



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO POR *Dekkera bruxellensis*  
A PARTIR DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

**Carolina Brito Codato**

Araras  
2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE 2ª GERAÇÃO POR *Dekkera bruxellensis*  
A PARTIR DE HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR**

Carolina Brito Codato  
Bióloga e Especialista em Gestão Ambiental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Agricultura e Ambiente -  
Centro de Ciências Agrárias/UFSCar para  
obtenção do título de Mestre em Agricultura  
e Ambiente

**Orientador:** Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos  
**Co-orientadora:** Profa. Dra. Sandra Regina Ceccato-Antonini

Araras  
2013

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar

C669pe

Codato, Carolina Brito.

Produção de etanol de 2ª geração por *Dekkera bruxellensis* a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar / Carolina Brito Codato. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
95 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fermentação. 2. *Dekkera bruxellensis*. 3. Resíduos lignocelulósicos. 4. Bagaço de cana. I. Título.

CDD: 660.28449 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
DE

**CAROLINA BRITO CODATO**

APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA  
E AMBIENTE, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM **13 de**  
**AGOSTO de 2013.**

BANCA EXAMINADORA:

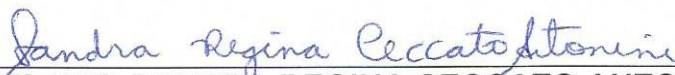


---

**PROF. DR. REINALDO GASPAR BASTOS**

**ORIENTADOR**

**DTAISER/CCA/USFSCAR**



---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI**

**CO-ORIENTADORA**

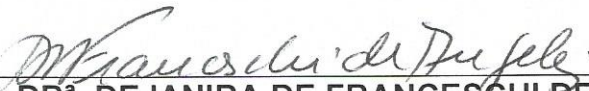
**DTAISER/CCA/UFSCar**



---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. MARCIA MARIA ROSA MAGRI**

**DCNME/CCA/UFSCar**



---

**PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS**

**UNESP/RIO CLARO**

*Dedico este trabalho*

*Aos meus pais Auréila e Caio que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e não mediram esforços para que eu pudesse realizá-los.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço em especial meu orientador Dr. Reinaldo Gaspar Bastos, pela confiança, dedicação e principalmente por tornar o desenvolvimento deste trabalho algo tão descontraído e prazeroso.

Agradeço a minha também orientadora, Dra. Sandra Regina Ceccato Antonini pela confiança depositada. Sou eternamente grata, pois graças ao seu convite de trabalho foi amadurecida a idéia do mestrado.

Aos meus pais Caio e Aurélia por todo amor, carinho e apoio incondicional. Tudo que conquistei foi graças a vocês, nunca mediram esforços para minha formação. Presentes em todos os momentos de minha vida, angustiantes ou de alegria, sempre com alguma palavra de conforto e otimismo.

Meu irmão Bruno, me ajudando nas horas mais cruciais deste trabalho. Mesmo distante sempre solucionou os problemas desta irmã que te ama muito.

Meu companheiro, amigo e futuro marido Geraldo. Sempre tão calmo e paciente. Aprendi e continuo aprendendo muito com você.

À amiga e companheira Afra, pela amizade, atenção e apoio dispensados em todas as etapas do trabalho. Aprecio muito nossa amizade.

À Cristina Martini, que há tanto tempo consegue me aturar nas mais diversas situações. Trabalhamos duro, mas foi divertido. Sua contribuição neste trabalho é algo que nunca esquecerei.

Expresso também minha gratidão à todos amigos do LAMAM, Ângelo, Ana Paula, Ana Silvia, Anna Lívia, Carol Zica, Gabriele, Gisele Rocha, Guilherme, Letícia, Michel, Renato Corrêa, Rodolfo, Vanda e Yubis. Em especial à Técnica Lúcia Piccolo (Lucinha), uma pessoa de coração enorme, que nunca dispensa carinho e atenção com todos.

Às professoras Silvana Perissatto Meneghin e Márcia Maria Rosa Magri, por toda atenção e carinho. Somos privilegiados em tê-las trabalhando conosco.

Às professoras não mais presentes no CCA Ana Lúcia Seghessi e Giselle Fracetto, apesar distância tenho muito carinho por vocês.

Aos técnicos do Laboratório de Simulação Tecnológica (LAST), Cidinho e Renato, à professora Teca e ao estagiário Rafael, pela colaboração nas barulhentas horas de separação do bagaço de cana.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC), Tina, Cláudia, Daniela e Luiz Felipe, que me ajudaram inúmeras vezes e sempre foram tão solícitos.

Ao pessoal da USP de Lorena, Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, Barbara Santiago, Bruno Guedes, Daniela Cortez, Isabela Zeferino, João Silva, Nicanor e Túlio Lima, sempre tão atenciosos com as amostras do HPLC.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente que contribuíram para a ampliação dos meus conhecimentos.

Aos colegas de turma, Érika, Daiane, Fabiane, Fernanda, Leandro, Otávio, Rodolfo e Vanessa. Foi um prazer ter estado junto de vocês.

Ao INCT-Bioetanol FAPESP (2008/5798-6) e CNPq (574002/2008-1), à bolsa de DTI-CNPq e à bolsa Capes Mestrado.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS .....   | 9  |
| LISTA DE TABELAS .....   | 11 |
| RESUMO .....   | 12 |
| ABSTRACT .....   | 13 |
| 1. INTRODUÇÃO .....  | 14 |
| 2. OBJETIVOS .....   | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....  | 18 |
| 3.1. Produção de etanol.....   | 18 |
| 3.2. Resíduos lignocelulósicos.....  | 20 |
| 3.3. Bagaço de cana-de-açúcar.....   | 23 |
| 3.4. Processos Hidrolíticos.....   | 25 |
| 3.4.1. Pré-tratamento.....   | 25 |
| 3.4.2. Hidrólise ácida.....  | 25 |
| 3.4.3. Hidrólise Enzimática.....   | 28 |
| 3.5. Fermentação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar .....                 | 29 |
| 3.6. Metabolismo de pentoses em leveduras.....                                     | 31 |
| 4. MATERIAL E MÉTODOS .....  | 33 |
| 4.1. Material lignocelulósico .....  | 33 |
| 4.2. Inóculo .....   | 33 |
| 4.3. Testes de fermentação com pentoses em meio sintético.....                     | 34 |
| 4.3.1. Fermentações com reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação ..... | 34 |
| 4.3.1.1. Preparo do inóculo.....   | 35 |
| 4.3.1.2. Fermentação .....   | 36 |
| 4.3.2. Fermentações sem reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação ..... | 36 |
| 4.3.2.1. Preparo do Inóculo .....  | 37 |
| 4.3.2.2. Fermentação .....   | 37 |
| 4.4. Curva padrão para quantificação da biomassa das leveduras .....               | 38 |
| 4.5. Obtenção do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....                     | 39 |
| 4.5.1. Pré-tratamento ácido e deslignificação .....                                | 39 |
| 4.5.2. Hidrólise Ácida .....   | 40 |



|         |  |    |
|---------|--|----|
| 4.6.    | Quantificações por CLAE.....   | 40 |
| 4.7.    | Análise Estatística.....   | 41 |
| 4.8.    | Determinação de nitrogênio total em pré-hidrolisado e em meio YEPD .....                                   | 41 |
| 4.9.    | Cinética de crescimento de <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....     | 42 |
| 4.9.1.  | Preparo do pré-hidrolisado.....  | 42 |
| 4.9.2.  | Ensaio de crescimento em pré-hidrolisados .....  | 42 |
| 4.10.   | Ensaio exploratórios em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar .....                                 | 43 |
| 4.10.1. | Inóculo adaptado em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose .....                                    | 43 |
| 4.10.2. | Inóculo adaptado em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%) .....                               | 44 |
| 4.10.3. | Inóculo sem adaptação.....   | 44 |
| 4.11.   | Ensaio fermentativo em pré-hidrolisado concentrado em banho termostaticado .....                           | 44 |
| 4.12.   | Ensaio em biorreator de bancada.....   | 45 |
| 4.12.1. | Preparo do inóculo.....  | 45 |
| 4.12.2. | Fermentação .....  | 45 |
| 4.13.   | Determinação de açúcares redutores.....  | 46 |
| 4.13.1. | Xilose.....  | 46 |
| 4.13.2. | Glicose.....   | 46 |
| 5.      | RESULTADOS E DISCUSSÃO .....   | 47 |
| 5.1.    | Potencial de produção de etanol das leveduras a partir de meios sintéticos adicionados de pentoses.....    | 47 |
| 5.1.1.  | Fermentações com reciclagem de células de <i>Dekkera bruxellensis</i> e adição crescente de pentoses ..... | 47 |
| 5.1.2.  | Fermentações sem reciclo .....   | 50 |
| 5.2.    | Obtenção do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar .....  | 53 |
| 5.3.    | Nitrogênio Total (NT) em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....                                 | 62 |
| 5.4.    | Tolerância de <i>D. bruxellensis</i> aos inibidores liberados no processo de pré-tratamento ácido.....     | 63 |
| 5.5.    | Cinética de crescimento por <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar .....    | 65 |
| 5.6.    | Ensaio exploratórios em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar .....                                 | 66 |

|  |    |
|--|----|
| 5.6.1. Inóculo de <i>D. bruxellensis</i> adaptado em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose .....     | 67 |
| 5.6.2. Inóculo de <i>D. bruxellensis</i> adaptado em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%)..... | 70 |
| 5.6.3. Inóculo sem adaptação de <i>D. bruxellensis</i> .....   | 72 |
| 5.7. Evaporação do pré-hidrolisado em banho termostaticado .....   | 73 |
| 5.8. Teste fermentativo com <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado evaporado .....                        | 75 |
| 5.9. Ensaios fermentativos em biorreator de bancada com <i>D. bruxellensis</i> .....                         | 78 |
| 6. CONCLUSÕES.....   | 81 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 82 |
| 8. APÊNDICE .....  | 93 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |                                      |
|--|--------------------------------------|
| <b>Figura 1:</b> Estrutura da molécula de celulose. Fonte: Lehninger, 1984. ....   | 21                                   |
| <b>Figura 2:</b> Estrutura típica da hemicelulose. Fonte: Mussato, 2002. ....  | 22                                   |
| <b>Figura 3:</b> Estrutura proposta para macromolécula de lignina de gramíneas. Fonte: Adaptada de Gomes et al., 2012. ....  | 23                                   |
| <b>Figura 4:</b> Vias de utilização de L-arabinose e D-xilose em fungos e leveduras (Adaptado de STAMBUK et al., 2008). ....   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| <b>Figura 5:</b> Esquema de preparo do inóculo para fermentações com reciclo de pentoses .....   | 35                                   |
| <b>Figura 6:</b> Esquema de fermentações com reciclo de pentoses (xilose e arabinose) em meio sintético de fermentação com <i>D. bruxellensis</i> . ....   | 36                                   |
| <b>Figura 7:</b> Esquema de fermentação sem reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação contendo xilose e glicose, com leveduras <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> . ....   | 38                                   |
| <b>Figura 8:</b> Esquema de preparo de inóculo e teste fermentativo em pré-hidrolisados de bagaço de cana, com <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> , cultivado por 48 horas, 30°C a 160 rpm e avaliado por absorbância a 600nm. ....   | 43                                   |
| <b>Figura 9:</b> Variação dos valores de Brix, teor alcoólico e pH para fermentação de <i>D. bruxellensis</i> realizada com volume de 20mL de meio de fermentação sintético contendo arabinose (gráficos A e B) ou xilose (gráficos C e D) como única fonte de carbono, em erlenmeyer de 50mL, pH 5,0, 10g/L de inóculo, 150 rpm, 30°C, com o tempo expresso em horas para cada ciclo. ....                                      | 38                                   |
| <b>Figura 10:</b> Valores de Brix, pH e teor alcoólico para fermentação realizada com <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> , em volume de 100mL (figuras A e B) e 200 mL (figuras C e D) de meio de fermentação sintético contendo 40 g/L de xilose e 10 g/L de glicose como única fonte de carbono, em erlenmeyer de 250mL (100 mL de meio) e de 500 mL (200 mL de meio), pH 5,0, 10g/L de inóculo, 150 rpm e 30°C. .... | 40                                   |
| <b>Figura 11:</b> Liberação de açúcares durante pré-tratamento de bagaço-de-cana com ácido sulfúrico diluído (0, 1 e 2 %v/v). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a um nível pelo teste de Tukey (p<0,05). ....  | 55                                   |
| <b>Figura 12:</b> Liberação de furfural, HMF e ácido acético no pré-tratamento de bagaço-de-cana com ácido sulfúrico diluído (0, 1 e 2 %v/v). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a um nível pelo teste de Tukey (p<0,05). ....  | 57                                   |
| <b>Figura 13:</b> Perfis dos compostos fenólicos no pré-tratamento com 60 minutos (A), e 120 minutos (B) com tratamento 0, 1 e 2% v/v de ácido sulfúrico. Os parâmetros Ácido Siringico, Vanilina e Ácido Ferúlico não foram analisados em 120 minutos. ....   | 59                                   |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 14:</b> Perfis de açúcares redutores (A), furfural e HMF (B) e compostos fenólicos (C) com tratamento 0, 5 e 10% v/v de ácido sulfúrico, por 150 minutos, 120°C e 1 atm. ....  | 61 |
| <b>Figura 15:</b> Resultados do pré-tratamento e hidrólise ácida, de acordo com a liberação de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e inibidores (furfural, HMF e ácido acético).....  | 62 |
| <b>Figura 16:</b> Crescimento das leveduras <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio de cultura YEPD , pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%) , 150 rpm a 30°C.....   | 64 |
| <b>Figura 17:</b> Produção de etanol de <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> em YEPD líquido, 50 e 100% de pré-hidrolisado, a 30°C, 160 rpm por 120 horas.....  | 65 |
| <b>Figura 18:</b> Perfis fermentativos de <i>D. bruxellensis</i> para arabinose, celobiose, glicose e xilose, em pré-hidrolisado diluído 50% (A), concentrado 100% (B), biomassa e pH (C) com inóculo na concentração de 10 g/L de massa úmida e adaptado previamente em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose. ....   | 69 |
| <b>Figura 19:</b> Perfis de ácido acético e etanol em fermentação por <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%) com inóculo na concentração de 10 g/L e adaptado previamente em meio sintético contendo xilose e glicose. ....  | 70 |
| <b>Figura 20:</b> Ensaio fermentativo empregando <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado diluído <b>A</b> (50%) e concentrado <b>B</b> (100%), com inóculo na concentração de 10 g/L de massa úmida e adaptado previamente em pré-hidrolisado.....   | 71 |
| <b>Figura 21:</b> Ensaio fermentativo empregando <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado diluído <b>A</b> (50%) e concentrado <b>B</b> (100%), com inóculo correspondendo a 5 g/L de massa úmida.....  | 73 |
| <b>Figura 22:</b> Curva de evaporação do do etanol %v/v do pré-hidrolisado tratado em Organosolv em banho termostatizado.....  | 74 |
| <b>Figura 23:</b> Produção de biomassa (g/L), consumo de xilose (g/L), produção de etanol (%v/v) e pH a 150 rpm, 30°C da levedura <i>D. bruxellensis</i> em pré-hidrolisado de bagaço de cana 50% (A) e 100% (B).....  | 77 |
| <b>Figura 24:</b> Curvas de crescimento quantificadas em biomassa seca (g/L), consumo de xilose e produção de etanol a 240 rpm, 30°C da levedura <i>D. bruxellensis</i> no pré-hidrolisado de bagaço de cana em biorreator de bancada. Gráfico <b>A</b> representa baixa concentração inicial de células, e <b>B</b> concentração de células inicial mais próximas de 5 g/L..... | 80 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição lignocelulósica de resíduos agro-industriais.....   | 21 |
| <b>Tabela 2:</b> Composição do meio sintético de fermentação.....   | 34 |
| <b>Tabela 3:</b> Protocolo Experimental para pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar (Adaptado de KIIPPER, 2009).....  | 39 |
| <b>Tabela 4:</b> Protocolo experimental das condições estabelecidas para hidrólise ácida do bagaço de cana para obtenção do hidrolisado (Adaptado de KIIPPER, 2009).....  | 40 |
| <b>Tabela 5:</b> Teor de açúcares redutores (AR) obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para o pré-tratamento à 120°C e 1 atm do bagaço de cana-de-açúcar. ....                           | 53 |
| <b>Tabela 6:</b> Valores de Nitrogênio Total em meio de cultura YEPD líquido, pré-hidrolisado com 1% de ácido sulfúrico e solução contendo 1% de extrato de levedura.....                                       | 63 |
| <b>Tabela 7:</b> Velocidade específica de crescimento e tempo de geração de <i>D. bruxellensis</i> e <i>P. stipitis</i> em meio YEPD, pré-hidrolisado de bagaço de cana diluído (50%) e concentrado (100%)..... | 66 |
| <b>Tabela 8:</b> Velocidades específicas de crescimento máximas, para YEPD, pré-hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar 50 e 100%.....  | 75 |

## RESUMO

O bioetanol é um combustível alternativo, de baixo custo o qual convencionalmente é obtido no Brasil a partir da fermentação de caldo de cana-de-açúcar, melaço ou a mistura destes. Entretanto, alternativamente, o etanol poderia ser obtido a partir de materiais lignocelulósicos, resíduos ou subprodutos agroindustriais compostos por celulose, hemicelulose e lignina, tais como o bagaço de cana-de-açúcar. Para cada tonelada de cana processada, são obtidos, em média, 250 kg de bagaço, o qual é geralmente queimado para geração de energia na indústria. Os cultivos microbianos a partir destas matérias-primas dependem da disponibilização dos substratos, nesse sentido, a hidrólise ácida tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica dos materiais lignocelulósicos, devido ao seu baixo custo e alta eficiência. No entanto, em condições de alta pressão e temperatura, glicose e xilose liberadas são degradadas a 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente. Estes compostos são caracterizados por inibirem as leveduras utilizadas na etapa de fermentação, o que influencia o metabolismo microbiano e a conversão das hexoses e pentoses obtidas em etanol. Neste contexto, o trabalho consistiu em avaliar a capacidade de uma linhagem da levedura *Dekkera bruxellensis* em produzir etanol a partir de pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, já que a mesma tem mostrado ser uma levedura tolerante a condições adversas encontradas em processos fermentativos industriais. Os resultados indicaram que *D. bruxellensis* foi capaz de produzir etanol em meio sintético contendo xilose ou arabinose, ou ainda xilose e glicose como únicas fontes de carbono, e quando cultivadas em concentrações de 50 ou 100% de pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, as velocidades específicas de crescimento máximas foram semelhantes, em torno de  $0,009 \text{ h}^{-1}$ , com produtividade celular de aproximadamente  $0,035 \text{ g.L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Os ensaios em biorreator demonstraram baixas velocidades específicas de crescimento nos primeiros cinco dias,  $0,003 \text{ h}^{-1}$ , ocasionado por um lento consumo de glicose. Porém em uma segunda fase de crescimento, com velocidade específica menor  $0,001 \text{ h}^{-1}$ , ocorreu um aumento no consumo de xilose, período que também se observou aumento na concentração de etanol com produtividade máxima de aproximadamente  $3,25 \text{ mg/L.h}$ . Portanto apesar de crescimento inferior quando comparado às leveduras convencionalmente usadas na fermentação etanólica industrial, estes resultados sugerem a viabilidade de cultivo da *D. bruxellensis* CCA155 em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar.

**Palavras chave:** *Dekkera bruxellensis*, resíduos lignocelulósicos, fermentação etanólica, bagaço de cana-de-açúcar.

## ABSTRACT

Bioethanol is an alternative low cost fuel, which is conventionally obtained in Brazil from the fermentation of sugarcane juice, molasses, or a mixture of these. However, alternatively, ethanol could be obtained from lignocellulosic materials, wastes or agroindustrial byproducts composed of cellulose, hemicellulose and lignin, such as sugarcane bagasse. For each ton of cane processed, 250 kg of bagasse are obtained on average, which is usually burned for power generation industry. The microbial cultivation using these materials depend on the availability of substrates, accordingly, acid hydrolysis has been considered one of the most widely used process for the depolymerization of the hemicellulose fraction of lignocellulosic materials, due to their low cost and high efficiency. However, under conditions of high temperature and pressure, glucose and xylose released are degraded to 5-hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural, respectively. These compounds are characterized by inhibiting the yeast used in the fermentation step, which influences the microbial metabolism and the conversion of hexoses and pentoses obtained in ethanol. In this context, the aim of this work was to evaluate the ability of a yeast strain, from the species *Dekkera bruxellensis* (CCA155) in producing ethanol from sugarcane bagasse hydrolysates, since it has shown to be a yeast tolerant to adverse conditions found in industrial fermentation processes. The results indicated that *D. bruxellensis* was capable of producing ethanol in a synthetic medium containing xylose or arabinose, and xylose or glucose as sole carbon sources, and when grown in concentrations of 50 or 100% sugarcane bagasse hydrolyzate, maximum specific speeds growth was similar, about 0.009 h<sup>-1</sup>, with cell productivity of about 0.035 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. In the bioreactor tests, the yeast displayed low specific growth rate during the first five days, 0.003 h<sup>-1</sup>, caused by a slow consumption of glucose. But in a second phase of growth, with a lower rate 0.001 h<sup>-1</sup>, there was an increase in xylose consumption, a period in that an increase in ethanol concentration with maximum yield of approximately 3.25 mg/L.h was observed. Therefore even with lower growth when compared to yeast fermentation conventionally used in ethanol industries, these results suggest the feasibility of the cultivation of *D. bruxellensis* in hydrolysates of sugarcane bagasse.

**Keywords:** *Dekkera bruxellensis*, waste lignocellulosic ethanol fermentation, sugarcane bagasse.

## 1. INTRODUÇÃO

Com inúmeras discussões sobre a preservação do meio ambiente, desenvolvimento sustentável e os desafios para o emprego de novas fontes energéticas, este estudo contempla o aproveitamento de resíduos agroindustriais na produção de etanol, uma vez que consiste na utilização de uma matéria-prima disponível em grande quantidade.

Atualmente, o etanol é em sua quase totalidade produzido apenas a partir de matérias-primas sacarinas ou amiláceas (cana-de-açúcar, milho, trigo), com os açúcares prontamente disponíveis, sendo chamado de etanol de primeira geração. Entretanto, a futura expansão pode basear-se no etanol de segunda geração, ou seja, produzido a partir de material lignocelulósico, caso de resíduos agrícolas como bagaço de cana-de-açúcar. Estes materiais são caracterizados por serem abundantes, renováveis, potenciais para produção de biocombustíveis, sem comprometimento da segurança alimentar, além de serem fundamentais na redução dos impactos ambientais.

Esses fatores tornam o etanol competitivo com os combustíveis fósseis, pois apresenta menor impacto ambiental causado pela emissão de poluentes, promovendo o aumento da produção sem alterar a expansão de área plantada, de forma a evitar a competição com áreas produtoras de alimentos ou entrar em áreas protegidas como florestas.

A composição básica do material lignocelulósico depende do vegetal de origem e, no caso de resíduos agroindustriais, do processamento, da região, idade e período do ano no momento da colheita e do material. Os principais componentes do material lignocelulósico são a celulose e a hemicelulose, constituindo estruturas duras e fibrosas infiltradas por outra estrutura formada por alcoóis aromáticos conhecida como lignina, ocorrendo ainda a existência de cinzas e outros componentes classificados como extrativos em pequenas quantidades.

Para a conversão da celulose e da hemicelulose em seus açúcares constituintes, o mecanismo mais estudado é a hidrólise ácida. Esse processo pode utilizar ácidos concentrados e/ou diluídos. Os produtos das reações químicas hidrolíticas do material lignocelulósico constituem hexoses (glicose, galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose), lignina, ácido acético, metanol, dentre outros, em proporções variáveis dependendo da matéria prima processada. No entanto, os principais problemas da hidrólise ácida estão relacionados à formação de componentes inibidores da fermentação, oriundos não só da hidrólise, mas também gerados por corrosão dos equipamentos. Glicose e xilose sob altas pressões e



temperaturas são degradadas a 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) e furfural, respectivamente, e caso não sejam removidos, podem levar a inibição microbiana quando os hidrolisados forem usados como meio de cultivo em bioconversões. Sendo assim, etapas de remoção química, física ou biológica desses compostos inibidores têm sido empregadas visando melhorar os rendimentos nos processos de bioconversão.

O tratamento químico pode ser realizado através do ajuste de pH com  $\text{Ca(OH)}_2$  e  $\text{NaOH}$ , causando uma precipitação dos componentes tóxicos. A rotoevaporação pode ser empregada como um método físico de detoxicação, promovendo diminuição na concentração de ácido acético, furfural e vanilina. Métodos biológicos podem ser aplicados mediante de tratamento com enzimas obtidas a partir do fungo ligninolítico *Trametes versicolor*. As lacases atuam na remoção de monômeros fenólicos e ácidos fenólicos. Além disso, *Trichoderma reesei* tem sido relatado por degradar ácido acético, furfural e derivados de ácido benzoico.

Bactérias e leveduras fermentam pentoses, porém a baixa concentração desse tipo açúcar dificultam o seu desenvolvimento, contribuindo com baixas velocidades de conversão para serem utilizados em processos industriais. Dentre as principais espécies que fermentam xilose são citadas *Pichia stipitis*, *Pachysolen tanophilus*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida guilliermondii*, *Candida blankii*, *Candida tenuis*, *Brettanomyces/Dekkera naardenensis*, *Pichia segobiensis*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polymorpha* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Entretanto, a capacidade de aplicação dessas espécies é muito limitada devido à baixa tolerância ao etanol e a compostos gerados durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise da hemicelulose. Além disso, a presença de hexoses como manose, galactose e glicose em hidrolisados hemicelulósicos pode promover diminuição na utilização de xilose, por preferência metabólica ou ainda atuar como repressora dos genes responsáveis pela utilização da xilose.

Estudos revelaram que leveduras do gênero *Dekkera* são resistentes quanto mudanças de temperatura e pH, com obtenção de energia mais eficiente em condições limitadas de oxigênio comparadas com *S. cerevisiae*, comprovando serem de grande potencial no desenvolvimento de processos industriais destinados à produção de etanol a partir de fontes renováveis.

Nesse contexto, tornam-se necessários estudos sobre a viabilidade de cultivo de *Dekkera bruxellensis* a partir de hidrolisados, avaliando a produção de etanol, cinética de crescimento e consumo de hexoses e pentoses, expandindo estes conhecimentos a partir de

hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, uma vez que a literatura cita altos rendimentos de pentoses em etanol com baixa produtividade desta levedura.

## 2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar a produção de etanol por uma linhagem de *Dekkera bruxellensis* a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, como uma forma alternativa de aproveitamento desta matéria-prima na produção de etanol de segunda geração.

Objetivos específicos:

- Avaliar o potencial de produção de etanol da levedura *D. bruxellensis* a partir de meios sintéticos adicionados de pentoses;
- Caracterizar o hidrolisado de cana-de-açúcar obtido a partir de diferentes condições de pré-tratamento;
- Avaliar a tolerância de *D. bruxellensis* aos inibidores produzidos na etapa de hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar;
- Estudar a cinética de crescimento, consumo de pentoses e hexoses por *D. bruxellensis* em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar a produção de etanol a partir dos pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar pela levedura *D. bruxellensis*, em diferentes condições de cultivo.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1. Produção de etanol**

Inicialmente o etanol era utilizado para produção de bebidas alcoólicas, vinagres e conservas, no entanto atualmente, é aplicado na indústria de fármacos, perfumes e cosméticos, fabricação de corantes e vernizes, materiais explosivos e plásticos, além da sua aplicação como matéria-prima de produtos da química fina (CRUEGER & CRUEGER, 1993). No Brasil e em vários países do mundo, sua produção tem sido estimulada, por se tratar de um combustível limpo e de origem renovável (SILVA-FILHO, 2003).

O Pró-álcool (Programa Nacional do Álcool) foi criado em 14 de novembro de 1975 e possibilitou grande expansão da cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Seu objetivo era estimular a produção do etanol e atender as necessidades do mercado interno e externo. Porém atingiu seu declínio em 1990 quando o preço do petróleo baixou, tornando o etanol um combustível pouco vantajoso tanto para o consumidor quanto para o produtor. Além disso, o preço do açúcar começou a aumentar no mercado internacional, tornando-se mais vantajoso para usineiros intensificar a sua produção.

Atualmente, o Brasil vive uma nova expansão dos canaviais com o objetivo de oferecer, novamente em grande escala, o etanol como combustível alternativo. A distribuição geográfica brasileira possibilita a produção de cana-de-açúcar e seus derivados em um amplo espaço (FRANCISCHINI, 2008).

A partir das principais conferências sobre o ambiente, as questões sobre a eficiência da geração e do uso da energia foram ampliadas, considerando principalmente os seus impactos ambientais, buscando cada vez mais o uso de fontes renováveis de energia, que possam contribuir para reduzir as emissões de CO<sub>2</sub>. A Agenda 21 e o Protocolo de Quioto sugerem a capacitação, educação e difusão do conhecimento técnico e científico, além da retomada da sustentabilidade, substituindo os combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia (GALBE; ZACCHI, 2010). Segundo o MAPA (2006), a energia renovável deve ser consolidada como grande negócio do século XXI, cabendo à biomassa papel de destaque, e no Brasil em particular à cana-de-açúcar, pois parece ser a maior e a mais sustentável fonte de energia renovável.

Neste cenário, o Brasil segundo maior produtor de etanol depois dos EUA, desponta como o país com as tecnologias e políticas mais avançadas do mundo devido à pioneira utilização do etanol obtido a partir da fermentação de hexoses da cana-de-açúcar como combustível (BERNARDO-NETO, 2009; BUCKERIDGE et al., 2010), e ainda o estado de São Paulo por ser o maior produtor de etanol no Brasil (CONAB, 2013).

O petróleo ainda representa 40% da energia utilizada no mundo. Até 2020 o consumo aumentará dos atuais 85 milhões de barris/dia para 110 milhões de barris/dia, ou seja, 31 bilhões de barris/ano para 40 bilhões de barris/ano. O recente retorno aos aumentos no preço do petróleo, as perspectivas de esgotamento das reservas, os riscos geopolíticos decorrentes da dependência do petróleo de países politicamente instáveis e os compromissos mais sólidos com a questão ambiental fizeram renascer a atenção nas fontes alternativas de energia (BASTOS, 2007).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2013), a lavoura de cana-de-açúcar continua em expansão, e um aumento progressivo, embora em um ritmo menor, foi detectado nos estados da região Centro-Oeste e Sudeste. Mato Grosso do Sul, São Paulo, Goiás e Mato Grosso foram os estados com maior acréscimo de áreas, tendo como justificativa as lavouras das novas plantas inauguradas recentemente, e a expansão de áreas das unidades mais antigas.

A área cultivada na safra 2013/14 está estimada em 8.893 mil hectares, distribuídas em todos os estados produtores, sendo o estado de São Paulo, o maior produtor, com 51,3%. Desta área estima-se uma produção total de 360.765,6 mil toneladas de cana, sendo destinadas 202.389,5 mil toneladas para produção de açúcar e 158.376,1 mil toneladas para produção de etanol (CONAB, 2013).

A produção de etanol estimada para safra 2013/2014 é de 25,77 bilhões de litros, um aumento de 2,13 bilhões de litros comparado com a safra anterior. Deste total, 44% serão destinados para etanol anidro e 56% para etanol hidratado, acréscimo de 15,35% e 4,45% respectivamente, comparados com a safra anterior (CONAB, 2013).

O aumento da demanda pelo etanol, impulsionado pelo aumento da mistura do etanol com a gasolina, veículos *flex-fuel*, além da constante preocupação das nações mundiais quanto às questões ambientais (TOMALSQUIM, 2012) estão incentivando o setor a realizar novos investimentos na área agrícola e industrial com o objetivo de expandir a capacidade de produção e atender a demanda futura pelo combustível (MOUTTA, 2009). Por outro lado, o aumento da produção de etanol acende preocupações com uma possível competição dos canaviais por terras agriculturáveis, prejudicando uma produção agrícola mais diversificada.

Nesse sentido, o uso de resíduos lignocelulósicos é considerado de grande potencial para produção do etanol de segunda geração, (GOMES et al., 2012), pois após sofrer hidrólise, um tratamento que consiste basicamente em “desmontar” a parede celular desse material, com ácidos ou enzimas, são liberados polissacarídeos como fonte de açúcares fermentescíveis (FENGEL; WEGENER, 1989)

No entanto, desenvolvimentos no processo de produção do etanol de segunda geração são fundamentais para que o produto possa ser mais competitivo economicamente (DIAS et al., 2010), já que atualmente o bagaço de cana é queimado pelas usinas na co-geração de energia, o que garante sua auto-suficiência energética, reduzindo ainda custos com energia e emissões de CO<sub>2</sub> para o ambiente, uma vez que é considerado um meio eficiente para produção de energia. Porém, para que isto ocorra, tecnologias mais avançadas e que permitam melhor aproveitamento energético devem ser utilizadas, como caldeiras de alta pressão e turbinas a vapor com maior capacidade e eficiência (GALBIATI et al., 2010).

### **3.2. Resíduos lignocelulósicos**

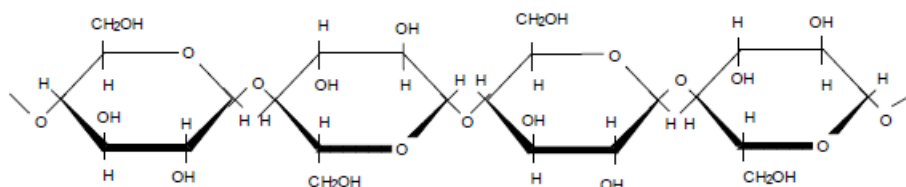
Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de compostos orgânicos, como polissacarídeos, celulose e hemicelulose, que são comumente encontrados nas paredes celulares das células vegetais. Apresentam grande potencial de uso como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (LATIF; RAJOCA, 2001; KRISHNA et al., 2001). Sendo assim, são considerados como potenciais recursos energéticos do mundo, possuindo em sua constituição em média 43% de celulose, 27% de lignina e 20% de hemicelulose (GOMES et al., 2012), conforme pode ser verificado na Tabela 1.

**Tabela 1:** Composição lignocelulósica de resíduos agro-industriais

| <b>Biomassa residual</b> | <b>Composição (% massa seca)</b> |                     |                |                   |               |
|--------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------|-------------------|---------------|
|                          | <i>Celulose</i>                  | <i>Hemicelulose</i> | <i>Lignina</i> | <i>Extrativos</i> | <i>Cinzas</i> |
| <b>Bagaço de cana</b>    | 32-55                            | 16-25               | 23-32          | 4-6               | 2-2,7         |
| <b>Palha de arroz</b>    | 32-37                            | 19-24               | 9-13           | 4-5               | 12-18         |
| <b>Sabugo de milho</b>   | 34-36                            | 16-24               | 15-19          | 2-6               | 2-4           |
| <b>Palha de trigo</b>    | 30-33                            | 22-28               | 14-18          | 3-7               | 3-7           |
| <b>Palha de sorgo</b>    | 34-36                            | 25-26               | 25-26          | -                 | -             |

**Fonte:** Adaptado de OLSSON; HAHN HAGERDAL (1996); PANDEY et al. (2000) SUN; CHENG (2002); GOMES et al. (2012)

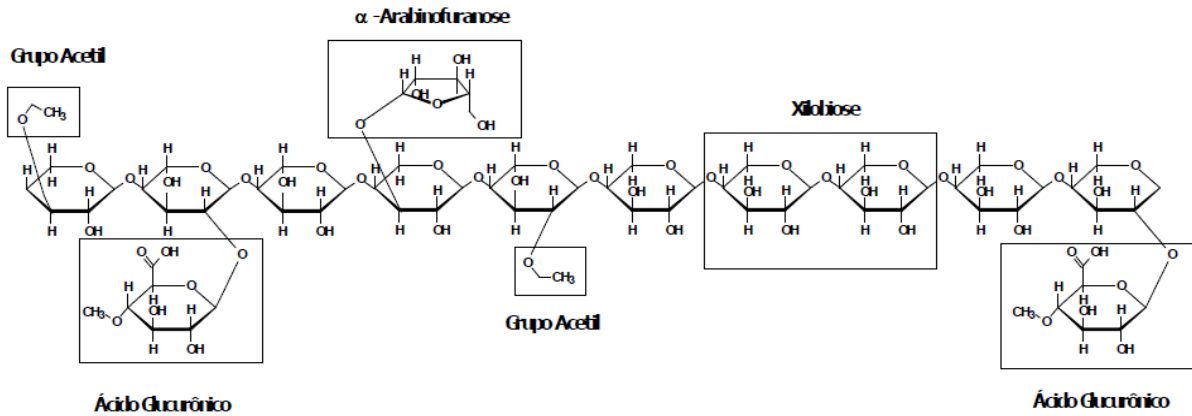
A celulose é a macromolécula mais abundante na natureza e constitui cerca de 40 – 50% da matéria prima vegetal (Figura 1). Sua característica fibrosa atribui à celulose rigidez e resistência ao estresse. Sua principal função é como componente estrutural em plantas, estando presente nas camadas da parede celular e na lamela média. Geralmente está entrelaçada com uma variedade de polissacarídeos formados por unidades de monossacarídeos, como a glicose, e frequentemente impregnada com lignina (MOUTTA, 2009).



**Figura 1:** Estrutura da molécula de celulose. Fonte: Lehninger, 1984.

A hemicelulose é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante nos vegetais, presente em todas as camadas da parede celular, mais concentrado principalmente nas camadas primária e secundária, entrelaçado com as fibras de celulose. Liga-se mediante ligações de hidrogênio às microfibrilas da celulose, formando uma rede que fornece a espinha dorsal estrutural da parede celular da planta (FENGEL; WEGENER, 1989). São usualmente formadas com um grau de polimerização que varia de 100 a 200 unidades de repetição, que em conjunto atingem massa molecular menor que a da celulose. Essas polioses, polissacarídeos com menor grau de polimerização consistem, em sua maior parte, de pentoses e hexoses formadas por uma variedade de unidades de açúcar como xilose, manose, arabinose

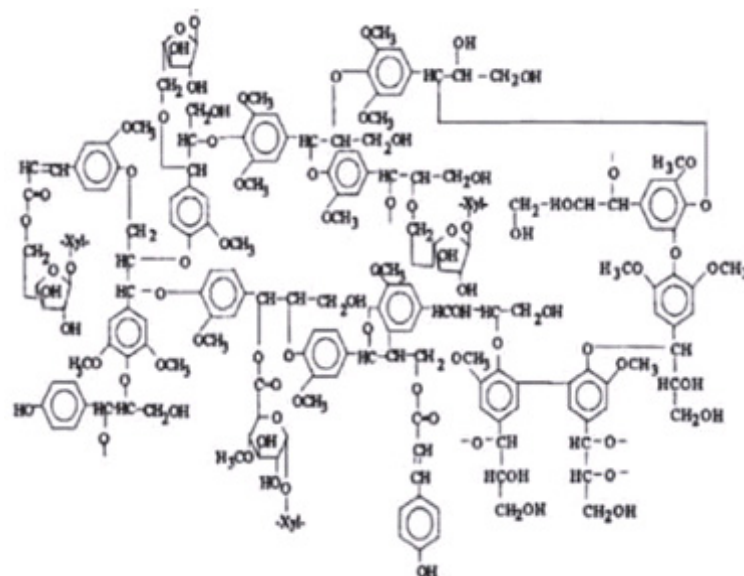
e outros constituintes menores que são classificados como compostos orgânicos e inorgânicos, conforme Figura 2 (SALAZAR et al., 2005).



**Figura 2:** Estrutura típica da hemicelulose. Fonte: Mussato, 2002.

A lignina é responsável pela rigidez da parede celular dos vegetais, funcionando como agente permanente de ligação entre as células, conferindo resistência ao impacto, compressão e dobra (LEMOS, 2001). Trata-se de um composto bastante estável, insolúvel em solventes orgânicos ou mesmo em ácido sulfúrico concentrado a quente. Além disso, a lignina é resistente à degradação química, enzimática e microbiana, impedindo a penetração de agentes externos capazes de destruir as células (LARSSON et al., 1999). É uma molécula amorfa com estrutura tri-dimensional muito complexa. Possui numerosas ligações cruzadas (aproximadamente 10 tipos diferentes), e é baseada em três precursores monoméricos: álcool trans-coniferílico, trans-p-cumarico e álcool trans-sinapílico (Figura 3) (MARTINS, 2005).





**Figura 3:** Estrutura proposta para macromolécula de lignina de gramíneas. Fonte: Adaptada de Gomes et al., 2012.

O material lignocelulósico é considerado a maior fonte de hexoses e pentoses. A conversão de hexoses, principalmente glicose, em etanol, tem sido o foco de pesquisas nas últimas décadas. Contudo, a exploração da lignocelulose pode ser reforçada com a utilização eficiente de pentoses ao lado da fração de hexoses, visto que a xilose pode ser considerada como a pentose mais abundante na hemicelulose, correspondendo a 20-30% da massa seca de biomassa lignocelulósica (ZHAO; XIA, 2009).

### 3.3. Bagaço de cana-de-açúcar

De acordo com a safra 2012/2013, 588 milhões de toneladas de cana foram processadas (CONAB, 2013 Abril 2013), produzindo em torno de 147 milhões de toneladas de bagaço de cana, com 50% de umidade (LAMONICA, 2005), que é utilizado para a produção de vapor e eletricidade. Atualmente, a queima do bagaço e palha da cana corresponde a 4% da matriz energética brasileira (DIAS, 2012). Apesar disto, são considerados processos de pouca eficiência, devido à inexistência de aplicações mais atraentes. Mesmo assim, entre 10% e 15% do bagaço são gerados com excedente no processo, não tendo uma destinação apropriada, tornando-se poluente (FAIRBANKS, 2003; SUN; CHENG 2005; CANILHA et al., 2010). Esse maior excedente poderia ser destinado a etapas

de pré-tratamento e posterior transformação em produtos de maior interesse, aumentando a produtividade das indústrias sem acréscimos nas áreas de plantio (PEREIRA, 2006).

Esta matéria-prima encontra-se triturada pelas moendas, além de estar disponível em grandes quantidades e pronta para uso no local, reduzindo o custo do transporte e, por consequência, o custo de produção de etanol por esta via (FUGITA, 2010). Além disso, o bagaço da cana-de-açúcar se destaca por ser produzido no próprio território nacional, não havendo, em consequência, o risco de sofrer grandes alterações no preço por causa do dólar (KIIPPER, 2009).

Após a última moenda da cana, o bagaço torna-se praticamente um pó formado de partículas e fibras de vários tamanhos. A porção mais rígida dessa mistura é rica em lignina e oriunda da parte externa do caule, sendo praticamente seca. O material menos rígido e úmido deriva do interior da planta (REYNOL, 2009). De acordo com Galbe; Zacchi (2010), essa é a melhor porção para produção de etanol, por possuir menor teor de lignina e ser rica em celulose.

No bagaço encontram-se várias substâncias químicas como terpenos/terpenóides, gorduras/ceras, compostos fenólicos, assim como proteínas e cinzas, os quais podem ser extraídos usando solventes polares e apolares. Estes componentes variam em cada espécie de material lignocelulósico, representando aproximadamente 5-20% (FENGEL; WEGENER, 1989). Durante as etapas de pré-tratamento e hidrólise, são liberados ácidos orgânicos de baixa massa molar, furanos e compostos aromáticos (GALAFASSI et al., 2010) A presença desses compostos pode levar a uma inibição do processo fermentativo por alterarem o metabolismo das leveduras (FUGITA, 2010). A adaptação a furaldeído pode ser uma alternativa na seleção de cepas resistentes a compostos tóxicos resultantes da geração de substrato provenientes de resíduos agroindustriais. Nesse sentido, Galafassi et al. (2010) verificaram que o gênero *Dekkera* em condições limitadas de oxigênio e pH baixo produz etanol com rendimentos comparáveis a *Saccharomyces cerevisiae* (0,44g/g), apesar da produtividade inferior. Bassi et al. (2011) confirmaram a capacidade da linhagem se desenvolver melhor em condições de estresse de pH e etanol do que a linhagem *Saccharomyces cerevisiae* PE-02, o que pode sugerir a aplicação deste micro-organismo nas condições estudadas.

### **3.4. Processos Hidrolíticos**

#### **3.4.1. Pré-tratamento**

O processo de produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos demanda a transformação da celulose e hemiceluloses em seus monômeros (glicose e xilose) e subsequente conversão dos mesmos pelos micro-organismos em etanol. Entretanto, a celulose nativa encontra-se muito protegida pela matriz lignina-carboidrato, de modo que a celulose torna-se recalcitrante à ação hidrolítica, resultando em processos lentos de conversão da celulose em glicose. Portanto, torna-se necessário realizar um pré-tratamento do bagaço de modo a incrementar a exposição das fibras de celulose, tornando-a mais acessível aos agentes hidrolíticos, seja no processo de hidrólise ácida ou enzimática (BAUDEL, 2007).

Estratégias de pré-tratamento têm sido categorizadas em físicas, químicas ou biológicas ou ainda uma combinação delas. Os tratamentos físicos geralmente são empregados como um primeiro estágio na abertura da rede lignocelulósica para então aplicar-se tratamento hidrolítico químico (ácido ou alcalino) ou biológico (enzimas).

Entre os tratamentos físicos citam-se moagem, trituração ou esfarelamento mecânicos e explosão com vapor (GALBE; ZACCHI, 2007). A estrutura da parede celular pode ser rompida se submetida a condições drásticas de pH. Os pré-tratamentos químicos consistem nas principais tecnologias de tratamento, e incluem tratamentos ácidos, alcalinos ou oxidativos. Todos são responsáveis pelas modificações químicas e estruturais da parede celular, que resultam em uma maior acessibilidade às camadas de hemicelulose e celulose. Os pré-tratamentos biológicos normalmente utilizam fungos e algumas bactérias, que secretam enzimas extracelulares, como lignina peroxidases e lacases, responsáveis em ajudar na remoção de lignina (OGEDA; PETRI, 2010).

O uso de solventes também se faz para esses efeitos. O processo chamado de “Organosolv” utiliza uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose (PAN et al., 2005).

#### **3.4.2. Hidrólise ácida**

A hidrólise tem como objetivo converter hemicelulose e celulose em seus monômeros, pentoses e hexoses respectivamente, mediante adição de água à molécula. Esta reação é

conhecida como hidrólise e, para que a mesma ocorra, é necessária a presença de um catalisador, que pode ser um ácido, denominada hidrólise ácida, ou uma enzima, a hidrólise enzimática (SOARES; VAZ ROSSELL, 2007).

A hidrólise ácida, empregando ácido sulfúrico diluído, tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica em material lignocelulósico, devido ao seu baixo custo e alta eficiência (SUN; CHENG, 2005). A partir da década de 40, vários processos de hidrólise ácida de material lignocelulósico foram desenvolvidos, empregando ácido sulfúrico diluído, onde o processo mais conhecido é o processo Madison. Em geral a hidrólise ácida é conduzida com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico em concentrações na faixa de 1 a 5 %, temperaturas em torno de 150°C e pressões de até 10 atm. Neste processo, a temperatura e a concentração do ácido são fatores importantes na formação de compostos tóxicos, sendo que temperaturas menores podem ser mais adequadas quanto à formação de inibidores na hidrólise da fração hemicelulósica, apesar de acarretarem a diminuição do rendimento de extração dos açúcares. Por outro lado, temperaturas acima de 160°C favorecem a hidrólise da fração celulósica, gerando altas quantidades de açúcares e compostos inibidores (SUN; CHENG, 2002; MOUTTA, 2009).

Dentre os compostos fenólicos, o siringaldeído e o ácido siringico são dois dos derivados mais abundantes nos hidrolisados lignocelulósicos (VAZ ROSSELL et al., 2005), e em concentrações de 2 g/L, é capaz de afetar fortemente o consumo de xilose em meio fermentativo (CORTEZ, 2005).

Estas substâncias são geradas nos processos de degradação da lignina, que ocorrem durante a hidrólise ácida. As substâncias fenólicas atuam debilitando as membranas celulares, o que diminui a capacidade de proteção e produção enzimática das células. Adicionalmente, tem sido reportada a inibição do consumo de xilose na presença de alguns compostos fenólicos de baixa massa molecular. Entre as substâncias fenólicas geradas da degradação da lignina encontram-se: ácido p-hidroxibenzoico, ácido m-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siringico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido cinâmico, siringaldeído, cinamaldeído, p-hidroxicinamaldeído, álcool coniferílico e álcool 3,5-dimetoxi-4-hidroxinamílico (PALMQVIST & HAHNHAGERDAL, 1999; PARAJO et al., 1998).

A partir da hidrólise ácida obtém-se um hidrolisado contendo açúcares pentoses como D-xilose e L-arabinose e hexoses como D-glicose além de compostos que podem inibir o desempenho dos micro-organismos fermentadores. Segundo Rodrigues (2007), a hidrólise ácida apresenta até 90% de recuperação de açúcares fermentescíveis, mas pode gerar alguns produtos inibidores da fermentação e degradação dos açúcares devido ao tempo de hidrólise.

Durante o processo pode ocorrer a formação de alguns subprodutos que interferem negativamente no processo de fermentação, tais como ácido acético, que é formado pela hidrólise do grupo acetil presente na hemicelulose; ácidos fórmicos e levulínicos, produtos da degradação do açúcar; compostos fenólicos, formados principalmente pela degradação parcial da lignina; e furaldeídos ou aldeídos furanos, e furfural e 5- hidroximetilfurfural, que sob altas pressões e temperaturas são formados pela degradação de pentoses e hexoses, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989; MARTÍN et al., 2007). A presença de furfural é responsável pelo aumento da fase “lag” de crescimento microbiano, por conta de sua degradação em acetaldeído, uma vez que o mesmo permanece acumulado no interior das células (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A presença de ácidos orgânicos no meio fermentativo resulta em aumento no consumo de ATP pela levedura. Nessas condições, parte do ATP que seria utilizado para crescimento ou fermentação é desviado para manutenção de seu pH interno (NARENDRANATH et al., 2001).

Taherzadeh et al. (2000) tem reportado que novas espécies microbianas engenheiradas metabolicamente toleram inibidores e podem diminuir a necessidade de detoxificar hidrolisados. Entretanto, os compostos aos quais essas espécies são resistentes ainda não são definidos. Diversos métodos de detoxificação, incluindo biológicos, físicos e químicos, tem sido propostos para transformar inibidores em compostos inativos ou reduzir suas concentrações (MOUTTA, 2009).

A efetividade de um método de detoxificação depende do tipo de hidrolisado hemicelulósico e da espécie microbiana empregada, pois cada tipo de hidrolisado tem um diferente grau de toxicidade e cada espécie de micro-organismo tem um diferente grau de tolerância a inibidores (LARSSON et al., 1999). Entre os métodos de detoxificação mais conhecidos encontram-se elevação de pH com CaO e Ca(OH)<sub>2</sub>, seguido de ajuste de pH para a condição de fermentação com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (ALVES et al., 1998), utilização de carvão ativado, colunas de troca iônica, precipitação, extração com solventes orgânicos, evaporação, peneiras moleculares, polieletrólitos, enzimas (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; HAHN-HÄGERDAL et al., 2007) e micro-organismos (FONSECA, 2009).

Segundo Marton (2002), a adsorção em carvão vegetal ativado é um dos métodos mais econômicos e eficientes, pois permite uma boa remoção do ácido acético e compostos fenólicos. Por outro lado as resinas de troca iônica também propiciam boa eficiência de remoção dos compostos inibitórios, porém são mais caras que o carvão (MARTON, 2005).

A utilização de polímeros vegetais tem sido proposta para remoção de compostos inibitórios do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, pois é considerada uma metodologia de baixo custo e fácil manipulação (ARRUDA et al., 2008), porém menos eficiente em relação aos tratamentos com carvão ativado e resina de troca iônica (SILVA, 2006).

Alguns tratamentos, apesar de se mostrarem eficientes na remoção de inibidores, podem criar condições que afetam as características do meio e geram uma maior condição de estresse ao micro-organismo. Por exemplo, tratamentos com variação de pH podem desencadear aumentos excessivos na força iônica do meio. Outros tratamentos podem provocar diminuição na concentração de açúcares do hidrolisado, como em precipitações ou uso de carvão ativado (MOUTTA, 2009).

### **3.4.3. Hidrólise Enzimática**

A hidrólise enzimática de material lignocelulósico é um processo muito estudado por apresentar especificidade da reação, ausência de reações secundárias que levariam à perda de rendimento, ausência de formação de produtos secundários e reação em condições suaves que não requerem altas pressões e temperaturas ou ambientes corrosivos para os equipamentos (BASTOS, 2007).

A cristalinidade da celulose, a proteção da lignina e as configurações espaciais do complexo celulose-hemicelulose-lignina tornam este tipo de hidrólise um processo lento e pouco econômico. A estrutura capilar das fibras de celulose e a presença de metais diminuem a eficiência da hidrólise enzimática (WILSON et al., 1989). No entanto, segundo estudo de Maeda et al. (2011), a cristalinidade de 70% em bagaço lignocelulósico não apresentou efeito prejudicial sobre o rendimento da hidrólise.

Em princípio, as rotas enzimáticas apresentam vantagens importantes sobre as rotas químicas. No entanto, um grande desafio consiste em tornar o processo enzimático viável. Os processos de hidrólise enzimática devem ser concebidos em função do tipo de substrato produzido e do pré-tratamento utilizado. Geralmente, o processo de hidrólise enzimática apresenta vantagens associadas à obtenção de rendimentos superiores a 0,85 g glicose/g celulose, sob temperaturas moderadas (40-50°C) e pressão atmosférica. Entretanto, aspectos operacionais relacionados ao elevado tempo de processo (48-72h), desativação catalítica por inibição da atividade enzimática, bem como do elevado custo das enzimas, têm acarretado

incertezas quanto à viabilidade econômica do processo de hidrólise enzimática no contexto da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. A taxa de hidrólise enzimática tende a decrescer com o aumento da concentração de carboidratos (xilose, glicose e celobiose) e de etanol no meio reacional, visto que estes compostos, a partir de determinadas concentrações, promovem inibição da atividade enzimática. Verifica-se que a glicose exerce maior influência sobre a inibição enzimática, em comparação com o etanol, bem como existe sinergia entre estes compostos no fenômeno (BAUDEL, 2007).

Saad Gonçalves (2011) realizaram uma avaliação econômica da produção de etanol via hidrólise enzimática de bagaço de cana. De acordo com os autores, o preço mínimo de venda do etanol foi estimado em R\$ 7,13/L o que torna a diminuição do custo de investimento e aumento do rendimento da hidrólise fundamentais para que o processo seja competitivo.

### **3.5. Fermentação de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar**

Quando hemiceluloses são hidrolisadas, uma mistura de monossacarídeos pode ser produzida. Os açúcares predominantes liberados são xilose, glicose e, em concentrações bem menores, arabinose, galactose e manose. Segundo Schlegel (1990) quando micro-organismos são expostos a essa mistura de açúcares, geralmente a glicose, é catabolizada preferencialmente e inibe a quebra de outros substratos, caracterizando assim fenômenos de diauxia.

De acordo com Du Preez et al. (1986), a diauxia pode causar um considerável período de fase de adaptação, sendo de ocorrência comum durante a fermentação de xilose ou celobiose na presença de glicose. Silva et al. (2011) estudaram a produção de etanol por *Pichia stipitis* NRRL Y7124 a partir de xilose em diferentes condições de aeração e agitação. Os autores reportaram que, por tratar-se de um levedura “fermentativa-aeróbia”, a maior concentração de etanol (26,7 g/L) foi obtida em condições de disponibilidade de oxigênio.

O gênero *Saccharomyces* é capaz de fermentar rapidamente glicose ou frutose produzindo etanol, com alta tolerância ao produto formado e às grandes variações de temperatura, características estas desejáveis para uma cepa de uso industrial (ANDRIETTA et al., 2007). Tem sido indicada para a fermentação de hexoses presentes nos hidrolisados lignocelulósicos, devido à capacidade de produção de etanol e a tolerância aos inibidores presentes (HAHN-HÄGERDAL et al., 1991). Entretanto não é capaz de fermentar açúcares como a xilose, arabinose, entre outros. Esses açúcares compõem o substrato de interesse na

biomassa lignocelulósica, de maneira que a busca por leveduras capazes de fermentá-los se faz necessária para que se possa elevar a produção de etanol (ROSSI; ANDRIETTA, 2009).

Dessa forma, a produção viável da biomassa a etanol implica na utilização de micro-organismos capazes de fermentar não somente a glicose, mas todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos, como D-xilose, L-arabinose, D-celobiose, galactose e manose com alto rendimento e produtividade (VAN MARIS et al., 2006; HAHN-HAGERDAL et al., 2007; BETTIGA et al., 2008; FUKUDA et al., 2009).

Muitas leveduras utilizam a xilose diretamente, mas com produção de etanol muito limitada. Apenas poucas espécies de leveduras produzem efetivamente etanol de xilose, como *Pachysolen tanophilus*, *Cândida shehatae* e *Pichia stipitis* (NIGAM et al., 1985). Toivola et al. (1984) realizaram um programa de *screening* sistemático com linhagens de cerca de 200 espécies de leveduras e identificaram *P. stipitis* como umas das espécies que produzem etanol de xilose com melhores rendimentos e produtividade.

Canilha et al. (2010) avaliaram a produção de etanol por *P. stipitis* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar detoxificado com carvão vegetal e resina, obtendo uma produtividade máxima de 0,16 g/L h em 48 horas e rendimento de açúcares em etanol de 0,3 g/g. No entanto, esta levedura é sensível a ácidos orgânicos presentes em hidrolisados lignocelulósicos, incluindo o ácido acético e etanol. Estes compostos inibem o crescimento celular e a produção de etanol. Estas leveduras são incapazes de fermentar xilose em pH baixo e necessitam de oxigênio para produção máxima de etanol, porém são sensíveis ao mesmo (STAMBUK et al., 2008; MATSUSHIKA et al., 2009)

Em contra partida, estudos realizados por Blomqvist et al. (2010) demonstraram que *D. bruxellensis* é capaz de resistir a grandes alterações no pH e temperatura e pode ter um metabolismo energético mais eficiente sob limitação de oxigênio do que quando comparada com *S. cerevisiae*. Trata-se de uma levedura com morfologia característica, com células alongadas e ogivais, alta produção de ácido e crescimento lento (MENEHIN, 2007). Possuem características metabólicas diferentes daquelas apresentadas por *S. cerevisiae*, contribuindo para seu comportamento não competitivo durante o processo de fermentação, porém com características oportunistas (SILVA, 2005).

Bassi (2011) mostrou uma significativa influência da agitação na produção de etanol e ácidos por estas leveduras. No entanto, os resultados indicaram que as leveduras não apresentaram um perfil fermentativo comparável à *S. cerevisiae* (no máximo 3% de etanol a partir de 10% de açúcar em 48h), podendo desviar o açúcar para a produção de ácidos, diminuindo o pH de 5,0 para cerca de 1,8, situação indesejada em processos fermentativos.



Além disto, dependendo do tipo de ácido produzido, pode ocorrer um efeito inibidor deste sobre a levedura do processo, afetando a sua viabilidade. Ainda neste cenário, cepas de *Dekkera* foram estudadas para explorar seu potencial para produzir etanol a partir de fontes renováveis em condições adequadas para processos industriais, tais como oxigênio limitado e baixo pH, revelando seu alto potencial de desenvolvimento em processos industriais desta natureza (GALAFASSI et al., 2010).

### 3.6. Metabolismo de pentoses em leveduras

Os micro-organismos capazes de fermentar pentoses podem ser divididos em dois grupos: os naturalmente fermentadores e aqueles geneticamente modificados. Os naturalmente fermentadores incluem linhagens das leveduras *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Pachysolen tannophilus* e *Spathaspora arborariae* (HAHN-HAGERDAL, et al., 1991). Aquelas geneticamente modificadas incluem, principalmente, a levedura *S. cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*, que apresentam grande potencial industrial para conversão de etanol a partir de hexoses, apesar de se apresentarem sensíveis a hidrolisados e incapazes de fermentar pentoses (HAHN-HAGERDAL, et al., 1991; PEREIRA, 2006).

As leveduras utilizam diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e energia, tais como D-glicose, D-galactose, D-xilose, glicerol, sorbitol, entre muitos outros. Porém, para cada espécie existe uma variação na habilidade de assimilação desses compostos, bem como na forma de metabolizá-los por vias respiratórias ou fermentativas no processo de geração de energia (MARTINS, 2011).

Em sua grande maioria, os micro-organismos apresentam maiores taxas de consumo de glicose ou galactose, seguido por xilose e arabinose. Usualmente, hexoses em hidrolisado podem ser completamente fermentadas em poucas horas. Entretanto, a completa conversão de xilose a etanol pode levar 48 a 72 horas ou mais (GONG et al., 1999).

Dentre os micro-organismos estudados e aplicados na produção industrial de etanol, *S. cerevisiae* ainda permanece como a principal espécie. No entanto, sua utilização na produção de etanol de segunda geração em hidrolisados que contém hexoses e pentoses não é eficiente, devido sua incapacidade de converter pentoses a etanol (HAN-HAGERDAL, et al., 2007). Segundo Toivari et al., (2004) o genoma desta levedura possui todos os genes necessários para a metabolização de xilose. Sua incapacidade em fermentar essa pentose foi atribuída a impossibilidade dessa levedura converter esse substrato em xilulose, mesmo apresentando

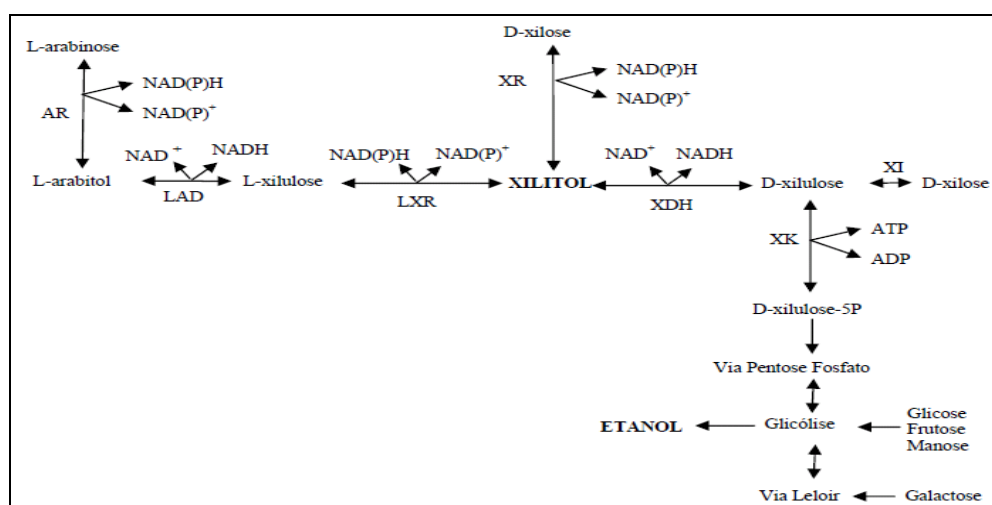
baixas atividades de XR (Xilose Reductase) e XDH (Xilitol Desidrogenase) (MATSUSHIKA, 2009). Além disso, a presença de xilose é capaz de revelar altos níveis de expressão em genes geralmente reprimidos em glicose (HECTOR et al., 2008).

A xilose pode ser metabolizada por bactérias, fungos ou leveduras. Dentre as principais espécies de leveduras fermentadoras de xilose, *P. stipitis* é considerada a mais promissora, já que é capaz de converter a maior parte dos açúcares presentes em hidrolisados hemicelulósicos em etanol. No entanto a utilização em larga escala destas leveduras é dificultada pela sua baixa tolerância ao hidrolisado e etanol, além da incapacidade de fermentar xilose a um pH baixo (STAMBUK et al., 2008).

Na maioria dos fungos, a conversão inicial de D-xilose e L-arabinose, a D-xilulose 5 fosfato por envolve a redução e oxidação dos cofatores NAD (P) + / NAD (P) H (Figura 1). A L- arabinose é reduzida a L-arabitol, que sofre uma oxidação adicional e etapas de redução a serem convertidas em xilitol, que é então oxidado em D-xilulose e fosforilado a D-xilulose 5-fosfato, ligando-se ao metabolismo inicial da xilose seguindo na via Pentose-Fosfato (PPP) e, em seguida, via glicólise até gerar etanol (RICHARD et al., 2003; VERHO et al., 2004). Em contra partida estudos realizados por Hahn-Hägerdal et al. (1991); Fonseca et al. (2007) revelaram que a adição de peptona e extrato de levedura em meios de cultivo, favorecem a conversão de arabinose em etanol, devido presença de receptores de elétrons presentes nestes compostos.

Em leveduras que naturalmente assimilam xilose, o transporte pode ocorrer por difusão simples, ou pelo transporte ativo através da membrana plasmática. Nesse tipo de sistema o açúcar é impulsionado por transportadores de alta e baixa afinidade, sendo a acumulação intracelular do substrato fortemente regulada pela concentração extracelular do mesmo (SPENCER-MARTINS, 1994; GÁRDONYI et al., 2003).

Por outro lado, um dos fatores capaz de afetar consideravelmente a produção de etanol, a partir de xilose, está associado com a aeração do cultivo. De acordo com a Figura 4 as duas primeiras enzimas dessa rota (XR e XDH) possuem cofatores distintos, preferência por NADPH e NAD<sup>+</sup> respectivamente. Essa distinção entre as enzimas causa um desequilíbrio redox entre seus cofatores (XR e XDH) causados em condições limitadas de oxigênio. Podem ocorrer ainda limitações metabólicas a partir da XDH, que incluem a etapa de conversão de xilulose a xilulose-5-fosfato catalisada pelo xiluloquinase (WALFRIDSSON et al., 1995; STAMBUK et al., 2008). Por essa razão a fermentação a partir de pentoses deve ocorrer em condição de micro-aerobiose, situação de difícil implantação em escala industrial (DAHN et al., 1996).



**Figura 4:** Vias de utilização de L-arabinose e D-xilose em fungos e leveduras (Adaptado de STAMBUK et al., 2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material lignocelulósico

O bagaço de cana-de-açúcar a ser utilizado foi coletado de usinas da região de Araras/SP, sendo acondicionado em laboratório e triturado em um Moinho de Facas Andamo<sup>®</sup> contendo uma peneira de Mesh 20 (abertura de 0,84mm). Em seguida, as partículas foram classificadas em conjunto de peneiras Tyler para selecionar material com tamanho na faixa de 0,59 e 0,84 mm.

### 4.2. Inóculo

A levedura *D. bruxellensis* (CCA155) utilizada no experimento foi isolada do vinho da Destilaria São Marino e pertencente ao banco de culturas do LAMAM – Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – UFSCar Campus Araras. Além desta, *P. stipitis* (NRRL Y-7124), gentilmente cedida pela Prof<sup>ª</sup>. Dra. Inês Conceição Roberto – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (EEL/USP) foi testada como comparação. Estas foram cultivadas em placas contendo meio de cultivo YEPD sólido (10g/L extrato de levedura, 20g/L peptona, 20g/L glicose e 20g/L ágar) e incubadas a 30°C por um período de

aproximadamente 48 horas. Após esse período, as colônias foram repicadas e armazenadas em *slants* de YEPD, a 4°C, e em água destilada estéril, a temperatura ambiente.

### 4.3. Testes de fermentação com pentoses em meio sintético

Os ensaios fermentativos foram conduzidos com as cepas *D. bruxellensis* e *P. stipitis* com reciclo e sem reciclo de células, em meio sintético contendo xilose, arabinose ou xilose + glicose como únicas fontes de carbono. Foram testadas concentrações de 20 a 100 g/L de xilose e arabinose e 40 g/L xilose + 10 g/L glicose com meio sintético de fermentação (Tabela 2). A cada 24 horas foram retiradas amostras para leitura de Brix (°) em refratômetro de campo, posterior destilação em Microdestilador de Álcool TE-012 Tecnal®, e análise do teor alcoólico (% vol/vol a 20°C) em densímetro digital Anton-Paar DMA-45.

**Tabela 2:** Composição do meio sintético de fermentação.

| Ingredientes                           | Quantidade (g/L) |
|--|------------------|
| Fosfato monobásico de potássio         | 5,0              |
| Cloreto de potássio                    | 1,0              |
| Cloreto de amônio                      | 1,5              |
| Extrato de levedura                    | 6,0              |
| Sulfato de magnésio heptahidratado     | 1,0              |
| Fonte de pentose (arabinose ou xilose) | *                |
| Glicose                                | 10               |

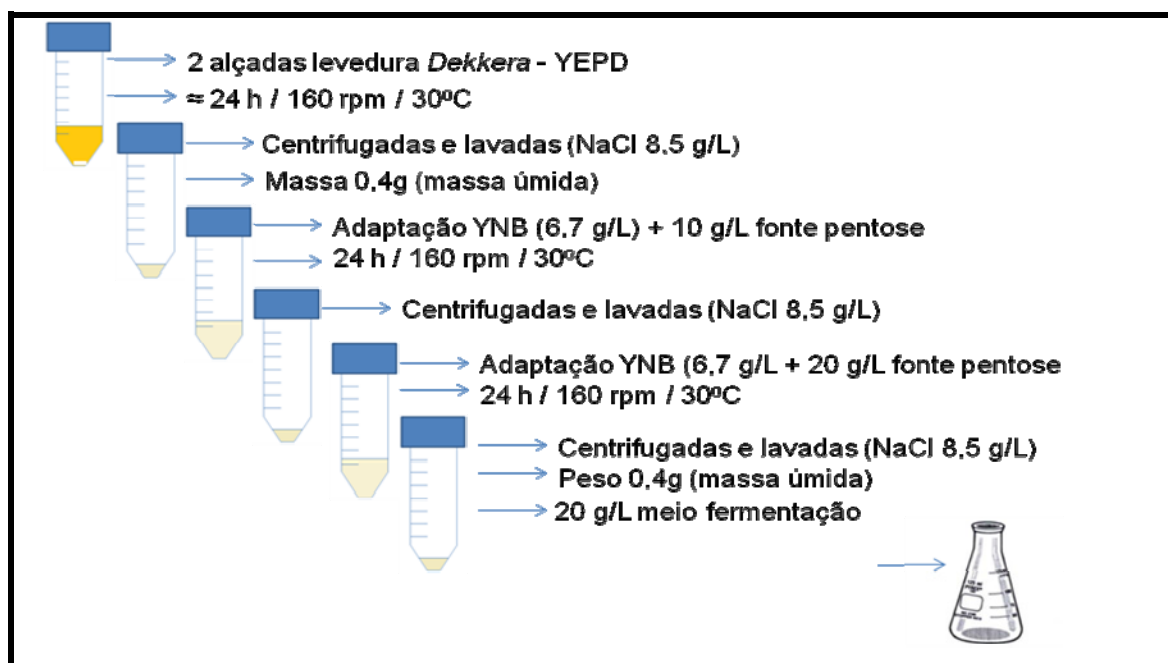
\*Concentração variável

#### 4.3.1. Fermentações com reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação

Os testes de fermentação com reciclo foram realizados em duplicatas em concentrações crescentes de arabinose e xilose (20, 40, 60, 80 e 100 g/L) como única fonte de carbono, pH 5,0, temperatura 30°C, concentração de células 10g/L de meio de fermentação, volume final de 20 mL e agitação de 150 rpm.

#### 4.3.1.1. Preparo do inóculo

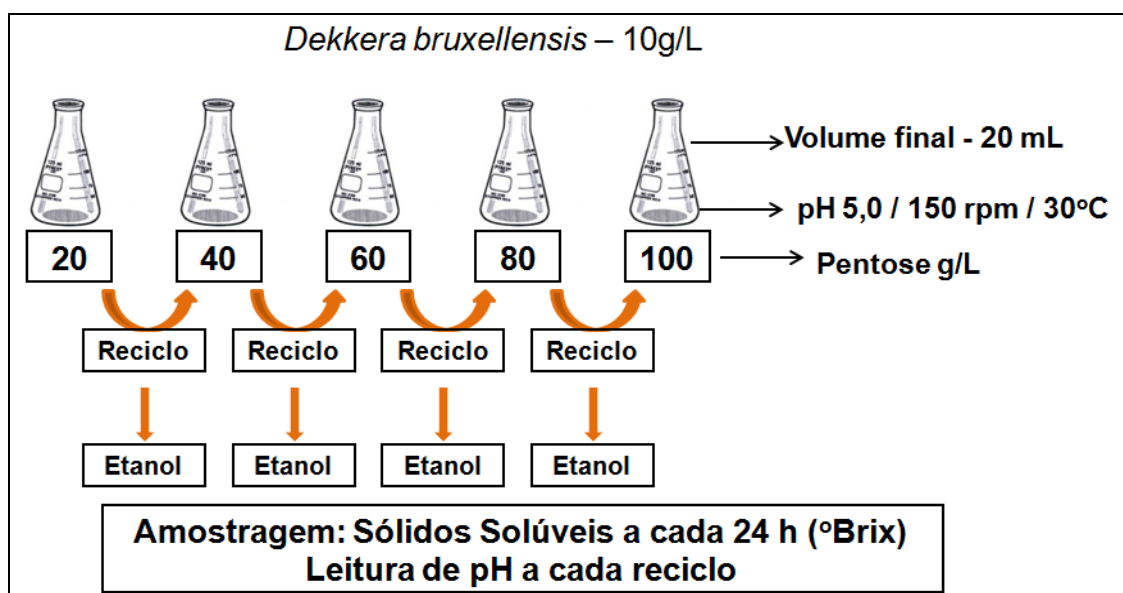
O inóculo foi preparado a partir de duas alçadas de cada levedura testada em tubos “Falcon” de 50 mL tarados, contendo meio de cultivo YEPD líquido, conforme a Figura 5. O conjunto foi colocado em agitador a 30°C e 160 rpm por 24 horas. Após esse período os tubos foram centrifugados a 3400 rpm por 5 minutos e o inóculo ressuspendido em solução salina (8,5 g/L de NaCl) para lavagem das células. Foram pesados e ajustados a fim de se obter uma massa celular de 0,4g. Em seguida, o inóculo passou por uma adaptação em meio YNB (6,7 g/L) contendo 10 g/L da fonte de pentose e levadas ao agitador a 30°C e 160 rpm por 24 horas. Após este período o material foi centrifugado novamente por 5 minutos a 3400 rpm, o sobrenadante descartado, as células ressuspendidas em meio YNB (6,7 g/L) contendo 20 g/L da fonte de pentose e retornadas ao agitador a 30°C e 160 rpm por 24 horas. Estes foram centrifugados a 3400 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi novamente descartado e as células lavadas duas vezes com solução salina (8,5 g/L de NaCl). Após a última lavagem, os tubos foram pesados em balança analítica para estimativa do peso da massa úmida. Utilizou-se a proporção de 10g de massa úmida/Litro de meio de fermentação, sendo necessários 0,2g de massa úmida/erlenmeyer de fermentação, portanto 0,4g de massa úmida (duplicata).



**Figura 5:** Esquema de preparo do inóculo para fermentações com reciclo de pentoses

#### 4.3.1.2. Fermentação

O inóculo obtido anteriormente (4.3.1.1) foi ressuspenso em 10 mL do meio sintético de fermentação e transferido para um erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio de fermentação, perfazendo um volume final de 20 mL, em duplicata. Os experimentos realizados com a concentração inicial da pentose (xilose ou arabinose) em 20 g/L foram aumentados a cada reciclo para 40, 60, 80 e 100 g/L da pentose, sendo colocados em agitador a 30°C e 150 rpm. Foram realizadas diariamente leituras de Brix, em refratômetro de campo, e pH inicial e final a cada reciclo, conforme mostra a Figura 6. A cada reciclo do meio de fermentação, as amostras foram destiladas em Microdestilador de Álcool TE-012 Tecnal® e o teor de álcool (% vol/vol a 20°C) foram medidos em densímetro digital Anton-Paar DMA-45.



**Figura 6:** Esquema de fermentações com reciclo de pentoses (xilose e arabinose) em meio sintético de fermentação com *D. bruxellensis*.

#### 4.3.2. Fermentações sem reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação

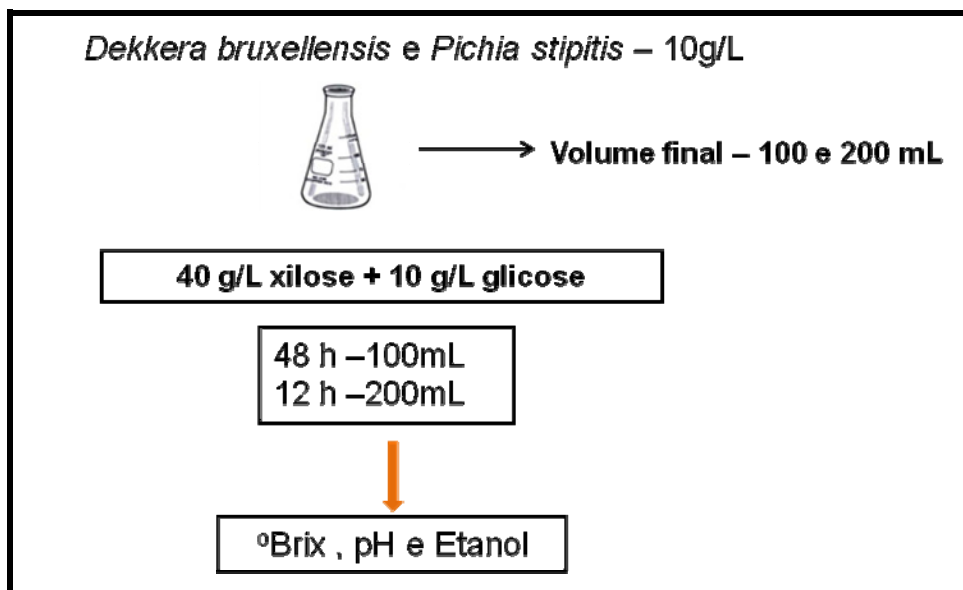
As fermentações sem reciclos de xilose com adição de glicose (40 g/L xilose + 10 g/L glicose) foram realizadas com pH 5, temperatura 30°C, concentração de células 10g/L, volume final de 100 e 200 mL, e agitação 150 rpm.

#### **4.3.2.1. Preparo do Inóculo**

O inóculo foi obtido a partir de duas alçadas de cada levedura testada (*D. bruxellensis* e *P. stipitis*) em frascos erlenmeyers contendo meio de cultura YEPD líquido em agitador a 30°C e 160 rpm por 48 horas. Tubos falcon de 50 mL tarados foram utilizados para centrifugação do inóculo. Após a centrifugação dos tubos e descarte do sobrenadante, eles foram pesados e ajustados a fim de se obter uma massa celular de 1 g (volume final 100 mL) e 2 g (volume final de 200 mL). Em seguida o inóculo passou por uma adaptação em meio YNB (6,7 g/L) contendo 20 g/L da fonte de pentose, nas mesmas condições descritas no item 4.3.1.1.

#### **4.3.2.2. Fermentação**

Para o experimento com volume final de 100 mL de meio de fermentação, o inóculo obtido anteriormente (proporção final de 10g/L de massa úmida) foi ressuspendido em 10 mL do meio de fermentação e transferido para o erlenmeyer (erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de meio de fermentação), perfazendo um volume final de 100 mL, em duplicata. Para o experimento com volume final de 200 mL, em frasco de 500 mL, o inóculo obedeceu a mesma proporção anterior (Figura 7). Os experimentos foram colocados em agitador a 30°C e agitação de 150 rpm. Foram realizadas leituras de Brix, por refratometria, e pH a cada 48 horas para 100 mL, e 12 horas para 200 mL. As amostras foram destiladas e o teor de álcool (% vol/vol a 20°C) e a densidade foram medidos em densímetro digital Anton-Paar DMA-45.



**Figura 7:** Esquema de fermentação sem reciclo de pentoses em meio sintético de fermentação contendo xilose e glicose, com leveduras *D. bruxellensis* e *P. stipitis*.

#### 4.4. Curva padrão para quantificação da biomassa das leveduras

Para determinação da curva padrão de absorbância e das suspensões de *D. bruxellensis* CCA155 e *P. stipitis* foram inoculadas duas alçadas de cada levedura em frascos erlenmeyer contendo meio de cultura YEPD líquido e colocados em agitador a 30°C e agitação de 150 rpm por 48 horas. Após este período, as células foram centrifugadas a 3400 rpm por 5 minutos e lavadas com solução salina (8,5 g/L NaCl). A massa celular foi diluída em série e leituras em espectrofotômetro a 600nm foram realizadas. O concentrado de células foi filtrado em membrana HA em ésteres de celulose (Nitrato 75-80%), 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro, branca e lisa. Em seguida as membranas foram secas em estufa a 105°C por 2 horas, dispostas em dessecador, sendo determinado a massa seca em balança analítica até peso constante.



## 4.5. Obtenção do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

### 4.5.1. Pré-tratamento ácido e deslignificação

As partículas de bagaço de cana-de-açúcar com tamanho de 0,59 a 0,84mm selecionadas conforme item 4.1 foram lavadas com água destilada, para retirada de possíveis resíduos de caldo de cana-de-açúcar, e colocadas em estufa a 70°C por 24 horas. Após esse período, foram submetidas a um pré-tratamento com ácido sulfúrico de acordo com as condições apresentadas na Tabela 3.

Durante a etapa de pré-tratamento ácido, foi utilizado o solvente Organosolov (água, acetona e etanol 2:1:1) para separação da lignina a fim de possibilitar a hidrólise da hemicelulose e celulose para obtenção de açúcares fermentescíveis. Na determinação da concentração ácida durante o pré-tratamento, foi adaptado o Protocolo Experimental desenvolvido por Kiipper (2009).

**Tabela 3:** Protocolo Experimental para pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar (Adaptado de KIIPPER, 2009).

| Experimento | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub><br>(%) | Bagaço<br>(g) | Acetona/Etanol<br>(1:1) / mL | Água<br>mL | Sulfato de<br>Ferro III/g | Tempo<br>min. |
|-------------|---------------------------------------|---------------|------------------------------|------------|---------------------------|---------------|
| Controle    | 0,0                                   | 18,75         | 250,0                        | 250,0      | 0,47                      | 60/120        |
| A           | 1,0                                   | 18,75         | 247,5                        | 247,5      | 0,47                      | 60/120        |
| B           | 2,0                                   | 18,75         | 245,0                        | 245,0      | 0,47                      | 60/120        |

Foram adicionados em frascos de vidro com tampa resistentes a calor e pressão (Boeco<sup>®</sup>) de 1 litro, acetona (95%), etanol (96°) e água destilada. Em seguida, adicionou-se o sulfato de ferro III como agente oxidante. O bagaço foi adicionado em seguida, e por último o ácido sulfúrico nas concentrações de 1 e 2%. Aliquotas de 2 mL foram retiradas de cada concentração para quantificação no tempo inicial. Os frascos foram mantidos em autoclave a 120°C e 1 atm nos tempos descritos na Tabela 3. Após serem retiradas da autoclave, as partículas foram filtradas em bomba a vácuo com papel filtro qualitativo, para retirar o máximo de líquido de sua massa. O mesmo foi filtrado em membrana Milipore<sup>®</sup> 0,20µm para quantificação por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) de açúcares (xilose, arabinose e glicose), furanos (HMF- hidroximetilfurfural e furfural) e ácido acético. O bagaço

de cada concentração foi lavado com água destilada e colocado em estufa a 70°C por 24 horas, para etapa posterior.

#### 4.5.2. Hidrólise Ácida

Após a etapa de pré-tratamento, o material tratado anteriormente foi exposto a concentrações maiores de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para determinar a melhor concentração ácida e melhor tempo (Tabela 4), com base na porcentagem de açúcares redutores (AR) e compostos inibidores no pré-hidrolisado.

**Tabela 4:** Protocolo experimental das condições estabelecidas para hidrólise ácida do bagaço de cana para obtenção do hidrolisado (Adaptado de KIIPPER, 2009).

| Experimento | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (%) | Bagaço (g) | Etanol (mL) | Água (mL) | Tempo (min.) |
|-------------|------------------------------------|------------|-------------|-----------|--------------|
| Controle    | 0,0                                | 18,75      | 250,0       | 250,0     | 150          |
| A           | 5,0                                | 18,75      | 237,5       | 237,5     | 150          |
| B           | 10,0                               | 18,75      | 225,0       | 225,0     | 150          |

Após a etapa de pré-tratamento, etanol (96°) e água destilada foram colocados em frascos de vidro de 1 litro tipo Boeco<sup>®</sup>. Em seguida o bagaço pré-tratado foi misturado e por último adicionado o ácido na concentração desejada. Os frascos foram mantidos em autoclave a 120°C e 1 atm por 150 minutos. As partículas de bagaço hidrolisadas foram filtradas em bomba a vácuo com papel filtro qualitativo para retirar o máximo de líquido da massa. O mesmo foi filtrado em membrana milipore 0,20 µm para quantificação por CLAE de açúcares (xilose, arabinose e glicose), furanos (HMF- hidroximetilfurfural e furfural) e ácido acético.

#### 4.6. Quantificações por CLAE

As análises de otimização da hidrólise ácida para açúcares (xilose, arabinose e glicose), furanos (HMF-hidroximetilfurfural e furfural) e ácido acético foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no Departamento de Biotecnologia (LOT) da Universidade Estadual de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena - EEL/USP,

Lorena/SP. Para açúcares e ácido acético, foi utilizada a coluna BIO-RAD Aminex/HPX-87H, temperatura da coluna 45°C, temperatura do detector 35°C, eluente ácido sulfúrico 0,0005 M, fluxo de 0,6 mL/min. e volume da amostra 20 µL. Os furanos foram determinados em equipamento Waters 2487/USA equipado com detector UV e coluna Resolve C18 Waters 3,9 x 300nm, temperatura 25°C, eluente acetonitrila e água na proporção de 1:8 com 1% de ácido acético, fluxo de 0,9 mL/min. e volume da amostra 20 µL. As amostras foram diluídas e filtradas em membrana HAWP 0,45µm (Millipore). O eluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,22µm (Millipore) e, em seguida, degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

As amostras dos testes fermentativos em pré-hidrolisados para determinação da concentração celobiose, glicose, xilose, arabinose e etanol foram realizadas pela Faculdade de Engenharia Química da Universidade de Campinas – FEQ/UNICAMP. Inicialmente, as mesmas foram filtradas diretamente em vials utilizando filtros de membrana GS em éster de celulose com poros de 0,22 µm (Millipore®). Foi utilizada para análise a coluna Aminex HPX-87H, detector índice de refração, temperatura do forno 65°C, temperatura do detector 40°C, fase móvel água deionizada filtrada e degaseificada, taxa de fluxo 0,6 mL/min. e volume da injeção 10 µL.

#### **4.7. Análise Estatística**

Os resultados das quantificações em CLAE do pré-tratamento foram analisados por análise de variância (ANOVA) e no caso de diferença significativa, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância, utilizando-se o software Statistica 7.

#### **4.8. Determinação de nitrogênio total em pré-hidrolisado e em meio YEPD**

O teor de nitrogênio total (NT) das amostras foi determinado através do método da digestão com persulfato de potássio e hidróxido de sódio (APHA, 2005), em bloco digestor HACH® DRB200 durante 30 minutos, com leituras a 410nm em Espectrofotômetro HACH® DR 5000.

#### **4.9. Cinética de crescimento de *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**

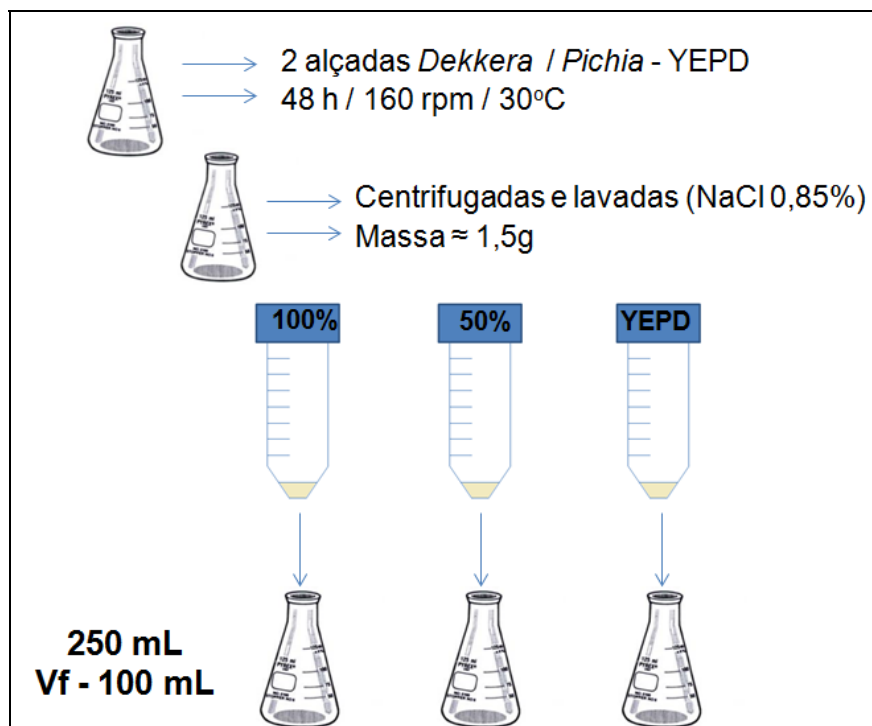
A partir dos perfis de biomassa com tempo nas diferentes condições experimentais, foram obtidas as velocidades específicas de crescimento máximas ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e tempo de geração (tg) na fase exponencial, considerando o ajuste linear da curva de crescimento semi-logarítmica.

##### **4.9.1. Preparo do pré-hidrolisado**

As partículas que sofreram pré-tratamento com 1% de ácido sulfúrico diluído e solvente Organosolov (água, acetona e etanol 2:1:1), em autoclave 120°C / 1atm, por 60 minutos, foram utilizadas neste ensaio. O pré-hidrolisado foi corrigido com NaOH 6M, ajustado para pH 6,5 e centrifugado a 8000 rpm por 10 minutos, para remoção de precipitado de cor escura formado durante a correção do pH. Em seguida, foi novamente autoclavado a 120°C / 1atm por 15 minutos. Os ensaios foram conduzidos em meio de cultivo com 100% e 50% do pré-hidrolisado diluído em água destilada autoclavada e em meio YEPD.

##### **4.9.2. Ensaio de crescimento em pré-hidrolisados**

O inóculo foi obtido a partir de duas alçadas de cada levedura (*D. bruxellensis* e *P. stipitis*) em frascos erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de YEPD líquido em agitador a 30°C e 160 rpm, por 48 horas. O inóculo foi centrifugado a 3400 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com solução salina (8,5 g/L de NaCl) duas vezes. As células foram ressuspensas em 10 mL de cada meio correspondente (100% pré-hidrolisado, 50% pré-hidrolisado ou meio de cultura YEPD líquido) e adicionadas ao erlenmeyer de 250 mL com 90 mL de meio correspondente. Os testes foram realizados em duplicata e amostras retiradas a cada 24 horas para avaliação da OD em espectrofotômetro a 600nm, por um período de 120 horas.



**Figura 8:** Esquema de preparo de inóculo e teste fermentativo em pré-hidrolisados de bagaço de cana, com *D. bruxellensis* e *P. stipitis*, cultivado por 48 horas, 30°C a 160 rpm e avaliado por absorvância a 600nm.

#### 4.10. Ensaios exploratórios em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar

Os testes foram realizados em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de pré-hidrolisado. A concentração do inóculo foi de 10 g/L de massa úmida, nos ensaios com adaptação do inóculo e com 5 g/L de massa úmida no ensaio sem adaptação das células. Nas duas concentrações os ensaios ocorreram conforme metodologia descrita anteriormente no item 4.3.1.1. Os ensaios foram conduzidos em meio de cultivo com 100% e 50% do pré-hidrolisado diluído em água destilada autoclavada. Amostras foram retiradas a cada 24 horas para determinação de OD<sub>600nm</sub>, açúcares e etanol.

##### 4.10.1. Inóculo adaptado em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose

Na adaptação em meio sintético, foram crescidas duas alçadas da levedura *D. bruxellensis* em meio YNB (6,7 g/L) contendo 20 g/L de xilose e 10 g/L de glicose, em frascos de 500 mL contendo 200 mL de meio, por um período de 48 horas, em agitador a 30°C e 160 rpm. Após o período de adaptação, tubos falcon de 50 mL tarados foram

utilizados para centrifugação do inóculo. Após a centrifugação dos tubos e descarte do sobrenadante, eles foram pesados e ajustados a fim de se obter uma massa celular de 10 g/L de massa úmida

#### **4.10.2. Inóculo adaptado em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%)**

Para adaptação em pré-hidrolisado diluído foram inoculadas duas alçadas da levedura *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado 25%, permanecendo por 48 horas em frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de meio, em agitador a 30°C e 160 rpm. Em seguida o inóculo foi centrifugado e ressuspensionado na concentração de 50%, permanecendo por mais 48 horas nas mesmas condições. Para adaptação em pré-hidrolisado 100%, o processo ocorreu como em 50%, no entanto após 50% permaneceu por mais 48 horas na concentração de 100%. Após o período de adaptação nas duas condições, procedeu-se conforme item 4.10.1.

#### **4.10.3. Inóculo sem adaptação**

Para o preparo do inóculo sem adaptação foram inoculadas duas alçadas da levedura *D. bruxellensis* em frasco erlenmeyer contendo meio de cultura YEPD líquido por em agitador a 30°C e 160 rpm por 48 horas. Tubos falcon de 50 mL tarados foram utilizados para centrifugação do inóculo. Após a centrifugação dos tubos e descarte do sobrenadante, eles foram pesados e ajustados a fim de se obter uma massa celular de 5 g/L de massa úmida.

#### **4.11. Ensaio fermentativo em pré-hidrolisado concentrado em banho termostaticado**

O pré-hidrolisado preparado conforme item 4.9.1 foi evaporado em banho termostaticado para evaporação de compostos voláteis presente no mesmo.

O meio foi colocado em béquer de vidro e aquecido em banho a 70°C. Inicialmente retirou-se uma alíquota de 10 mL para destilação e posterior determinação de etanol inicial, procedendo-se da mesma maneira a cada 30 minutos por um período de 5 horas.

O teste fermentativo com pré-hidrolisado evaporado foi realizado com inóculo na concentração de  $5 \text{ g/L}^{-1}$ , em frascos erlenmeyer de 500 mL com 200 mL de meio, conforme item 4.10, com exceção da determinação de etanol que foi realizada a partir de 48 horas.

#### **4.12. Ensaio em biorreator de bancada**

O ensaio foi realizado no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMAC/DTAISER/CCA) em biorreator de bancada A Z® tipo mistura perfeita com cuba de 3 L e volume final 1,6 L. Agitação de 240 rpm, 30°C, monitoramento de pH, CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> dissolvido.

##### **4.12.1. Preparo do inóculo**

O inóculo foi propagado em meio de cultura YEPD líquido em frascos erlenmeyer de 125, 250, 500 e 1000 mL. Inicialmente colocou-se uma alçada da levedura em erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio. O frasco permaneceu em agitação de 160 rpm, a 30°C por 48 horas. Em seguida o volume foi centrifugado a 3600 rpm por 5 minutos, e a biomassa ressuspensa em frascos de 250 mL com 100 mL de meio. Essas etapas procederam-se da mesma maneira em frascos de 500 e 1000 mL, com volumes de YEPD de 200 e 500 mL respectivamente, até que se atingisse a concentração de  $5 \text{ g/L}^{-1}$  de biomassa úmida.

##### **4.12.2. Fermentação**

Após padronização do inóculo, o mesmo foi centrifugado e ressuspensa em pré-hidrolisado 100%. Em seguida foi transferido para a cuba de fermentação previamente esterilizada. Durante o experimento sensores de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e pH marca Mettler Toledo® monitoraram o processo, mantido a 240 rpm de agitação para manter as condições de mistura (xg) dos frascos menores. A cada 24 horas foi retirada uma alíquota de 15 mL, para leitura de densidade óptica (OD), determinação do teor alcoólico e de açúcares redutores (xilose e glicose).

### **4.13. Determinação de açúcares redutores**

#### **4.13.1. Xilose**

A determinação de xilose foi realizada pelo Método Colorimétrico do Reagente Ácido Dinitrosalicílico (ADNS), com auxílio de curva padrão (Adaptado de Procedimento Operacional Padrão – Lab. de Microbiologia Aplicada e Controle – LABMAC, 2011).

#### **4.13.2. Glicose**

A determinação de glicose foi realizada por método enzimático glicose oxidase-peroxidase, através do kit da Laborlab®. A amostra foi misturada com o reativo enzimático e incubada em banho-maria a 37°C por 10 minutos, e em seguida realizada leitura em espectrofotômetro a 505 nm. A quantificação foi determinada por curva padrão de glicose realizada com o reativo enzimático.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Potencial de produção de etanol das leveduras a partir de meios sintéticos adicionados de pentoses

#### 5.1.1. Fermentações com reciclagem de células de *Dekkera bruxellensis* e adição crescente de pentoses

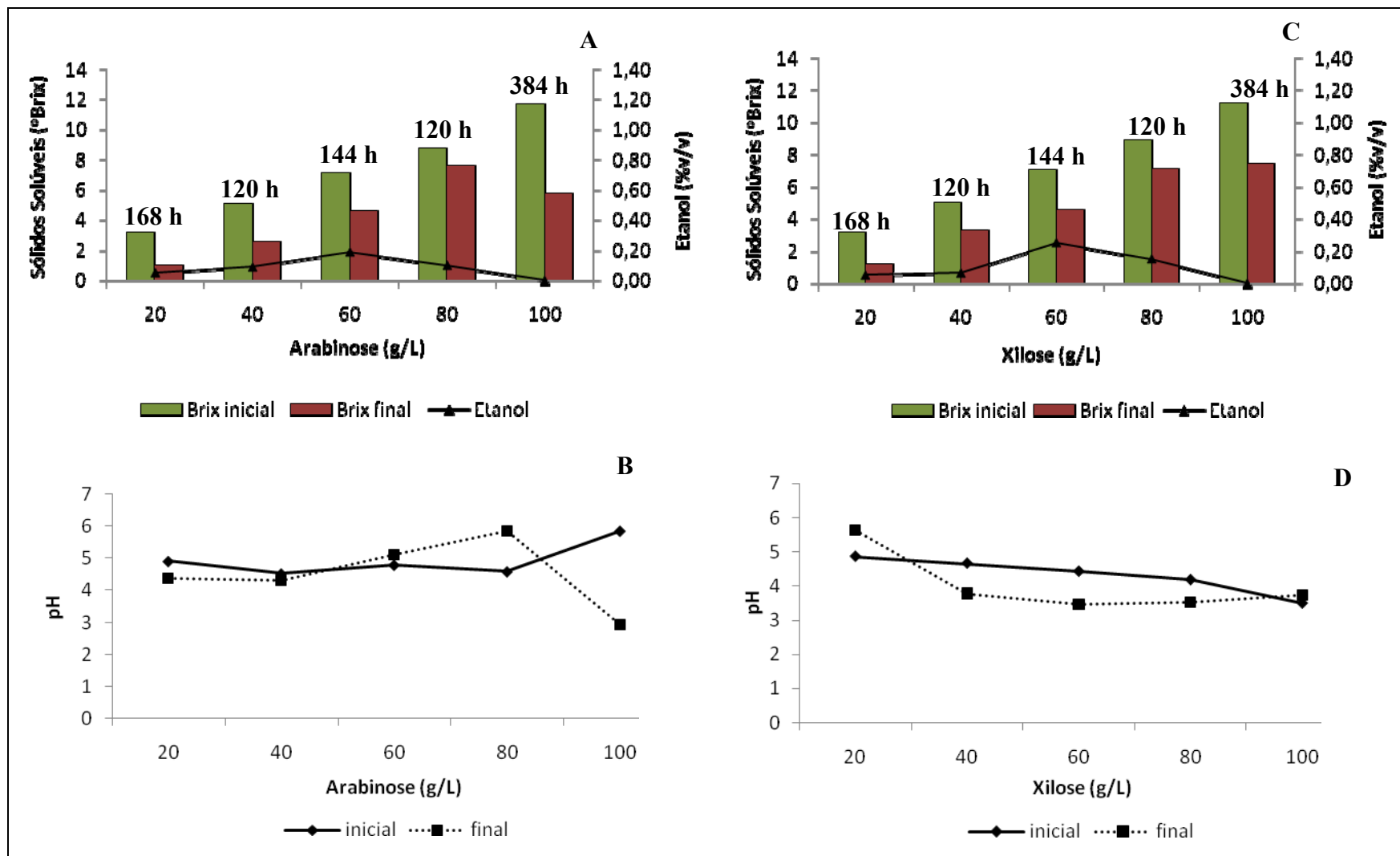
Primeiramente foram conduzidos ensaios fermentativos a partir de meio sintético padrão com ciclos celulares crescente de pentoses.

Em relação à arabinose, de acordo com a Figura 9 A e B, verificou-se que a produção de etanol foi mais acentuada com meio de fermentação contendo 60 g/L deste açúcar. O Brix do meio variou para todas as concentrações, exceto em 80 g/L, situação na qual começou a ocorrer uma diminuição na produção de etanol. Na concentração de 100 g/L não houve produção de etanol, apesar do consumo considerável da fonte de pentose, tornando o brix final por volta de 6 sugerindo redução da metade da concentração inicial dos açúcares.

Os valores de pH não sofreram variações consideráveis até 60 g/L de arabinose. Com 100 g/L houve acidificação do meio, momento em que também ocorreu maior consumo de arabinose. Em comparação com xilose, apresentou níveis pouco inferiores de etanol. Valores de pH em torno de 2 são relatadas na literatura como capazes de limitar o crescimento de *Dekkera* em meio YEPD (BASSI, 2011). Segundo Freer et al. (2003) a espécie *D. bruxellensis* é capaz de produzir elevada quantidade de ácido acético a partir de glicose em meio bem misturado, apesar do metabolismo lento. Além disso, estas leveduras podem se adaptar a ambientes com limitação de nutrientes e alta concentração de etanol, podendo ainda utilizá-lo como fonte de carbono (SUÁREZ et al., 2007).

Para fermentação com xilose (Figura 9 – C e D) como única fonte de carbono também foi observada maior produção de etanol na concentração de 60 g/L, condição que também apresentou maior diminuição no pH. Segundo Ciani e Ferraro (1997) leveduras do gênero *Dekkera*, em condições de semi-anaerobiose resultam em boa combinação entre produção de etanol e formação de ácido acético, devido a presença do efeito Custer positivo, efeito causado quando o processo fermentativo é estimulado pela aeração.

Com 80 g/L de xilose houve baixa produção de etanol e a 100 g/L houve completa inibição na produção de etanol. Os valores de Brix indicaram variação em todas as concentrações, com consumo de substrato mais acentuado a 100 g/L, comprovando um metabolismo mais lento. Segundo Dias et al. (2010), a assimilação da xilose é considerada mais lenta quando comparado à glicose, sendo que o seu consumo é fortemente influenciado pela sua concentração. Em estudo realizado por Roberto et al. (1991) com *P. stipitis* registrou-se inibição da fermentação com concentrações iniciais de xilose entre 76 g/L e 99 g/L.



**Figura 9:** Variação dos valores de Brix, teor alcoólico e pH para fermentação de *D. bruxellensis* realizada com volume de 20mL de meio de fermentação sintético contendo arabinose (gráficos A e B) ou xilose (gráficos C e D) como única fonte de carbono, em erlenmeyer de 50mL, pH 5,0, 10g/L de inoculo, 150 rpm, 30°C, com o tempo expresso em horas para cada ciclo.

### 5.1.2. Fermentações sem reciclo

Os testes fermentativos sem reciclo de pentose foram realizados com a levedura *D. bruxellensis* e *P. stipitis*, esta última considerada padrão para produção de etanol a partir de pentoses por alcançar rendimentos fermentativos a partir de xilose (NIGAM et al., 1985), em torno de 24 g/L (SILVA et al., 2011). Entretanto fatores de aeração interferem no rendimento a partir desta pentose.

Na Figura 10 é possível observar a fermentação realizada por *D. bruxellensis* e *P. stipitis* em 100 e 200 mL de meio em frascos de 250 e 500 mL respectivamente. Na fermentação com 100 mL (Figura 10 A e B) houve produção máxima de etanol, 0,38 %v/v, somente em 48 horas, com discreta acidificação do meio e manutenção do pH constante até 192 horas, para *D. bruxellensis*. O Brix diminuiu nas primeiras 48 horas, permanecendo constante até 144 horas, seguido de leve diminuição em 192 horas. Tratando-se de uma fermentação em batelada, é possível que tenha ocorrido consumo do etanol como fonte de carbono, uma vez que não se verificou variação nos valores de Brix, diferente do que ocorre com a concentração de etanol. Em contra partida para *P. stipitis* ocorreu decréscimo dos valores de Brix e pH durante os tempos, tornando-se mais estável a partir de 144 horas. Comparando-se as fermentações de *P. stipitis* com *D. bruxellensis*, verificou-se que houve maiores valores de etanol a partir de 48 horas, com produção máxima em 96 horas, em torno de 1,20 %v/v.

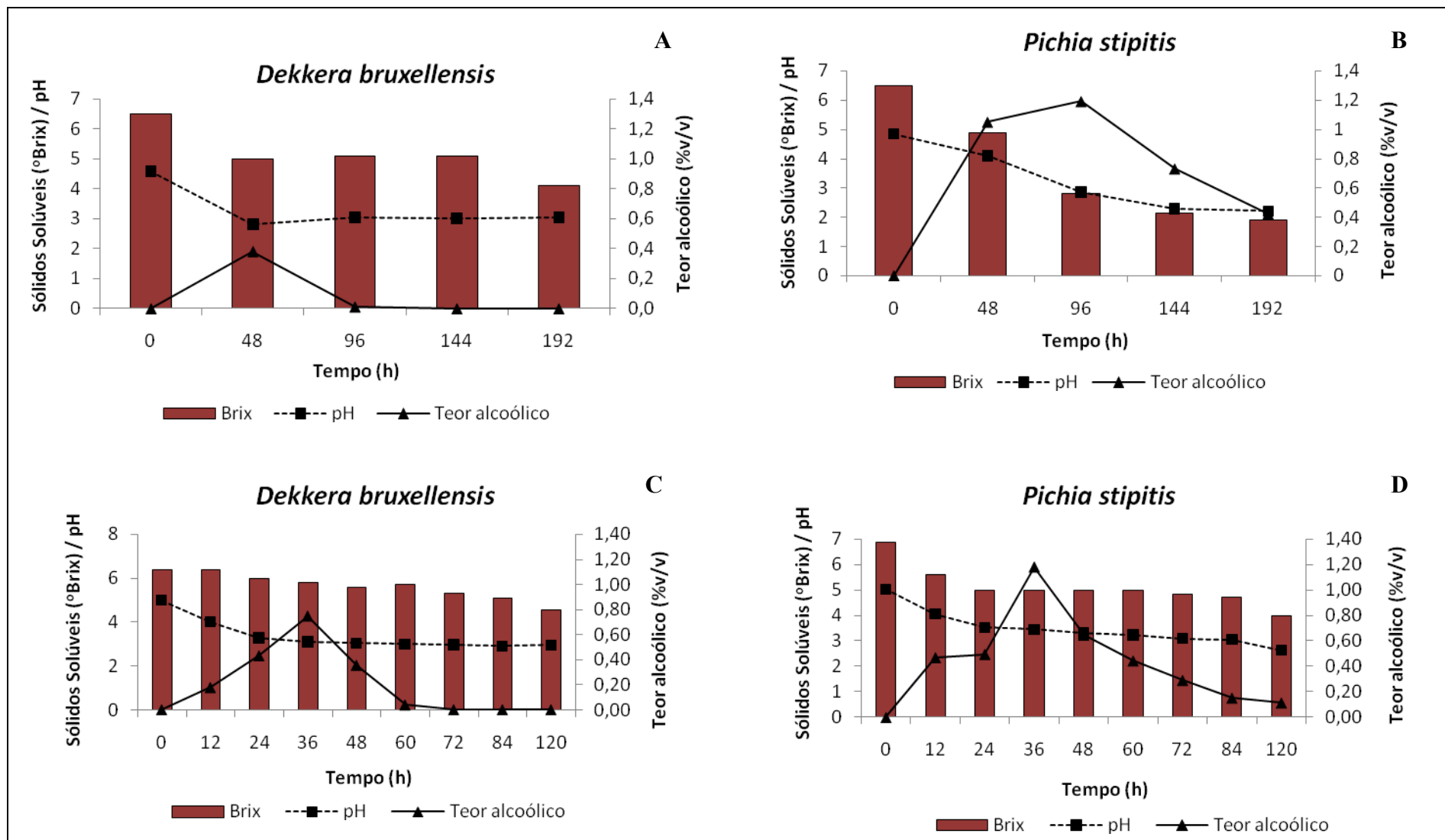
Testes realizados com *D. bruxellensis* por Galafassi et al. (2010) revelaram que devido à presença de glicose na alimentação houve rendimento maior de etanol no processo fermentativo com xilose, razão pela qual se optou por acrescentar uma baixa concentração de glicose (10 g/L) ao meio de fermentação. Além disso, ao aumentar a taxa de alimentação com açúcares, foram obtidos maiores níveis de rendimento e produtividade. Esse fato pode indicar que a fermentação de xilose sob limitação de oxigênio ocasiona um desequilíbrio redox, provavelmente devido à utilização de um co-fator diferente pelas duas enzimas (Xilose Redutase e Xilose Desidrogenase), envolvidas inicialmente no metabolismo de xilose (GALAFASSI et al., 2010). Estudos realizados por Ceccato-Antonini et al. (2010) indicam ainda que a aeração é um parâmetro importante no cultivo de *D. bruxellensis* em batelada durante o processo de fermentação alcoólica.

A fermentação com 200 mL (Figura 10 - C e D) de meio mostrou picos dos teores de etanol, entre 24 e 36 horas, com decréscimo em 48 horas para as duas leveduras. Os valores

de Brix para *D. bruxellensis* começaram a diminuir a partir de 24 horas, indicando metabolismo mais lento da levedura quando comparada com *P. stipitis*, que a partir de 12 horas demonstrou diminuição no valor de Brix.

As leveduras estudadas mostraram melhores resultados em 36 horas de fermentação, onde o teor alcoólico foi mais acentuado. No entanto concentrações maiores de etanol foram encontradas na fermentação com *P. stipitis*.

Segundo Schneider (1989) e Rizzi et al. (1989), a taxa de aeração é determinante na quantidade de carbono utilizada pela célula para crescimento celular ou formação de etanol, existindo um nível de oxigenação ideal que levaria ao alto rendimento e produtividade em etanol, com baixo rendimento em biomassa. A oxigenação em leveduras fermentadoras de xilose é necessária para a produção máxima de etanol, e mesmo assim ainda atinge níveis muito baixo, comparado com a produção de *S. cerevisiae* a partir de glicose



**Figura 10:** Valores de Brix, pH e teor alcoólico para fermentação realizada com *D. bruxellensis* e *P. stipitis*, em volume de 100mL (figuras A e B) e 200 mL (figuras C e D) de meio de fermentação sintético contendo 40 g/L de xilose e 10 g/L de glicose como única fonte de carbono, em erlenmeyer de 250mL (100 mL de meio) e de 500 mL (200 mL de meio), pH 5,0, 10g/L de inóculo, 150 rpm e 30°C.

## 5.2. Obtenção do hidrolisado do bagaço de cana-de-açúcar

Na etapa de produção do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, com partículas de 0,59 a 0,84 mm, foram testados inicialmente dois tempos (60 e 120 minutos) e duas concentrações de ácido (1 e 2%) para o pré-tratamento. Em seguida o material tratado sofreu hidrólise ácida, onde foram testadas duas concentrações de ácido sulfúrico (5 e 10%) por 150 minutos.

De acordo com os dados de pré-tratamento ácido por um período de 60 minutos, as amostras do pré-hidrolisado com 1 e 2% de ácido sulfúrico apresentaram valores próximos de açúcares redutores (AR) (Tabela 5), considerando apenas xilose, glicose e arabinose, predominando a xilose nos tratamentos de 1 e 2% de ácido (Figura 11).

**Tabela 5:** Teor de açúcares redutores (AR) obtidos na determinação do melhor tempo e concentração ácida para o pré-tratamento à 120°C e 1 atm do bagaço de cana-de-açúcar.

| Bagaço de cana-de-açúcar (g) | Tempo (minutos) | H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (% v/v) | AR (g/L) (arabinose, glicose e xilose) |
|------------------------------|-----------------|--|--|
| 1,5                          | 60              | 0                                      | 1,32                                   |
|                              |                 | 1                                      | 17,73                                  |
|                              |                 | 2                                      | 22,00                                  |
|                              | 120             | 0                                      | 1,50                                   |
|                              |                 | 1                                      | 23,68                                  |
|                              |                 | 2                                      | 16,85                                  |

Em 120 minutos, os valores de açúcares também permaneceram semelhantes ao do tratamento anterior. Segundo Aguilar et al. (2002), arabinose e xilose são provenientes da hemicelulose. Como a xilose está presente em maiores concentrações, torna-se o produto de maior liberação no bagaço de cana quando comparado com arabinose. A glicose pode ser liberada da fração celulósica e hemicelulósica. No entanto condições mais brandas de hidrólise, com ácido diluído, não são suficientes para quebrar a fração celulósica, ao contrário da porção hemicelulósica. Estudo realizado por Rodrigues et al. (2010) em hidrolisado de bagaço de cana com ácido diluído, a concentração de glicose permaneceu em torno de 1 g/L,

situação semelhante à condição estudada, conforme mostra Apêndice A. Em contra partida Rocha et al. (2011), em pré-tratamento utilizando 1% de ácido sulfúrico e 1% de ácido acético em reator rotativo obtiveram concentrações maiores de glicose, em torno de 3 g/L. Nas duas situações xilose apresentou maiores níveis de liberação, quando comparada com outros açúcares presentes, 19 g/L (RODRIGUES et al., 2010) e 9g/L (ROCHA et al., 2011), no entanto o processo com ácido diluído mostrou-se mais eficiente para liberação de xilose.

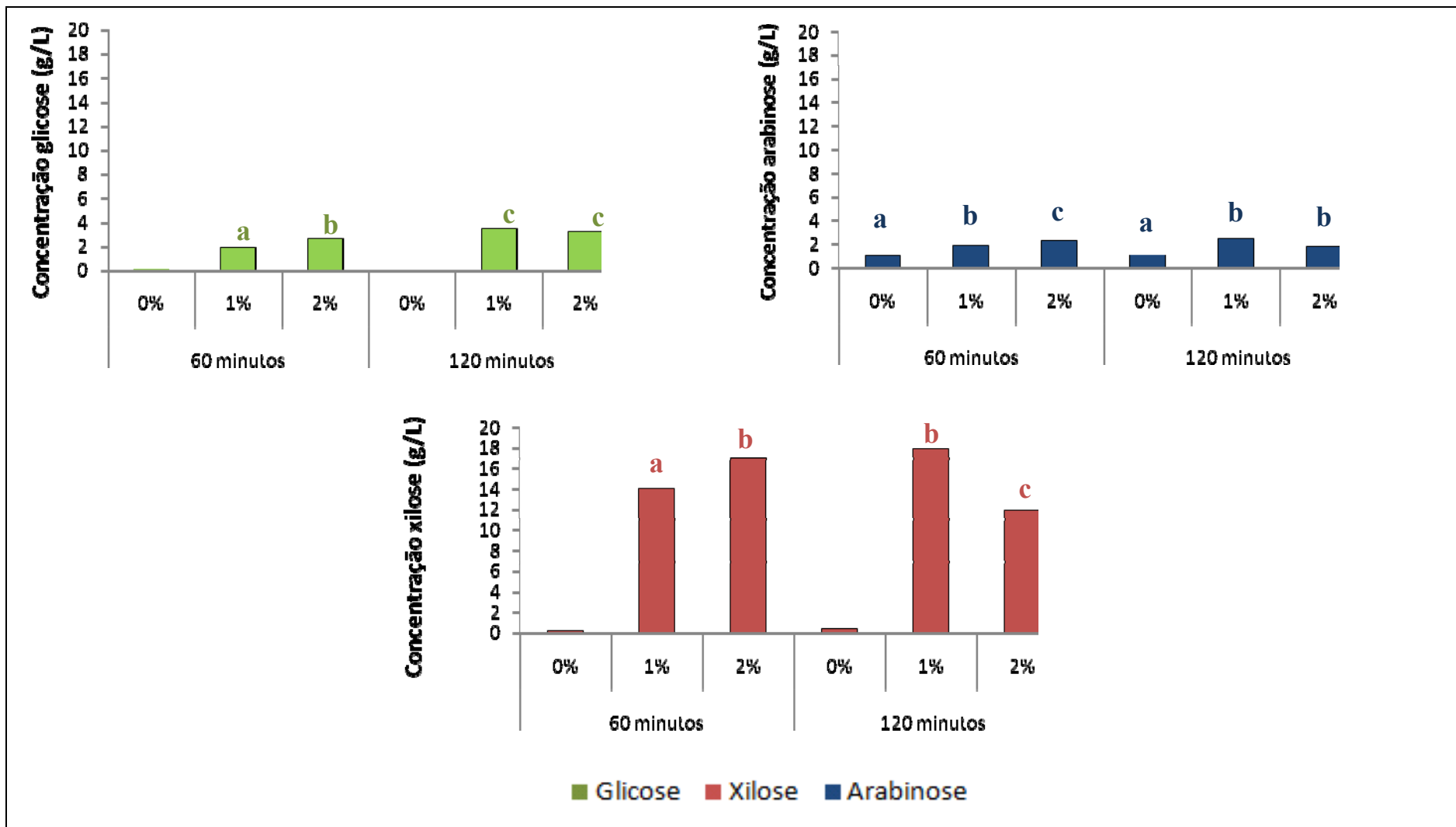
Análise de variância e comparação das médias pelo Teste Tukey a 5% de significância, comprovaram maiores liberações de xilose na hidrólise com ácido a 1 ou 2%, a 120 minutos e 60 minutos (Figura 11), respectivamente, estatisticamente diferente das demais concentrações. Avaliando-se o tempo de hidrólise e a concentração de ácido sulfúrico separadamente, verificou-se que com 1% de ácido sulfúrico a 60 ou 120 minutos houve a maior liberação de xilose. Assim, independentemente do tempo, a concentração de 1% de ácido sulfúrico apresentou melhor rendimento em xilose. Por outro lado, o rendimento de xilose em 120 minutos a 2% diminuiu devido à exposição prolongada a altas temperaturas e acidez da pentose, o que contribuiu para a formação de ácidos orgânicos e furfural (KIIPPER, 2009).

As concentrações de glicose e arabinose foram menores que as de xilose quando utilizado a concentração de 1 e 2% de ácido sulfúrico. Quantificou-se níveis maiores de glicose no pré-tratamento ácido com 1 e 2% de ácido em 120 minutos, respectivamente, conforme Figura 8. Nestas concentrações, houve diferença significativa (Tukey  $p < 0,05$ ) com relação aos outros tratamentos, no entanto avaliando as concentrações de ácido em 120 minutos, não existiu diferença significativa (Tukey  $p < 0,05$ ) entre as mesmas. Soluções de ácido sulfúrico diluído (1 a 3%) não são capazes de hidrolisar as fibras celulósicas devido ao fato de exigirem pressões e temperaturas elevadas, o que torna este tipo de hidrólise pouco competitiva na indústria (VAZ ROSSELL et al., 2005; KIM et al., 2010).

As maiores liberações de arabinose foram obtidas no pré-tratamento com 1% de ácido a 120 minutos e 2% de ácido a 60 minutos (Figura 11), respectivamente, mas sem diferenças significativas entre esses tratamentos. Na avaliação do tempo de hidrólise e a concentração de ácido sulfúrico separadamente, verificou-se que com 60 ou 120 minutos o ácido não influenciou na liberação de arabinose.







**Figura 11:** Liberação de açúcares durante pré-tratamento de bagaço-de-cana com ácido sulfúrico diluído (0, 1 e 2 %v/v). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a um nível pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a Figura 12, a quantidade de ácido acético liberada, comparada com a literatura, foi baixa para as duas concentrações de ácido sulfúrico testadas e nos tempos de 60 e 120 minutos, em média 0,55 g/L e 0,10 g/L, respectivamente, sendo maiores com 1 e 2% de ácido sulfúrico em 60 minutos, sem diferença significativa.

Ácido acético é gerado a partir dos grupos acetil presentes na estrutura hemicelulósica, sendo reportadas concentrações de até 17 g/L em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, dependendo das condições de hidrólise ácida (PARAJÓ et al., 1998). Em condições mais brandas, ou seja com ácido diluído, o teor de ácido acético foi maior em 60 minutos, inferior à concentração reportada anteriormente. De acordo com a literatura, devido o menor grau de cristalinidade da hemicelulose, essa condição liberou grupos acetil, favorecendo a produção de ácido acético (DU PREEZ, 1994).

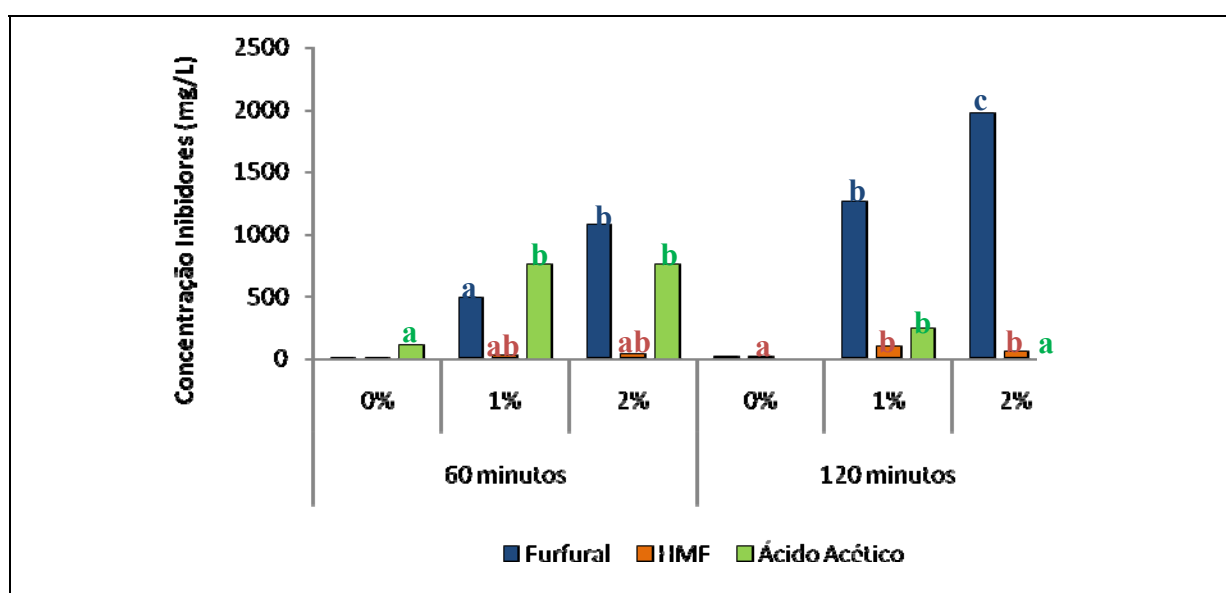
Segundo Rodriguez-Chong et al. (2004) concentrações acima de 4 g/L podem inibir o crescimento de micro-organismos devido à sua difusão via membrana celular que leva a diminuição do pH intracelular. De acordo com Tosetto (2008), a presença de ácido acético no meio de fermentação pode ainda provocar redução nos parâmetros de rendimento em biomassa, produtividade e consumo de ART (açúcares redutores totais). Portanto, tratamentos de detoxificação têm sido empregados para remoção deste composto em hidrolisados hemicelulósicos (FONSECA, 2009).

Analisando a Figura 12, que insere a composição dos compostos fenólicos verifica-se que em 60 minutos ocorreu grande produção de furfural nas duas concentrações de ácido estudadas, comparado com a literatura (ROCHA et al., 2011). Em 120 minutos, seu valor foi praticamente dobrado, devido o maior tempo de exposição de pentoses e hexoses a altas temperaturas que, quando degradadas, produzem furfural e HMF, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989; MARTÍN et al., 2007). A concentração de 1% de ácido sulfúrico proporcionou menores liberações de furfural, apresentando diferença significativa (Tukey  $p < 0,05$ ) com relação às outras concentrações, quando comparada com 60 e 120 minutos. No entanto, não foram notadas diferenças significativas (Tukey  $p < 0,05$ ) entre os tempos de 60 e 120 minutos na concentração de 1%.

Testes realizados por Uppal et al. (2008), visando a produção de furfural a partir do bagaço de diferentes variedades de cana-de-açúcar indicaram que a concentração de 2% de ácido sulfúrico a partir de 90 minutos produziu maior quantidade de furfural, provavelmente por se tratar de um ácido forte, completamente ionizado. No entanto, concentrações de até 0,5 g/L não proporcionam impacto no consumo de glicose e produção de etanol (WIKANDARI

et al., 2010). No presente trabalho, concentração de 0,5 g/L de furfural foi obtida no pré-tratamento com 1% de ácido sulfúrico por 60 minutos.

Quanto ao HMF, menores liberações foram quantificadas em 60 minutos de exposição, sendo as maiores concentrações obtidas em 120 minutos com 1 e 2% de ácido sulfúrico, significativamente diferente dos demais tratamentos, mas sem diferença significativa entre as mesmas. Neste caso, trata-se de uma substância gerada da degradação de hexoses, a qual diminuí a formação de ATP e produção de etanol, sendo capaz de prolongar a fase lag do crescimento das leveduras (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). De acordo com Tossetto (2008), em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o aumento da concentração de HMF proporciona redução do rendimento em produto e no consumo de ART, podendo chegar a zero em concentrações acima de 500 mg/L. A toxicidade do HMF é considerada equivalente à do furfural, entretanto sua concentração em hidrolisado hemicelulósico é menor devido principalmente à sua menor concentração de hemiceluloses (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).



**Figura 12:** Liberação de furfural, HMF e ácido acético no pré-tratamento de bagaço-de-cana com ácido sulfúrico diluído (0, 1 e 2 %v/v). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa a um nível pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

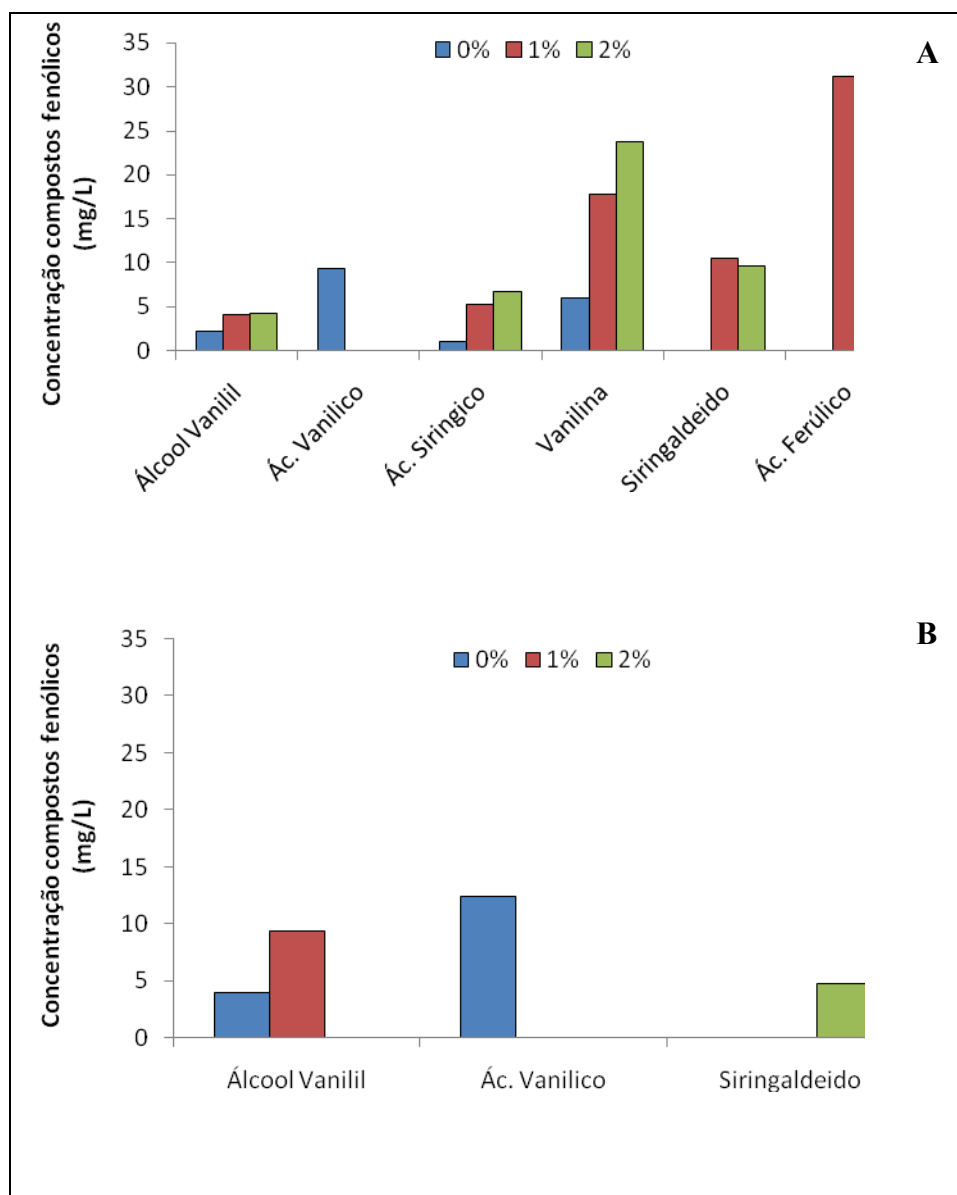
Compostos fenólicos como álcool vanilil, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído e ácido ferúlico também foram analisadas no pré-tratamento com 60 minutos e na etapa posterior de hidrólise com 150 minutos. Para o pré-tratamento com 120 minutos,

apenas os compostos álcool vanilil, ácido vanílico e siringaldeído foram analisados (Figura 10).

Os compostos álcool vanilil e ácido siríngico apresentaram as menores concentrações em todos os tratamentos com ácido sulfúrico, não ultrapassando 10 mg/L, porém aumentaram com a adição de ácido. Por outro lado o ácido vanílico foi encontrado somente sem adição de ácido sulfúrico. Ácido ferúlico, vanilina e siringaldeído apresentaram-se nas maiores concentrações respectivamente, sendo o siringaldeído o composto que apresentou maiores índices de liberação com 1% de ácido sulfúrico, aproximadamente 30 mg/L (Figura 13). Ainda assim, o valor encontrado manteve-se muito inferior às concentrações de furfural, testadas nas mesmas condições.

A presença de ácido ferúlico confere à parede de gramíneas, especial resistência aos raios UV e ao ataque das enzimas hidrolíticas de patógenos. Encontram-se interligadas com a hemicelulose (BUCKERIDGE et al., 2010).

Em resumo, os testes de variância demonstraram que concentrações de 1 e 2% de ácido sulfúrico no pré-tratamento não apresentaram diferenças significativas para xilose e arabinose, houve dependência apenas do tempo. Para glicose, essa diferença também não existiu, exceto em 120 minutos. Na liberação do furfural não houve diferença significativa na concentração de 1% de ácido em 60 e 120 minutos, ao contrário de HMF, onde o tempo de 60 minutos diferiu significativamente (Figura 12) de 120 minutos, e este último com diferença entre as concentrações de 1 e 2% ácido. Para o ácido acético houve maior liberação na concentração de 1% de ácido, mas sem diferenças entre os tempos. Kiipper (2009) obteve melhor resultado com 60 minutos de reação a 120°C utilizando o solvente Organosolv. No entanto, não encontrou diferença estatística nas concentrações de açúcares. Os resultados comprovaram que 60 minutos, 120°C de temperatura e 1% de ácido sulfúrico compõem a condição mais adequada de pré-tratamento, devido a liberação de açúcares, diminuição da degradação de fontes de carbono e menor formação de compostos inibidores da fermentação. Portanto, a partir desses resultados, escolheu-se a concentração de 1% de ácido sulfúrico a ser empregada no processo de pré-tratamento, utilizando-se menor volume de ácido com melhores resultados.



**Figura 13:** Perfis dos compostos fenólicos no pré-tratamento com 60 minutos (A), e 120 minutos (B) com tratamento 0, 1 e 2% v/v de ácido sulfúrico. Os parâmetros Ácido Siringico, Vanilina e Ácido Ferúlico não foram analisados em 120 minutos.

Na hidrólise ácida verificaram-se níveis menores de açúcares, predominando somente a glicose com a utilização de 10% de ácido sulfúrico (Figura 14). Em hidrólise com 5% de ácido sulfúrico, Kipper (2009) encontrou uma concentração de 3,07 g/L de açúcares totais, e com 10%, 9,75 g/L de açúcares totais, valores estes superiores aos apresentados na Figura 14. No entanto, hidrolisados com altas concentrações de ácido apresentam dificuldades de neutralização para etapa posterior de fermentação, além de dificuldades de manipulação em processos industriais causadas pela corrosão de equipamentos (FOAUD et al., 2005).

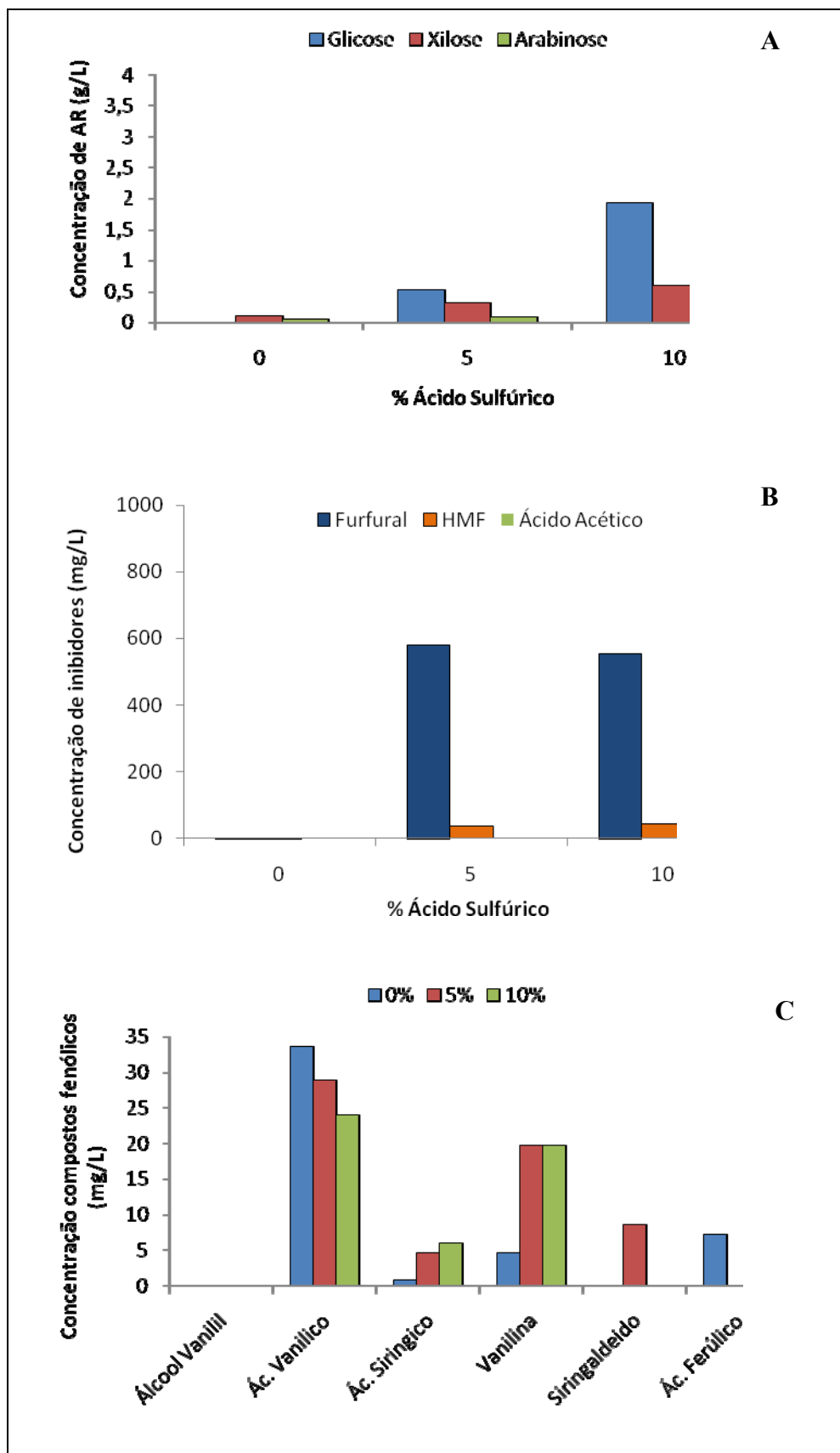
Níveis semelhantes de furfural (600 mg/L) foram encontrados nos tratamentos com 5 e 10% de ácido. Como a maior porção de xilose foi liberada na etapa de pré-tratamento, sua

concentração tende a ser menor nesta etapa, justificando menores índices de furfural, uma vez que o mesmo é resultado da degradação desta pentose.

Nesta etapa, o ácido vanílico prevaleceu na liberação de compostos voláteis, seguido da vanilina. álcool vanilil, ácido siríngico, siríngaldeído e ácido ferúlico não ultrapassaram 10 mg/L, conforme mostra a Figura 14. De acordo com Pacheco e Damasio (2010), o ácido vanílico é um composto intermediário formado antes da produção de vanilina a partir do ácido ferúlico. Dausch e Pastore (2005), reportaram que concentrações acima de 1 g/L de ácido vanílico são capazes de inibir o crescimento de micro-organismos.

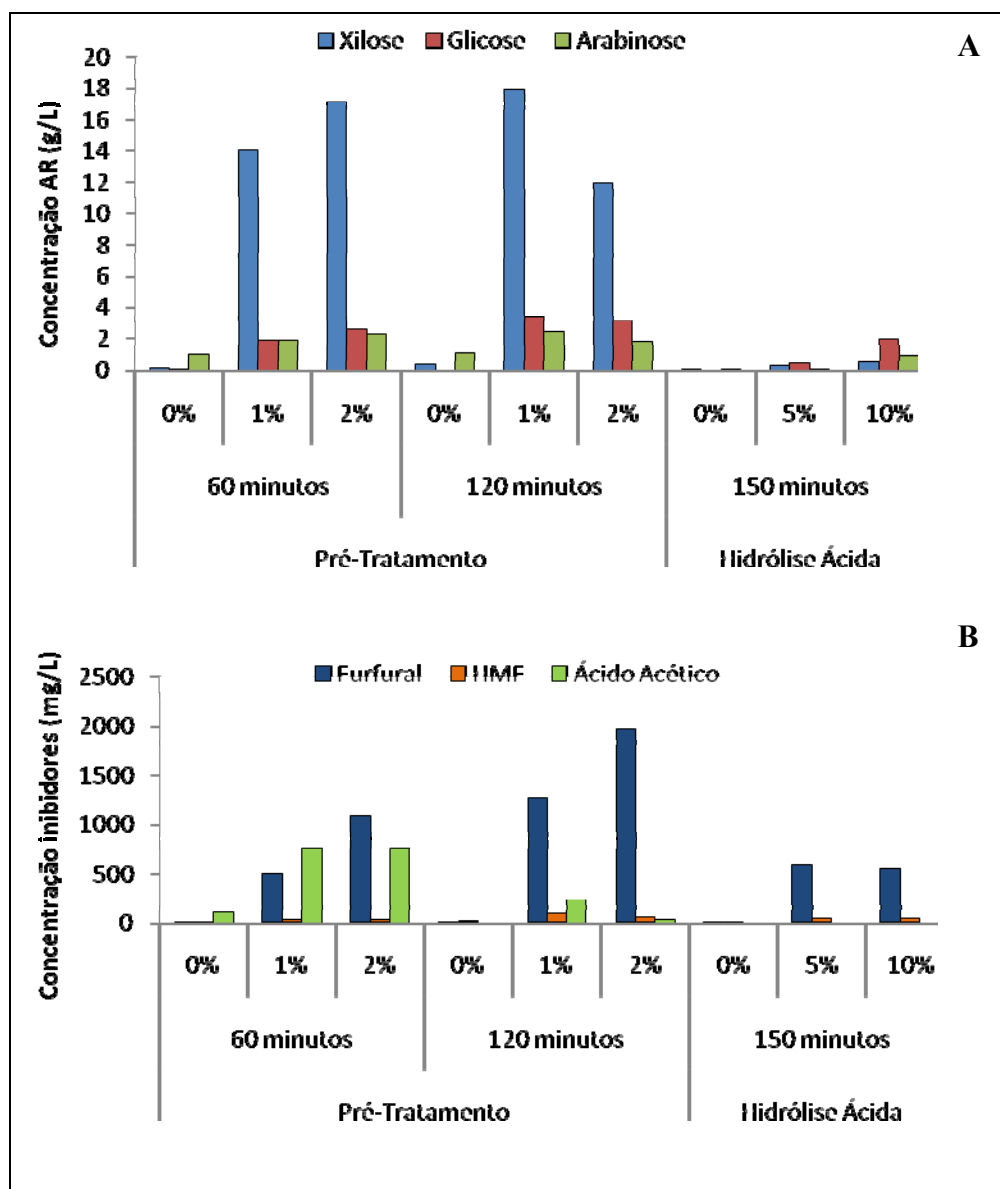
Considerando a finalidade de se obter maiores liberações de açúcares (xilose, glicose e arabinose), com menores níveis de inibidores (furfural, HMF e ácido acético), os resultados da hidrólise ácida, não foram analisados estatisticamente devido à baixa concentração de açúcares disponíveis, comparadas a alta produção de furfural e HMF.

Portanto, com base nos resultados apresentados na Figura 15, pode-se afirmar que a escolha dos parâmetros de tempo e concentração ácida no pré-tratamentos do bagaço da cana, demonstraram que em 1% de ácido sulfúrico, a 60 minutos, a 121°C, foi a condição mais eficiente, devido ao fato de que nesta etapa o rendimento da xilose foi maior comparado com a produção de furfural. Por conta disso, optou-se por realizar os ensaios fermentativos com o pré-hidrolisado, visto que as condições de hidrólise ácida não apresentaram liberações significativas de açúcares redutores.



**Figura 14:** Perfis de açúcares redutores (A), furfural e HMF (B) e compostos fenólicos (C) com tratamento 0, 5 e 10% v/v de ácido sulfúrico, por 150 minutos, 120°C e 1 atm.





**Figura 15:** Resultados do pré-tratamento e hidrólise ácida, de acordo com a liberação de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e inibidores (furfural, HMF e ácido acético).

### 5.3. Nitrogênio Total (NT) em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

Os teores de Nitrogênio Total (NT) encontrados em amostras de pré-hidrolisado (com 1% de ácido sulfúrico e 60 minutos de hidrólise) de bagaço de cana foram próximos aos valores encontrados para o meio de cultura YEPD (Tabela 6), sugerindo que o cultivo de leveduras não será limitado por este nutriente e não será necessário adicioná-lo.

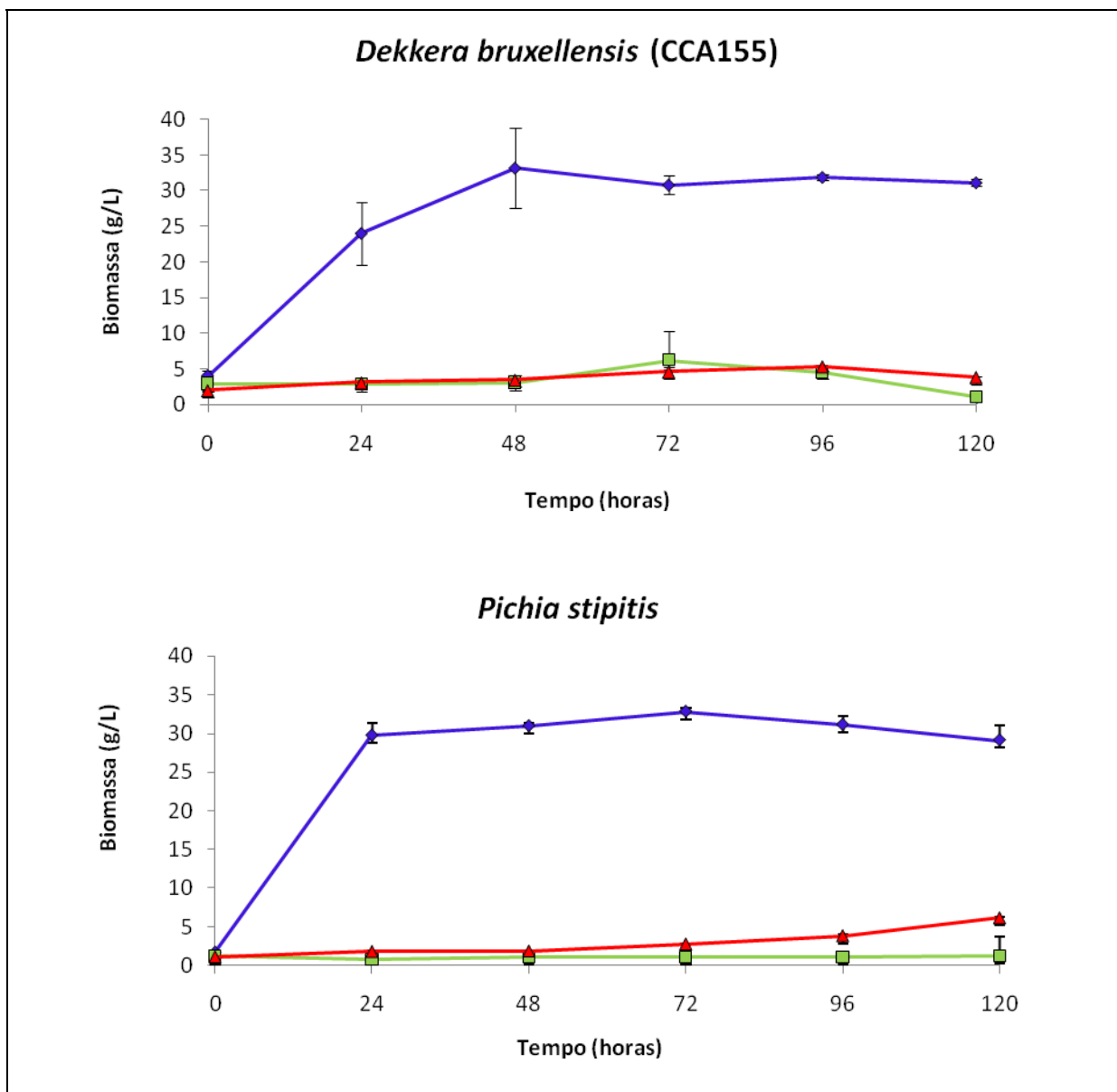
**Tabela 6:** Valores de Nitrogênio Total em meio de cultura YEPD líquido, pré-hidrolisado com 1% de ácido sulfúrico e solução contendo 1% de extrato de levedura.

| <b>Amostra</b>  | <b>g/L NT</b> |
|---|---------------|
| <b>YEPD</b>   | 0,540         |
| <b>Pré-Hidrolisado 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b> | 0,630         |
| <b>Extrato de levedura 1%</b>                         | 0,035         |

Entre os nutrientes mais importantes em um processo fermentativo, a concentração de nitrogênio pode afetar o rendimento e a eficiência do cultivo microbiano (LIMA, 2001). Fernandes et al. (1993) relataram valores de 35,2% de C total, e de 0,19 a 0,21% de N total por % de massa seca de bagaço de cana. Estudos realizados por Barbieri e Barcelos (2009), para transformação de bagaço de cana-de-açúcar em fertilizante orgânico, encontrou teores de Carbono e Nitrogênio Total (NT) de 37,81% e 1,07% respectivamente.

#### **5.4. Tolerância de *D. bruxellensis* aos inibidores liberados no processo de pré-tratamento ácido**

O teste realizado teve a finalidade de registrar o desempenho quanto ao crescimento de *D. bruxellensis* frente aos inibidores produzidos na etapa de pré-tratamento ácido. Os perfis de biomassa de *D. bruxellensis* e *P. stipitis* são apresentados na Figura 16 em cultivo com YEPD, 50 e 100% de pré-hidrolisado. Desta forma, foi escolhido o pré-hidrolisado com tratamento de 1% de ácido sulfúrico devido às concentrações de xilose, furfural e HMF encontradas no meio, sendo testadas duas concentrações do pré-hidrolisado (100 e 50%) e o meio YEPD líquido como controle. As amostras foram destiladas ao final do teste em 120 horas para avaliação do teor alcoólico (Figura 17).

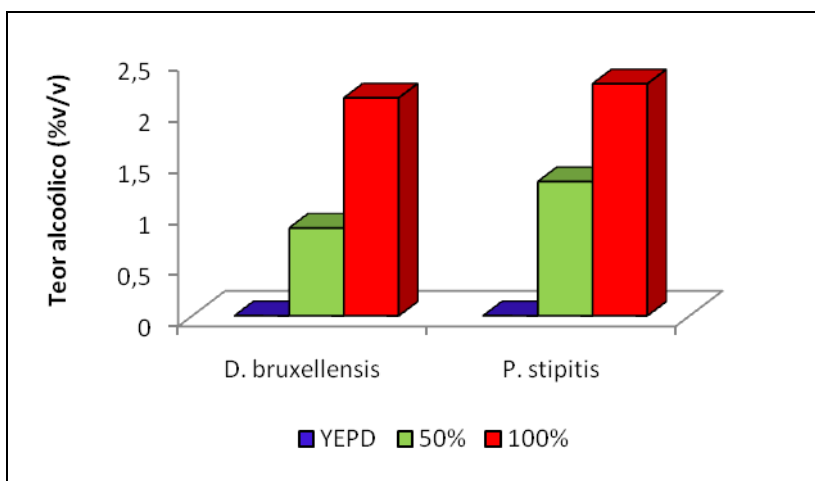


**Figura 16:** Crescimento das leveduras *D. bruxellensis* e *P. stipitis* em meio de cultura YEPD ◆, pré-hidrolisado diluído (50%) ■ e concentrado (100%) ▲, 150 rpm a 30°C.

O resultado revelou que o crescimento da levedura *D. bruxellensis* foi semelhante em pré-hidrolisado diluído e concentrado, constante até 120 horas. Ao contrário, a levedura *P. stipitis* apresentou resultados levemente superiores em pré-hidrolisado concentrado, e aumento de biomassa a partir de 72 horas. Houve produção de etanol nas duas concentrações de pré-hidrolisado (50% e 100%), sendo maior em pré-hidrolisado concentrado, com níveis semelhantes para *D. bruxellensis* e *P. stipitis* (Figura 17).

Em seu trabalho, Blomqvist (2011) testou a capacidade de crescimento e produção de etanol por *D. bruxellensis* a partir de glicose oriunda de material lignocelulósico pré-hidrolisado com enzimas. Os autores indicaram que com o aumento gradual na concentração

do pré-hidrolisado, *D. bruxellensis* foi capaz de crescer e produzir etanol, indicando uma capacidade de adaptação aos compostos inibidores do pré-hidrolisado. Além disso, em testes fermentativos foram obtidos rendimentos semelhantes ou maiores do que cepas industriais de *S. cerevisiae*, indicando o potencial de aplicação desta levedura na produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos.



**Figura 17:** Produção de etanol de *D. bruxellensis* e *P. stipitis* em YEPD líquido, 50 e 100% de pré-hidrolisado, a 30°C, 160 rpm por 120 horas.

### 5.5. Cinética de crescimento por *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 7 apresenta os parâmetros cinéticos de crescimento de *D. bruxellensis* e *P. stipitis* em meio YEPD e pré-hidrolisado (50 e 100%),  $\mu_{\text{máx}}$  (crescimento máximo) e tg (tempo de geração), calculados a partir dos dados apresentados no Apêndice B e C.

**Tabela 7:** Velocidade específica de crescimento e tempo de geração de *D. bruxellensis* e *P. stipitis* em meio YEPD, pré-hidrolisado de bagaço de cana diluído (50%) e concentrado (100%).

|  |      | $\mu_{\text{máx}}(\text{h}^{-1})$ | tg (h) |
|--|------|-----------------------------------|--------|
| <i>Dekkera bruxellensis</i>  | YEPD | 0,044                             | 15,8   |
|  | 50%  | 0,007                             | 99     |
|  | 100% | 0,009                             | 77     |
| <i>Pichia stipitis</i>   | YEPD | 0,017                             | 40,8   |
|  | 50%  | 0,001                             | 693    |
|  | 100% | 0,013                             | 53,3   |
| <i>(<math>\mu_{\text{máx}}</math>) velocidades específicas de crescimento máximas e tg tempo de geração.</i> |      |                                   |        |

Analisando-se a Tabela 7, verificam-se comparativamente velocidades de crescimento inferiores no pré-hidrolisado em relação ao meio YEPD, o que pode ser explicado pela composição diversa dos meios. Entretanto, os parâmetros cinéticos indicam crescimento similar entre as leveduras com 50 e 100% de pré-hidrolisados, e apesar da baixa viabilidade, sugere a utilização deste meio para crescimento destas leveduras.

### 5.6. Ensaios exploratórios em pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar

Os ensaios a seguir tiveram a finalidade de descobrir qual a condição ideal em termos de crescimento e consumo de açúcares, frente aos inibidores presentes no pré-hidrolisado. Inicialmente foram testadas duas adaptações: em meio sintético (YNB, xilose e glicose), e em pré-hidrolisado. Posteriormente foi testada a diminuição na concentração do inóculo, de 10 g/L para 5 g/L de massa úmida sem adaptação do mesmo. Além disso, a análise em CLAE ocorreu somente para o ensaio realizado com adaptação em meio sintético, portanto somente nesta situação foram analisados os parâmetros dos açúcares arabinose, celobiose, glicose e xilose, etanol e ácido acético (não houve possibilidade de utilização do equipamento para os experimentos seguintes).

### 5.6.1. Inóculo de *D. bruxellensis* adaptado em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose

As Figuras 18 e 19, apresentam os perfis de biomassa, sólidos solúveis, pH, glicose, arabinose, celobiose, xilose, ácido acético e etanol para cultivos de 100 e 50% de pré-hidrolisado, com adaptação do inóculo de *D. bruxellensis* em meio YNB com 2% de xilose e 1% de glicose. Verificam-se um crescimento maior com 100% de pré-hidrolisado, porém mais lento, conforme já havia sido evidenciado em resultados anteriores (Figura 16). Além disso, com a adaptação, a concentração final de biomassa foi superior ao valor encontrado nos trabalhos anteriores, com 10 g/L em 5 dias. Barata et al. (2008) constatou que uma característica conhecida de *Brettanomyces bruxellensis*, gênero amorfo de *D. bruxellensis*, é seu crescimento lento em meios ricos em açúcar, e que utiliza glicose com menos eficiência e cresce mais lentamente comparada com *S. cerevisiae*. Pode ainda facilmente sobreviver a altas concentrações de etanol e pequenas quantidades de nitrogênio e açúcares, condição encontrada ao final de processos fermentativos. Entretanto visando o controle de contaminação industrial Guerra (1998) verificou ausência de crescimento de *D. bruxellensis* em meios contendo a partir de 7% de etanol.

Blomqvist et al. (2011) reportaram que apesar de *D. bruxellensis* ser sensível ao hidrolisado de serragem, é capaz de adaptar-se aos inibidores presentes no meio, e que em meios contendo maltose e celobiose apresentaram longa fase de adaptação e baixos níveis de etanol.

Em 50% de pré-hidrolisado o crescimento atingiu níveis máximos em 48 horas (8,7 g/L), sem alterações expressivas no consumo de açúcares analisados, exceto para glicose que em 36 e 120 horas apresentaram níveis superiores ao tempo inicial, ocasionado provavelmente por algum problema na amostragem. Por outro lado as concentrações de etanol e ácido acético apresentaram um perfil diferente de 100% de pré-hidrolisado. Para etanol verificou-se que a produção não ultrapassou a concentração inicial presente, sugerindo como em 100%, um consumo do mesmo. Em contra partida níveis máximos de ácido acético foram semelhantes em 50 e 100% (0,9 e 1,0), porém com variação maior em 50% de pré-hidrolisado. De acordo com Freer et al. (2003), a espécie *D. bruxellensis* produz quantidade significativa de ácido acético, a partir de glicose, em cultura agitada, porém isso exige um tempo maior. Em seu trabalho comprovou que a temperatura também pode influenciar a formação do ácido acético, que é maior a 30°C, com o etanol ou a glicose como fonte de carbono. Segundo Blomqvist et

al. (2011) *D. bruxellensis* foi capaz de utilizar etanol como fonte de carbono para produção de ácido acético. Os autores encontraram ainda maiores níveis de ácido acético quando a cepa foi cultivada em maltose, celobiose e glicose em cultura submetida a agitação.

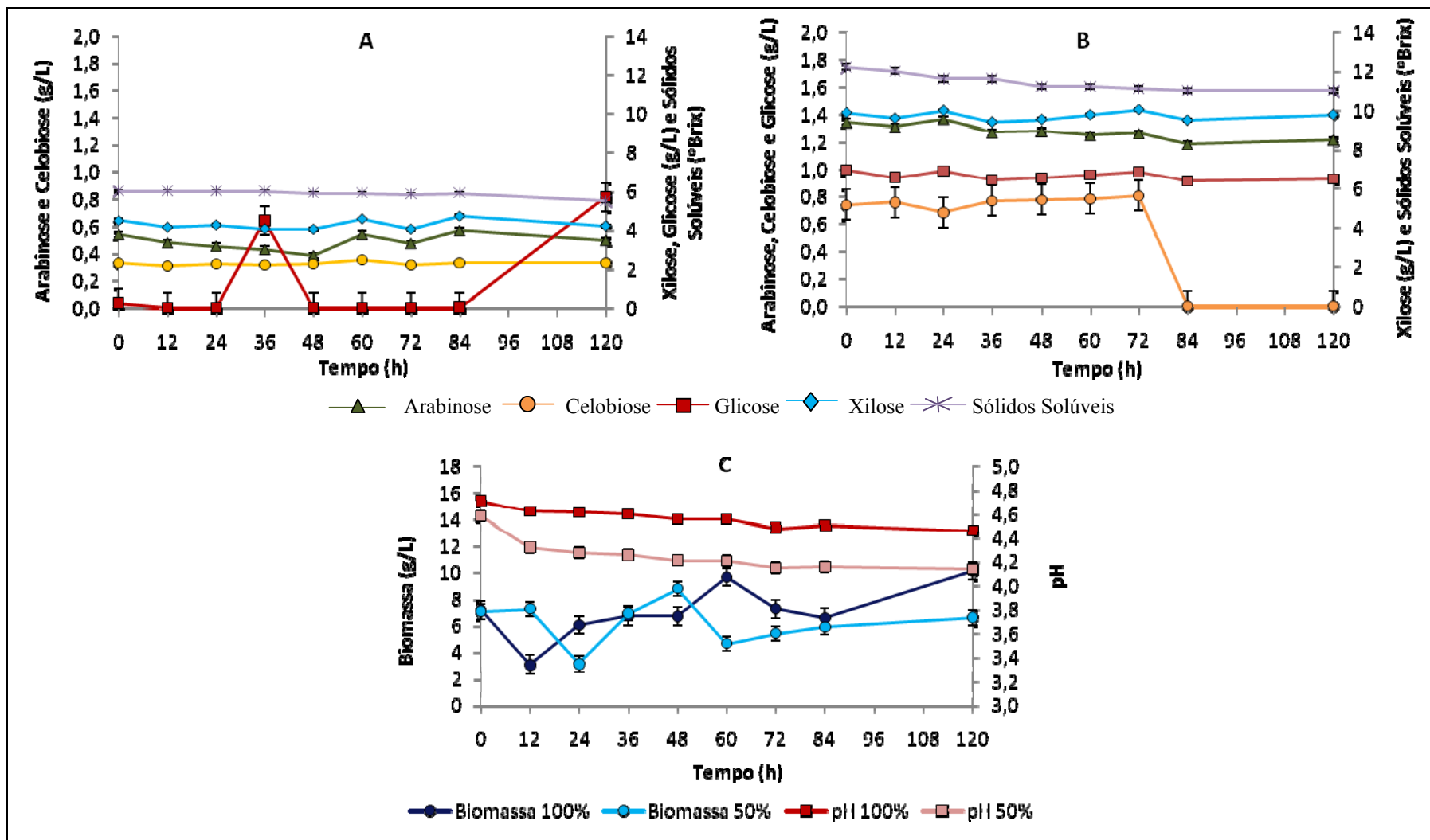
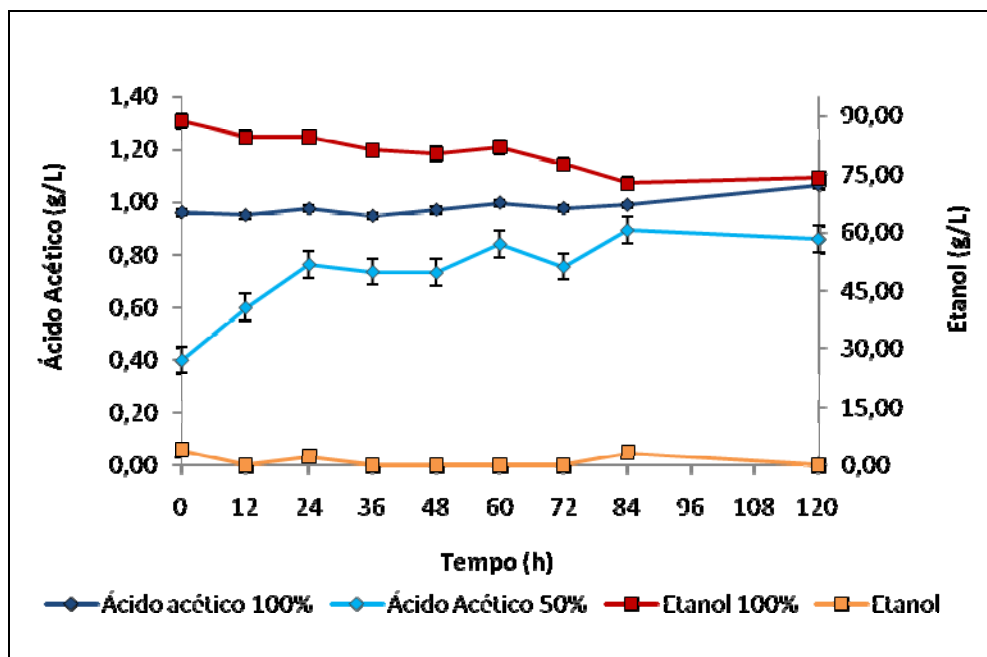


Figura 18: Perfis fermentativos de *D. bruxellensis* para arabinose, celobiose, glicose e xilose, em pré-hidrolisado diluído 50% (A), concentrado 100% (B), biomassa e pH (C) com inóculo na concentração de 10 g/L de massa úmida e adaptado previamente em meio sintético contendo YNB, xilose e glicose.





**Figura 19:** Perfis de ácido acético e etanol em fermentação por *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%) com inóculo na concentração de 10 g/L e adaptado previamente em meio sintético contendo xilose e glicose.

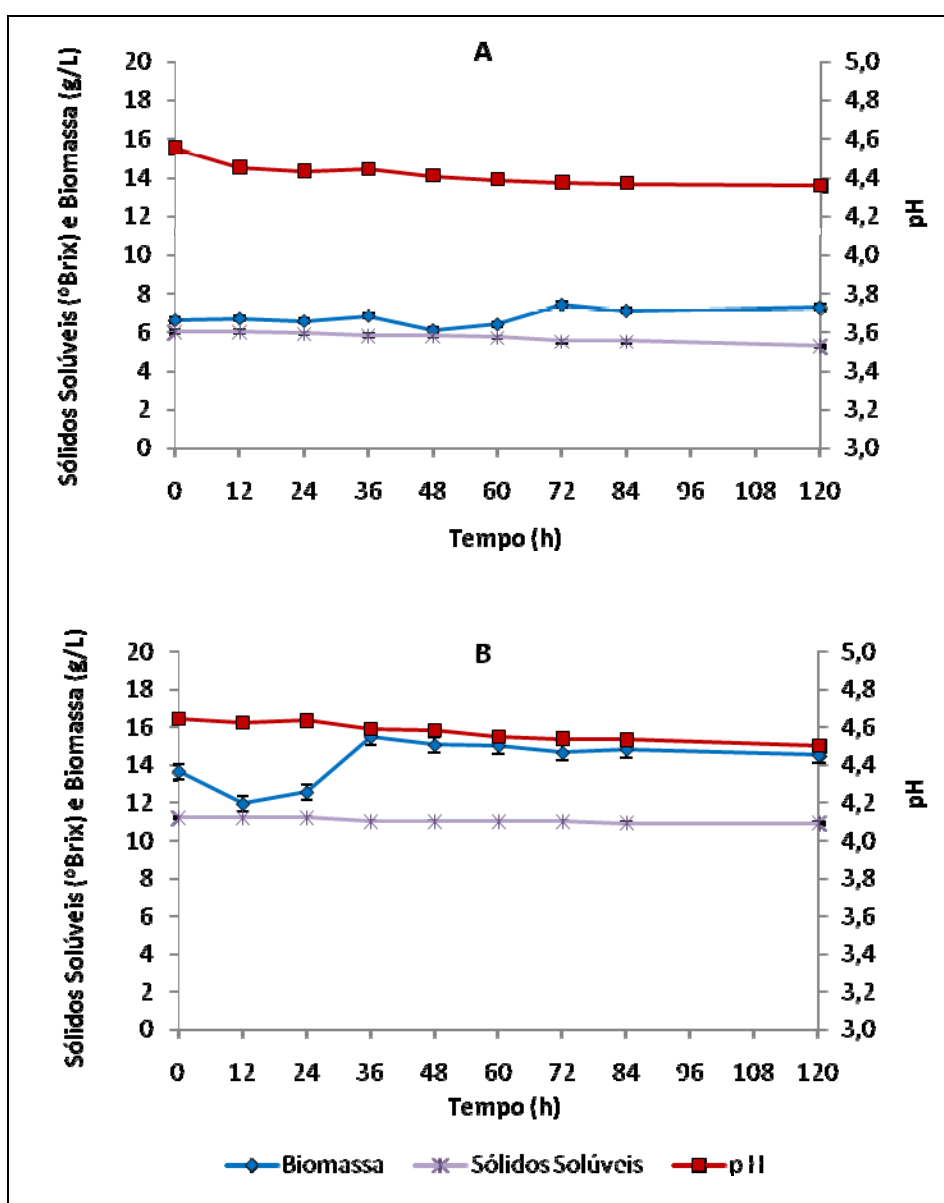
### 5.6.2. Inóculo de *D. bruxellensis* adaptado em pré-hidrolisado diluído (50%) e concentrado (100%)

Quando se analisa os resultados da fermentação de *D. bruxellensis* apresentados na Figura 20, verifica-se maior formação de biomassa em pré-hidrolisado de 100% nas primeiras 36 horas. Por outro lado, em 50% de pré-hidrolisado ocorreu um leve aumento de biomassa somente em 72 horas, porém em ambos meios de cultivo o aumento de biomassa foi desprezível. Em 100% de pré-hidrolisado apesar de encontrar concentrações em torno de 16 g/L, superiores aos encontrados no ensaio anterior (Figura 18 C), o inóculo de partida continha em torno de 14 g/L, revelando crescimento semelhante nas duas condições de adaptação.

Em estudo de aclimatação com *Pichia stipitis*, após o processo adaptativo a linhagem testada metabolizou eficientemente a xilose na presença de inibidores, com aumento de biomassa (OLIVEIRA, 2010). Diferentemente, os resultados aqui apresentados, revelaram que a adaptação de *D. bruxellensis* mostrou-se eficiente somente em 100% de pré-hidrolisado, onde ocorreu diminuição da fase de adaptação de 60 para 36 horas, porém com baixa produção de biomassa. Os valores de pH não sofreram alterações consideráveis nos dois

meios de cultivo, no entanto foi possível notar valores inferiores em 50% de pré-hidrolisado (4,3), comparado com seu equivalente de 100% (4,5).

Sendo assim, a adaptação em pré-hidrolisado por 4 dias a 50% e 6 dias a 100% de concentração foi inadequada para *D. bruxellensis*, sugerindo uma propagação em meio de cultivo padrão com suplementação de açúcares específicos do hidrolisado e então utilizada para produção de etanol. Além disso, partindo dessas considerações, pode-se concluir que um sistema por ciclos usando pré-hidrolisado deva ser indesejável, sendo recomendados processos por batelada simples a partir deste meio de cultivo.



**Figura 20:** Ensaios fermentativos empregando *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado diluído **A** (50%) e concentrado **B** (100%), com inóculo na concentração de 10 g/L de massa úmida e adaptado previamente em pré-hidrolisado.

### 5.6.3. Inóculo sem adaptação de *D. bruxellensis*

Neste tipo de fermentação a concentração do inóculo foi de 5 g/L em relação ao inóculo adaptado que foi de 10 g/L de massa úmida. Essa diminuição teve o objetivo de melhorar o desempenho da levedura em fermentações com pré-hidrolisado hemicelulósico. De acordo com a literatura a alta densidade celular é utilizada nas destilarias, com processos fermentativos convencionais a partir de caldo de cana-de-açúcar e/ou melaço, para diminuir o tempo de fermentação e elevar a produtividade do processo. Portanto para que as fermentações tenham uma condução satisfatória, é necessário que se adicione aos mostos quantidade suficiente de microrganismos capazes de transformar rapidamente os açúcares em álcool e gás carbônico. (CHANG et al., 1994).

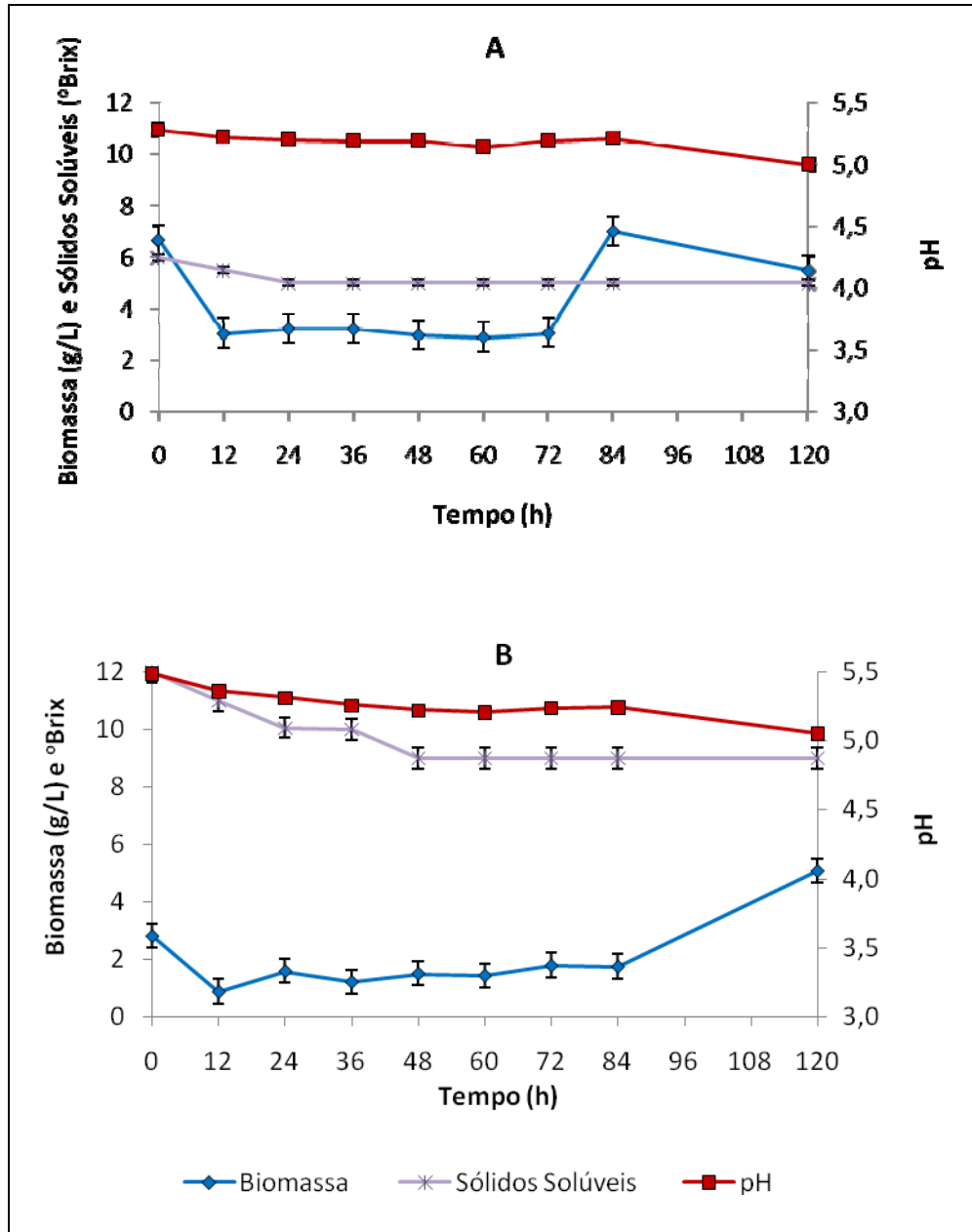
Segundo Wheals et al. (1999), algumas usinas brasileiras trabalham com densidade celular na faixa de 8% a 17% (v/v), ou ainda com 25% a 30% (v/v) do volume total da dorna (Basso, Basso e Rocha (2011).

Tratando-se de estudos com hidrolisados lignocelulósicos é possível observar diminuição na concentração de células. Segundo Agbogbo et al. (2007) em fermentações com *P. stipitis* em meio sintético a partir de xilose, a melhor condição encontrada foi de 6,5 g/L. Em hidrolisados de madeira Sreenath e Jeffries (2000), utilizaram em torno de 1,5 a 3,0 g/L com *P. stipitis* e *Candida shehatae*, concentração semelhante utilizada por Canilha et al. (2010) em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar também com *P. stipitis*.

Galafassi et al. (2010) utilizando a cepa *D. bruxellensis* em meios sintéticos, com concentrações semelhantes de glicose e xilose encontradas em hidrolisados de madeira, utilizou 0,05 g de massa seca. Em hidrolisado lignocelulósico South (2010), padronizou o inóculo a partir da Densidade Óptica ( $O.D_{600nm}$ ), ficando em torno de 0,9-1,0 que também representa uma concentração baixa de células.

De acordo com os resultados da Figura 21, em 50% de pré-hidrolisado foi possível quantificar aumento de biomassa a partir de 72 horas, enquanto que em 100% de pré-hidrolisado ocorreu a partir de 84 horas. No entanto neste meio de cultivo, a diminuição dos sólidos solúveis atingiu níveis mais baixos, quando comparados com os resultados das Figuras 15 e 17. Isso sugere que pode estar ocorrendo consumo de açúcares como glicose, xilose, arabinose ou celobiose e não de etanol, como observado anteriormente. Ao contrário, em 50% de pré-hidrolisado, apesar do aumento de biomassa a concentração de sólidos solúveis permaneceu sem variações.

Valores de pH não sofreram alterações em 50 e 100% de pré-hidrolisado apenas uma pequena acidificação em 120 horas para ambos.



**Figura 21:** Ensaio fermentativo empregando *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado diluído **A** (50%) e concentrado **B** (100%), com inóculo correspondendo a 5 g/L de massa úmida.

### 5.7. Evaporação do pré-hidrolisado em banho termostatizado

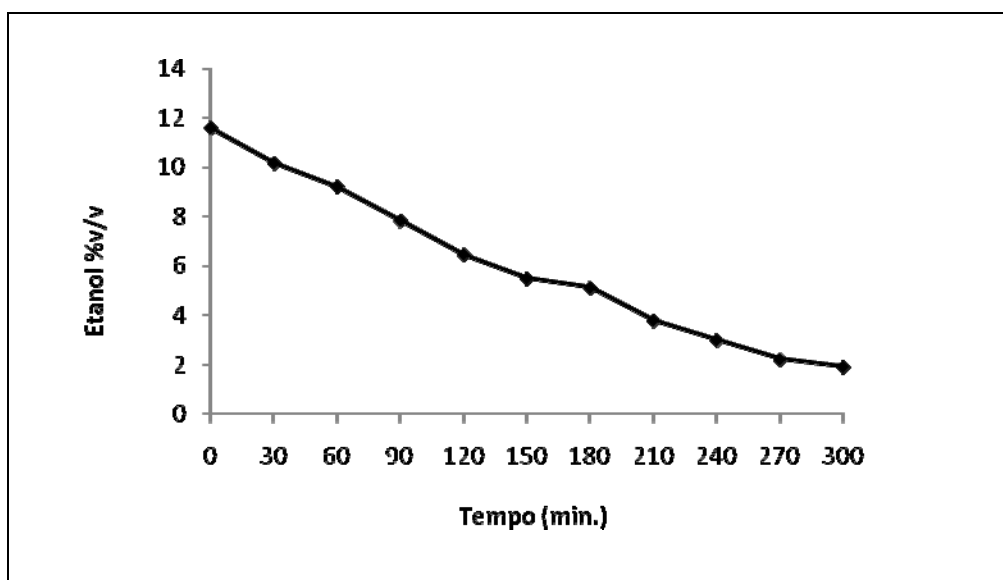
No pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar realizado com o solvente Organosolv, participa etanol. Nesta etapa foi necessário remove-lo uma vez que sua presença pode influenciar o crescimento das leveduras, correspondendo a uma inibição do tipo não

competitiva (PAN et al., 2005). Para remoção do etanol procedeu-se os ensaios de evaporação do pré-hidrolisado em banho termostatzado. A evaporação do etanol residual encontra-se na Figura 22.

Durante a fermentação, a levedura pode estar sujeita a vários fatores estressantes como alta concentração de etanol, temperaturas elevadas e acidez do meio (BASSI, 2011). Em contra partida, a levedura *Dekkera*, conhecida por contaminar vinhos, é capaz de sobreviver em condições de fermentação e também no vinho já engarrafado, este em situação de anaerobiose, com alto teor alcoólico e baixa concentração de açúcares (NARDI et al., 2010).

O pré-hidrolisado apresentou em torno de 12% v/v de etanol inicialmente (Figura 22) e, de acordo com Bassi (2010), concentração de etanol a partir de 10% v/v, poderia ser um fator limitante para o controle de *Dekkera bruxellensis* em destilarias.

Trabalho realizado por Codato (2009) com a linhagem *D. bruxellensis* (CCA155) em meio YEPD líquido mostrou uma resistência menor ao etanol. Verificou que a concentração mínima inibitória de etanol foi 4 e 6%, respectivamente para  $10^5$  ou  $10^6$  células/mL de inóculo inicial. Portanto, determinou-se a concentração aproximada de 2% v/v (Figura 22) para os testes fermentativos posteriores com a levedura.



**Figura 22:** Curva de evaporação do do etanol %v/v do pré-hidrolisado tratado em Organosolv em banho termostatzado.

### 5.8. Teste fermentativo com *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado evaporado

Os resultados apresentados na Tabela 8 e Figura 23 indicam a produção de biomassa da levedura, o consumo de xilose (g/L) e a produção de etanol (%v/v) nas diferentes condições de cultivo.

A concentração de biomassa manteve-se ao redor de 10 e 5 g L<sup>-1</sup> para 100 e 50% de pré-hidrolisado respectivamente, entre 24 e 72 horas, sendo superior na concentração de 100%. Infere-se este aumento pela maior disponibilidade de açúcares, levando a velocidades específicas de crescimento máximas para 100% de pré-hidrolisado em torno de 0,011 h<sup>-1</sup> (Tabela 8), com produtividade celular de aproximadamente 0,014 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> e 0,17 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o meio controle (YEPD).

Estes resultados podem ser explicados uma vez que comparado com o meio controle, o pré-hidrolisado apresenta a influência de componentes inibitórios, como furfural, HMF, ácido acético e outros compostos fenólicos. Dias et al. (2010) demonstraram que a influencia de mais de um componente tóxico presente em hidrolisados hemicelulósicos sobre a fermentação, é maior do que a influencia de cada um isoladamente, devido a um efeito de sinergia entre eles. Estes autores conduziram ensaios de fermentação com *P. stipitis* em meio sintético (glicose 20 e xilose 15 g/L) e comprovaram que a fermentação com suplementação de ácido acético igual a 3 g/L, conduziu uma velocidade específica máxima de crescimento 0,06 h<sup>-1</sup>. Quando suplementado com apenas furfural 2 g/L a velocidade específica máxima foi igual a 0,11 h<sup>-1</sup>. Realizando a mistura dos dois componentes, nas mesmas concentrações individuais, não houve crescimento celular nem consumo dos açúcares indicando o efeito sinérgico negativo sobre os micro-organismos.

**Tabela 8:** Velocidades específicas de crescimento máximas, para YEPD, pré-hidrolisado de bagaço-de-cana de açúcar 50 e 100%

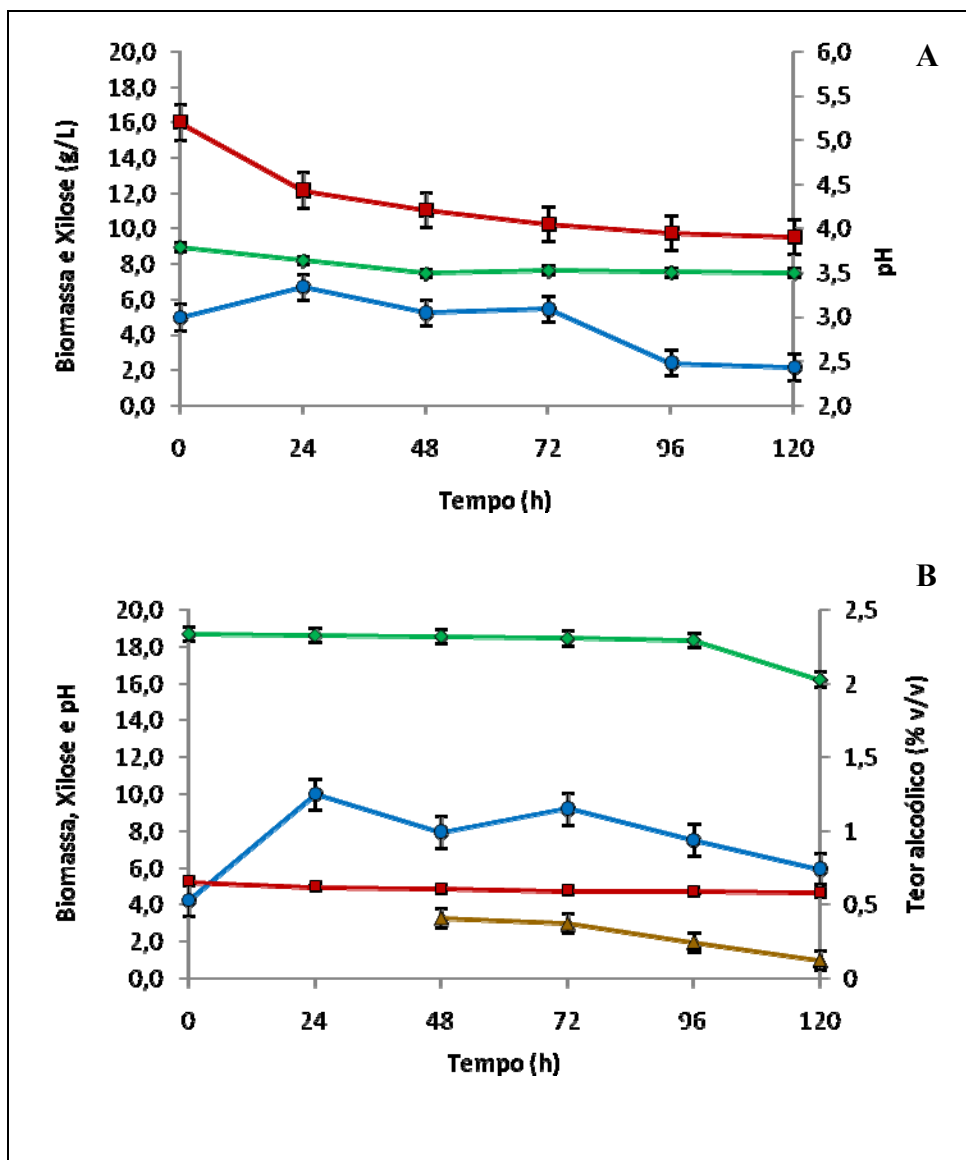
|                            | $\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> ) | tg (h) |
|----------------------------|---------------------------------|--------|
| <b>YEPD</b>                | 0,023                           | 30     |
| <b>Pré-hidrolisado 50%</b> | 0,001                           | 693    |
| <b>Pré-idrolisado 100%</b> | 0,011                           | 63     |

*( $\mu_{\max}$ ) velocidades específicas de crescimento máximas e tg tempo de geração.*

A concentração de açúcares redutores foi estimada pelo teor de xilose, a partir de curva-padrão, uma vez que este representa o açúcar majoritário no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (ROCHA et al., 2011). Os teores de xilose apresentaram valores iniciais em torno de 8,9 g/L para pré-hidrolisado diluído a 50% e 18,7 g/L para pré-hidrolisado concentrado 100%. Durante as 120 horas de experimento os valores não sofreram diminuição na concentração para pré-hidrolisado 50%, e somente a partir de 96 horas, com 100% de pré-hidrolisado houve discreto consumo deste açúcar (Figura 23). Moutta (2009) comprovou que em fermentação de hidrolisado de folha seca de cana-de-açúcar, utilizando a cepa *Pichia stipitis*, a glicose já havia sido completamente consumida em 15 horas, enquanto que xilose prosseguiu do início ao final de 110 horas de processo, sendo consumida mais lentamente na presença de glicose.

Mesmo xilose sendo a fonte de carbono em maior concentração, outros açúcares redutores tais como glicose, arabinose, manose, galactose, também estão presentes após o processo de pré-tratamento (BETANCUR; PEREIRA-JUNIOR, 2005). Sendo assim, estes açúcares possivelmente foram consumidos e sustentaram o crescimento microbiano levando a produção de biomassa.

Além disso, a celulose apresenta algumas regiões mais susceptíveis às condições de hidrólise, regiões menos ordenadas ou amorfas, condição encontrada na metodologia estudada. Desta forma, pode haver liberação da celobiose, um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose, as quais podem ser utilizadas por *D. bruxellensis* na produção de etanol (BLOMQUIST, 2010).



**Figura 23:** Produção de biomassa (g/L), consumo de xilose (g/L), produção de etanol (%v/v) e pH a 150 rpm, 30°C da levedura *D. bruxellensis* em pré-hidrolisado de bagaço de cana 50% (A) e 100% (B)

Os rendimentos de substrato em etanol podem ser fortemente afetados pelas variações de pH. No presente estudo os valores de pH não sofreram alterações significativas durante as 120 horas, partindo de valores em torno de 5,0 e finalizando em aproximadamente 4,0 para 50% e 4,5 para 100% de pré-hidrolisado. Estes resultados estão de acordo com os testes realizados por Bassi (2011) os quais demonstraram que *D. bruxellensis* foi capaz de crescer em uma faixa de pH 2,5 a 6,0.

A produção de etanol foi analisada a partir de 48 horas, uma vez que nos experimentos anteriores com pré-hidrolisado não evaporado a levedura iniciou a produção a partir deste período. Para o cálculo foi descontado o teor alcoólico inicial presente no pré-hidrolisado, ou



seja, 0,45% v/v (50%) e 1,20% v/v (100%), devido a utilização do solvente Organosolv (água, acetona e etanol 2:1:1). De acordo com a Figura 23, foi possível observar que nas primeiras 48 horas, com 100% de pré-hidrolisado a levedura já apresentava aproximadamente 0,5 %v/v de etanol, revelando que a produção iniciou-se antes do esperado. Em 50% a levedura não produziu quantidade considerável de etanol, não variando do valor inicial presente.

De acordo com a literatura, o rendimento de etanol obtido pelas leveduras fermentadoras de pentose em meios de cultivo com D-xilose é limitado principalmente por dois fatores: a utilização concorrente do etanol na presença de concentrações elevadas de xilose e a formação de xilitol e outros compostos como subprodutos (DUARTE, 1989). De acordo com Kipper (2009), o consumo de etanol se deve ao fato de que a concentração de AR diminui rapidamente nas primeiras 24 horas e passa a diminuir gradualmente até as 120 horas finais do experimento, momento em que o etanol é utilizado como fonte de carbono. Além disso, quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns micro-organismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono (MALESZKA; SCHNEIDER, 1982).

Os resultados obtidos no pré-hidrolisado evaporado revelaram que a concentração de etanol inicial em sinergia com outros compostos inibitórios presentes no meio aumentaram a fase de adaptação da levedura (Figura 23). Após a evaporação esse tempo foi reduzido de 72-94 h para 24 horas. A produção de etanol apresentou níveis máximos inferiores (0,41 %v/v) quando comparada com teste anterior (2,5 %v/v). Portanto, apesar da diminuição da fase de adaptação, os testes posteriores em fermentadores de bancada foram realizados com o pré-hidrolisado sem a etapa de evaporação, buscando a obtenção maiores teores de etanol.

### **5.9. Ensaios fermentativos em biorreator de bancada com *D. bruxellensis***

Devido à variação de umidade da massa úmida de leveduras, o primeiro ensaio iniciou com a concentração de células abaixo do esperado, com aproximadamente 2 g/L (Figura 24 A), e por conta disso, foi realizado uma segunda fermentação com uma concentração de células próximas a 5 g/L (Figura 24 B).

Os resultados da Figura 24 A mostram que, a partir de 72 horas ocorreu um discreto aumento de biomassa, permanecendo estável até 236 horas, onde um segundo aumento também foi registrado. Verificam-se neste mesmo período, por volta de 170 horas uma redução na concentração de xilose. Gong et al. (1999) reportaram que ocorre a assimilação

preferencial de glicose em relação a pentoses e que o comportamento de leveduras cultivadas em mistura de açúcares, hexoses e pentoses, apresenta uma inibição, ou retardamento, da utilização de xilose pela presença de glicose no meio. Han-Hagerdal et al. (1991) reportaram que concentrações acima de 2% de glicose, mesmo em espécies que possuem afinidade no transporte de pentoses, como *P. stipitis*, são capazes de reprimir a absorção de xilose.

Analisando os dados verifica-se que nos primeiros cinco dias há um crescimento discreto com  $\mu_{\text{máx}} = 0,003 \text{ h}^{-1}$  (tempo de geração de 231 horas), ocasionado por um lento consumo de glicose a 0,339 mg/L.h. Entretanto, segue-se uma segunda fase de crescimento com velocidade específica menor ( $0,001 \text{ h}^{-1}$ ), mas com elevado consumo de xilose (16,3 mg/L.h).

Este efeito de diauxia, ou seja, a presença de duas fases de crescimento exponencial durante um cultivo em batelada simples se deve a disponibilidade de mais de um substrato limitante assimilável pelo micro-organismo, o que ocorre com glicose e xilose em hidrolisado de cana-de-açúcar.

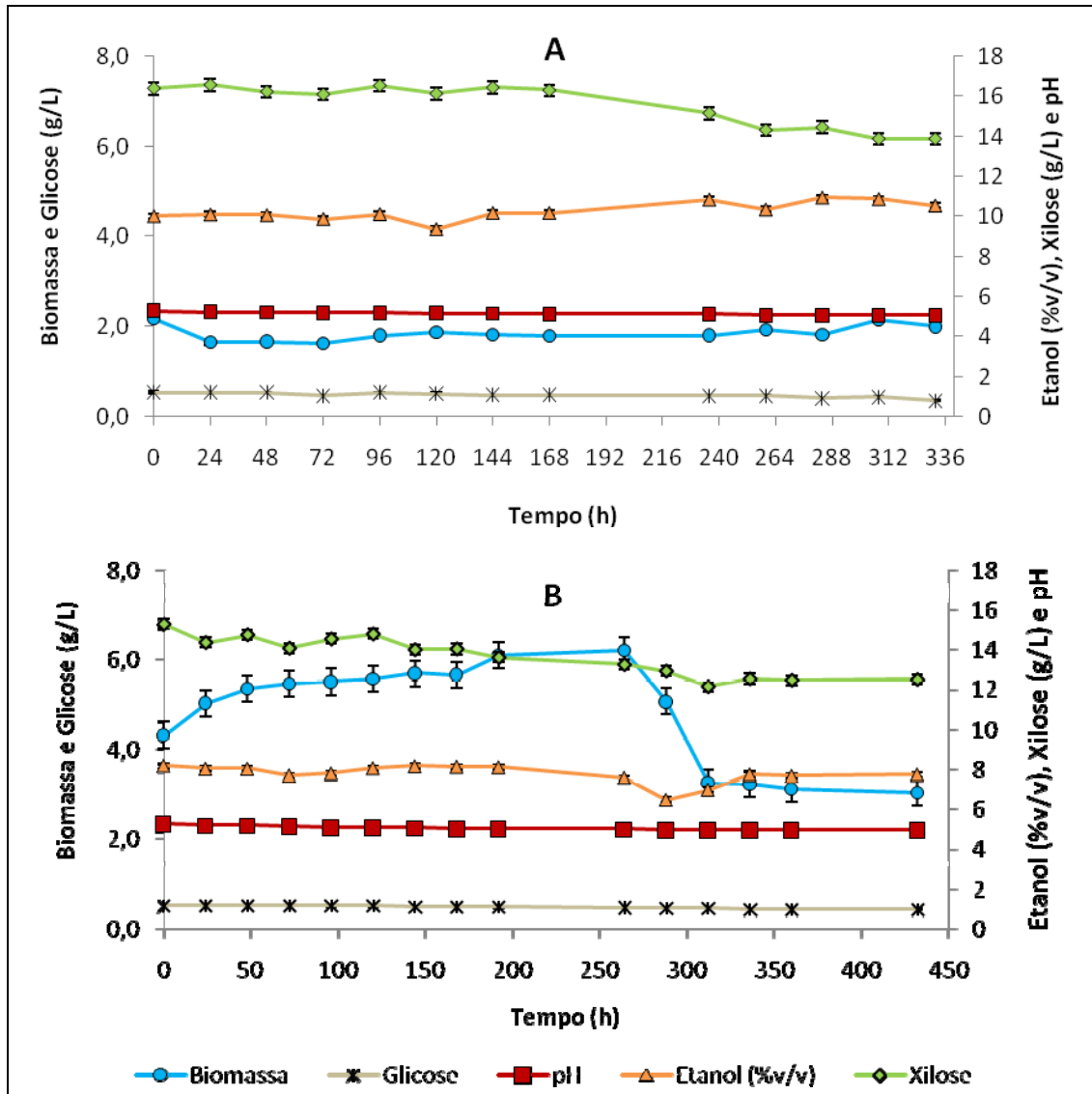
A concentração de etanol foi calculada descontando-se o valor de etanol inicialmente presente no pré-hidrolisado aproximadamente 10% v/v (Figura 24 A) e 8% v/v (Figura 24 B). Sendo assim, a partir de 170 horas ocorreu um aumento na concentração de etanol, período em que também se iniciou o consumo de xilose, justificando que a levedura pode ter utilizado esta fonte de carbono para utilização de etanol (Figura 24 A).

Considerando ainda que no período de consumo de xilose houve o aumento na produção de etanol levando a uma produtividade máxima de aproximadamente 3,25 mg/L.h, os resultados indicaram que a glicose foi inicialmente mais utilizada para a produção de biomassa. Entretanto isso, no período final do experimento, a xilose passa a ser consumida mais intensamente e o fluxo de carbono é direcionado para a formação de etanol. Sendo assim, ao se calcular os rendimentos destes açúcares em etanol, verifica-se que a conversão de xilose em etanol é cerca de cinco vezes superior a conversão de glicose.

Jeffries et al. (1985) comprovaram que adições periódicas de 0,5% glicose em fermentações aeróbias com *Pachysolen tannophilus* de 3% de xilose aumentaram o rendimento de etanol de 0,28 g/g de xilose para 0,41 g/g de xilose utilizada, comprovando que nesta concentração glicose não inibiu a utilização de xilose em condições aeróbias.

No segundo ensaio a concentração inicial de biomassa foi maior, em torno de 4 g/L. A partir de 24 horas já foi possível registrar um pequeno aumento de biomassa, e em aproximadamente 170 horas também ocorreu um segundo aumento, no entanto em proporções bem menores que o experimento anterior.

A partir destas constatações verifica-se a importância da otimização da relação entre glicose e xilose no pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, estes resultados sugerem o potencial de crescimento e produção de etanol por *Dekkera bruxellensis* neste tipo de meio de cultivo.



**Figura 24:** Curvas de crescimento quantificadas em biomassa seca (g/L), consumo de xilose e produção de etanol a 240 rpm, 30°C da levedura *D. bruxellensis* no pré-hidrolisado de bagaço de cana em biorreator de bancada. Gráfico A representa baixa concentração inicial de células, e B concentração de células inicial mais próximas de 5 g/L.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados comprovaram que a levedura *D. bruxellensis* produziu baixas quantidades etanol a partir de meios sintéticos contendo pentoses ou ainda com pré-hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, quando comparadas com *S. cerevisiae* em processos industriais a partir do caldo da cana-de-açúcar.

- Nos ensaios em meios sintéticos a partir de pentoses, *D. bruxellensis* foi capaz de produzir em torno de 0,8% v/v de etanol contra 1,2% v/v da levedura *P. stipitis* padrão. Demonstrando ser capaz de fermentar xilose em condições ideais.

- As condições de pré-tratamento estudadas revelaram que a concentração de 1% ácido sulfúrico propiciou melhores condições para liberação de xilose, devido maior disponibilidade desta fonte frente aos compostos inibitórios produzidos;

- Os testes de crescimento em pré-hidrolisados concluíram que *D. bruxellensis* foi capaz de crescer em todas as condições do pré-hidrolisado, diluído ou concentrado, com crescimento médio semelhante com 3,4 e 3,7 g/L de biomassa respectivamente, comprovando sua capacidade de se adaptar aos inibidores normalmente presentes na etapa pré-tratamento, principalmente furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético.

- A concentração de 100% de pré-hidrolisado apresentou velocidades específicas maiores que 50%, em torno de 0,009 h<sup>-1</sup>. Verificam-se aumento na velocidade quando se utilizou pré-hidrolisado evaporado, 0,011 h<sup>-1</sup>, porém com baixa produção de etanol 0,13% v/v (50%) e 0,24% v/v (100%). Em contra-partida, apesar da baixa velocidade específica, o pré-hidrolisado sem tratamento prévio produziu 0,53% v/v (50%) e 1,36 v/v (100%);

- Testes em fermentador demonstraram a presença de duas fases de crescimento exponencial. A primeira fase com baixa velocidade específica 0,003 h<sup>-1</sup> e lento consumo de glicose (0,339 mg/L.h). Em um segundo momento menores velocidades específicas de crescimento (0,001 h<sup>-1</sup>), porém com elevado consumo de xilose (16,3 mg/L.h), mas ainda discreta produção de etanol (0,9% v/v), a partir de 240 horas.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOGBO, F. K; COWAED-KELLY, G; TORRY-SMITH, M; WENGER, K; JEFFRIES, T. W. The effect of initial cell concentration on xilose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.136-140, p.653-662, 2007.

AGUILAR, R., RAMÍREZ, J. A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309-318, 2002.

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

ANDRIETTA, M. G. S., ANDRIETTA, S. R., STECKELBERG, C., STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol: 30 years of proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n.1299, p.195-200, 2007.

APHA- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 21º ed., 2005.

ARRUDA, P. V; CHAUD, L. C. S; FELIPE, M. G. A; PIVETTA, L. R. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcar e a bioconversão de xilose em xilitol, **Nucleus**, v.5, n.1, p.2-17, 2008.

BARATA, A; PAGLIARA, D; PICCININNO, T; TARANTINO, F; CIARDULLI, W; MALFEITO-FERREIRA, M; LOUREIRO, V. The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. **Federation of European Microbiological Societies**, v.8, p.1097-1102, 2008.

BASSI, A.P.G. **Tolerância ao estresse e características fermentativas de leveduras *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica**. 2011. 88p. Dissertação (Mestrado Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, Piracicaba, 2011.

BASSI, A.P.G.; REIS, V.R.; SILVA, S.C.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. Efeito ao pH e etanol sobre o crescimento de linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 18, 2011, Caxias do Sul, Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

BASSO, L; BASSO, T; ROCHA, S. **Ethanol production in Brazil: the industrial process and its impact on yeast fermentation**. In: BERNARDES, M. Biofuel production: recent developments and prospects. 5th ed. Croacia: InTech, 2011, p.85-100.

BASTOS, V. D., Etanol, Alcoolquímica e Biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.25, p.5-38, 2007.

BAUDEL, H. M. Pré-tratamento e hidrólise do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol. In: **III Workshop tecnológico sobre hidrólise para produção de etanol**, 3, 2007, São Paulo. Disponível em: [http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper\\_sessao\\_2\\_Henrique\\_Baudel.pdf](http://www.apta.sp.gov.br/cana/anexos/PPaper_sessao_2_Henrique_Baudel.pdf). Acesso em: Agosto, 2011.

BARBIERI, R.H.T., BARCELOS, I.S. Produção de fertilizante orgânico a partir do bagaço de cana-de-açúcar: uma alternativa para o gerenciamento do resíduo oriundo de indústrias sucroalcooleiras. In: **VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 8, 2009, Uberlândia. Disponível em: <http://www.cobeqic2009.feq.ufu.br/uploads/media/110919171.pdf>. Acesso em: Setembro, 2012.

BERNARDO-NETO, O. **Integração das principais tecnologias de obtenção de etanol através do processamento de celulose (2ª geração) nas atuais usinas de processamento de cana-de-açúcar (1ª geração)**. 2009. 138p. Dissertação (Mestre em Engenharia) – Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2009.

BETANCUR, G. J. V; PEREIRA-JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part II: Hemicellulose hydrolysate fermentability. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.13, n.5, 2005.

BETTIGA, M; HAHN-HÄGERDAL, B; GORWA-GRAUSLUND. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnology Biofuels**, v.1, p.1-16, 2008.

BLOMQVIST, J. **Dekkera bruxellensis – a competitive yeast for ethanol production from conventional and non-conventional substrates**. 2011, 59p. Tese – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2011.

BLOMQVIST, J; EBERHARD, T; SCHÜRER, J; PASSOTH, V. Fermentation characteristics of *Dekkera bruxellensis* strains. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 87, p. 1487-1497, 2010.

BLOMQVIST, J; SOUTH, E; TIUKOVA, L; MOMENI, M. H; HANSSON, H; STAHLBERG, J; HORN, S. J; SCHÜRER, J; PASSOTH, V. Fermentation of lignocellulosic hydrolysate by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.53, p.73-78, 2011.

BNDES - BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONOMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). **Cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316p.

BUCKERIDGE, M. S., SANTOS, W. D., SOUZA, A. P. **As rotas para o etanol celulósico no Brasil**. In: Cortez, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher-FAPESP, 2010, p 365-381.

CAMARGO, P. D. Força verde: um novo campo para a indústria química. **Revista Brasileira de Engenharia Química**, p. 18-21, 2005.

CANILHA, L; CARVALHO, W; FELIPE, M. G. A; SILVA, J. B. A; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010.

CECCATO-ANTONINI, S. R., BASSI, A. P., REIS, V. R. Effect of the carbon source on the fermentative performance of *Dekkera bruxellensis*, contaminant yeast from the alcohol fermentations. **Journal of Biotechnology** – Special Abstracts, p.531, 2010.

CHANG, H. N; YOO, I. K; KIM, B. S. Hight density cell culture by membrane-based cell recycle. **Biotechnology Advances**, v.12, n.3, p.467-487, 1994.

CIANI, M; FERRARO, L. Role of oxygen on acetic acid production by *Brettanomyces/Dekkera* in winemaking. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.75, p.489-495, 1997.

CODATO, C. B., **Potencial fermentativo e tolerância ao etanol de linhagens de *Dekkera bruxellensis* isoladas da fermentação alcoólica**. 2009, 53p. Trabalho de Conclusão de Curso - UNIARARAS, Araras, 2009.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira: cana-de-açúcar**. Brasília, Abril 2013, Safra 2013/2014, primeiro levantamento, 18p.

CORTEZ, D. V. **Influência dos produtos de degradação de lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii***. 2005, 100p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Faenquil, Lorena, 2005.

CRUEGER, W. E; CRUEGER, A. **Biotecnologia: Manual de Microbiologia Industrial**. Zaragoza: Acribia, 1993, 413p.

DAHAN, K, M; DAVIS, B. P; PITTMAN, P. E; KENEALY, W. R; JEFFRIES, W. Increased xylose reductase activity in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* by over expression of *XYL1*. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.57/58, p.267-276, 1996.

DAUGSCH, A; PASTORE, G. Obtenção de vanilina: oportunidade biotecnológica. **Química Nova**, v.28, p.642-645, 2005.

DIAS, V. Diversificação da cana-de-açúcar traz boas perspectivas para o setor no país. **União da indústria da cana-de-açúcar**, São Paulo, 2012. Disponível em: <http://www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode={08232023-10F4-4624-8410-9AAE30D15B12}>. Acesso em: agosto 2012.

DIAS, M. O. S, CUNHA, M. P., MACIEL-FILHO, R., BONOMI, A., JESUS, C. D. F., VAZ ROSSELL, C. E. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods; **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.52, p 1551-1554, 2010.

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

DU PREEZ, J. C; BOSCH, M; PRIOR, B. A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.23, p.228-233, 1986.

DUARTE, M. C. T. **Hidrolise de bagaço de cana com ácido clorídrico concentrado**. 1989. Mestrado (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, 1987.

FAIRBANKS, M. Álcool: Tecnologia amplia oferta e reduz custo do álcool. **Química e Derivados**, n. 417, 2003. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/quimica/index.php?sessao=reportagem&id=557&pagina=1>. Acessado em: agosto de 2012.

FENGEL, D., WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultra structure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FERNANDES, F., PIERRO, A. C., YAMAMOTO, R. Y. Produção de fertilizante orgânico por compostagem do lodo gerado por estações de tratamento de esgotos. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.28, n.5, p.567-574, 1993.

FOAUD, B., JOVER, J., GONZALEZ, E. Hydrolysis of bagasse with sulfuric acid in obtaining bioethanol. **Ingenieria Quimica**, v.37, n.425, p.240-248, 2005.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009, 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP, Lorena, 2009.

FONSECA, C; SPENCER-MARTINS, I; HAHN-HÄGERDAL, B. L-arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603<sup>T</sup> and *Pichia guilhermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.75, p.303-310, 2007.

FRANSCISCHINI, F. **In: Tecnologia e Gestão Sulcroalcoleira (Curso de extensão)**. Araras: Uniararas, 2008, 1CD-ROM.

FREER, S. N., DIEN, B., MATSUDA, S. Production of acetic acid by *Dekkera/Brettanomyces* yeasts under conditions of constant pH. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.101-105, 2003.

FUGITA, T. P. L. **Desempenho de leveduras que metabolizam xilose para produção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana**. 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Jaboticabal, 2010.

FUKUDA, H; KONDO, A; TAMALAMPUDI, S. Bioenergy: sustainable fuels from biomass by yeast and fungal whole-cell biocatalysts. **Biochemical Engineering Journal**, v.44, p.2-12, 2009.



GALAFASSI, S., MERICO, A., PIZZA, F., HELLBORG, L., MOLINARI, F., PIŠKUR, J., COMPAGNO, C. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1079-1088, 2010.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41-65, 2007.

GALBE, M., ZACCHI, G. **Produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos**. In: CORTEZ, L. A. B. Bioetanol de cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Blucher-FAPESP, 2010, p. 697-717.

GALBIATI, J. K., GALLO, C. A., LAVANHOLI, M. G. D. P. Produção de energia elétrica a partir da queima do bagaço de cana-de-açúcar. **Nucleus**, v.7, n.1, p.127-138, 2010.

GÁRDONYI, M; ÖSTERBERG, M; RODRIGUES, C; SPENCER-MARTINS, I; HAHN-HÄGERDAL. High capacity xylose transport in *Candida intermedia* PYCC 4715. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.45-52, 2003.

GONG, C. S., CAO, N. J., DU, J., TSAO, G. T. Ethanol Production from Renewable Resources. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 65, p. 207-241, 1999.

GOMES, E; THOMÉO, J. C; PRADO, H. F. A; MARTINS, D. A. B; SILVA, R; BOSCOLO, M. **Resíduos agrícolas e agroindustriais: potencialidades e uso na produção de etanol**. In: Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012, cap 10, p.271-319.

GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcoólica industrial por *Brettanomyces bruxellensis*: impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), UNESP – Campus de Rio Claro, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B., KARHUMAA, K., FONSECA, C., SPENCER-MARTINS, I. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.74, p.937-953, 2007.

HAHN-HAGERDAL, B., LINDEN, T., SENAC, T., SKOOG, K. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, n.1, p. 131-144, 1991.

HECTOR, R; QURESHI, N; HUGHES, S. R; COTTA, M. A. Expression of a heterologous xylose transporter in a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to utilize xylose improves aerobic xylose consumption. **Applied Microbiology and Cell Physiology**, v.80, p.675-684, 2008.

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

KIM, J. H; BLOCK, D. E; MILLS, D. A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: na optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.88, p.1077-1085, 2010.

KIIPPER, P. G. **Estudo da pré-hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar e fermentação alcoólica do mosto de xilose por *Pachysolen tannophilus***. 2009. 102p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Rio Claro, 2009.

KRISHNA, S. H., REDDY, T. J., CHOWDARY, G. V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. **Bioresource technology**, v. 77, p. 193-6, 2001.

LAMONICA, H. M. Geração de energia elétrica a partir da biomassa de cana. **In: III Seminário de Bioeletricidade**, 3, 2005, Rio de Janeiro. Anais eletrônicos. Rio de Janeiro: BNDES. Palestra. Disponível em: [http://www.inee.org.br/download/eventos/Geracao\\_EE\\_Biomassa\\_Cana\\_Lamonica\\_BNDES\\_2005.pdf](http://www.inee.org.br/download/eventos/Geracao_EE_Biomassa_Cana_Lamonica_BNDES_2005.pdf). Acesso em: Agosto 2012.

LARSSON, S., REIMANN, A., NILVEBRANT, N., JËONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemical Biotechnology**, v. 77– 79, p. 91–103, 1999.

LATIF, F., RAJOCA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource technology**, v. 77, p.57-63, 2001.

LEMOS, J. L. S. **Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana**. 2001. 196p. Tese (Doutorado em tecnologia de processos químicos e bioquímicos), Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, 2001.

LEHNINGER, A. L. **Princípios de Bioquímica**. Sao Paulo: Editora Savier, 1984.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. **Produção de etanol**. In: SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotechnology Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.3, cap. 1, p.1-40.

MAEDA, R. N., SERPA, V. I. S., ROCHA, V. A. L., MESQUITA, R. A. A., ANNA, L. M. M. S., de CASTRO, A. M., DRIEMEIER, C. E., PEREIRA JR., N., POLIKARPOV, I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases. **Process Biochemistry**, v.45, p.1196-1201, 2011.

MALESZKA, R; SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, xylitol and D-xylulose by yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v.28, n.3, p.360-363, 1982.

MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002, 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química Lorena – FAENQUIL/USP, Lorena, 2002.

MARTON, J. M. **Avaliação da performance de carvão ativo e resinas de troca iônica no desenvolvimento de um sistema de tratamento que minimize a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana à obtenção de xilitol.** 2005, 131p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química Lorena – FAENQUIL/USP, Lorena, 2005.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Plano Nacional de Agroenergia 2006-2011.** Secretaria de Produção e Agroenergia. 2ed. revisada. Brasília: Embrapa Informação tecnológica, 2006, 110p.

MARTÍN, C., ALMAZÁN, O., MARCET, M., JONSSON, L.J. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production. **International Sugar Journal**, v. 109, p. 1267, 2007.

MARTINS, G.M. **Isolamento e seleção de leveduras fermentadoras de xilose.** 2011. 101p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, São José do Rio Preto, 2011.

MARTINS, L. F. Caracterização do complexo celulásico de *P. echinulatum*. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, p.119, 2005.

MATSUSHIKA, A., HIROYUKI, I., MURAKAMI, K., TAKIMURA, O., SAWAYAMA, S. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2392-2398, 2009.

MENEGHIN, M. C. **Caracterização e comportamento fermentativo de linhagens de *Dekkera* contaminantes da fermentação alcoólica.** 2007. 86p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ, Piracicaba, 2007.

MOUTTA, R. O. **Hidrólise ácida de palha de cana-de-açúcar para obtenção de hidrolisado hemicelulósico visando à utilização em processos de produção de bioetanol.** 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, USP/EEL, Lorena, 2009.

MUSSATO, I. S; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de Xilitol a partir de palha de arroz. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v.28, p.24-39, 2002.

NARDI, T; REMIZE, F; ALEXANDRE, H. Adaptation of yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Brettanomyces bruxellensis* to winemaking conditions: a comparative study of stress genes expression. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.88, n.4, p.925-937, 2010.

NARENDRANATH, N. V., THOMAS, K. C., INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p.71-177, 2001.

NIGAM, J. N., IRELAND, R. S., MARGARITIS, A., LACHANCE, M. A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-Xylose directly to ethanol. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, n. 6, p. 1486-1489 1985.

OGEDA, T. L; PETRI, D. F. S. Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**, v.33, n.7, p.1549-1558, 2010.

OLIVEIRA, F. P. **Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares.** 2010. 141p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Escola de Química – EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

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

PACHECO, S. M; DAMASIO, F. Vanilina Origem, Propriedades e Produção. **Química Nova na Escola**, v.32, p.215-219, 2010.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzate I: inhibition and detoxication. **Bioresource Technology**, 74, 17-24, 2000.

PAN, X. J., ARATO, C., GILKES, N., GREGG, D., MABEE, W., PYE, K., XIAO, Z. Z., ZHANG, X., SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 90, p. 473–481, 2005.

PANDEY, A., SOCCOL, C. R., NIGAM, P. E., SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, vol. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

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

PEREIRA, R. E. **Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para Produção de Etanol.** 2006. 133p. Dissertação. (Mestrado em Ciências) Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2006.

REYNOL, F. Bagaço de qualidade. **Cana Oeste**, 2009. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br/namidia/noticia/34232/bagaco-de-qualidade/>. Acesso em: Julho, 2010.

RICHARD, P; VERHO, R; PUTKONEM, M; LONDESBOROUGH, J; PENTTILÄ, M. Production of ethanol from L-arabinose by *Saccharomyces cerevisiae* containing a fungal L-arabinose pathway. **FEMS Microbiology**, v.27, p.547-557, 2003.

RIZZI, M; HARWART, K; ERLEMANN, P; BUI-THANH, N. A; DELLWEG, H. Purification and properties of the NAD<sup>+</sup>-xylitol-dehydrogenase from the yeast *Pichia stipitis*. **Journal Ferment Bioengineering**, v.67, p.20-24, 1989.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.36, p.271-275, 1991.

ROCHA, G.J.M., MARTIN, C., SOARES, I.B., MAIOR, A.M.S., BAUDEL, H.M., ABREU, C.A.M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass & Bioenergy**, v.35, p.663-670, 2011.

RODRIGUES, F. A. **Avaliação da tecnologia de hidrólise ácida de bagaço de cana**. 2007. 160p. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2007.

RODRIGUES, R. C. L. B., ROCHA, G. J. M., RODRIGUES-JUNIOR, D., FILHO, H. J. I., FELIPE, M. D. G. A., PESSOA-JUNIOR, A. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v.101, p.1247-1253, 2010.

RODRIGUEZ-CHONG, A., ROMIREZ, J. A., GARROTE, G., VAZQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.143-152, 2004.

ROSSI, R. A., ANDRIETTA, M. G. S. Isolamento de leveduras de bagaço da cana-de-açúcar: propriedades em assimilação e fermentação de açúcares. **In: XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 17, 2009, Natal, Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2009.

SAAD, M. B. W.; GONÇALVES, A. R. Avaliação técnica-econômica da produção de etanol de bagaço de cana via hidrólise enzimática. **In: XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos (SINAFERM)**, 18, 2011, Caxias do Sul, Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos, 2011.

SALAZAR, R. F. S., SILVA, G. L. P., SILVA, M. L. C. P. Estudo da composição da palha de milho para posterior utilização como suporte na preparação de compósitos. **In: VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, 6, 2005. Campinas, Brasil.

SCHLEGEL, H. G. **General Microbiology**. Cambridge University Press, 7<sup>o</sup> ed., 1990, 214p.

SCHNEIDER, H. Conversion of pentoses to ethanol by yeasts and fungi. **CRC Critical Reviews in Biotechnology**, v.9, p.1-40, 1989.

SILVA-FILHO, E. A. **Caracterização genética de populações de leveduras de destilarias de álcool combustível para otimização do processo de fermentação**. 2003. 108p. Doutorado em Biologia de Fungos - Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, 2003.

SILVA, G. A. **Dekkera/Brettanomyces: leveduras não competitivas que deterioram vinhos**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2005. 72p.

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

SILVA, T. F. M; NAZIMA, K. S; ARRUDA, P. V; FELIPE, M. G. A. Xylitol production by *Candida guilhermondii* sugarcane bagasse hydrolysate treated with polymer of vegetable origin. In: IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages. **Book of Abstracts**, p.153, 2006.

SOARES, P.A; VAZ ROSSELL, C.E. **Conversão de celulose pela tecnologia Organosolv**. NAIPPE - USP, Vol. 3 - Nova Série, São Paulo, 2007.

SOUTH, E. **Fermentation of lignocellulosic material by the alternative industrial ethanol yeast *Dekkera bruxellensis***. Master of Science degree in Engineering Biology – Linköping Institute of Technology – Linköping University/Department of Microbiology – SLU, Upsala, 2010.

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

SREENATH, H. K; JEFFRIES, T. W. Production of ethanol from Wood hydrolyzate by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 72, p.253-260, 2000.

STAMBUK, B. U., ELEUTHERIO, E. C. A., FLOREZ-PARDO, L.M., SOUTO-MAIOR, A. M., BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

SUÁREZ, R., SUÁREZ-LEPE, J. A., MORATA, A., CALDERÓN, F. The production of ethylphenols in wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A review. **Food Chemistry**, v.102, p.10-21, 2007.

SUN, Y.; CHENG, J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1599 - 1606, 2005.

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

TAHERZADEH, M. J., NIKLASSON, C., LIDEN, G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates. **Biotechnology Bioengineering**, v. 69, p. 330–338, 2000.

TOIVARI, M. R; SALUSJARVI, L; RUOHONEN, L; PENTTILA, M. Endogenous xylose pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environment Microbiology**, v.70, p.3681-3686, 2004.

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

TOLMASQUIM, M. T. Perspectivas e planejamento do setor energético no Brasil. **Estudos Avançados**, v.26, n.74, p.1-14, 2012.

TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de Saccharomyces frente a compostos inibitórios presentes no melão de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. 258p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, Campinas, 2008.

UPPAL, S. K., GUPTA, R., DHILLON, R. S., BHATIA, S. Potential of sugarcane bagasse for production of furfural and its derivatives. **Sugar Tech**, v.10, p.298-301, 2008.

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

VAZ ROSSELL, C. E; LAHR, D. F; HILST, A. G. P; LEAL, M. R. L. V. Saccharification of sugarcane bagasse for ethanol production using the Organosolv process. **International Sugar Journal**, v.107, p.192-195, 2005.

VERHO, R; PUTKONEM, M; LONDESBOROUGH, J; PENTTILÄ, M; RICHARD, P. Anovel NADH-linked L-xylulose reductase in the L-arabinose catabolic pathway of yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.15, p.14746-14751, 2004.

WALFRIDSSON, M; HALLBORN, J; PENTTILÄ, KERÄNEN, S; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied Environment Microbiology**, v.61, n.12, p.4184-4190, 1995.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: John Wiley, 1998, 350p.

WHEALS, A. E; BASSO, L. C; ALVES, D. M. G; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v.17, p.482-487, 1999.

WIKANDARI, R., MILLATI, R., SYAMSIYAH, S., MURIANA, R., AYUNINGSIH, Y. Effect of furfural, hydroxymethylfurfural and acetic acid on indigeneous microbial isolate for bioethanol production. **Agricultural Journal**, v.5, p.105-109, 2010.

WILSON, J. J., DESCHATELETS, L., NISHIKAWA, N. K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.31, n. 5-6, p. 592-596, 1989.

ZHAO, J., XIA, L. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline-pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain. **Fuel Processing Technology**, v. 90, n. 10, p. 1193-1197, 2009.

## 8. APÊNDICE

**APÊNDICE A:** Análise cromatográfica de 1,5g de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado em diferentes concentrações de ácido. Em A a concentração de açúcares (g/L), e em B a concentração de furanos (mg/L) sendo que T1 60' e T2 120' correspondem ao pré-tratamento, e T3 150 minutos corresponde à hidrólise ácida.

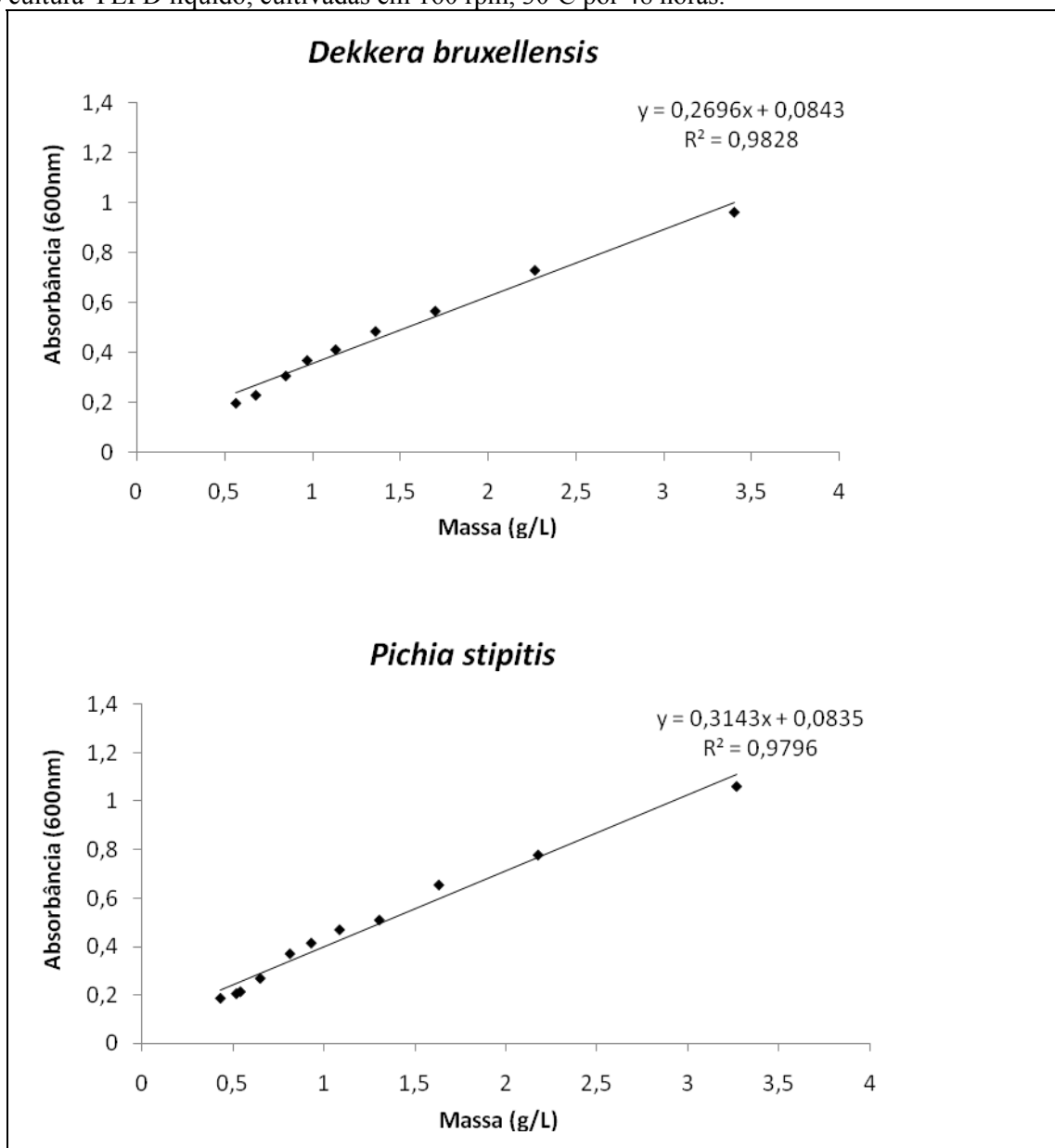
| Tempo (min) | Amostra (%) | Açúcares (g/L) |        |           | Ácido Acético (g/L) | A |
|-------------|-------------|----------------|--------|-----------|---------------------|---|
|             |             | Glicose        | Xilose | Arabinose |                     |   |
| T1 60'      | 0           | 0,102          | 0,186  | 1,030     | 0,117               |   |
|             | 1           | 1,844          | 14,037 | 1,849     | 0,766               |   |
|             | 2           | 2,690          | 17,138 | 2,249     | 0,766               |   |
| T2 120'     | 0           | 0,000          | 0,400  | 1,100     | 0,000               |   |
|             | 1           | 3,400          | 17,850 | 2,430     | 0,250               |   |
|             | 2           | 3,150          | 11,900 | 1,800     | 0,040               |   |
| T3 150'     | 0           | 0,000          | 0,110  | 0,054     | 0,000               |   |
|             | 5           | 0,520          | 0,314  | 0,087     | 0,000               |   |
|             | 10          | 1,934          | 0,590  | 0,991     | 0,000               |   |

B

| Tempo (min) | Amostra (%) | Furanos (mg/L) |        |                |              |               |          |               |              |
|-------------|-------------|----------------|--------|----------------|--------------|---------------|----------|---------------|--------------|
|             |             | Furfural       | HMF    | Álcool Vanilil | Ác. Vanílico | Ác. Siringico | Vanilina | Siringaldeido | Ác. Ferúlico |
| T1 60       | 0           | 3,419          | 1,658  | 0,396          | 11,376       | 1,028         | 5,913    | 0,000         | 0,000        |
|             | 1           | 492,059        | 25,224 | 0,000          | 0,000        | 5,189         | 17,792   | 10,471        | 31,253       |
|             | 2           | 1080,918       | 31,121 | 0,000          | 0,000        | 6,705         | 23,758   | 9,692         | 3,274        |
| T2 120      | 0           | 8,690          | 10,590 | 3,960          | 12,420       | 0,000         | 0,000    | 0,000         | 0,000        |
|             | 1           | 1265,188       | 91,908 | 9,288          | 0,000        | 0,000         | 0,000    | 0,000         | 0,000        |
|             | 2           | 1970,888       | 49,513 | 0,000          | 0,000        | 0,000         | 0,000    | 4,700         | 0,000        |
| T3 150      | 0           | 2,596          | 1,120  | 0,000          | 33,624       | 0,716         | 4,535    | 0,000         | 7,156        |
|             | 5           | 581,795        | 38,424 | 0,000          | 0,000        | 4,524         | 19,678   | 8,634         | 0,000        |
|             | 10          | 554,081        | 45,221 | 0,000          | 24,062       | 5,979         | 19,784   | 0,000         | 0,000        |



**APÊNDICE B:** Curvas padrão absorbância X massa seca *D. bruxellensis* (C) e *P. stipitis* (D) em meio de cultura YEPD líquido, cultivadas em 160 rpm, 30°C por 48 horas.



**APÊNDICE C:** Curvas de crescimento da levedura *D. bruxellensis* (A) e *P. stipitis* (B) em meio de cultura YEPD, pré-hidrolisado de bagaço de cana diluído (50%) e concentrado, 150 rpm a 30°C.

