fração fenólica com álcoois (VIEIRA, 2016; SANTOS, 2012).

3.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é resistente à degradação, sua composição química e características físicas são pontos críticos no isolamento de seus componentes, por isso é necessário uma combinação de vários procedimentos para a ruptura da matriz lignocelulósica. Inicialmente faz o processo do pré-tratamento cuja finalidade é diminuir a estabilidade das fibras, sendo utilizado para minimizar a interação entre celulose, hemicelulose e lignina, solubilizando a hemicelulose e/ou a lignina, além de deixar o substrato mais acessível às enzimas que convertem os polissacarídeos em açúcares fermentescíveis (VIEIRA, 2016). Somente é viável a produção de etanol 2G se o pré-tratamento for eficaz no processo de deslignificação com a menor degradação possível para não interferir na hidrólise ou na fermentação. Pois seu papel é justamente de melhorar os rendimentos de hidrólise, separando o conteúdo da biomassa, removendo a lignina (COLETTA et al., 2013).

O objetivo principal do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é remover a hemicelulose e a lignina. Além de aumentar a área superficial acessível, descristalizar a celulose e solubilizar a hemicelulose e a lignina, minimizando a perda de açúcares e custos de operação (SILVA, 2010; VIEIRA, 2016). Segue abaixo a Figura 11 que ilustra a matriz lignocelulósica após o pré-tratamento.

FIGURA 11 - ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPLEXO CELULOSE-HEMICELULOSE-LIGNINA DETERMINADAS PELO PRÉ-TRATAMENTO.



Fonte: Rossi et al (2014).

No pré-tratamento também ocorrem outras reações formando coprodutos inibidores dos processos fermentativos, cuja produção depende do processo de prétratamento usado e da fonte do material lignocelulósico. Os três principais grupos de coprodutos formados são furanos, ácidos orgânicos e compostos fenólicos. A presença do primeiro grupo resulta em elevado potencial de inibição e em perdas de rendimento em açúcares (VIEIRA, 2016).

Os pré-tratamentos podem ser classificados em:

- FÍSICOS Caracterizados pela fragmentação do material por meio de ação mecânica, seja por trituração, moagem ou esfarelamento. Esse tipo de pré-tratamento aumenta a área superficial, diminuindo o tamanho do bagaço (VIEIRA, 2016; SOUZA, 2011);
- **QUÍMICOS** Degradam a hemicelulose ou removem a lignina, afrouxam a estrutura da rede lignina-hemicelulose-celulose. Pode ser

utilizado a partir de ozonólise, pré-tratamento ácido, pré-tratamento alcalino, deslignificação oxidativa, ou processo *Orfanosolv* (VIEIRA, 2016; SOUZA, 2011). O pré-tratamento ácido causa a hidrólise da hemicelulose além de desestruturar a matriz, resultando em uma fração líquida contendo em grande maioria a xilose. Após o pré-tratamento, o líquido contendo o hidrolisado hemicelulósico é separado de um resíduo sólido, composto fundamentalmente de celulose e lignina, denominado de celulignina. Enquanto o pré-tratamento ácido resulta na hidrólise da fração hemicelulósica, o alcalino remove parte da fração de lignina, expondo as fibras de celulose e deixando-a acessível ao ataque enzimático (SANTOS, 2012; COLETTA et al., 2013);

FÍSICO-QUÍMICOS - Esse tipo de pré-tratamento precisa de controle mais rigoroso na operação visto que as reações ocorrem em condições de temperatura e pressão bastante elevadas. Dentre elas, tem-se explosão a vapor, hidrotérmico, explosão por amônia líquida (Ammonium Fibre explosion (AFEX)) e explosão com CO₂ (SOUZA, 2011; VIEIRA, 2016). O pré-tratamento hidrotérmico emprega as propriedades catalíticas das moléculas de água para a solubilização de matéria orgânica complexa, não utilizando nenhum produto químico, considerado uma tecnologia limpa uma vez que utiliza água como reagente principal. O aumento da temperatura até 374 °C faz com que a constante dielétrica da água diminua e a constante de dissociação aumente, resultando no enfraquecimento das ligações de hidrogênio. Como resultado, moléculas de água, na região subcrítica (100 °C - 374 °C), dissocia-se em hidroxônio (H3O⁺) e hidroxila (OH⁻). Os íons hidroxônios atuam como catalisadores e penetram na estrutura complexa de materiais lignocelulósicos, despolimerizando a hemicelulose e tornando a celulose mais acessível para posterior hidrólise enzimática. Esse processo baseia-se na solubilização da hemicelulose através da água quente, tornando a celulose mais acessível e minimiza a formação de inibidores (furanos - furfural e hidroximetilfurfural), formados pela degradação das pentoses e hexoses. Estes compostos podem atuar como inibidores nas etapas de hidrólise enzimática e fermentação, inibindo o crescimento celular e a produção de etanol em leveduras. Uma maneira para evitar a formação de inibidores, é manter o pH entre 4-7, pois neste pH os açúcares da fração hemicelulósica são mantidos na forma de oligômeros e a formação de monômeros é minimizada (SOUZA, 2016; DASGUPTA; CHANDEL, 2019).

BIOLÓGICOS - Esse método resulta na degradação da lignina e da • hemicelulose deixando a biomassa mais acessível à digestão enzimática. Dentre os microrganismos mais utilizados neste processo estão os fungos de decomposição branca, que degradam principalmente a lignina, e os fungos de decomposição parda, que degradam os polissacarídeos. As principais vantagens desse processo são o baixo consumo de energia e as condições reacionais brandas. No entanto, a velocidade de biodegradação é lenta, sendo pouco atrativo, além de ter baixa eficiência, perda considerável de carboidratos e necessidade de alto controle das condições de crescimento, pois os microrganismos consomem além da lignina, a celulose e hemicelulose (VIEIRA, 2016).

3.5 HIDRÓLISE DE HEMICELULOSE

A fração hemicelulósica é hidrolisada mais facilmente do que a celulose, não obstante a fermentação da xilose não é tão desenvolvida quanto da glicose. A etapa posterior ao pré-tratamento compõe-se na remoção da lignina e na hidrólise da hemicelulose (BNDS, 2008).

Com o tratamento de hidrólise rápida (ácida) altas quantidades de açúcares são geradas a partir da fração hemicelulósica. São utilizados neste tratamento alguns ácidos como ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido clorídrico (HCI), ácido fluorídrico (HF), ácido acético (CH₃COOH) e ácido nítrico (HNO₃) (ROSSI et al., 2014).

No caso de hidrólise por rota enzimática, a hidrólise completa da hemicelulose exige a atuação de várias enzimas de forma cooperativa em virtude da sua característica heteropolissacarídica, tornando complexo o mecanismo do ataque enzimático. Para degradação total de xilanas são necessárias várias enzimas. Endo-1,4- β -D-xilanases são enzimas que fragmentam a estrutura de arabinoxilana, fornecendo oligossacarídeo de xilose, essa é uma das principais enzimas envolvidas na degradação deste polímero. β -1,4-xilosidades catalisam a hidrólise de xilooligossacarídeos e xilobiose a partir de terminais não redutores, liberando xilose. Para a completa hidrólise da hemicelulose, é ainda necessária a ação das enzimas desramificadoras dos grupos laterais ligados à cadeia principal de xilana, α -glicuronosidase, β -arabinosidase e acetil xilana esterease (SOUZA, 2011). Santos (2012) relata outras enzimas auxiliares que hidrolisam a hemicelulose, como as glucuronidases, acetilesterases, xilanases, β - xilosidases, galactomannanases e glucomannanases.

Alguns fatores podem alterar a hidrólise enzimática tal como tamanho da partícula, porosidade do material, presença de fibras, resultando na diminuição da eficiência do processo de hidrólise. Assim sendo as condições de reação incluindo temperatura e Potencial hidrogeniônico (pH), geralmente amenos, a composição do meio específico e o tempo de fermentação também representam elevada importância no processo enzimático (SANTOS, 2012).

GUO et al. (2018) realizaram experimentos com hidrolisado de hemicelulose a partir de sabugo de milho com solução aquosa de ácido sulfúrico a 2 % repetido por diversas vezes. Após a primeira hidrólise, a concentração de D-xilose foi de 28,0 g/L, ao chegar no décimo quinto experimento a concentração foi de 196,7 g/L, portanto o uso repetido de hidrolisado colabora para um aumento significativo do teor de D-xilose.

3.6 FERMENTAÇÃO DE D-XILOSE

A conversão de açúcares em etanol envolve muitas reações de forma ordenada, catalisada por uma enzima específica, que ocorre no citoplasma celular, região que ocorre a fermentação alcoólica (GARCIA, 2012). Quando a xilose está no interior das células de leveduras, ela é convertida por duas reações sequênciais em xilulose como apresentado na Figura 12. A primeira etapa no metabolismo de xilose é a sua redução em xilitol pela enzima xilose redutase (XR), em seguida, a oxidação do xilitol em xilulose é catalisada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH). A conversão de xilose em xilulose também pode ocorrer por isomerização direta usando uma xilose isomerase (XI). Nas duas situações, a xilulose é fosforilada na posição C₅-OH pela xilulokinase endógena ou heteróloga (XKS) a xilulose–5–fosfato (X5P), que segue a via da pentose fosfato (Pentose Phosphate Pathway (PPP)), convertida por transcetolases (TLK) em intermediários glicolíticos como o gliceraldeído-3-fosfato (GA3P) e fructose-6-fosfato (F6P). Esses intermediários são convertidos em piruvato na rota metabólica. Em condições anaeróbias, o piruvato é descarboxilado pela enzima piruvato descarboxilase (PDC) a acetaldeído e reduzido pela enzima álcool desidrogenase (ADH) em álcool (FARWICK et al., 2014; PATIÑO LAGOS, 2015; VIEIRA, 2016).

Inúmeras enzimas XR possuem certas particularidades por diferentes coenzimas, empregando tanto dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH) como dinucleótido de nicotinamida e adenina fosfato reduzido (NADPH), mas geralmente com preferência pelo NADPH. Entretanto, a maioria das enzimas XDH utilizam dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado (NAD+) como coenzima. Essas coenzimas precisam ser regenerados para manter o equilíbrio redox. Ocorre então um acúmulo de xilitol se quantidades insuficientes de NAD+ são regeneradas, e o metabolismo da xilose é consequentemente bloqueado. A fim de solucionar isso, é necessário adicionar de forma controlada oxigênio durante a fermentação da xilose, para regenerar o NAD+ a partir de NADH (VIEIRA, 2016; NEVES; ELEUTHERIO; VILELA, 2014).



FIGURA 12 - ROTA METABÓLICA DA XILOSE EM LEVEDURAS.

Algumas cepas que possuem XDH dependente de NADH em adição à XR dependente de NADPH, a fermentação anaeróbica da xilose é possível, desde que o excesso de NADH seja orientado para a formação de xilitol. Essa formação diminui o rendimento teórico de etanol. A fermentação anaeróbica da xilose sem a produção do xilitol é cabível quando as enzimas XR e XDH são dependentes dos mesmos coenzimas. Essa rota é análoga à conversão direta da xilose em xilulose pela enzima XI que acontece em bactérias metabolizadoras de xilose. O excesso de NADH a partir da xilose metabolizada pelas leveduras por meio XR / XDH, pode ser retirada pela aeração, o excesso de produção de xilitol só pode ser evitado com a presença de oxigênio. No entanto, muita aeração causaria uma competição do NADH pela respiração mitocondrial e fermentação alcoólica, reduzindo o rendimento em etanol. Desse modo, microrganismos que convertem xilose em etanol via anaeróbica para uma produção de etanol lignocelulósico são considerados eficientes em termos de custos (VIEIRA, 2016).

Fonte: Montaño (2013).

O piruvato gerado é fragmentado pela piruvato-ferredoxina oxidoredutase na presença da coenzima A (CoA) para obtenção de acetil-CoA e outros. A acetil-CoA formada corresponde um intermediário essencial na rota para formação de ácidos, pode ser fosforilada pelo sistema da fosfotranscetilase ou fosfotransbutilase para geração de ácido acético e butírico, respectivamente, e trifosfato de adenosina (ATP) (SÁ; CAMMAROTA; FERREIRA-LEITÃO, 2014).

3.7 Scheffersomyces stipitis

A xilose não é fermentada pela *Saccharomyces cerevisiae* (levedura muito utilizada na produção de etanol 1G), no entanto, a *S. stipitis* é um potencial biocatalisador para o combustível 2G (FARIAS; ATALA; MAUGERI, 2017).

O metabolismo da xilose pela *S. stipitis* converte a xilose em xilulose por duas vias metabólicas diferentes. Uma via das fosfato pentoses em que a xilulose é obtida da xilose pela XI e entra no metabolismo principal para produzir etanol pela glicólise. A outra via metabólica de xilose consiste na xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). XR reduz a xilose em xilitol usando NAD(P)H como coenzima e XDH oxida mais xilitol para xilulose usando NAD+. Este caminho XR-XDH pode fornecer maiores fluxos metabólicos do que a via XI, pois acumula xilitol que foi produzido devido ao desequilíbrio da coenzima. A via de assimilação de xilose equilibrada com NADH exibiu altos rendimentos de etanol (JO et al., 2017).

Farias, Atala e Maugeri (2017) relataram que durante o processo em batelada, *S. stipitis* consumiu xilose para produção de etanol, e após 40 h de fermentação resultou em um rendimento de 0,39 g_{etanol}/g_{xilose}, uma produtividade de 0,26 g/(L.h) e uma eficiência de produção de etanol de cerca de 84,7 % (baseado no valor teório de Y_{P/S} = 0,47 g_{etanol}/g_{xilose}), para uma concentração inicial de xilose de 50 g/L e a biomassa foi inoculado no reator de forma a obter uma absorbância inicial de 0,2 a 600 nm. Já durante o processo em batelada alimentada, a concentração máxima de etanol foi de 46,5 g/L em uma concentração inicial de xilose de 50 g/L e

taxa de fluxo de alimentação otimizada definido de acordo com a concentração de xilose no meio de alimentação (que variou entre 100 e 200 g/L), com um rendimento de 0,43 g/g, uma produtividade de 0,58 g/(L.h) e uma eficiência de produção de etanol de 93,5 %, estes resultados foram alcançados em virtude da pouca inibição do substrato no processo de fermentação em batelada alimentada, melhorando o desempenho da fermentação.

Deshavath et al. (2018) realizaram estudos de fermentação em frascos Erlenmeyer de 250 mL estéreis contendo 100 mL de pré-hidrolisado da biomassa de sorgo, 170 mg de base nitrogenada de levedura, 100 mg de ureia e 650 mg de peptona, o pH inicial do meio foi ajustado para 6,0. Depois de inoculado com a *S. stipitis*, foi incubado a 30 °C com 120 rpm por 24 h e retirado alíquota de 1 mL desse meio de fermentação a cada 6 horas para análise na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram utilizados cerca de 13,0 a 14,5 g/L de glicose e xilose, resultando numa concentração de etanol em torno de 6,63 a 7,39 g/L.

3.8 Pachysolen tannophilus

O microrganismo *P. tannophilus* foi a primeira levedura nativa descoberta para produção de etanol a partir de xilose, inclusive ela pode fermentar todos os açúcares em hidrolisados lignocelulósicos, exceto a L-arabinose (MEI et al., 2018).

Segundo Mei et al. (2018) muitos estudos sobre leveduras para fermentação da pentose tem se concentrado mais na *S. stipitis*, e poucos para a *P. tannophilus*. Isso porque a *S. stipitis* produz etanol quase que exclusivamente, enquanto que a *P. tannophilus* produz etanol e xilitol. Porém a *P. tannophilus* tem demonstrado ser menos sensível a alguns dos principais inibidores derivados da lignocelulose do que *S. stipitis*.

Neirinck, Maleszka e Schneider (1984) relataram que a *P. tannophilus* em condições de limitação de oxigênio, sofre o efeito Custer (inibição da fermentação) e aumenta mais a produção de ácido acético, e é formado o xilitol.

El Harchi, Fakihi Kachkach e El Mtili (2018) publicaram um estudo em que a levedura *P. tannophilus* foi cultivada em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 30 mL de meio YEPD (extrato de levedura, 10 g/L; peptona, 10 g/L; glicose, 20 g/L) em uma incubadora de agitação a 30 °C e 120 rpm obtiveram em 48 horas de experimento uma produção de bioetanol em torno de 9,26 \pm 0,05 g/L.

Já Slininger et al. (1982) usaram esta levedura na conversão de D-xilose em etanol, e em culturas contendo inicialmente 50 g/L de D-xilose produziram 0,34 g de etanol por grama de pentose consumido. A taxa específica de produção de etanol foi de 0,08 g/(g.h).

O metabolismo deste microrganismo com a xilose envolve a xilose redutase dependente de NADPH, para a conversão de xilose em xilitol, seguida da conversão de xilitol em xilulose pelo xilitol desidrogenase dependente de NAD, ambas as enzimas são induzidas na presença de xilose. Sob condições anaeróbicas, o NADH pode servir como coenzima para a xilose redutase (NANCY, 1985).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a produção de etanol de segunda geração a partir do licor de hemicelulose do bagaço de malte neste trabalho foram utilizadas duas leveduras capazes de fermentar xilose, *S. stipitis* e *P. tannophilus*, adquiridas pela Fundação André Tosello - Coleção de Culturas Tropical. Estas leveduras foram cultivadas em diferentes meios, para avaliar seu crescimento e produção de metabólitos. A Figura 13 traz um resumo dos procedimentos que foram realizados ao longo deste mestrado, com o intuito de ficarem mais claros os procedimentos abordados neste capítulo.



FIGURA 13 – FERMENTAÇÃO DE DIVERSOS MEIOS DE CULTIVO UTILIZANDO AS LEVEDURAS *S. stipitis* E *P. tannophilus* PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL 2G.

4.1 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

4.1.1 Meio de ativação das leveduras

As leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* foram estocadas em microtubos tipo *eppendorfs* estéreis contendo 700 µL do meio GPY (ver Tabela 1) com levedura ativada e 300 µL de solução crioprotetora glicerol 80 % v/v, em ultrafreezer a -70°C.

Fonte: Próprio autor.

Líquido (g/L)	Sólido (g/L)
20	20
5	5
5	5
qs	qs
	20
	Líquido (g/L) 20 5 5 qs

Tabela 1 – Composição do meio GPY líquido e sólido.

Para a ativação dos microrganismos, 5 mL do meio GPY líquido estéril foram adicionados em tubo de 15 mL estéril, posteriormente, com auxílio de uma alça estéril descartável, raspou-se o *Eppendorf* que continha o microrganismo, inoculando no líquido uma porção da levedura. Em seguida, o tubo foi colocado em incubadora Shaker por 1 hora, a 30 °C e 250 rpm.

4.1.2 Meio de crescimento sólido

Em placas de Petri estéreis foram adicionados 20 mL de meio GPY sólido (ver Tabela 1) previamente fundido e resfriado a 45°C. Após homogeneização e solidificação, foi adicionado o microrganismo previamente ativado (item 4.1.1), espalhando-o sobre a placa de forma homogênea (formando colônias isoladas). As placas foram incubadas a 30°C durante dois dias. Decorrido este período as placas foram armazenadas em geladeira para utilização dos experimentos deste trabalho.

4.2 MEIOS DE CRESCIMENTO

Este trabalho avaliou o consumo de xilose e os metabólitos produzidos por duas leveduras utilizando três diferentes meios de cultivo: meio complexo (YPX),

Meio Mínimo com Xilose (MMX) e meio de licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com componentes do meio MMX (LHBMS). Na Tabela 2 é apresentada a composição dos meios. Os meios de crescimento foram autoclavados com um ciclo de 30 minutos a 127 °C, no Esterilizador tipo Autoclave Stermax, analógica 30 L, e misturados apenas dentro da capela de fluxo laminar.

Nos experimentos em shaker, a correção do pH foi realizada utilizando soluções de H_2SO_4 (2,9 % v/v) e NaOH (P.A.). Já nos experimentos em biorreator a correção do pH foi realizada utilizando soluções de H_3PO_4 e NH₄OH, todas a 30 %, que já servem como fontes de fosfato e nitrogênio.

Componente	YPX (g/L)	MMX (g/L)	LHBMS (g/L)
Peptona	20	-	-
Extrato de Levedura	10	-	-
Xilose	20	20	19,4
Água destilada	qs	qs	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	5,0	5,0
Ureia	-	1,5	1,5
KH ₂ PO ₄	-	1,5	1,5
Licor Hemicelulose	-	-	qs

Tabela 2 - Composição dos meios de cultivo.

* Licor Hemicelulose contém (g/L): 2,2 celobiose, 0,72 glicose, 0,59 xilose, 1,43 arabinose, 0,45 ácido acético, 0,91 etanol, 0,10 HMF, 0,03 furfural.

4.2.1 Preparo do meio YPX

A composição do meio é exibida na Tabela 2. Foram homogeneizados os dois primeiros componentes com água destilada com quantidade suficiente (qs), utilizando um agitador magnético e em seguida medido o volume da mistura. Em outro frasco foi homogeneizado o terceiro componente com água destilada, medido o volume com proveta e completado até o volume final do meio preparado. O pH deve ser ajustado nestas duas etapas para 5,5. Em seguida, as soluções eram

autoclavadas separadamente e misturadas apenas dentro da capela de fluxo laminar após atingir a temperatura ambiente.

4.2.2 Preparo do meio MMX

A composição utilizada na preparação do meio MMX é mostrada na Tabela 2, onde cada item foi pesado em recipientes distintos e solubilizados na água destilada, sendo volume final de cada solução medido em proveta, com ajuste de pH a 5,5. Em seguida, as soluções eram autoclavadas separadamente e misturadas apenas dentro capela de fluxo laminar após atingir a temperatura ambiente.

4.2.3 Preparo do meio do licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado

Este meio foi preparado de igual forma que o meio MMX (ver item 4.2.2), mas em lugar do uso de água destilada, cada componente foi dissolvido com qs de licor do pré-tratamento e ajustado o pH para 5,5.

4.3 ANÁLISES

4.3.1 Quantificação de açúcares, ácidos orgânicos e álcoois

A amostra para análise no HPLC foi centrifugada, por 15 minutos a 15000 rpm e retirado 800 μ L do sobrenadante com o intuito de retirar as células da levedura. Em seguida o sobrenadante foi diluído 4X e passado em filtros de 0,22 μ m diretamente nos *vials*.

As concentrações de açúcares e produtos da fermentação foram quantificadas por CLAE de troca iônica (cromatógrafo Shimadzu Prominenc com detectores Ultravioleta (UV) e Infravermelha (Infrared (IR)), coluna Shimpack SCR-102(H) com fase móvel uma solução aquosa com 5 mM de ácido perclórico, eluindo à vazão de 0,6 mL/min, como fase móvel. A temperatura para separação dos componentes foi de 50 °C. A detecção dos ácidos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm, e álcoois por índice de refração.

4.3.2 Densidade ótica e massa seca

No espectrofotômetro, a D.O. não pode ultrapassar a escala de 0,8, caso ocorra devem ser realizadas diluições na amostra a ser coletada, pois geralmente é na faixa de absorbância de 0,15 a 0,8 que a maioria das substâncias possuem uma relação linear entre a D.O. e a concentração, sendo, portanto, possível a aplicação da Lei de Beer.

Para correlação da massa seca com a absorbância, foram pesados eppendorfs previamente secos em estufa. Amostras foram centrifugadas nestes eppendorfs onde foi retirado o sobrenadante para as análises do CLAE, e a

biomassa retida no *eppendorf* foi lavada com uma solução salina (NaCl) a 1 % e posteriormente colocado em estufa a 70 °C para retirar a umidade, após este período foi colocado no dessecador por aproximadamente duas horas antes de ser pesada. Estas amostras inicialmente foram realizadas leitura no espectrofotômetro e se necessário, diluídas para que estivesse na faixa de 0,15 a 0,8 aproximadamente. O valor da absorbância em 600 nm ficou em função da diferença de massa do *eppendorf* contendo biomassa seca com o *eppendorf* vazio, e gerado um gráfico para obtenção de uma equação de reta através da regressão linear com definição de interseção igual a zero, capaz de determinar a concentração celular pela densidade ótica em função do peso da célula seca. A Equação 1 obtida para a realização dos cálculos de parâmetros cinéticos, de coeficiente de determinação (R²) 0,9124, para a levedura *S. stipitis* foi determinada por:

Concentração celular (g/L) =
$$0,3134*D.O._{600nm}$$
 (Eq.1)

E a Equação 2 para a levedura *P. tannophilus* de coeficiente de determinação (R²) 0,9126, foi determinada por:

Concentração celular (g/L) =
$$0,3245*D.O._{600nm}$$
 (Eq.2)

4.3.3 Quantificação de açúcar redutor pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)

Para quantificação da xilose ainda presente no caldo de cultivo como método de monitoramento durante os experimentos foi adaptado do descrito por Miller (1959). Neste ensaio foi pipetado 0,6 mL da amostra em um tubo de ensaio (diluído 10X) e adicionado 1,2 mL do reagente DNS, os tubos de ensaios devem ser bem agitados para homogeneizar, em seguida foi aquecido em banho maria a 100 °C por 5 minutos, e resfriado em banho de gelo por 5 minutos. Adicionado 8,2 mL de água destilada, homogeneizado bem e feito a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 540 nm, após zerar o aparelho com o branco de DNS (0,6 mL de água destilada, 1,2 mL de DNS, aquecido e resfriado conforme mencionado acima e adicionado mais 8,2 mL de água destilada). Os valores encontrados são

inseridos na equação de calibração para a obtenção da concentração do açúcar redutor, multiplicando o valor da diluição no final do resultado. A equação 3 obtida para a realização dos cálculos de Açúcar Redutor (AR), de coeficiente de determinação (R²) 0,9906 foi determinada por:

AR
$$(g/L) = (2,2251*D.O._{540nm} - 0,01)*$$
fator de diluição (Eq.3)

4.3.4 Viabilidade celular

A viabilidade das células durante os cultivos foi acompanhada por microscopia ótica (Microscópio Modelo CX40RF200 da Olympus Optical, conectado a um sistema de captura e armazenamento de imagens) mediante a contagem de células utilizando uma câmara de contagem. Esta câmara, também conhecida como câmara de Neubauer, permite a determinação do número de células em um volume específico de solução. A câmara empregada foi a câmara de contagem Neubauer Dupla melhorada espelhada, modelo 7301-1B (0,0025 mm2 x 0,100 mm) da Global optics.

O método utilizado para a análise de viabilidade foi o de coloração com Azul de Metileno a 0,025 %. Inicialmente coletou-se a amostra em *eppendorf* de 2 mL, e a partir do valor da D.O. dessa amostra, diluiu em um número de vezes na solução de azul de metileno de tal forma que fosse possível realizar a contagem das leveduras. Dessa diluição retirou-se uma alíquota de 15 µL com auxilio da micropipeta, e fez-se o carregamento na câmara de Neubauer.

Após o carregamento foi colocado sobre a amostra uma lamínula para microscopia, P22X22 (espessura 0,13 a 0,16 mm de 22,0 x 22,0 mm) da Precision Glass Line, e levado à câmara de Neubauer ao microscópio utilizando a objetiva acromática 40X.

A contagem foi efetuada no sentido horário, nos 4 primeiros quadrantes que formam o quadrilátero dos 4 quadriláteros maiores situados nas laterais da câmara.

As células foram contadas de forma que as brancas eram as viáveis e as coradas de azuis as inviáveis.

Segundo Neves (2018), para o cálculo de células viáveis é necessário subtrair o número de células inviáveis do número de células totais. Para isto deve-se aplicar a equação 4 abaixo:

$$N = A / (V \times D)$$
(Eq.4)

Onde:

N = Concentração celular (células/mm³)

A = Número de células

V = Volume da Câmara de Neubauer

D = Fator de diluição (inverso da diluição utilizada)

Portanto para este cálculo é necessário saber o volume da Câmara, de acordo com a sua referência do modelo cada quadrado maior tem 1 mm² de área e é subdividido em 16 quadrados, logo a área de cada quadrado é 1/16 mm². Como foram utilizados 16 quadrados na contagem, portanto a área é 1 mm². E segundo Neves (2018) a distância da lamínula da Câmara de Neubauer é de 1/100 mm, resulta num volume de 1/100 mm³.

4.4 ESTIMATIVA DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

4.4.1 Fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$) e substrato em produto ($Y_{P/S}$)

Os Fatores de conversão de substrato em biomassa $(Y_{X/S})$ e substrato em produto $(Y_{P/S})$ foram estimados utilizando as equações 5 e 6.

O Y_{X/S} (unidade: g_{células}/g_{substrato}) definido por:

$$Y_{X/S} = (X - X_0) / (S_0 - S)$$
 (Eq.5)

Onde:

X = concentração de biomassa (g_{células})

S = concentração de substrato (g_{substrato})

X₀ = concentração de biomassa no tempo zero (g_{células})

 S_0 = concentração de substrato no tempo zero ($g_{substrato}$)

O Y_{P/S} (unidade: g_{produto}/g_{substrato}) definido por:

$$Y_{P/S} = (P - P_0) / (S_0 - S)$$
(Eq.6)

Onde:

 $P = \text{concentração de produto } (g_{\text{produto}})$ $S = \text{concentração de substrato } (g_{\text{substrato}})$ $P_0 = \text{concentração de produto no tempo zero } (g_{\text{produto}})$ $S_0 = \text{concentração de substrato no tempo zero } (g_{\text{substrato}})$

4.4.2 Seletividade

Calcula quantas vezes mais uma fermentação produziu um metabólito específico em relação ao outro produzido, em um mesmo intervalo de tempo, conforme Equação 7.

$$\begin{split} & S_{\text{metabólito 1/metabólito 2}} = C_1 / C_2 & (Eq.7) \\ & \text{Onde:} \\ & S_{\text{metabólito 1/metabólito 2}} = \text{Seletividade do metabólito 1 em relação ao metabólito 2} \\ & C_1 = \text{concentração do metabólito 1 produzido na fermentação (g_{\text{produto}}/L)} \end{split}$$

C₂ = concentração do metabólito 2 produzido na fermentação (g_{produto}/L)

4.4.3 Velocidade específica máxima de crescimento celular (µmáx)

Como acompanhamento cinético do crescimento celular, a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{máx}$) é a máxima inclinação, obtida na parte linear da curva, calculada a partir da equação 8 abaixo, proveniente da integração da equação $\mu_{máx} = (1/X).(dX/dt)$ (unidade: h⁻¹).

$$Ln (X/X_0) = \mu_{máx} . (t - t_0)$$
 (Eq.8)

Onde:

X = concentração de biomassa (g_{células})
X₀ = concentração de biomassa no tempo zero (g_{células})
t = tempo referente à concentração de biomassa (h)
t₀ = tempo referente à concentração de biomassa no tempo zero (h)

4.5 CRESCIMENTO AERÓBIO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EM SHAKER

O crescimento celular nos meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com MMX (LHBMS) foi realizado em triplicata. Foram utilizados 3 erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do seu respectivo meio, para a realização de testes em triplicata. 25 mL de meio de cultivo sem inocular foram separados como solução padrão (branco) do meio. Feito este mesmo procedimento para as duas leveduras.

Segue abaixo o procedimento para crescimento aeróbio em shaker para esses três diferentes tipos de meios de cultivo e para ambas as cepas. Cada crescimento foi realizado em semanas diferentes com a finalidade de evitar contaminação cruzada. O objetivo destas análises foi de verificar os parâmetros cinéticos de crescimento das leveduras em sistema aeróbio em diferentes meios de cultivo.

Inicialmente uma raspagem da levedura plaqueada em placa de petri foi ativada em 10 mL do meio, a uma temperatura de 30 °C e agitação de 250 rpm por 1 hora. Em seguida era retirada uma alíquota para verificar a densidade ótica (D.O.) no espectrofotômetro a 600 nm, com a finalidade de mensurar o volume de inóculo a ser adicionado em cada erlenmeyer para iniciar o experimento com uma D.O. de aproximadamente 0,15.

Para calcular o volume de inóculo a ser adicionado nos frascos de erlenmeyers foi utilizada a fórmula de diluição de soluções, a Equação 9:

C1.
$$V_1 = C2. V_2$$
 (Eq. 9)

Onde:

C1 = Concentração do pré-inóculo;

 V_1 = Alíquota do pré-inóculo a ser retirado (mL);

C2 = Concentração final do meio do erlenmeyer já com a adição da levedura ativada;

 V_2 = Volume final da solução a ser preparada (mL).

Após a inoculação do meio, os frascos foram homogeneizados e posteriormente foram retiradas amostras de 1 mL do caldo de cada erlenmeyer em diferentes tempos, destinada para análise de açúcares, álcoois e ácidos orgânicos pelo CLAE e medição da D.O., com estas mesmas amostras foi realizado o monitoramento da concentração do açúcar redutor presente através do método 3,5-Dinitrossalicilato (DNS) ao longo do experimento. Todo o período as triplicatas ficaram no sistema de agitação, shaker, com temperatura de 30 °C e 200 rpm de agitação, sendo retirado de três em três horas apenas para amostragem. No final do experimento foi medido o pH.

4.6 FERMENTAÇÃO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO DAS CEPAS S. stipitis E P. tannophilus EM SHAKER

Foram preparados 100 mL dos meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com os componentes do meio MMX, conforme composição das Tabela 2, para cada cepa. Cada meio de cultivo foi inoculado observando a D.O. inicial em torno de 0,15 a 600 nm, utilizando a Eq. 9 para adicionar o volume do inóculo no meio. Em seguida, este meio já inoculado foi homogeneizado e distribuído em aproximadamente 66 eppendorfs de 2 mL contendo 1,5 mL do meio inoculado. No tempo zero foram retirados 3 eppendorfs e medido a D.O., logo depois centrifugado essas amostras e retirado o sobrenadante para análise no CLAE dos compostos presentes. Transcorridas 2 horas, todos os eppendorfs foram furados com agulha estéril para fuga do CO₂ gerado durante a fermentação. Todos os eppendorfs inoculados foram colocados na incubadora Shaker com temperatura de 30 °C e agitação de 100 rpm. Sendo retirado em triplicata os eppendorfs de 24 em 24 horas, no início do experimento e posteriormente a cada 48 horas, a fim de destinar as amostras para leitura no CLAE. Em conjunto foram retiradas amostras para controle do açúcar pelo método de DNS. No final do experimento, também foram verificados o pH e a D.O. As amostras destinadas à análise no CLAE foram diluídas 4X e filtradas nos vials.

4.7 FERMENTAÇÃO DO LHBMS PELAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EM BIORREATOR

Para os ensaios em Biorreator batelada simples foram utilizados o licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com os componentes do meio MMX com 40 g/L de xilose em três diferentes níveis de oxigênio dissolvido, 10 %, 5 % e 1 %.

O biorreator utilizado foi o Minifors 2 da marca Infors HT, do tipo tanque agitado, com capacidade até 1,5 L, acoplados 4 bombas (para ácido, soda cáustica, alimentação, antiespumante), com sensores para controle de pH, pO₂, temperatura e antiespumante. Com sistema apropriado para amostragem, refrigerador de gases de escape, inoculação pré-atribuída, conforme mostrado na Figura 14 abaixo. Este biorreator é do Departamento de Engenharia Química da Univerdade Federal de São Carlos – UFSCar, situada em São Carlos, São Paulo.

FIGURA 14 – BIORREATOR MINIFORS 2 UTILIZADO NAS FERMENTAÇÃOES DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus A PARTIR DO LHBMS COM CONTROLE DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO.



Fonte: Infors HT (2019).

Foram preparados 420 mL do meio LHBMS para cada cepa e condição de oxigenação, dos quais 20 mL foi destinado para uso como padrão deste experimento. Para manter o percentual de Oxigênio Dissolvido (OD) desejado, foram realizados ao longo do cultivo variações ora na velocidade de agitação ora no fluxo de ar comprimido. A temperatura foi mantida em 30 °C e o controle do pH foi ajustado em 5,5. Todos os dados experimentais foram monitorados por um Software denominado Eve. E na saída do condensador o gás de escape foi passado por um analisador de gases o qual era monitorado pelo software HOBO.

4.7.1 Preparação do pré-inóculo

Foi adicionado em um erlenmeyer de 100 mL, 50 mL do meio YPX e inoculado uma porção da levedura utilizando-se alça estéril descartável. Em seguida foi colocado na incubadora Shaker por 1 hora, a 30 °C e 250 rpm. Este procedimento foi realizado para as duas leveduras estudadas nesta dissertação.

4.7.2 Preparação do inóculo

Após ler a densidade ótica do pré-inóculo, utilizou-se da Equação 9 para mensurar a alíquota correspondente para que o inóculo iniciasse com uma D.O. de 0,2. Em seguida adicionou esta quantidade em um erlenmeyer de 250 mL com quantidade suficiente para 100 mL de meio YPX. Para a levedura *S. stipitis* a duração foi 15 horas e para a *P. tannophilus* a duração foi de 30 horas em câmara rotativa a 30 °C e 200 rpm. Após este período, foi calculado a quantidade a ser inoculado no biorreator, submetido a centrifugação a 10000 rpm por 20 minutos com temperatura de 4 °C, retirado o sobrenadante e lavado com água estéril. Em seguida adicionado em uma seringa estéril, 10 mL de água estéril com células das leveduras ressuspendidas para inocular no biorreator.

4.7.3 Preparação do cultivo em biorreator

Incialmente o meio LHBMS, a solução do H₃PO₄ e a solução antiespumante (Polipropilenoglicol (PPG) 30 %) foram preparados e adicionados em frascos

específicos do reator. O eletrodo do pH foi calibrado, em seguido encaixado no biorreator bem como o sensor de oxigênio (pO₂). Após toda a montagem do biorreator, é protegido as bombas e os filtros com papel alumínio, as mangueiras são presas com as braçadeiras, e em seguida foi autoclavado. Após o ciclo de autoclavagem o biorreator é encaixado no suporte, conectado as mangueiras de ar e do condensador, e ligado o banho-maria para que resfrie o licor até a temperatura de 30 °C, e ligado o fluxo de ar para garantir que não entrará contaminação, apenas saída de ar. Após conectado todos os sensores e o rotor, inicia a programação no sistema Eve, configurando os parâmetros da batelada simples. No painel do biorreator enche as mangueiras do ácido, base e anti-espumante, e calibra o pO₂ em 0 % e 100 %, e novamente o eletrodo do pH.

Após temperatura e pH controlados no biorreator, foi adicionado pelo septo o inóculo e iniciado a fermentação, realizando os controles pelo *touchscreen* do painel do equipamento, como velocidade de agitação e fluxo de ar para manter o OD desejado. E iniciado o analisador de gases que quantifica o percentual de CO₂ e O₂ que escapam durante o cultivo.

Foram retiradas amostras no ponto zero e a cada três horas durante todo o período de fermentação, que se estendeu em média por 36 horas, para análises de crescimento celular, monitoramento do consumo da xilose, determinação da massa seca, e com o sobrenadante foram quantificados o consumo da xilose e dos metabólitos produzidos. Cada cultivo foi interrompido após verificado pelo método DNS que a xilose havia se esgotado ou que permanecia um residual.

4.8 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus A PARTIR DO LHBMS

No intuito de avaliar a influência da fonte de nitrogênio no meio LHBMS na fermentação das leveduras estudadas, foram realizados ensaios de fermentação aeróbia em shaker com 30 °C de temperatura e 200 rpm, mantendo as

concentrações do MgSO₄.7H₂O (5 g/L), KH₂PO₄ (1,5 g/L), Xilose (19,4 g/L) e Licor de hemicelulose (qs), alterando a fonte de nitrogênio para sulfato de amônio - $(NH_4)_2SO_4$ (4 g/L e 6 g/L) e ureia (4 g/L e 6 g/L). Portanto foram realizados 4 cultivos para cada levedura.

Para os cultivos com limitação de oxigênio, foi escolhido a fonte de nitrogênio com melhores resultados quanto à produção de metabólitos referente ao cultivo aeróbio para realização dos ensaios. O meio utilizado para esta fermentação foi do licor de hemicelulose suplementado com os componentes do MMX com ureia a 6 g/L.

Estes meios foram preparados assim como o meio LHBMS (ver item 4.2.3).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO AERÓBIA DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EM SHAKER

Neste trabalho, foi realizado o cultivo de duas leveduras que tem a capacidade de converter xilose em etanol, com o intuito de aproveitar o licor advindo do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte. Foram utilizados 3 meios de cultivo: Meio YPX que é um meio complexo rico em nutrientes, usado como parâmetro de crescimento sem restrição de nutrientes; meio MMX que é um meio mínimo, escolhido por ser considerado viável economicamente desde o ponto de vista industrial; e o licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com os componentes do meio MMX. A comparação entre o crescimento celular utilizando os dois últimos meios foi importante para analisar possíveis efeitos inibitórios de alguns componentes presentes no licor de pré-tratamento (dentre os que se encontram furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético).

Após experimento em shaker das leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* nos três meios de cultivos diferentes cada uma, e registro de valores da absorbância em 600 nm a cada 3 horas até a fase estacionária de crescimento celular, é possível comparar a cinética de crescimento utilizando a xilose como fonte de carbono, como mostram as Figuras 15 e 16 da concentração da biomassa de cada amostra (a partir do cálculo da correlação de massa seca com a D.O_{600 nm} obtida) em função do tempo.

Na Figura 15 referente à levedura *S. stipitis* pode-se observar o desviopadrão das triplicatas demostrado pela barra de erro, e que a fase de latência ou fase lag que ocorre logo após a inoculação, seguida da fase de transição nos três meios são semelhantes, ocorrendo em torno das 7 primeiras horas de incubação. Após esse período a levedura cultivada no meio YPX possui uma fase de crescimento exponencial mais acentuada e que obteve maior crescimento celular e com menor duração de tempo até a fase estacionária que nos outros dois meios estudados, alcançando 4,62 ± 0,12 g/L de biomassa em 27 horas, isso se dá pelo fato do YPX ser um meio complexo, que é rico em fontes de nitrogênio, aminoácidos, dentre outros. Nesta fase exponencial a velocidade específica de crescimento é constante e máxima ($\mu_{máx}$), os valores referentes a esta velocidade de todos os meios das duas leveduras estão indicados na Tabela 3.

A fase exponencial de crescimento da *S. stipitis* no meio MMX se estendeu até 36 horas de consumo de xilose, alcançando uma concentração celular final de $1,41 \pm 0,09$ g/L de biomassa presente neste meio. No meio de LHBMS a fase de crescimento celular se estendeu aproximadamente até 30 horas para iniciar as fases de desaceleração e estacionária, em que ocorre um equilíbrio entre crescimento e morte da levedura, com um máximo valor de biomassa de 2,01 ± 0,04 g/L em 68 horas de cultivo.

O crescimento celular dessa levedura no meio mínimo MMX já era previsível ser menor em virtude de sua limitação de nutrientes, porém no meio com LHBMS o crescimento foi melhor que do meio MMX pelo fato do bagaço de malte ser rico em proteínas que propiciou para este desenvolvimento, mostrando não ter influência significativa dos componentes inibitórios no licor no crescimento celular.

FIGURA 15 - CRESCIMENTO AERÓBIO DA CEPA *S. stipitis* NO MEIO YPX, MMX E LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO COM COMPONENTES DO MMX.



O crescimento celular da cepa *P. tannophilus* nos três meios estudados é apresentado na Figura 16, podendo ser verificado que a barra de erro, demonstrando o desvio padrão entre as triplicatas. Este microrganismo mantém o crescimento estável por cerca de 9 horas nos três meios de cultivo, referente a um período de adaptação ao meio. Após sair da fase exponencial de crescimento a concentração celular foi menor para o cultivo no meio MMX, atingindo um máximo de 0,34 ± 0,04 g/L de biomassa, em 21 horas de experimento. No licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado esta levedura chegou a aproximadamente 2,27 ± 0,04 g/L de biomassa após 73 horas de cultivo, teve um melhor desempenho no licor suplementado que apenas no meio MMX em virtude das proteínas presentes no licor que serviu como condições mais propícias para esta levedura se desenvolver.

FIGURA 16 - CRESCIMENTO AERÓBIO DA CEPA *P. tannophilus* NO MEIO YPX, MMX E LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO COM COMPONENTES DO MMX.



O melhor meio para o crescimento celular desta levedura foi o complexo YPX com uma formação máxima de biomassa no valor de 10,64 ± 0,4 g/L em 45 horas de cultivo. O que indica que os nutrientes deste meio são mais favoráveis para seu crescimento.

Quanto à velocidade de crescimento celular pode-se observar que tanto a *P. tannophilus* como a *S. stipitis* no meio de cultivo YPX obtiveram a maior concentração de biomassa, representada pela velocidade específica máxima de crescimento, conforme indica a tabela 3 abaixo. Comparando esta velocidade entre as duas leveduras estudadas obtida das fermentações realizadas a partir do LHBMS, verifica-se que a levedura *S. stipitis* favoreceu para um maior $\mu_{máx}$ quando comparado à levedura *P. tannophilus*.

Tabela 3 - Valores de μ_{máx} (h⁻¹) para as leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* nos meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado (LHBMS) em condição aeróbia.

S. stipitis				P. tannophilus	
YPX	MMX	LHBMS	YPX	MMX	LHBMS
0,21±2,7x10 ⁻³	0,10±7x10 ⁻⁴	0,12±3x10 ⁻⁴	0,13±1,3x10 ⁻³	0,08±1,9x10 ⁻³	0,08±2x10 ⁻⁴

5.1.1 Produção de metabólitos durante o crescimento celular

Na Figura 17 observa-se que aproximadamente em 15 horas de cultivo da *S. stipitis* em meio MMX o consumo da xilose está diretamente relacionado apenas para o crescimento celular dessa cepa, não houve formação de produtos, e que após este período o consumo desse substrato é utilizado tanto na formação de biomassa quanto na formação de metabólitos.

Os metabólitos de maior relevância produzidos foram etanol com $0,2 \pm 0,012$ g/L e xilitol com $0,78 \pm 0,03$ g/L. Não houve produção significativa de ácido acético o que justifica o pH final de 5,64, valor próximo ao do meio, o maior valor de produção deste ácido ocorreu após 36 horas de cultivo com valor de $0,18 \pm 0,03$ g/L. Não houve produção de glicerol. Porém para o término desta fermentação o substrato não se esgotou completamente, isso pode ter ocorrido porque outros nutrientes essenciais para o crescimento celular da levedura se esgotaram. Não é possível dizer que esta levedura é inibida por concentrações tão baixas de etanol e xilitol, pois para os outros meios como mostrado a seguir houve o consumo completo da xilose.

A Figura 18 representa os produtos gerados e o consumo de xilose durante o processo de crescimento aeróbio da *S. stipitis* em meio YPX. Pode-se observar que durante a fase de adaptação da levedura no meio de cultivo YPX não houve consumo considerável da xilose, diferentemente quando está na fase exponencial em que praticamente toda a pentose foi consumida, que implica que não houve inibição dos metabólitos no crescimento celular desta levedura e que este meio possui nutrientes favoráveis para o aumento da biomassa celular. Nesta mesma fase exponencial há produção de etanol e xilitol, porém favorecendo mais o etanol que o xilitol.

O maior acúmulo de etanol para esta cepa neste meio foi na fase estacionária, transcorridas 30 horas de cultivo com $5,24 \pm 0,09$ g/L de etanol, já a produção de xilitol foi de $0,44 \pm 0,09$ g/L de xilitol. A *S. stipitis* não apresentou produção significativa de ácido acético, o que acarretou em uma pequena elevação

do pH final em relação ao inicial, que foi de 6,10. O Glicerol manteve-se estável durante todo o tempo com máxima produção de $0,02 \pm 0,002$ g/L.



FIGURA 17 – CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *S. stipitis* EM MEIO MMX EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

FIGURA 18 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR S.stipitis EM MEIO YPX EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.



A Figura 19 ilustra o consumo da xilose e os metabólitos formados durante o crescimento aeróbio da *S. stipitis* em meio do LHBMS. A xilose permanece constante durante todo o intervalo de tempo da fase lag, havendo um decréscimo da concentração do açúcar praticamente total na fase exponencial até alcançar a fase estacionária. Na fase exponencial ocorre um aumento na produção de etanol e xilitol. Porém é na fase estacionária que há mais acúmulo, favorecendo a produção de etanol de 1,86 ± 0,1 g/L do que a de xilitol com 0,33 ± 0,05 g/L em 68 horas de fermentação. Com a produção de ácido acético finalizando com 0,54 ± 0,09 g/L o pH final diminuiu em relação ao valor inicial do meio, para 4,20. Houve uma pequena produção de glicerol após 30 horas com valor de 0,12 ± 0,01 g/L.

Pode-se observar que realmente a *S. stipitis* em meio aeróbio na rota metabólica da xilose consiste na XR e XDH, pois há presença de xilitol no produto final, o que significa que XR reduz a xilose em xilitol usando NAD(P)H como coenzima e XDH oxida xilitol para xilulose usando NAD+, que desencadeia a rota para o ciclo de Krebs e para a formação de etanol.



FIGURA 19 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *S. stipitis* EM MEIO LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

Já para a levedura *P. tannophilus* no meio MMX, de acordo com a Figura 20 pode-se observar que esta levedura entra na fase estacionária antes do consumo total da xilose, e que a produção de metabólitos ocorre entre 24 a 27 horas de cultivo, já na fase estacionária, com valores não muito significativos para xilitol, 0,06 \pm 7,1 x 10⁻⁴ g/L e produção de etanol de 0,64 \pm 0,02 g/L em 24 horas de fermentação. O pH final para esse meio foi de 7,09, sua produção e/ou consumo do ácido acético não foi significativo, apenas nas últimas 3 horas de cultivo houve formação de 0,14 \pm 4,8 x 10⁻⁴ g/L de ácido. Não apresentou produção significativa de glicerol.

Assim como a levedura *S. stipitis* neste mesmo meio, a *P. tannophilus* não consumiu todo o substrato, isto pode ser devido a quantidades ou tipos de nutrientes essenciais insuficientes.



FIGURA 20 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO MMX EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

A levedura *P. tannophilus* em meio YPX consome praticamente toda a xilose presente no meio até entrar na fase estacionária, como representado na Figura 21. Durante a fase exponencial a levedura consome toda a pentose além do ácido acético que foi produzido. Porém mesmo com a diminuição do ácido acético no meio o pH final foi de 4,37 que pode ter sido pela quantidade remanescente de ácido acético no meio, em torno de 0,19 \pm 0,03 g/L. Não apresentou produção significativa de glicerol. O etanol acumulado foi de 1,54 \pm 0,15 g/L e 1,61 \pm 0,09 g/L de xilitol ao final do experimento, com 48 horas de cultivo.

No meio de LHBMS conforme apresentado na Figura 22, há um consumo praticamente total da xilose, e após esse consumo observa-se que esta levedura também utiliza os metabólitos formados como fonte de carbono para seu crescimento. Com isso o melhor tempo para produção de xilitol foi de 27 horas onde houve a produção máxima de $0,27 \pm 0,09$ g/L, e de 51 horas para a produção de etanol com $0,20 \pm 0,09$ g/L. Com o consumo total do ácido acético o pH final aumentou em relação ao inicial para 6,23. Pode-se considerar que não houve produção de glicerol.

Melhor assimilação da xilose foi observada neste último meio quando comparado com o meio MMX, devido aos nutrientes presentes no licor, o que favoreceu o crescimento celular e a formação de metabólitos.

FIGURA 21 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO YPX EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.



FIGURA 22 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.



A Tabela 4 indica os fatores de conversão substrato/células ($Y_{x/s}$) e os fatores de conversão substrato/produto ($Y_{p/s}$) para as duas leveduras estudadas em condições aeróbias.

	•	•		,		
	S. stipitis			P. tannophilus		
	YPX	MMX	LHBMS	ΥΡΧ	MMX	LHBMS
Y _{x/s}	0,20±0,013	0,22±0,008	0,29±0,005	0,56±0,041	0,14±0,04	0,12±0,008
Y _{p/s (etanol)}	0,24±0,017	0,02±0,013	0,14±0,0002	0,07±0,012	0,19±0,03	0,005±0,001
Y _{p/s (xilitol)}	0,02±0,005	0,15±0,013	0,04±0,00003	0,08±0,008	0,02±0,002	0,05±0,02

Tabela 4 - Valores de Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras S. stipitis e P. tannophilus nos meios YPX, MMX e LHBMS em condições de aerobiose.

Com os dados acima nas condições já explicitadas o melhor meio para a produção de etanol foi o YPX com a levedura *S. stipitis,* pois o fator de conversão substrato em produto foi maior que nos demais meios e na outra levedura. E melhor no meio MMX com a mesma levedura para produção de xilitol. Porém em quesito de crescimento celular o melhor foi com a *P. tannophilus* no meio YPX em que o fator de conversão substrato em células foi significativamente maior.
No meio estudado, LHBMS, o que teve melhor desempenho em relação à conversão de substrato em células foi com a levedura *S. stipitis*, que para a mesma se sobressaiu em relação aos outros dois meios usados como fonte de comparação de nutrientes. E que também foi a melhor das duas leveduras para a produção de etanol, porém para a produção de xilitol nesse meio, a que melhor se destaca é a *P. tannophilus*. Quanto ao fator de conversão substrato em biomassa (Y_{X/S}), o obtido com a *S. stipitis* foi 0,29 ± 0,005 g_{célula}/g_{xilose}, aproximadamente 2,6 x maior que o fator da *P. tannophilus*, com Y_{X/S} = 0,12 ± 0,008 g_{célula}/g_{xilose}. Este parâmetro fermentativo é considerado alto quando comparado com os experimentos relatados por Garcia (2012), onde a fermentação com hidrolisado de hemicelulose do bagaço de malte suplementado apenas com 3 g/L de ureia alcançou um Y_{X/S} = 0,11 g_{célula}/g_{xilose} com a levedura *S. stipitis*; E também quando comparado com os ensaios realizados por Bravo et al. (1995) utilizando a levedura *P. tannophilus* em meio de fermentação contendo 1 g/L MgSO₄, 2 g/L KH₂PO₄, 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 3,6 g/L peptona e 25 g/L de xilose obteve um Y_{X/S} = 0,094 g_{célula}/g_{xilose}.

Este fato demonstra a importância de adicionar os demais suplementos utilizados nos ensaios desta dissertação para alcançar maiores fatores de conversão da xilose em células, pois na fermentação, a necessidade de nutrientes da célula das leveduras influencia no crescimento celular e na produção de etanol.

O nitrogênio é um elemento importante, por entrar como constituinte de várias substâncias orgânicas presentes na levedura, como os aminoácidos, proteínas, enzimas, etc. Um suprimento de nitrogênio extracelular é essencial para a contínua produção de novas células e a levedura geralmente obtém esse elemento de substâncias relativamente simples, como os sais de amônia e aminoácidos. O potássio atua como ativador em uma série de reações da glicólise, processo bioquímico em que a molécula de glicose, proveniente da alimentação, é quebrada em duas moléculas menores de ácido pirúvico ou piruvato, liberando energia. O íon fosfato não é absorvido pela levedura na ausência de potássio no meio. O magnésio atua como ativador em diversas reações da vida fermentativa, sendo elemento indispensável para multiplicação e para a fermentação. Deficiência de magnésio pode causar deformação celular e retardar a liberação da célula-filha pela célula-mãe, sendo um elemento importante para o crescimento de leveduras.

Resultados similares à Tabela 4 em relação a *S. stipitis* foi relatado por Ferreira et al. (2011) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com 5 g/L extrato de levedura e 30 g/L de xilose em condições de aerobiose alcançou um $Y_{P/S} = 0,19 g_{etanol}/g_{xilose}$. Garcia (2012) no hidrolisado de hemicelulose do bagaço de malte contendo 55 g de xilose suplementado apenas com 3 g/L de ureia alcançou um $Y_{P/S} = 0,29 g_{etanol}/g_{xilose}$ também em condições de aerobiose.

5.2 FERMENTAÇÃO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EM SHAKER

A fermentação com limitação de oxigênio foi realizada com o intuito de avaliar o efeito desta variável sobre metabolismo da xilose, e principalmente na produção de metabólitos de interesse. As Figuras 23 a 25 apresentam a evolução na produção de compostos durante o consumo dessa pentose, para a levedura *S. stipitis* e as Figuras 26 a 28 da levedura *P. tannophilus,* nos três diferentes meios de cultivo.

Com relação à levedura *S. stipitis* usando o meio MMX, conforme apresentado na Figura 23, em 430 horas de experimento só foi observado o consumo da metade do substrato inicial disponível no meio, uma possível explicação, pode ser a ausência de algum nutriente fundamental no auxílio do metabolismo da xilose. Uma análise da viabilidade celular indicou que só 20,39 % das células estavam viáveis, conforme explicitado no item 4.3.4 desta dissertação. No final da fermentação o pH foi de 6,4, o que é acorde com a ausência de ácidos orgânicos. Os melhores resultados com relação ao etanol e xilitol foram no final do experimento em 430 horas de fermentação com 1,51 \pm 0,06 g/L e 5,94 \pm 0,09 g/L produzidos respectivamente. Para o caso do glicerol este não apresentou produção significativa.



FIGURA 23 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DA FERMENTAÇÃO DA *S. stipitis* EM MEIO MMX COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.

No caso da Figura 24, o cultivo da *S. stipitis* usando como meio de fermentação o meio YPX a xilose foi totalmente consumida. Em relação ao metabolismo, foi possível observar uma produção máxima de 4,53 \pm 0,24 g/L de etanol durante as primeiras 70 horas de cultivo, enquanto que para o xilitol a produção foi de 1,36 \pm 0,13 g/L, porém somente após transcorrido 238 horas de experimento que a concentração de xilitol teve sua máxima produção com 1,45 \pm 0,08 g/L. O ácido acético produzido durante esta fermentação atinge sua maior concentração em 190 horas de cultivo, com 4,02 \pm 0,17 g/L porém finaliza com apenas 0,47 \pm 0,03 g/L em 238 horas. Ao final da fermentação apresentou um pH de 7,9.

Após atingir uma concentração de 2,55 \pm 0,38 g/L de xilose, e concentrações máximas dos metabólitos, a levedura muda a velocidade de consumo do açúcar, pois é possível observar o início do consumo do principal metabólito gerado junto com o restante de xilose. Após essa mudança, existe também uma estabilização na produção de xilitol e um aumento na produção do ácido acético. Já para o final da fermentação, observa-se o início do consumo do xilitol uma vez que o etanol chega

em uma concentração em torno de $1,3 \pm 0,16$ g/L. Para o caso do glicerol não houve produções significativas durante as 238 horas de cultivo.





A Figura 25 a seguir, apresenta a fermentação usando a mesma levedura, porém utilizando como meio de cultivo o LHBMS. Nesta fermentação foi possível observar, um consumo quase total da xilose, o metabolismo da levedura muda em torno das primeiras 144 horas de cultivo, quando a concentração de açúcar atinge os 11,61 \pm 0,11 g/L, comportamento bem diferente do cultivo anterior, pois neste caso específico o etanol começa a ser consumido quando ainda resta uma boa quantidade de xilose no meio e o xilitol continua sendo produzido. A maior produção de etanol foi em 144 horas de experimento com 1,90 \pm 0,11 g/L e 1,63 \pm 0,18 g/L de xilitol nesse mesmo período, contudo sua máxima produção de xilitol foi de 2,92 \pm 0,3 g/L com 432 horas após a inoculação, ao final da fermentação.

FIGURA 25 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DA FERMENTAÇÃO DA *S. stipitis* EM MEIO LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.



No final do experimento referente à Figura 25 havia cerca de 1,45 % de células viáveis. Não houve produção representativa de glicerol, já o ácido acético mesmo sendo consumido durante a fermentação ao final resta uma quantidade significativa, 1,08 \pm 0,12 g/L resultando em um pH de 4,56, mais baixo que o valor inicial do meio.

Comparando estes resultados com os resultados desta mesma levedura na presença de oxigênio, a produção de etanol foi melhor nas condições de aerobiose e melhor com limitação de oxigênio para a produção de xilitol.

Para a levedura *P. tannophilus* no meio MMX com limitação de oxigênio a xilose não se esgotou, pois havia apenas uma taxa de 6,66 % de viabilidade celular, não houve produção de glicerol, a maior produção de etanol se deu ao final do experimento com 330 horas equivalente a $1,83 \pm 0,06$ g/L, e $6,23 \pm 0,5$ g/L de xilitol produzido ao final deste mesmo período. Houve uma pequena produção de ácido acético, $0,28 \pm 0,02$ g/L, que resultou no pH final de 5,04, um pouco menor em relação ao pH inicial deste meio. Isto pode ser verificado conforme ilustrado na Figura 26.



FIGURA 26 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DA FERMENTAÇÃO DA *P. tannophilus* EM MEIO MMX COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.

A Figura 27 representa o perfil de açúcar e metabólitos da levedura *P. tannophilus* no meio YPX com limitação de oxigênio. Pode-se observar que o substrato foi consumido praticamente de forma total, e que após 193 horas decorridas da inoculação alguns metabólitos também começam a ser utilizados como fonte de carbono pela levedura. Não apresentou produção de glicerol durante todo o cultivo, já o ácido acético tem uma concentração final de 0,24 ± 0,03 g/L, o que acarreta na diminuição do pH em relação ao inicial presente neste meio, resultando em um pH final de 5,20. O maior acúmulo de produto se deu em 193 horas com 2,67 ± 0,04 g/L de etanol e 5,66 ± 0,18 g/L de xilitol.



FIGURA 27 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DA FERMENTAÇÃO DA *P. tannophilus* EM MEIO YPX COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.

A Figura 28 indica a fermentação da *P. tannophilus* no meio LHBMS com limitação de oxigênio. O substrato não foi consumido completamente, deixando um residual de xilose no meio de cultivo ao término da fermentação, com aproximadamente 0,08 % de viabilidade celular. Não ocorreram alterações significativas na produção e/ou consumo do glicerol, com máxima produção em 119 horas com 0,08 \pm 0,01 g/L, porém a concentração de ácido acético finalizando o cultivo foi de 0,49 \pm 0,19 g/L acarretando a diminuição do pH para 4,16. Os melhores resultados de formação de produto se deram em 359 horas para o etanol com 1,48 \pm 0,008 g/L e 407 horas para a produção de 7,58 \pm 0,02 g/L.

FIGURA 28 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DA FERMENTAÇÃO DA *P. tannophilus* EM MEIO LICOR DA HEMICELULOSE DO BAGAÇO DE MALTE SUPLEMENTADO COM LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.



A tabela 5 abaixo indica os fatores de conversão substrato/células ($Y_{X/S}$) e os fatores de conversão substrato/produto ($Y_{P/S}$). Com os dados desta tabela pode-se verificar que as duas leveduras nos meios estudados possuem similaridade em relação ao $Y_{X/S}$. Os valores para $Y_{X/S}$ das duas leveduras a partir do LHBMS, não foi significativo, apenas 0,06 ± 0,01 g_{célula}/g_{xilose}, o que implica que as duas leveduras utilizaram a fonte de carbono disponível mais para produção de algum metabólito do que para crescimento celular. Nesta condição foi medido apenas a D.O._{600nm} inicial e final para cada cultivo. E em relação à produção de etanol o melhor meio foi o YPX com a levedura *S. stipitis,* pois o fator de conversão substrato em produto foi maior que nos demais meios e na outra levedura. E para a produção de xilitol o melhor meio e levedura foi o MMX também com a *S. stipitis.*

Quando comparado a Tabela 5 com a tabela 4 observa que em condição de aerobiose pelos dados apresentandos há uma preferência do consumo da xilose para crescimento celular do que para produção de metabólitos, enquanto que em limitação de oxigênio a fonte de carbono foi consumida com melhor preferência para a produção de etanol / xilitol que para o crescimento celular.

	S. stipitis			P. tannophilus			
	YPX	MMX	LHBMS	YPX	MMX	LHBMS	
Y _{x/s}	0,27±0,003	0,10±0,016	0,06±0,013	0,20±0,004	0,06±0,005	0,06±0,008	
Y _{p/s (etanol)}	0,26±0,015	0,14±0,01	0,22±0,01	0,15±0,003	0,15±0,01	0,09±0,002	
Y _{p/s (xilitol)}	0,08±0,008	0,55±0,028	0,19±0,02	0,32±0,012	0,52±0,06	0,47±0,007	

Tabela 5 - Valores de Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras S. stipitis e P. tannophilus nos meios YPX, MMX e licor da hemicelulose do bagaço de malte suplementado com componentes do MMX com condições de limitação de oxigênio.

Nestas condições trabalhadas o fator de conversão substrato em produto favorece mais o xilitol que o etanol, exceto no meio YPX para a *S. stipitis*. Que infere que as leveduras nestes meios completam toda a rota metabólica da xilose para produção de etanol associado a rota de manutenção celular, porém favorecendo a produção de xilitol. Isto pode ser ocasionado pela insuficiência de oxigênio para regenerar o NAD+, e, portanto, o XDH não consegue converter o xilitol em xilulose para seguimento da rota até a produção de etanol e energia para manutenção da célula, acumulando assim maior quantidade de xilitol no meio.

O metabolismo de xilose em leveduras está relacionado com a disponibilidade de oxigênio. A enzima XR tem maior afinidade por NADPH do que por NADH, enquanto XDH utiliza somente NAD+, essa diferença de especificidade ao coenzima resulta em um acúmulo de NAD+ e NADH devido a um desequilíbrio de reciclagem de co-fatores que ocorre sob condições de respiração reduzida, provocando a inibição da atividade de XDH, o que, em leveduras fermentadoras de xilose, contribui significativamente para o aumento da formação de xilitol e diminuição da produção de etanol. Sob condições anaeróbias, NADPH pode ser regenerado por meio de frutose-6-P na via PPP e através das enzimas NADP-dependentes, isocitrato desidrogenase e aldeído desidrogenase, minimizando o acúmulo de NAD+, entretanto, não é possível produzir a regeneração de NADH a NAD+ por meio da fermentação alcoólica e o sistema de transferência de elétrons é incapaz de realizar a re-oxidação pela respiração devido aos baixos níveis de O₂ (MARTINS, 2011, p. 21).

Em condições de microaeração Nigam (2001) empregando o hidrolisado hemicelulósico de madeira (39 g/L de açúcares totais), suplementado com 3 g/L extrato de levedura, 5 g/L peptona, 2 g/L KH₂PO₄, 1 g/L (NH₄)₂SO₄, 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O obteve um fator de conversão de 0,25 g/g. Verifica-se que os resultados obtidos nos ensaios desta dissertação com a levedura *S. stipitis* são promissores quando comparados aos dados acima reportados, visto que ao empregar uma suplementação economicamente viável para a indústria, os resultados alcançaram valores de Y_{P/S} consideravelmente próximos aos relatados pelos autores acima citados que utilizaram quantidades de suplementação não tão viáveis quanto às do presente estudo.

Em relação à levedura *P. tannophilus*, Converti, Perego e Domínguez (1999) relataram que em condições microaerofílicas fermentações a partir de hidrolisado de hemicelulose de madeira contendo 53,6 g/L de xilose suplementados com 3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte e 5 g/L de peptona utilizando a cepa *P. tannophilus* atingiu um $Y_{P/S} = 0,39 \text{ g}_{xilitol}/\text{g}_{xilose}$. E Saleh et al. (2014) empregando esta mesma levedura em hemicelulose de oliva, suplementado com 4 g/L extrato de levedura, 3,6 g/L peptona, 3 g/L (NH₄)₂SO₄, 2 g/L MgSO₄·7H2O, 2 g/L KH₂PO₄ e 25 g/L xilose em condição de microaeração obtiveram um $Y_{P/S} = 0,33 \text{ g}_{xilitol}/\text{g}_{xilose}$. Observando a partir destes dados coletados, esta cepa nas condições e meio de cultivo estudados nesta dissertação são considerados promissores para fins industriais, pois com suplementações consideradas de baixo custo, apresentou maior rendimento na produção de xilitol quando comparadas aos resultados acima relatados.

Os cultivos utilizando o LHBMS realizados com a levedura *S. stipitis* favorecem mais a produção de etanol que xilitol, e os cultivados com a *P. tannophilus* apresentam maior produção de xilitol quando comparado à produção de etanol. As condições de aerobiose e limitação de oxigênio favoreceram a seletividade etanol a xilitol para os cultivos com *S. stipitis,* já com respeito à produção de xilitol, *P. tannophilus* apresentou a maior seletividade xilitol em relação à etanol nas duas condições de oxigênio estudada, como observa-se na Tabela 6.

Tabela 6 - Valores de Seletivadade (g/g) para as leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* obtidos da fermentação a partir do LHBMS.

Condição de oxigênio	Levedura	S _{etanol} /xilitol	S _{xilitol/etanol}
Aerobiose	S. stipitis	3,40 ± 0,006	0,29 ± 5,4 x 10 ⁻⁴
	P. tannophilus	0,12 ± 0,02	8,6 ± 1,68
Limitação de oxigênio	S. stipitis	1,17 ± 0,06	0,86 ± 0,04
	P. tannophilus	0,20 ± 0,0006	5,12 ± 0,014

5.3 FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus EM BIORREATOR COM REGIME DE BATELADA SIMPLES

Foi realizado o cultivo das duas leveduras estudadas no biorreator em três condições diferentes de oxigênio dissolvido, 10 %, 5 % e 1 %, utilizando o licor advindo do pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de malte, a fim de determinar qual melhor condição de oxigenação para produção de etanol / xilitol. Os parâmetros de pH foram de 5,5 e da temperatura em 30 °C para todos os cultivos.

Os cultivos iniciaram com 400 mL de licor e retirado 3 mL a cada três horas para as análises, incluindo o acompanhamento do crescimento celular através do registro de valores da absorbância em 600 nm até a fase estacionária de crescimento celular, ou até o esgotamento da xilose monitorado pelo método do DNS. A Figura 29 mostra a cinética de crescimento das leveduras utilizando a xilose como fonte de carbono, através da concentração da biomassa de cada amostra em função do tempo.

FIGURA 29 - CRESCIMENTO CELULAR DA FERMENTAÇÃO NO BIORREATOR A PARTIR DO MEIO LHBMS SOB 30 °C E UM pH DE 5,5, SOB TRÊS CONDIÇÕES DE CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO DAS CEPAS (A) *S. stipitis* (B) *P. tannophilus*.



Observa-se pela Figura 29 o desvio-padrão das medições de D.O. em triplicatas demostrado pela barra de erro, e que a fase de latência na levedura *S. stipitis* nas três fermentações com concentrações de oxigênio dissolvido diferentes, são semelhantes, ocorrendo em torno das 9 primeiras horas de incubação, e que apresenta um maior crescimento celular quando comparado com a levedura *P. tannophilus. P*orém essa última levedura apresenta uma maior inclinação na fase exponencial, indicando uma maior velocidade máxima de crescimento conforme demonstrado na Tabela 7. Para as três fermentações realizadas com a *P. tannophilus* a fase de latência foi diferente para cada condição de oxigênio dissolvido.

Após esse período da fase lag a levedura *S. stipitis* cultivada com 10 % de OD (oxigênio dissolvido) possui a maior fase de crescimento exponencial, e é a que apresentou maior biomassa celular, alcançando 24,76 \pm 2,34 g/L ao final da fermentação com 34 horas de duração. A segunda maior concentração celular se deu com a *P. tannophilus* fermentada a 10 % de OD, com 18,05 \pm 1,69 g/L em 27 horas de cultivo. Para a concentração de oxigênio dissolvido de 5 %, a *S. stipitis* teve sua máxima concentração celular em 24 horas de cultivo com 16,78 \pm 0,4 g/L, e a *P. tannophilus* atingiu 14,74 \pm 0,72 g/L de biomassa celular em 21 horas de fermentação. Com 1 % de OD a *S. stipitis* alcançou 14,49 \pm 0,37 g/L de concentração celular em 27 horas de cultivo, e a *P. tannophilus* atingiu 11,14 \pm 0,19 g/L de biomassa celular em 42 horas de cultivo.

Portanto, as fermentações com 10 % de OD possuem a maior concentração celular, em virtude de uma maior oxigenação que nos demais cultivos proporcionando que a rota metabólica favorecesse ao crescimento celular das leveduras estudadas.

Tabela 7 - Valores de μ_{máx} (h⁻¹) para as leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* no meio LHBMS em 10 %, 5 % e 1 % de OD em fermentações realizadas em biorreator.

	S. stipitis		P. tannophilus			
10 %	5 %	1 %	10 %	5 %	1 %	
0,16±0,001	0,22±0,0006	0,16±0,0006	0,23±0,002	0,24±0,00008	0,12±0,002	

5.4.1 Cultivo da cepa S. stipitis em biorreator com 10 % de oxigênio dissolvido

Durante todo o cultivo foram ajustados a velocidade de agitação bem como o fluxo de ar para que os 10 % de OD se mantivesse durante toda a fermentação, até o consumo de toda xilose ou quando a mesma permanecesse com um residual constante. Além destes parâmetros foram acompanhados os valores de pH em torno de 5,5 e da temperatura em 30 °C, valores obtidos pelo sistema Eve. Este monitoramento é mostrado na Figura 30.

Observa-se que a temperatura e o pH ficaram praticamente constantes durante todo o cultivo, apenas o fluxo de ar e a velocidade de agitação que sofreram alterações ao longo da fermentação, pois com o aumento da concentração celular no meio, aumenta a demanda de oxigenação para as leveduras, necessitando de aumentar estes parâmetros para manter a concentração em 10 % de OD, porém ao final do experimento em que as leveduras começam a entrar na fase estacionária, a demanda de oxigênio é menor, precisando portanto de diminuir a vazão de ar e a agitação.

A Figura 31 apresenta os valores dos gases de escape durante a fermentação, a concentração da mistura de O_2 mantém em média 20 % durante todo o cultivo, conforme especificado no programa do biorreator em que na mistura de gases o O_2 manteria em 21 %, sofrendo variações apenas com o aumento do escape de CO_2 , que teve seu máximo valor em torno de 25 a 30 horas de cultivo, com 2,5 % CO_2 . Os valores de CO_2 aumentam lentamente durante a fase exponencial, demonstrando que houve fermentação, porém com baixos valores de metabólitos gerados. Nota-se ainda que quando há uma variação na densidade ótica desse experimento, durante o mesmo intervalo de tempo há também variação no CO_2 liberado. Estes valores foram adquiridos pelo software HOBO que armazena todos os dados obtidos através do analisador de Oxigênio e Dióxido de carbono, modelo 902P da Quantek Instruments.

FIGURA 30 – MONITORAMENTO DOS PARÂMENTROS EXPERIMENTAIS OBTIDOS PELO SISTEMA EVE AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *S. stipitis* EM BIORREATOR COM 10 % DE OD. (A) FLUXO DE AR, (B) VELOCIDADE DE AGITAÇÃO, (C) TEMPERATURA E PH, (D) CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO.



FIGURA 31 – (A) CO₂ % e (B) O₂ %, DOS GASES DE ESCAPE OBTIDOS PELO SISTEMA HOBO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *S. stipitis* EM BIORREATOR COM 10 % DE OD.



5.4.2 Cultivo da cepa *S. stipitis* em biorreator com 5 % de oxigênio dissolvido

A Figura 32 mostra as variáveis que foram controladas pelo software Eve para manter durante todo o período de cultivo em 5 % de OD. As condições de pH e temperatura foram as mesmas do cultivo apresentado no item 5.4.1.





Para esta fermentação, o fluxo de ar e a velocidade de agitação após 10 horas apresentou um controle mais estável ao longo do cultivo. A liberação da concentração de CO₂ foi pouco expressiva conforme mostrado na Figura 33, com

valores em torno de 0,6 % CO₂ durante a fase exponencial desse cultivo que ocorreu entre 9 e 24 horas do cultivo.



FIGURA 33 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, DOS GASES DE ESCAPE OBTIDOS PELO SISTEMA HOBO



5.4.3 Cultivo da cepa S. stipitis em biorreator com 1 % de oxigênio dissolvido

O acompanhamento dos parâmetros necessários para a fermentação da *S. stipitis* em biorreator com 1 % de OD é mostrada na Figura 34. Verifica-se que o fluxo de ar e a velocidade de agitação sofreram bastantes variações ao longo do cultivo para manter a concentração de OD desejada.

Através da Figura 35 é possível observar que nessa condição há pouco crescimento celular, em virtude da % CO₂ de escape não ter atingido valores significativos, praticamente ao longo das 33 horas não apresentou alteração.





FIGURA 35 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, DOS GASES DE ESCAPE OBTIDOS PELO SISTEMA HOBO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *S. stipitis* EM BIORREATOR COM 1 % DE OD.



5.4.4 Cultivo da cepa *P. tannophilus* em biorreator com 10 % de oxigênio dissolvido

Durante as 39 horas de fermentação a velocidade de agitação bem como o fluxo de ar foram ajustados para que os 10 % de OD se mantivesse durante o cultivo, a Figura 36(A) mostra que o fluxo de ar manteve-se controlado em torno de 0,25 L/min, ocorrendo apenas alterações na velocidade de agitação de acordo com a demanda necessária de oxigênio durante o experimento, pois com o aumento da concentração celular no meio, aumenta a demanda de oxigenação para as leveduras, necessitando de aumentar estes parâmetros para manter a concentração em 10 % de OD, porém ao final do experimento em que as leveduras começam a entrar na fase estacionária, a demanda de oxigênio é menor, precisando diminuir a vazão de ar e a agitação. Este monitoramento é mostrado na Figura 36.

FIGURA 36 – MONITORAMENTO DOS PARÂMENTROS EXPERIMENTAIS OBTIDOS PELO SISTEMA EVE AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *P. tannophilus* EM BIORREATOR COM 10 % DE OD. (A) FLUXO DE AR, (B) VELOCIDADE DE AGITAÇÃO, (C) TEMPERATURA E PH, (D) CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO.



A Figura 37 apresenta os valores dos gases de escape durante a fermentação. Os valores de CO₂ aumentam no período da fase exponencial. Em torno de 33 horas de fermentação verifica-se uma queda da % CO₂ liberado, indicando a finalização da fermentação.





5.4.5 Cultivo da cepa *P. tannophilus* em biorreator com 5 % de oxigênio dissolvido

As variáveis controladas pelo software Eve para manter ao longo da fermentação em 5 % de OD é mostrada na Figura 38 abaixo. Neste cultivo o fluxo de ar manteve-se controlado praticamente em todo o período, ocorrendo alterações na velocidade de agitação para manter a concentração em 5 % de OD, estas variações ocorrem para suprir a demanda de oxigênio que as leveduras necessitam em virtude do aumento da concentração celular no meio.

Através da Figura 39 nota-se que a liberação da concentração de CO₂ foi pouco expressiva.

FIGURA 38 - MONITORAMENTO DOS PARÂMENTROS EXPERIMENTAIS OBTIDOS PELO SISTEMA EVE AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *P. tannophilus* EM BIORREATOR COM 5 % DE OD. (A) FLUXO DE AR, (B) VELOCIDADE DE AGITAÇÃO, (C) TEMPERATURA E PH, (D) CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO.



FIGURA 39 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, DOS GASES DE ESCAPE OBTIDOS PELO SISTEMA HOBO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *P. tannophilus* EM BIORREATOR COM 5 % DE OD.



5.4.6 Cultivo da cepa *P. tannophilus* em biorreator com 1 % de oxigênio dissolvido

O acompanhamento dos parâmetros necessários para a fermentação deste cultivo é mostrado na Figura 40. Observa-se que com 1 % OD para a cepa *P. tannophilus* as variáveis analisadas praticamente não sofrem alterações significativas, o que pode inferir que o fluxo de carbono não foi direcionado para o crescimento celular desta cepa, havendo baixa conversão de xilose em células.

A Figura 41 apresenta % CO₂ crescente durante a fase exponencial de crescimento celular, e uma diminuição da fermentação após 24 horas de cultivo até o esgotamento da xilose, finalizando a fermentação.







FIGURA 41 - (A) CO₂ % e (B) O₂ %, DOS GASES DE ESCAPE OBTIDOS PELO SISTEMA HOBO AO LONGO DA FERMENTAÇÃO PARA *P. tannophilus* EM BIORREATOR COM 1 % DE OD.

5.4.7 Produção de metabólitos durante a fermentação realizada em reator

Os resultados dos metabólitos produzidos realizados na UFSCar não foram discutidos no trabalho por não apresentarem confiabilidade nos dados conforme apresentado na Figura 42 abaixo, por apresentarem vários picos de produção de etanol e xilitol. Posteriormente foram repassadas novas amostras no CLAE do laboratório de Engenharia de Alimentos da UFG, porém acredita-se que as amostras foram danificadas durante o transporte de São Carlos até Goiânia, pois os resultados não apresentaram boa correlação com o esperado.



FIGURA 42 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS DO CRESCIMENTO CELULAR DA S. stipitis E P. tannophilus NO MEIO LHBMS EM BIORREATOR COM CONDIÇÕES DE 10 %, 5 % E 1 % DE OD.

5.4 INFLUÊNCIA DA FONTE DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO DAS LEVEDURAS S. stipitis E P. tannophilus A PARTIR DO LHBMS

5.5.1 Fermentação aeróbia das leveduras S. stipitis e P. tannophilus em shaker

A fonte de nitrogênio tem um papel fundamental no metabolismo das leveduras, não só restringindo-se a composição celular, em alguns casos com da *Saccharomyces cerevisiae* a amônia também funciona como um importante intermediário que conecta as rotas de degradação e biossíntese, assim como a expressão dos genes que codificam enzimas (TERCHURE; VAN RIEL; VERRIPS, 2000). Por esta razão, foram realizados experimentos em shaker das leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus*, utilizando como fonte de carbono xilose com uma concentração inicial de 20 g/L, afim de comparar a cinética de crescimento e produção de metabolitos das duas leveduras. Para este estudo, foi utilizado o meio LHBMS, sem ureia e adicionando duas diferentes concentrações (2 e 4 g/L) e fontes de nitrogênio (sulfato de amônio e Ureia). Condições que permitiram realizar uma análise preliminar da influência da fonte de nitrogênio e sua concentração no meio de fermentação.

A Figura 43 apresenta o cultivo da levedura *S. stipitis* no meio LHBMS-sem Ureia com (NH₄)₂SO₄ (4 g/L). Em relação ao crescimento celular pode-se observar que a fase lag seguida da fase de transição ocorre em torno das 20 primeiras horas de incubação. Após esse período a levedura entra em uma fase de crescimento irregular, alcançando 5,39 g/L de biomassa em 62 horas de experimento. O consumo da xilose está diretamente relacionado ao crescimento celular dessa cepa e a formação de etanol. Após o esgotamento da xilose com um residual em torno de 0,8 g/L há uma estabilização na produção do etanol, a maior produção desse metabólito ocorreu em 62 horas de cultivo atingindo 2,26 g/L. Xilitol nesse mesmo período de tempo obteve 0,23 g/L. Em todos os experimentos realizados para esta condição de oxigenação não apresentaram produção significativa de glicerol.



FIGURA 43 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR S. stipitis EM MEIO LHBMS COM (NH₄)₂SO₄ A 4 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

O cultivo da levedura *S. stipitis* no meio LHBMS-sem Ureia com (NH₄)₂SO₄ (6 g/L) apresentou um comportamento similar, quanto usada uma concentração menor de (NH₄)₂SO₄. No final, após 62 horas de cultivo a levedura atingiu uma concentração máxima de biomassa, igual a 5,40 g/L. Observa-se que após o esgotamento da xilose com um residual em torno de 0,8 g/L assim como o que aconteceu com o teste acima há uma estabilização na produção do etanol,. Com relação aos metabolitos produzidos, o etanol apresentou uma concentração máxima de 2,15 g/L, enquanto que para o xilitol foi de 0,29 g/L, como apresentado na Figura 44 abaixo.

Após os experimentos realizados usando como fonte de Nitrogênio o Sulfato de amônia, foi testada a ureia como fonte de nitrogênio com uma concentração de 4 g/L. Os resultados obtidos durante a fermentação da levedura *S. stipitis* no meio LHBMS com ureia são apresentados na Figura 45. Esta cepa apresentou um comportamento mais linear na fase de crescimento celular, quando comparada ao crescimento nos meios utilizando sulfato de amônio. Porém com mesmo intervalo de 20 horas de fase lag. No final do cultivo a levedura alcançou uma concentração de biomassa de 4,78 g/L para 62 horas de cultivo, aproximadamente 0,6 g/L a

menos que nos experimentos acima citados. No entanto a concentração de etanol foi um pouco melhor, alcançando 2,59 g/L em 62 horas de experimento período no qual não houve produção de xilitol.



FIGURA 44 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR S. stipitis EM MEIO LHBMS COM (NH₄)₂SO₄ A 6 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

FIGURA 45 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR S. stipitis EM MEIO LHBMS COM UREIA A 4 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.



Na Figura 46 é apresentada a fermentação da levedura *S. stipitis* no meio LHBMS com ureia (6 g/L). Nesta condição de cultivo a levedura apresentou uma fase de crescimento celular linear, iniciando em torno das 20 horas de cultivo, e obtendo uma concentração de biomassa máxima ao final das 62 horas de experimento, com um valor de 4,57 g/L. Observa-se ainda uma produção do etanol, que atingiu seu valor máximo em 62 horas com uma concentração de 2,48 g/L, e com ausência na produção de xilitol.

Por outro lado, cultivos da levedura *P. tannophilus* no meio LHBMS-sem ureia e com (NH₄)₂SO₄ (4 g/L) foram realizados e podem ser observados na Figura 47. A diferença da *S. stipitis*, esta levedura apresentou uma fase lag durante as primeiras 15 horas de cultivo, referente ao período de adaptação no meio. Na fase de crescimento, a concentração celular atingiu um máximo valor de 10,92 g/L em 71 horas de experimento, restando um pequeno residual de xilose em torno de 0,9 g/L. Os valores máximos de produção de etanol e xilitol obtidos durante as 71 horas de cultivo, foram de 0,52 g/L e 0,87 g/L respectivamente para o mesmo período.

FIGURA 46 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR S. stipitis EM MEIO LHBMS COM UREIA A 6 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.





FIGURA 47 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO LHBMS COM (NH₄)₂SO₄ A 4 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

No caso da Figura 48, são apresentados os resultados obtidos durante o cultivo da *P. tannophilus* no meio LHBMS sem ureia e com (NH₄)₂SO₄ (6 g/L). Em relação ao crescimento celular pode-se observar que a fase lag seguida da fase de transição ocorre nas 15 primeiras horas de incubação. Após essa transição a levedura passa para a fase de crescimento alcançando 10,72 g/L de biomassa em 65 horas de experimento, resultando em 0,71 g/L de produção de etanol e 1,05 g/L de xilitol. A xilose não foi consumida integralmente restando um residual de aproximadamente 1 g/L.

Na Figura 49 a seguir são apresentados os resultados obtidos durante a fermentação no meio LHBMS com ureia (4 g/L) pela levedura *P. tannophilus*. Verifica-se que neste meio foi consumida praticamente toda a xilose, restando um residual de 0,6 g/L no final das 86 horas de fermentação. A fase lag seguida da fase de transição ocorre também nas 15 primeiras horas de incubação, e em seguida a levedura entra na fase de crescimento alcançando 9,81 g/L de biomassa ao final da fermentação, em 86 horas. Com esgotamento da xilose observa-se a estabilização da produção de etanol que atingiu 0,77 g/L e 0,85 g/L de xilitol em 71 horas de experimento.



FIGURA 48 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO LHBMS COM (NH₄)₂SO₄ A 6 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.

FIGURA 49 - CRESCIMENTO CELULAR, CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR P. tannophilus EM MEIO LHBMS COM UREIA A 4 G/L EM CONDIÇÕES AERÓBIAS.



Analisando a Figura 50 que apresenta o cultivo da levedura *P. tannophilus* no meio LHBMS com ureia (6 g/L), verifica-se que nesta concentração de fonte nitrogênio a fase de crescimento celular inicia-se após 15 horas de incubação, alcançando 8,43 g/L de biomassa em 86 horas de experimento e com um valor de

xilose residual de aproximadamente 0,6 g/L. Após o esgotamento da xilose a produção de etanol atingiu o valor máximo em 71 horas de cultivo com uma concentração de 0,84 g/L, valor similar à obtida na produção de xilitol. A maior produção de xilitol ocorreu no final do cultivo com 0,95 g/L, onde a levedura inicia uma mudança no seu metabolismo para esta via, provavelmente pela baixa concentração de substrato no meio, levando-a a priorizar sua manutenção.

A partir destas análises foi possível realizar os parâmetros cinéticos dos oito ensaios e comparar com o resultado do primeiro experimento realizado utilizando como fonte de N₂ a ureia (1,5 g/L). Valores calculados são apresentados na Tabela 8, a partir da comparação dos valores obtidos, foi possível selecionar o meio que favoreça a produção de um metabólito específico e que permita o esgotamento do substrato, o que leva a pensar que não existe limitação pela fonte de nitrogênio durante a fermentação. Após essa comparação foram realizadas as fermentações com limitação de oxigênio.





	S. stipitis				P. tannophilus			
	µ _{máx} (h⁻¹)	Y _{x/s}	Y _{p/s} (etanol)	Y _{p/s} (xilitol)	$\mu_{máx}$ (h ⁻¹)	Y _{x/s}	Y _{p/s} (etanol)	Y _{p/s} (xilitol)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (4 g/L)	0,07	0,28	0,12	0,01	0,06	0,54	0,03	0,05
(NH ₄) ₂ SO ₄ (6 g/L)	0,07	0,27	0,11	0,02	0,07	0,55	0,04	0,05
Ureia (1,5 g/L)	0,12	0,29	0,14	0,04	0,08	0,12	0,01	0,05
Ureia (4 g/L)	0,07	0,24	0,13	0	0,05	0,46	0,04	0,04
Úreia (6 g/L)	0,07	0,23	0,13	0	0,05	0,41	0,05	0,05

Tabela 8 - Valores de $\mu_{máx}$ (h⁻¹), Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* nos meios LHBMS com (NH₄)₂SO₄ (4 g/L e 6 g/L) e ureia (1,5 g/L, 4 g/L e 6 g/L) em condições de aerobiose.

Com os dados acima nas condições já explicitadas o melhor meio para a produção de etanol foi o da ureia (1,5 g/L) com a levedura *S. stipitis,* pois o fator de conversão substrato em produto foi maior que nos demais meios e na outra levedura, sendo mais viável economicamente em virtude de uma menor concentração. Porém para a levedura *P. tannophilus* o melhor meio foi o que utilizou ureia (6 g/L) que apresentou melhor fator de conversão Y_{P/S(etanol)} quando comparada com os dos outros ensaios, em virtude disto, este meio será utilizado para a realização dos testes de fermentação com limitação de oxigênio.

5.5.2 Fermentação com limitação de oxigênio das leveduras *S. stipitis* e *P. tannophilus* em shaker

A Figura 51 apresenta a produção de metabólitos de interesse durante o consumo da xilose para o meio LHBMS com ureia como fonte de nitrogênio, numa concentração de 6 g/L pela *S. stipitis*. Na fermentação de 432 horas, foi possível chegar quase ao esgotamento total da pentose, restando um residual de $1,27 \pm 0,17$ g/L. Observa-se que quando aumentou a concentração de ureia no meio, a produção de etanol também aumentou ocasionando um metabolismo diferente do que ocorreu no experimento com ureia a 1,5 g/L, nesse em 144 horas o etanol era

consumido juntamente com a xilose favorecendo a produção de xilitol, o contrário do que ocorre neste experimento em que a produção de etanol é crescente, ocorrendo um acúmulo de 3,88 ± 0,09 g/L ao final do cultivo, e uma produção de 1,22 ± 0,25 g/L de xilitol. Isso pode ter ocasionado em função do nitrogênio favorecer a produção de novas células, equilibrando, portanto, as coenzimas NADH e NAD+, contribuindo para rota metabólica da produção de etanol.

No final do experimento houve uma pequena produção de glicerol de 0,11 ± 0,005 g/L, já para o ácido acético não apresentou concentração significativa ao final do cultivo, resultando em um pH final de 5,87.

Para a fermentação da *P. tannophilus* a xilose não foi consumida completamente, deixando um residual de $5,17 \pm 0,14$ g/L no meio de cultivo ao término da fermentação, que perdurou por 432 horas. As melhores produções de etanol e xilitol ocorreram em 288 horas de cultivo, com $0,61 \pm 0,07$ g/L de etanol e $0,81 \pm 0,001$ g/L de xilitol. A partir deste período verifica-se que há uma estabilização da produção de metabólitos em virtude também da estabilização do consumo da xilose conforme mostrado na Figura 52.

FIGURA 51 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *S. stipitis* EM MEIO LHBMS COM UREIA A 6 G/L EM CONDIÇÕES DE LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.





FIGURA 52 - CONSUMO DE XILOSE E PRODUTOS OBTIDOS POR *P. tannophilus* EM MEIO LHBMS COM UREIA A 6 G/L EM CONDIÇÕES DE LIMITAÇÃO DE OXIGÊNIO.

A partir dos valores obtidos a respeito da Figura 52, é possível considerar que existe uma diferença considerável no metabolismo das duas leveduras, mais ainda numa situação desfavorável como é o caso da limitação de oxigênio, situação que leva a diferentes valores *uptake* do substrato, tanto no caso da *S.stipitis* quanto para o caso da *P. tannophillus*, sendo que esta última apresentou um acúmulo de substrato no meio e mudanças no seu metabolismo. No experimento também foi possível identificar uma alta produção de ácido acético que ocorreu em 240 horas, o que levaria a um stress e uma inibição do metabolismo desta cepa, uma vez que altas concentrações de ácido acético pode levar a morte celular (KITANOVIC et. al., 2012; SOUSA et al., 2012). A concentração final de ácido acético foi de 6,6 g/L ± 0,05 g/L, resultando em um pH final de 5,0.

Em 288 horas o glicerol atingiu uma máxima concentração de $0,87 \pm 0,14$ g/L, e posteriormente foi consumido 50 % desse valor ao final do experimento, o que indica que além da xilose, este microrganismo também utilizou o glicerol a partir deste momento como fonte de carbono.

Com o intuito de comparar os parâmetros cinéticos desse experimento utilizando ureia a 6 g/L com o de 1,5 g/L a Tabela 9 foi elaborada.

Levedura	Parâmetros Cinéticos	Meio LHBMS com:		
		Ureia (1,5 g/L)	Ureia (6 g/L)	
	µ _{máx} (h⁻¹)	*	*	
	Y _{x/s}	0,06±0,013	0,05±0,005	
S. stipitis	Y _{p/s (etanol)}	0,22±0,01	0,22±0,002	
	Y _{p/s (xilitol)}	0,19±0,02	0,07±0,01	
	Setanol/xilitol	1,17±0,06	3,18±0,6	
	S _{xilitol/etanol}	0,86±0,04	0,32±0,06	
	µ _{máx} (h ⁻¹)	*	*	
P. tannophilus	Y _{x/s}	0,06±0,008	0,11±0,001	
	Y _{p/s (etanol)}	0,09±0,002	0,05±0,005	
	Y _{p/s (xilitol)}	0,47±0,007	0,06±0,0004	
	S _{etanol} /xilitol	0,20±0,0006	0,75±0,08	
	S _{xilitol/etanol}	5.12±0.15	1.33±0.15	

Tabela 9 - Valores de µ _{máx} (h ⁻¹), Yx/s, Yp/s (etanol) e Yp/s (xilitol) para as leveduras S. stipitis e
P. tannophilus nos meios LHBMS com ureia (1,5 g/L e 6 g/L) em condições de limitação de
oxigênio.

* Os µmax referente as condições com limitação de oxigênio não foram realizados, pois nesta condição não foi acompanhado o crescimento celular.

Observa-se pelos resultados que o aumento da concentração de nitrogênio na condição de limitação de oxigênio não favoreceu a produção de metabólitos, pois os melhores fatores de conversão de substrato em etanol ocorreram quando a ureia com uma concentração de 1,5 g/L foi utilizada para ambas as leveduras estudadas.

Não há muitas literaturas que relatam como a fonte de nitrogênio pode influenciar no metabolismo celular, porém alguns artigos citam sobre o rendimento em determinada concentração de uma fonte de nitrogênio. Monteiro (2016), por exemplo, relata que nos experimentos que ele realizou utilizando o mosto da cana de açúcar com três concentrações diferentes de uma mesma fonte de nitrogênio, que ao adicionar mais desta fonte nitrogenada diminuía o rendimento da fermentação alcoólica.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a partir da fermentação do licor de hemicelulose do bagaço de malte suplementado, através da conversão de xilose, a *S. stipitis* apresentou a melhor seletividade etanol/xilitol tanto em condições de aerobiose quanto em limitação de oxigênio. Já em relação à seletividade xilitol/etanol a *P. tannophilus* obteve melhor desempenho nas duas condições de oxigênio estudada.

Quando realizada a comparação entre os três meios de cultivo: meio complexo (YPX), meio mínimo (MMX) e meio de licor de hemicelulose do bagaço de malte suplementado (LHBMS), para determinar o desempenho da *S. stipitis* e da *P. tannophilus* nesses meios, como esperado o meio "rico" YPX deu os melhores resultados para crescimento e produção de etanol, mas este meio é caro sendo inviável de ser usado na indústria. Este estudo demonstrou que *S. stipitis* cultivada no meio LHBMS tem potencial para ser usada na indústria como aproveitamento da fração de hemicelulose de resíduos lignocelulósicos como o bagaço de malte. Contudo, as condições de oxigenação devem estar bem estabelecidas para evitar o desfavorecimento da seletividade etanol/xilitol.

O cultivo da levedura *P. tannophilus* nos três meios de crescimento, e nas duas condições de oxigênio, permitiu analisar as mudanças no metabolismo da levedura, além de verificar a relação que existe entre a produção de xilitol e etanol com a disponibilidade de oxigênio no meio de cultura, sendo que o xilitol foi preferivelmente produzido na limitação de oxigênio enquanto o etanol em maior concentração deste gás. Finalmente, no caso dos meios utilizados para a fermentação, foi possível observar pouca variabilidade no fator de conversão de xilose em xilitol nos cultivos quando realizados com limitação de oxigênio, o que resulta interessante no aspecto econômico, pois o uso de um meio de cultura mais acessível permite viabilizar a produção desse metabólito por esta levedura.

Ao aumentar a concentração da fonte de nitrogênio no meio LHBMS verificase que o desempenho da levedura *S. stipitis* nas duas condições de oxigênio melhora em relação aos ensaios realizados de menor concentração de fonte nitrogenada quanto à concentração de etanol produzido, em torno de 50 % a mais para a condição de aerobiose e de até 100 % a mais para limitação de oxigênio. No entanto o desempenho é desfavorável para a *P. tannophilus* que em condição de limitação de oxigênio apresenta baixa concentração de etanol produzido, correspondendo a 142 % abaixo do produzido com a fonte nitrogenada de menor concentração, e aproximadamente 900 % menor na produção de xilitol, em aerobiose os resultados foram similares, contudo em detrimento dos resultados em condição de limitação para esta cepa, não é interessante o uso da ureia como fonte de nitrogênio com concentração de 6 g/L.
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, D.; MACNAUGHTAN, W.; FOSTER, T. J. Interactions between microfibrillar cellulose and carboxymethyl cellulose in an aqueous suspension. **Carbohydrate Polymers**. Loughborough, UK, p. 1-24, dez. 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.086>. Acesso em: 23 fev. 2018.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA, N. Bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de etanol de segunda geração. Parte II: Fermentabilidade do Hidrolisado de Hemicelulose. **Revista Eletrônica de Biotecnologia**. V. 13 No. 5, 2010.

BIODIESELBR. **Biocombustíveis - da primeira a quarta geração**. 2008. Disponível em: https://www.biodieselbr.com/destaques/2007/biocombustiveis-primeira-quarta-geracao-10-03-08.htm. Acesso em: 23 fev. 2018.

BNDS. **Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável**. 1. ed. Rio de Janeiro, 2008.

BRASIL. **Lei nº 13.576**, de 26 de dezembro de 2017. Dispõe sobre a política nacional de biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/L13576.htm. Acesso em: 06 mar. 2018.

BRAVO, V.; CAMACHO, F.; SANCHEZ, S.; CASTRO, E. Influence of the Concentrations of D-Xylose and Yeast Extract on Ethanol Production by *Pachysolen tannophilus*. **Journal of Fermentation and Bioengineering.** V. 79, No. 6, 566-511. 1995.

CHEIRAN, K. P. et al. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**. 2019.

CHU, B. C. H.; LEE, H. Genetic improvement of Saccharomyces cerevisiae for xylose fermentation. **Biotechnology Advances**. Ontario, Can, v. 25, p. 425–441, 2007.

COELHO, J. M. F. Perspectivas para o setor de biocombustíveis do Brasil em 2018. **Revista Canavieiros**. Edição de janeiro de 2018, N. 139, ano XI, 2018. Disponível em: http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1160888>. Acesso em: 23 fev. 2018.

COLETTA, V. C. et al. Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. **Biotechnology for Biofuels**. São Carlos, SP, p. 1-10, 2013. Disponível em: http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/43. Acesso em: 24 fev. 2018

CONVERTI, A., PEREGO, P., DOMÍNGUEZ, J. M. (1999). Xylitol Production from Hardwood Hemicellulose Hydrolysates by Pachysolen tannophilus, Debaryomyces hansenii, and Candida guilliermondii. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 82(2), 141–152.

DASGUPTA, A., CHANDEL, M.K. Enhancement of biogás production from organic fraction of municipal solid waste using hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology Reports**. BITEB 100281, 2019.

DESHAVATH, N.N. et al. Chemical composition analysis of various genetically modified sorghum traits: Pretreatment process optimization and bioethanol production from hemicellulosic hydrolyzates without detoxification. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. 2018.

DRAGONE, S. I. M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007. 173 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)-Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

EI HARCHI, M.; FAKIHI KACHKACH, F.Z; EL MTILI, N. Optimization of thermal acid hydrolysis for bioethanol production from Ulva rigida with yeast Pachysolen tannophilus. **South African Journal of Botany**. v.115, p. 161–169, 2018.

FARIAS, D.; ATALA, D. I. P.; MAUGERI, F. Improving bioethanol production by *Scheffersomyces stipitis* using retentostat extractive fermentation at high xylose concentration. **Biochemical Engineering Journal**. v. 121, p. 171 – 180, 2017.

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

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definição e perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**. Três Lagoas, MS, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2015.

GARCIA, D. Estudo da produção de etanol pela levedura Pichia stipitis a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. 2012. 153 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial)-Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

GOLDANI, E.; BONI, L. A. B.; SANTOS, A. M. Manual para o Preparo de Reagentes e Soluções. **Grupo Tchê Química – Química Porto Alegrense**.

Gracioli, M. R. **Purificação e caracterização de uma xilanase halotolerante de Aspergillus hortai CRM 1919 e aplicação na hidrólise de subprodutos agroindustriais**. 2018. 130 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada))-Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, São Paulo, 2018.

GRANBIO. **Bioflex I - Bioflex e o etanol de segunda geração_Produção de biocombustível de forma tecnológica e inovadora**. [2014]. Disponível em: http://www.granbio.com.br/conteudos/biocombustiveis/. Acesso em: 13/03/2018.

GUO, L. et al. The green hydrolysis technology of hemicellulose in corncob by the repeated use of hydrolysate. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v. 26, p. 191–195, 2018.

INFORS HT. Disponível em: https://www.infors-https://www.infors-https://www.infors2. Acesso em: 02 abr. 2019.

JO, J.H. et al. Construction of efficient xylose-fermenting Saccharomyces cerevisiae through a synthetic isozyme system of xylose reductase from Scheffersomyces stipitis. **Bioresource Technology**. v. 241, p. 88 – 94, 2017.

KITANOVIC, A. et al. Acetic acid treatment in S. cerevisiae creates significant energy deficiency and nutrient starvation that is dependent on the activity of the mitochondrial transcriptional complex Hap2-3-4-5. **Front Oncol**. 2012.

LOPES, J. J. C. Balanço de Nutrientes Minerais no Processo Melle-Boinot de Fermentação Alcoólica. 1989. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

LOPES, M.L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and Industry. **Biotechnology and Industry Microbiology**. V. 47, p. 64–76, São Paulo, 2016.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. **Embrapa**. Comunicado Técnico 85, Março, 2013.

MALDONADE, I. R. et al. Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson. **Embrapa**. Comunicado Técnico 86, Março, 2013.

MARTINS, G. M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose**. 2011. 101 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp, Campus de São José do Rio Preto/SP, 2011.

MATOS, J. P. et al. Alcoholic Fermentation of Hemicellulosic Hydrolyzate from Sunflower Cake by *Galactomyces geotrichum* UFVJM-R10 and *Candida akabanensis* UFVJM-R131. **Química Nova**. v.41 no.1 São Paulo. 2018.

MEI, G-Y. et al. Transfer of plasmid into the pentose-fermenting yeast Pachysolen tannophilus. **Journal of Microbiological Methods**. v.148, p. 97-103, 2018.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MONTAÑO, I. D. C. Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração. 2013. 126 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos/SP, 2013.

MONTEIRO, B. M. S. Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar. 2016. 137 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – USP, Piracicaba, 2016.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* Parte I – Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Árvore**. Viçosa, MG, v.29, n.3, p.461-470, 2005.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**. Lorena/SP, v. 43, p. 1–14, 2006.

NANCY, J.A. Temperature Sensitivity of the Induction of Xylose Reductase in Pachysolen tannophilus. **Biotechnology and Bioengineering**. v. XXVII, p. 1739-1744, 1985.

NAVIGANT RESEARCH. **Biofuels demand for road transportation will surpass 51 billion gallons annually by 2022**. [2014]. Disponível em: <https://www.navigantresearch.com/newsroom/ biofuels-demand-for-roadtransportation-will-surpass- 51-billion-gallons-annually-by-2022>. Acesso em 05 mar. 2018.

NEVES, B. C.; ELEUTHERIO, E. C. A.; VILELA, L. F. Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada e seu uso. Instituto Nacional de Propriedade Industrial. 2014.

NEIRINCK, L. G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. The Requirement of Oxygen for Incorporation of Carbon from D-Xylose and D-Glucose by *Pachysolen tannophilus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. Canada. v. 228, No. 1, January, p. 13-21, 1984.

NIGAM, J.N. Development of xylose-fermenting yeast Pichia stipitis for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, p. 208-215, 2001.

NOGUÉ, V. S.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation The Requirement of Oxygen for Incorporation of Carbon from D-Xylose and D-Glucose by Pachysolen tannophilus'as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnol Lett**. p. 1-12, 2014.

PATIÑO LAGOS, M. A. Engenharia evolutiva e genômica de leveduras Saccharomyces cerevisiae recombinantes fermentadoras de xilose. 2015. 109 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências)- Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2015.

PORTAL DO BIOGÁS. **Fabricação de Açúcar e Etanol a partir da Cana-deaçúcar**. 2014. Disponível em: https://www.portaldobiogas.com/fabricacao-deacucar-e-etanol-partir-da-cana-de-acucar/>. Acesso em 20 nov. 2018.

ROSA, S. E. S.; GARCIA, J. L. F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. **Revista do BNDES 32**. p. 117-156, 2009. Disponível em: https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/10017/1/RB%2032%200%20etan ol%20de%20segunda%20gera%C3%A7%C3%A3o_limites%20e%20oportunidades_ P_BD.pdf>. Acesso em: 06 mar. 2018.

ROSSI, E. et al. Pré-tratamentos na produção de etanol de segunda geração. Revista Monografias Ambientais – REMOA; Revista do Centro do Ciências Naturais e Exatas - UFSM. Santa Maria. v.13, n.4, p.3516-3522, 2014.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. Nature. v. 454, p. 841–845, 2008.

SÁ, L. R.V.; CAMMAROTA, M. C.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Produção de hidrogênio via fermentação anaeróbia – Aspectos gerais e possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais brasileiros. **Quimíca Nova**. v. 37, n. 5, p. 857-867, 2014.

SALEH, M., CUEVAS, M., GARCÍA, J. F., SÁNCHEZ, S. (2014). Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by Pachysolen tannophilus. **Biochemical Engineering Journal**, 90, 286–293.

SANTOS, D. S. **Produção de etanol de segunda geração por Zymomonas** *mobilis* naturalmente ocorrente e recombinante, empregando biomassa lignocelulósica. 2012. 243 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia industrial – Engenharia bioquímica**. São Paulo: Blucher, 2001.

SILVA, J. S. et al. Enzymatic Hydrolysis, Fermentation and Biofuels Production from *Ananas Comosus*crown. **Química Nova.** v.41 no.10 São Paulo. 2018

SILVA, N. L. C. **Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose**. 2010. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

SIMS, R. E. H. et al. An overview of second generation biofuel technologies. **Bioresource Technology**, v. 101, p.1570–1580, 2010.

SOUZA, A. C. **Utilização de celulases de leveduras para produção de bioetanol de segunda geração**. 2011. 90f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras - UFLA, Lavras, 2011.

SOUSA, M. J. et al. 2012. Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid. **Metabolismo celular** - homeostase celular e resposta ao estresse, Paula Bubulya, IntechOpen, DOI: 10.5772 / 27726. Disponível em:

https://www.intechopen.com/books/cell-metabolism-cell-homeostasis-and-stress-response/stress-and-cell-death-in-yeast-induced-by-acetic-acid

SOUZA, R. B. A. **Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar**. 2016. 106 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)-Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, São Carlos, SP, 2016.

SLININGER, P.J. et al. Conversion of D-Xylose to Ethanol by the Yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. XXIV, p. 371-384, 1982.

SRITRAKUL, N.; NITISINPRASERT, S.; KEAWSOMPONG, S. Evaluation of dilute acid pretreatment for bioethanol fermentation from sugarcane bagasse pith. **Agriculture and Natural Resources.** p. 1-23, 2018.

TERSCHURE, E. G., VAN RIEL, N.A.W., VERRIPS, C. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. **FEMS MICROBOL**. V.24, P. 67-83, 2000.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A.S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3, 5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. **Embrapa Agroindústria Tropical**. Fortaleza, 2013.

VIEIRA, C. F. S. Seleção e melhoramento de leveduras capazes de fermentar pentoses através de engenharia evolutiva. 2016. 111 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, SP, 2016.