

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**GUILHERME SILVEIRA MORAES**

**INFLUÊNCIA DA LINHAGEM DA LEVEDURA E DAS CONDIÇÕES  
DE CULTIVO NO PROCESSO DE ISOMERIZAÇÃO E  
FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DA XILOSE**

**SÃO CARLOS/SP**

**2013**

**INFLUÊNCIA DA LINHAGEM DA LEVEDURA E DAS CONDIÇÕES  
DE CULTIVO NO PROCESSO DE ISOMERIZAÇÃO E  
FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DA XILOSE**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**GUILHERME SILVEIRA MORAES**

**INFLUÊNCIA DA LINHAGEM DA LEVEDURA E DAS CONDIÇÕES  
DE CULTIVO NO PROCESSO DE ISOMERIZAÇÃO E  
FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS DA XILOSE**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em Engenharia Química, área de concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

**Orientador: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami**

**Coorientadores: Profs. Drs. Roberto de Campos Giordano e**

**Raquel de Lima Camargo Giordano**

**SÃO CARLOS/SP**

**2013**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M827iL

Moraes, Guilherme Silveira.

Influência da linhagem da levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação simultâneas da xilose / Guilherme Silveira Moraes. -- São Carlos : UFSCar, 2013.

101 f.

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

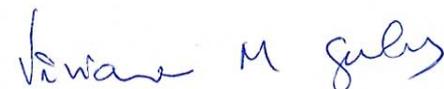
1. Engenharia bioquímica. 2. *S. cerevisiae*. 3. Glicose isomerase. 4. Xilose. 5. Xilulose. 6. Etanol. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **GUILHERME DA SILVEIRA DE MORAES** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 21 DE MARÇO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

  
Teresa Cristina Zangirolami  
**Orientadora, UFSCar**

  
Viviane Maimoni Gonçalves  
**Instituto Butantan**

  
Gisella Maria Zanin  
**UEM**

Dedico este trabalho, ao meu avô que com os  
olhos de Deus poderá ver seu primeiro neto  
diplomado mestre e também à minha família,  
meu grande porto seguro.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiríssimo lugar ao nosso bom e querido Deus misericordioso, que tudo nos permite, e nos aconselha o que é bom. Agradeço imensamente a minha família principalmente minha mãe Maria Inês, meu pai Joel e avó Maria pelo amparo emocional, financeiro e espiritual, grandes agradecimentos a minhas tias e tio, Veide, Lúcia, Vera, José Davi, Luci, Darlete, Joelma e também a todas as derivações em primos, Lúcia Helena e todos os em “anexo na família” que sempre rezaram por mim, apoiaram e incentivaram.

À professora Dra. Teresa Cristina Zangirolami, serei eternamente grato pela orientação e pela sua grande pessoa, atenciosa, humilde, realista a melhor palavra a defini-la é realmente “Orientadora”. Agradeço essencialmente pela coorientação dos professores Dr. Roberto de Campos Giordano e Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano.

Agradeço a nossa “família pentose” composta também por Cláudia Ramos da Silva e Patrícia Marina de Aquino, não possuímos o mesmo sobrenome, entretanto, compartilhamos das mesmas dificuldades e alegrias nos ambientes acadêmico, científico e laboratorial. A amizade conquistada nos manterá unidos mesmo quando a tristeza da distância chegar.

Ao Centro Tecnológico da Marinha pela compreensão e liberação em todos os eventos demandados deste trabalho, especialmente a Oswaldo, Cmte. Velasco e Cmte. Yamamoto igualmente a todos do ambiente de trabalho.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos pela infraestrutura e recursos disponíveis, aos programas PRÓ-ENGENHARIAS CAPES e BIOEN FAPESP, pela bolsa concedida pelos recursos, aos professores do PPGEQ e a todos os profissionais envolvidos, também aos técnicos Amadeus, Thais, Aline e Thiago.

Também aos amigos sempre presentes tanto nas aulas, questionamentos, correções exercícios, laboratório quanto nos almoços no RU cafés e em todo o entretenimento. Claudia, Pat, Cleiton, Agnes, Felipe, Cintia, Alexandre, Alano, Paula, Adriana, Waldir, Mayer, Carlos, Inti, Aline, Maurício, Marcelo, Samirys, Marina, Diogo, Sandrinha, Anny, Lionete, Adilson, Lili, Ana Maria. Peço desculpas se esqueci de alguém, mas, sempre me lembrarei da importância de cada um para com meu aprendizado de vida.

Por fim agradeço a todas as pessoas que me apoiaram, incentivaram questionaram, e que de maneira direta ou indireta ajudaram para a realização deste trabalho e do meu crescimento acadêmico e profissional.

Tens ouvido: “Olho por olho, dente por dente” Eu, porém, vos digo: não resistas ao mau, se alguém te ferir a face direita, oferece também a outra. Se alguém te trazer em justiça para tirar a túnica, cede também a capa. Se alguém vem obrigar-te a andar mil passos, anda dois mil. Dá a quem pede e não desvies daquele que quer pedir emprestado. Tens ouvido: “Amarás o teu próximo e poderás odiar teu inimigo”. Eu, porém, vos digo: amai vossos inimigos, fazei bem aos que vos odeiam, orai pelos que vos maltratam e perseguem. Deste modo sereis os filhos de vosso Pai que está no céu, pois ele faz nascer o sol sobre os maus e bons, e faz chover sobre os justos e injustos. Se amares somente os que vos amam, que recompensa terás? Pois até os mercenários amam os que vos amam.

Mateus 5, 38-46

## RESUMO

A conversão da fração hemicelulósica da biomassa em etanol é um dos fatores que impactam a viabilidade econômica do processo de produção de etanol de segunda geração a partir do bagaço de cana-de-açúcar. A hemicelulose do bagaço é um heteropolímero constituído por pentoses e glicose, sendo a xilose o açúcar predominante (~ 21 %). Dentre as diversas alternativas tecnológicas para a produção de etanol a partir de xilose, o processo SIF (Simultânea Isomerização e Fermentação), consistindo na isomerização da xilose em xilulose pela enzima glicose-isomerase (GI) e na fermentação da xilulose pela levedura *S. cerevisiae*, é considerado uma alternativa promissora. Os principais objetivos do presente trabalho foram: i) avaliar o desempenho de diferentes cepas de *S. cerevisiae* em termos de assimilação de xilulose e produtividade em etanol; ii) estudar a influência das condições de cultivo (disponibilidade de oxigênio, temperatura e da concentração inicial de xilose) na produção de etanol e xilitol pelas cepas selecionadas; iii) definir as condições de operação para um processo SIF contínuo em sistema de reatores de leito fixo associados em série. Os experimentos preliminares foram conduzidos em frascos de 50 mL contendo 4 g de pellets com carga de 20 % de glicose isomerase imobilizada, coimobilizada com levedura (carga de 10%) em gel de alginato. Para a seleção da levedura com melhor desempenho na produção de etanol a partir de xilose, foram avaliadas duas linhagens de levedura de panificação comercial (Itaiquara<sup>®</sup> e Fleischmann<sup>®</sup>), três cepas industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2) e uma utilizada em laboratório (CEN.PK113-7D). Esses experimentos SIF foram conduzidos a 35°C utilizando meio composto por xilose (60 g/L), ureia (5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (1,9 g/L) e sais diversos, em pH inicial 5,6. Experimentos SIF complementares foram realizados com as leveduras selecionadas Itaiquara<sup>®</sup>, BG-1 ou CEN.PK113-7D em diferentes condições de temperatura (40°C), aeração (frascos de 15 mL) e concentração inicial de xilose (130 g/L) para comparação com os resultados obtidos nas condições padrão. Em todos os experimentos SIF, amostras foram retiradas para determinação da concentração de açúcares redutores (método DNS) e de xilose, xilulose, etanol e subprodutos (xilitol, glicerol etc.) por cromatografia em fase líquida. Foi também acompanhada a viabilidade celular ao longo do cultivo. Na comparação entre as diferentes leveduras, destacou-se especialmente a levedura Itaiquara<sup>®</sup>, alcançando concentrações de etanol de 22,4 g/L, com produtividade em etanol de 2,1 g/Lh. A conversão de xilose foi semelhante entre as leveduras industriais e entre as leveduras de panificação e a de laboratório. Quanto ao conjunto de experimentos complementares, na temperatura de 40°C houve diminuição de viabilidade e seletividade em etanol para a Itaiquara<sup>®</sup> e melhora na produtividade e seletividade para a CEN.PK113-7D. Nos experimentos realizados em condições semianaeróbias, a levedura BG-1 apresentou aumento de seletividade e rendimento em etanol, porém para um tempo de reação de 45 horas, aproximadamente. Já a levedura Itaiquara<sup>®</sup> não teve seu desempenho influenciado pela menor disponibilidade de oxigênio. No experimento realizado com 130 g/L de xilose, alcançou-se mais de 40 g/L de etanol em 24 horas de cultivo. Conclui-se, assim, que o processo SIF de xilose, proposto no presente trabalho, é uma alternativa viável para a produção de etanol a partir de xilose ou de resíduos lignocelulósicos. Para a operação em sistema contínuo composto por reatores de leito fixo associados em série recomenda-se a utilização de levedura Itaiquara<sup>®</sup> e de temperatura de, no máximo, 35°C, mantendo-se o tempo de residência total em torno de 10 horas para uma alimentação contendo 60 g/L de xilose.

**PALAVRAS-CHAVE:** *S. cerevisiae*, xilose, xilulose, levedura de panificação, isomerização e fermentação simultâneas

## ABSTRACT

The conversion of the hemicellulosic fraction in ethanol is a factor that impacts on the economic viability of the second generation ethanol production process from sugar cane bagasse. Hemicellulose from bagasse is a heteropolymer constituted by pentoses and glucose, being xylose the predominant sugar (~ 21 %). Among the available technological alternatives for ethanol production from xylose, SIF process (Simultaneous Isomerization and Fermentation), consisting of xylose conversion to xylulose by glucose isomerase (GI) enzyme and xylulose fermentation by the yeast *S. cerevisiae*, is considered a promising alternative. The main objectives of the present work were: i) evaluate the performance of different *S. cerevisiae* strains towards xylulose intake and ethanol productivity; ii) assess the influence of cultivation conditions (temperature, oxygen availability and initial xylose concentration) upon ethanol and xylitol production by the selected strains; iii) define the operation conditions for the continuous SIF process, using a system of fixed bed reactors associated in series. Preliminary experiments were conducted in 50 mL flasks, containing 4 g of pellets with a load of 20 % of immobilized GI, co-immobilized with yeast (load of 10 %) in alginate gel. For the screening of yeasts showing better performance on ethanol production from xylose, two commercial baker's yeast strains (Itaiquara<sup>®</sup> e Fleischmann<sup>®</sup>), three industrial strains (BG-1, CAT-1 e PE-2) and one lab strain (CEN.PK113-7D) were evaluated. These experiments were performed at 35 °C, using a medium composed by xylose (60 g/L), urea (5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (1.9g/L) and several salts, at initial pH of 5.6. Additional SIF studies were carried out with the selected yeasts Itaiquara<sup>®</sup>, BG-1 or CEN.PK113-7D under different temperature conditions (40 °C), aeration (15 mL flasks) and initial xylose concentration (130 g/L) for comparison with the results obtained at the standard conditions. For SIF cultures, samples were withdrawal and the concentrations of reducing sugars were determined by DNS method while xylose, xylulose, ethanol and by-products (xylitol, glycerol etc) concentrations were assessed by liquid chromatography. Cell viability was also measured at the beginning and end of the experiment. When comparing the different yeasts, Itaiquara<sup>®</sup> strain presented the best performance, reaching ethanol concentrations of 22.4 g/L, with a productivity of 2.1 g/Lh. The conversion of xylose was similar for all studied industrial strains as well as among the baker's yeast and lab strains. Concerning the group of additional experiments, at 40 °C, a decrease of viability and ethanol selectivity was observed for Itaiquara<sup>®</sup>, whereas productivity and selectivity for CEN.PK113-7D. was improved. For the studies conducted under semi-anaerobic conditions, the yeast BG-1 showed an increase in selectivity and yield. However, the reaction time increased to app. 45 hours. On the other hand, the performance of strain Itaiquara<sup>®</sup> was not altered by the lower level of oxygen tested. In the experiment with 120 g/L of xylose, more than 40 g/L of ethanol was obtained in 24 hours of cultivation. Thus, we conclude that the SIF process proposed in the present work is a viable alternative for the production of ethanol from xylose or lignocellulosic residues. For the operation of the continuous system composed by fixed bed reactors associated in series, the recommended conditions include the Itaiquara<sup>®</sup> yeast with a temperature no higher than 35 °C, keeping the total residence time around 10 hours for a feeding supply containing 60 g/L of xylose.

**KEYWORDS:** *S. cerevisiae*, xylose, xylulose, baker's yeast, simultaneous isomerization and fermentation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Estrutura lignocelulósica das plantas. ....	20
<b>Figura 2</b> - Fibra lignocelulósica (recalcitrante).....	21
<b>Figura 4</b> - Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses.....	23
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.....	24
<b>Figura 6</b> - Alcoóis precursores da lignina: A – álcool p-cumarílico; B – álcool coniferílico; C – álcool sinapílico. ....	26
<b>Figura 7</b> - Bagaço de cana-de-açúcar acumulado na indústria .....	28
<b>Figura 11</b> - Solventes a partir de hidrolisados hemicelulósicos.....	33
<b>Figura 13</b> - Diferentes opções metabólicas para a fermentação alcoólica de xilose com um balanço redox. ....	38
<b>Figura 14</b> - Equação estequiométrica de formação de etanol a partir de xilose. ....	39
<b>Figura 15</b> – Procedimento experimental .....	49
<b>Figura 17</b> - Sistema SIF, falcons contendo meio e pelletes na razão 1:1 incubados em shaker a 150 rpm e 35 °C.....	53
<b>Figura 19</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 69,8 g/L xilose em tubo falcon de 50mL com levedura BG-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.....	60
<b>Figura 20</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 62,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CAT-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.....	61
<b>Figura 21</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 67,4 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura PE-2. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.....	61
<b>Figura 23</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura Itaiquara. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.....	62
<b>Figura 24</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CEN.PK113-7D. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch. ....	63

<b>Figura 25</b> - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose falcon de 50 mL para diferentes leveduras. ....	64
<b>Figura 26</b> - Seletividade em Etanol no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose, falcon de 50 mL, para diferentes leveduras. ....	65
<b>Figura 28</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 67,2 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura Itaiquara <sup>®</sup> . Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch. ....	68
<b>Figura 29</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 65,4 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura BG-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch. ....	69
<b>Figura 30</b> - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose para as leveduras Itaiquara <sup>®</sup> e BG-1 sob diferentes condições de disponibilidade de O <sub>2</sub> . ....	69
<b>Figura 32</b> - Produtividade em etanol no processo SIF a 35°C, 65g/L xilose para as leveduras Itaiquara <sup>®</sup> e BG-1 sob diferentes condições de disponibilidade de O <sub>2</sub> . ....	70
<b>Figura 34</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 40 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CEN.PK117-7D. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch. ....	72
<b>Figura 36</b> - Seletividade em etanol no processo SIF semi-aeróbio, a 70,0 g/L xilose para as leveduras Itaiquara <sup>®</sup> e CEN.PK117-7D sob diferentes temperaturas. ....	73
<b>Figura 38</b> - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35°C, 130,4 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura Itaiquara <sup>®</sup> . Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch. ....	75
<b>Figura 39</b> - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, semi-anaeróbio, para a levedura Itaiquara <sup>®</sup> e diferentes concentrações de xilose. ....	75
<b>Figura 41</b> - Seletividade e Produtividade em etanol em função da conversão no processo SIF a 35 °C, semi-anaeróbio, para a levedura Itaiquara <sup>®</sup> e diferentes concentrações de xilose. ....	76
<b>Figura 43</b> – Diferentes linhagens utilizadas nos experimentos SIF (A) BG-1, (B) CAT-1, (C) CEN.PK113-7D, (D) Fleischmann, (E) Itaiquara, (F) PE-2. ....	82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Composição química de materiais lignocelulósicos. ....	21
<b>Tabela 2</b> - Principal composição química da hemicelulose de materiais lignocelulósicos. (% por massa seca do material). ....	25
<b>Tabela 3</b> - Microrganismos fermentadores de xilose. ....	40
<b>Tabela 4</b> - Estudos sobre a produção de etanol por isomerização e fermentação simultâneas. ....	43
<b>Tabela 5</b> - Características das espécies de <i>S. cerevisiae</i> . ....	46
<b>Tabela 6</b> - Resumo de experimentos SIF em batelada. ....	54
<b>Tabela 7</b> - Avaliação do desempenho das diferentes leveduras testadas (conjunto de experimentos C1) utilizando classificação por <i>Scores</i> . ....	67
<b>Tabela 8</b> - Recuperação de carbono para diferentes condições de SIF. ....	78
<b>Tabela 9</b> - Viabilidade e concentração de células para diferentes condições de SIF. ....	80
<b>Tabela 10</b> - Produtividade e velocidade de assimilação específicas para diferentes condições de SIF. ....	84
<b>Tabela 11</b> - Resumo de parâmetros calculados para diferentes SIF's variando Temperatura (°C), Concentração inicial de Xilose e diferentes volumes de tubo reator. ....	87
<b>Tabela 12</b> - Parâmetros de diferentes microrganismos por diferentes processos na conversão de xilose em etanol. ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SIF</b>	<b>Simultânea Isomerização e Fermentação</b>	
<b>2G</b>	<b>Segunda Geração</b>	
<b>pH</b>	<b>Potencial Hidrogeniônico</b>	
<b>t</b>	<b>Tempo</b>	
<b>XOS</b>	<b>Xilooligossacarídeos</b>	
<b>HXT</b>	<i>Hexoses Transportes</i>	
<b>Km</b>	<b>Constante de Michaelis Menten</b>	
<b>XI</b>	<b>Xilose Isomerase</b>	<b>mM</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosina Trifosfato</b>	
<b>NAD</b>	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido</b>	
<b>NADH</b>	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Hidreto</b>	
<b>NADP</b>	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato</b>	
<b>NADPH</b>	<b>Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato Hidreto</b>	
<b>CLAE</b>	<b>Cromatografia Líquida de Alta Eficiência</b>	
<b>V<sub>máx</sub></b>	<b>Velocidade Máxima de Reação</b>	
<b>CO<sub>2</sub></b>	<b>Dióxido de Carbono</b>	
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	<b>Sulfato de Magnésio</b>	
<b>CoCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloreto de Cobalto</b>	
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>Cloreto de Cálcio</b>	
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	<b>Hidrogênio Fosfato de Potássio</b>	
<b>AR</b>	<b>Açúcar Redutores</b>	
<b>X</b>	<b>Conversão</b>	<b>%</b>
<b>Pr</b>	<b>Produtividade em Etanol</b>	<b>g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup></b>
<b>S</b>	<b>Seletividade em Etanol</b>	<b>Mol.Mol<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sub>ETOH</sub></b>	<b>Rendimento em Etanol</b>	<b>g.g<sup>-1</sup></b>
<b>Y<sub>XOH</sub></b>	<b>Rendimento em Xilitol</b>	<b>g.g<sup>-1</sup></b>
<b>V</b>	<b>Viabilidade</b>	<b>%</b>
<b>Pr<sub>esp</sub></b>	<b>Produtividade Específica de Etanol</b>	<b>g<sub>ETOH</sub>.g<sub>cél</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup></b>
<b>Ass<sub>esp</sub></b>	<b>Assimilação Específica</b>	<b>g<sub>S</sub>.g<sub>cél</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup></b>
<b>DO</b>	<b>Densidade Óptica</b>	<b>nm</b>
<b>Cx</b>	<b>Concentração Celular em Massa Seca</b>	<b>g.L</b>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	20
2.1.1 CELULOSE.....	22
2.1.2 HEMICELULOSE.....	23
2.1.3 LIGNINA.....	26
2.2 FONTES DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	27
2.3 PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	29
2.3.1 ETANOL DE CELULOSE.....	29
2.3.2 PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE HEMICELULOSE.....	30
2.3.2.1 XILO-OLIGOSSACARÍDEOS.....	31
2.3.2.2 XILITOL.....	31
2.3.2.3 SOLVENTES E MATÉRIAS-PRIMAS.....	32
2.3.2.4 PRODUTOS DIVERSOS.....	33
2.3.2.5 ETANOL DE HEMICELULOSE.....	34
2.4 METABOLISMO DE XILOSE POR <i>S. CEREVISIAE</i> .....	35
2.5 ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE.....	38
2.5.1 CONVERSÃO A ETANOL POR MICRORGANISMOS FERMENTADORES DE XILOSE.....	38
2.5.2 ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SIF).....	42
2.5.2.1 XILOSE ISOMERASE (XI).....	44
2.5.2.1 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	45
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 GLICOSE ISOMERASE IMOBILIZADA E MICRORGANISMOS.....	49
3.1.1 PREPARO DO SUPORTE E IMOBILIZAÇÃO DA GLICOSE ISOMERASE.....	49
3.1.2 CULTIVO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	50
3.2 PREPARO DO BIOCATALISADOR.....	51
3.3 SIF (SIMULTÂNEA ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO) DE XILOSE: ESTUDOS PRELIMINARES.....	52
3.4 DISSOLUÇÃO DOS PELLETES PARA ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR.....	54
3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	55
3.6 CÁLCULOS REALIZADOS.....	56
3.7 REPRODUTIBILIDADE DOS EXPERIMENTOS.....	58
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1 COMPARAÇÃO DA SIF DA XILOSE PARA DIFERENTES LEVEDURAS (C1).....	60
4.2 INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO (C2).....	67

4.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA (C3) .....	71
4.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE XILOSE (C4).....	74
4.5 PANORAMA GERAL DOS ESTUDOS REALIZADOS .....	77
4.5.1 BALANÇO DE MASSA DE CARBONO.....	77
4.5.2 VIABILIDADE E MORFOLOGIA CELULAR .....	78
4.5.3 COMPARAÇÃO ENTRE O PROCESSO SIF ESTUDADO E AS ALTERNATIVAS DE APROVEITAMENTO DE XILOSE APRESENTADAS NA LITERATURA .....	85
5 CONCLUSÕES.....	89
6 REFERÊNCIAS .....	92



## 1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o Brasil e o mundo têm investido em pesquisa e desenvolvimento de novas formas de obtenção de energia, principalmente devido à futura escassez dos combustíveis fósseis e aos problemas ambientais causados pelo uso dos mesmos. Neste panorama, as biomassas de fontes renováveis surgem como alternativas economicamente atrativas, sendo as ricas em carboidratos as mais adequadas para suprir as demandas energéticas e de insumos básicos para as indústrias químicas (TORRESI, PARDINI e FERREIRA, 2008).

Existe uma grande gama de tecnologias para a conversão energética da biomassa para diversas aplicações e escalas. Elas incluem gaseificação, uso direto na produção de calor e eletricidade (cogeração), recuperação de energia a partir de resíduos sólidos urbanos ou aterros sanitários, além da obtenção de biocombustíveis para o setor de transportes, tais como etanol e biodiesel (GOLDEMBERG, 2009). Os processos atualmente empregados para a produção de etanol são baseados na fermentação de açúcares por leveduras, resultando em etanol e CO<sub>2</sub>. No Brasil, esse açúcar é obtido de maneira direta a partir da cultura de cana-de-açúcar (sacarose presente no caldo ou subprodutos do processo de produção de açúcar). Já nos EUA, o açúcar provém da cultura do milho pelo método de sacarificação por hidrólise do amido (ROSA e GARCIA, 2009).

Porém, para aumentar a produção de biocombustíveis sem provocar uma crise na produção de alimentos devido ao deslocamento de áreas agriculturáveis, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam um melhor aproveitamento das matérias-primas existentes (SUAREZ, 2009). Neste sentido, insere-se o conceito de etanol de segunda geração (2G), obtido a partir de matérias-primas lignocelulósicas (SILVA, SILVA JR. E PINTO JR., 2010). No Brasil, devido à grande disponibilidade para as indústrias sucroalcooleiras instaladas, sendo utilizado na geração de vapor e de energia elétrica (CÂNDIDO, 2009), o bagaço de cana-de-açúcar desponta como o resíduo agroindustrial de maior potencial para a produção de etanol 2G.

Assim como todos os vegetais, o bagaço de cana-de-açúcar é um composto lignocelulósico, sendo constituído por celulose, hemicelulose e lignina, sendo estes biopolímeros que determinam as características de cada material lignocelulósico. No bagaço, a lignina está presente em fração máxima de 22%, celulose corresponde a 44%, enquanto o restante é hemicelulose (~ 26%). Hemicelulose é composta principalmente por xilose e, em

menor grau, por arabinose, podendo conter ainda outros açúcares como glicose, galactose e manose (GOUVEIA, NASCIMENTO e SOUTO-MAIOR, 2009).

A viabilidade econômica do processo de produção de etanol 2G depende, em grande parte, do aproveitamento de todos os açúcares presentes nos materiais lignocelulósicos para a produção de etanol. Porém, enquanto as hexoses como a glicose são facilmente assimiladas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* – largamente utilizada pela indústria de etanol – essa levedura é incapaz de fermentar a xilose, principal constituinte da hemicelulose, a etanol. Entretanto, *S. cerevisiae* consegue assimilar a xilulose, isômero da xilose, convertendo-o em etanol. Tendo como base a conversão de xilose a xilulose, diversas abordagens vêm sendo investigadas para a obtenção de etanol, incluindo o uso de *S. cerevisiae* geneticamente modificada (KUYPER *et al.*, 2004), assim como a isomerização *ex-situ*, por meio da enzima xilose isomerase. Neste caso, a isomerização e a fermentação podem ser conduzidas em sequência ou simultaneamente, nos denominados processos SIF (Simultânea Isomerização e Fermentação). Apesar das diferenças nas condições ótimas para a isomerização (T ~70 °C e pH ~7) e para a fermentação (T ~30 °C e pH ~4), estudos conduzidos por Gong *et al.* (1981), Lastick *et al.* (1989), Chandrakant e Bisaria (2000) e Nakata *et al.* (2009) apontaram o processo SIF como muito promissor para a produção de etanol a partir de xilose. Esses autores relatam que a condução das reações de isomerização e fermentação em uma mesma etapa favorece o deslocamento do equilíbrio da reação de isomerização no sentido da produção de xilulose, proporcionando o aumento da velocidade de produção de etanol.

Outra dificuldade destacada pelos autores mencionados anteriormente é a lenta assimilação da xilulose por *S. cerevisiae*, com velocidade de consumo cerca de 90 vezes menor que a observada com glicose (GONG *et al.*, 1981). Por isso, a utilização de alta carga de levedura é um recurso recomendável para aumentar a produtividade.

Neste contexto, o presente trabalho se insere no subprojeto “Estudo da produção de etanol a partir de hemicelulose, usando enzimas livres e imobilizadas” do projeto temático “BIOPROCESS SYSTEMS ENGINEERING (BSE) APPLIED TO THE PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM SUGARCANE BAGASSE” (2008/56246-0), BIOEN FAPESP, coordenado pelo Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano, do Departamento de Engenharia de Química da Universidade Federal de São Carlos. A estratégia proposta no subprojeto para o aproveitamento da fração hemicelulósica consiste no desenvolvimento de um sistema de reatores de leito fixo associados em série (TROVATI, 2001; GIORDANO,

1992) para a realização do processo SIF utilizando partículas de alginato contendo enzima xilose isomerase imobilizada e coimobilizada com levedura *S. cerevisiae*. Os diversos aspectos envolvidos no processo SIF, desde o desenvolvimento do biocatalisador adequado (SILVA *et al.*, 2012) até a definição das condições de temperatura, pH, carga de enzima e carga de levedura na micropartícula de alginato, vêm sendo investigados no Doutorado de Claudia Ramos da Silva e no Mestrado de Patrícia Marina de Aquino, ambos realizados em paralelo ao presente trabalho.

Assim, os estudos aqui relatados tiveram como principal objetivo contribuir para a implementação de um processo SIF contínuo em sistema de reatores de leito fixo associados em série, destacando-se como objetivos específicos:

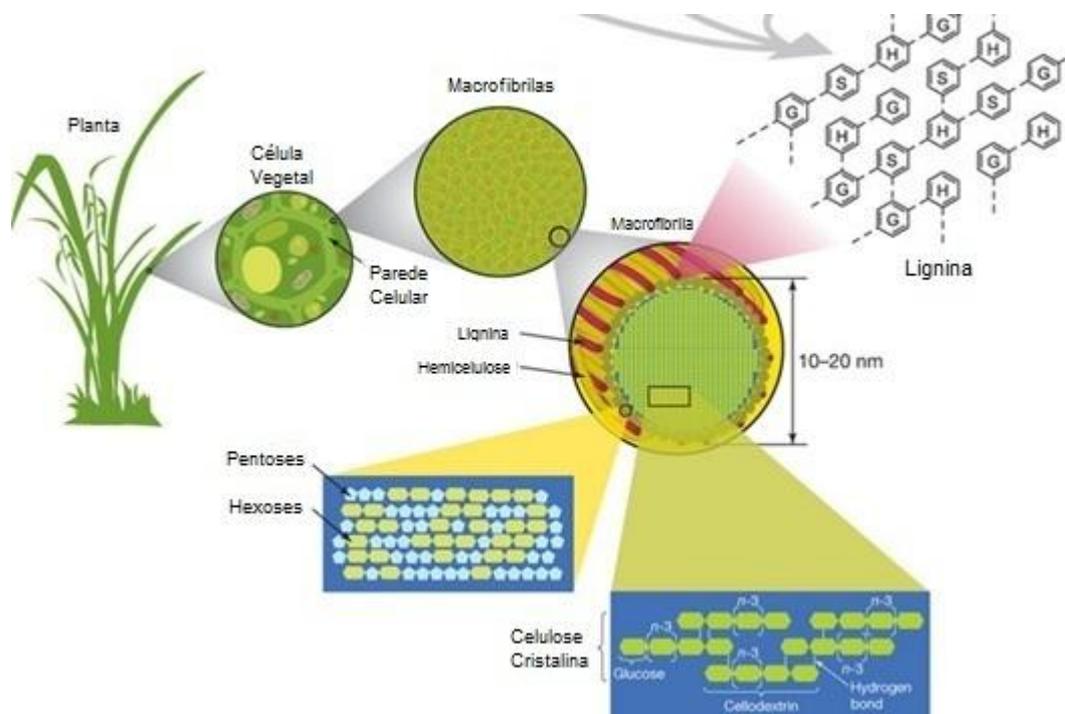
- Avaliar o desempenho de diferentes cepas de *S. cerevisiae* em termos de assimilação de xilulose, produtividade em etanol e xilitol e seletividade a etanol, e selecionar a levedura mais adequada para a SIF;
- Avaliar a influência da temperatura, da disponibilidade de oxigênio e da concentração inicial de xilose no desempenho das melhores cepas de *S. cerevisiae* identificadas anteriormente, em termos de assimilação de xilulose, produtividade em etanol e xilitol e seletividade a etanol.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Diferente das células animais, as células vegetais possuem um envoltório externo espesso e relativamente rígido chamado de parede celular celulósica ou também membrana esquelética celulósica, onde estão dispostas as macrofibrilas lignocelulósicas, conforme esquematizado na Figura 1.

**Figura 1** - Estrutura lignocelulósica das plantas.



Fonte: **PLANT STRUCTURE** - ([www.nature.com](http://www.nature.com), acesso em Janeiro de 2013).

Nota: ácido p-cumarílico (G), coniferílico (H) e sinapílico (S) precursores da lignina.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos basicamente por três polímeros: celulose (polímero de glicose), hemicelulose (cadeias ramificadas de açúcares, na maioria aldopentoses, principalmente xilose) e lignina (álcoois fenólicos polimerizados) na proporção média de 50:30:20, respectivamente (WYMAN *et al.*, 2005). Cinzas, compostos fenólicos, ácidos graxos e outros constituintes, denominados extrativos, compõem a fração remanescente desta biomassa vegetal (OLIVEIRA, 2007).

Na Tabela 1 estão representadas composições químicas de celulose, hemicelulose e lignina para alguns dos principais materiais lignocelulósicos encontrados no Brasil.

**Tabela 1-** Composição química de materiais lignocelulósicos.

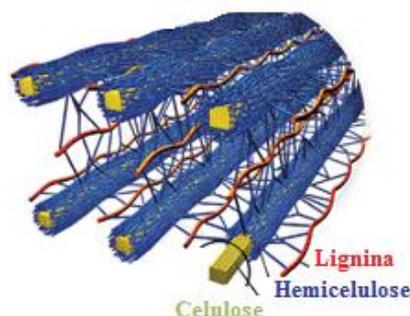
<b>Material Lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina (%)</b>	<b>Referência</b>
<b>Algodão</b>	95,0	2,0	0,9	Canilha, 2006
<b>Palha de arroz</b>	43,3	26,4	16,3	Canilha, 2006
<b>Fibra de bananeira</b>	60,0-65,0	6,0-8,0	5,0-10,0	Nunes Silva, 2009
<b>Bagaço de cana</b>	32,0-48,0	19,0-24,0	23,0-32,0	Nunes Silva, 2009
<b>Fibra de coco</b>	36,0-46,0	0,2-0,3	41,0-45,0	Nunes Silva, 2009
<b>Sabugo de milho</b>	31,7	34,7	20,3	Moutta, 2009
<b>Folha de milho</b>	37,6	34,5	12,6	Moutta, 2009
<b>Forragem de milho</b>	38,0-40,0	28,0	7,0-21,0	Nunes Silva, 2009
<b>Palha de Trigo</b>	33,8	31,8	20,1	Moutta, 2009

Fonte: Acervo próprio.

O alto teor de celulose e hemicelulose, baixo teor de lignina, assim como grande disponibilidade e baixo custo de obtenção são características que revelam uma fonte de biomassa com grande potencial para o processo de etanol 2G.

A composição principal dos materiais lignocelulósicos varia de acordo com o vegetal. Em culturas agroindustriais, a região, a idade e o período de colheita, são fatores que influenciam na proporção dos componentes celulose, hemicelulose e lignina (MOUTTA, 2009).

Como mostra a Figura 2, as fibras de celulose dos materiais lignocelulósicos estão envolvidas em uma matriz amorfa de hemicelulose e lignina. Tal matriz confere a esse material uma estrutura rígida e pouco reativa, provendo uma barreira natural (recalcitrância) ao ataque de microrganismos e/ou enzimas (FENGEL e WEGENER, 1989).

**Figura 2 -** Fibra lignocelulósica (recalcitrante).

Fonte: *Lignocellulose Decomposition* - [www.secondgenome.com](http://www.secondgenome.com), acesso em Janeiro de 2013.

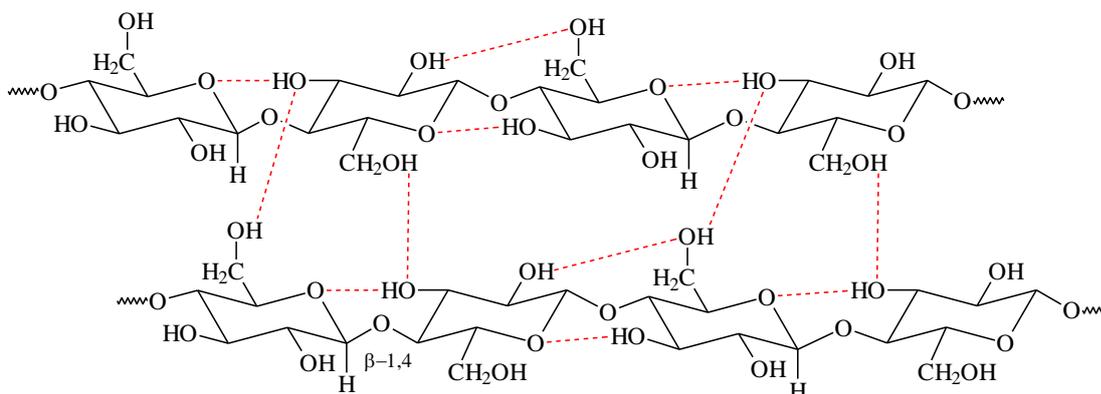
Embora os referidos compostos apresentem grande potencial para a obtenção de diversos produtos de valor agregado, há necessidade de desenvolvimento de tecnologias na área de bioprocessos, de biotecnologia e engenharia, devido às características químicas e morfológicas desses compostos como a elevada resistência a agentes biológicos, sendo indispensáveis os tratamentos prévios, às vezes sob condições drásticas para a obtenção de açúcares fermentescíveis (MOUTTA 2009).

A seguir estarão caracterizados os constituintes dos materiais lignocelulósicos.

### 2.1.1 Celulose

Celulose está presente na maioria dos vegetais em frações entre 40-50%, sendo o principal componente da parede celular vegetal e a macromolécula mais abundante na natureza. A celulose das paredes celulares possui certo grau de cristalização e também regiões amorfas, atribuindo ao vegetal rigidez e resistência (GOLDSTEIN, 1981). Os vários grupos hidroxilas (-OH), presentes na estrutura da celulose, permitem que ligações de hidrogênio inter e intramolecular ocorram entre as cadeias (Figura 3), formando regiões cristalinas. Este tipo de interação entre as cadeias possibilita a formação de microfibrilas com alto grau de cristalinidade de celulose (FENGEL e WEGENER, 1989). Entretanto, em algumas regiões dessas fibrilas que serão formadas, ocorrem irregularidades das interações, gerando então as regiões amorfas na rede cristalina (ROEHR, 2001).

**Figura 3** - Estrutura da cadeia celulósica.



Fonte: ZHANG e PERCIVAL, 2008, p. 370.

A celulose é um homopolímero constituído de glicose, cujas unidades glicosídicas são unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (ZHANG e PERCIVAL, 2008), o que permite às

moléculas de glicose uma disposição de 180° entre si Figura 1. Esta disposição no espaço torna a cadeia de celulose uma macromolécula linear (MORAES, 2010).

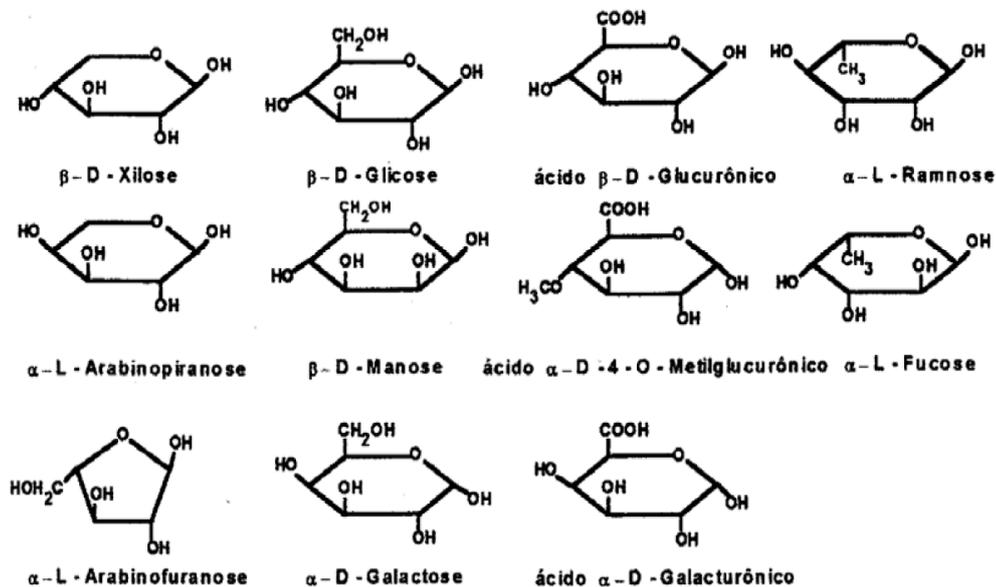
As regiões cristalinas da celulose tornam a mesma altamente resistente à hidrólise ácida, alcalina ou enzimática (WOOD e SADDLER, 1988; CONVERSE e WARE, 1994).

Em uma molécula de celulose pode haver mais de 15.000 unidades de glicose e as cadeias de celulose se encontram agregadas paralelamente para formar as fibrilas elementares, celobiose (dímero de glicoses) é a unidade repetitiva do polímero (FENGEL e WEGENER, 1989).

### 2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose, também chamada de poliose, é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante nos vegetais, é uma mistura de diferentes polissacarídeos e ácidos orgânicos (Figura 4).

**Figura 4** - Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses.



Fonte: CANILHA, 2006.

A composição principal de moléculas orgânicas presentes na hemicelulose depende do tipo de planta (MARTINS, 2007; SANDGREN, 2005) como apresentado na Tabela 2. Este heteropolímero está presente em todas as camadas da parede celular, mas concentrado principalmente nas camadas primária e secundária, entrelaçado com as fibras de

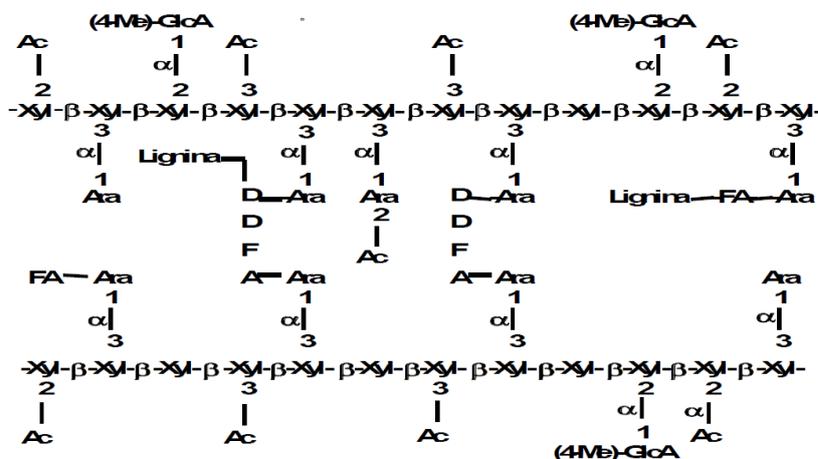
celulose (BISARIA e GHOSE, 1981). A hemicelulose encontra-se integrada à celulose por ligações de hidrogênio (HAYASHI e MACLACHLAN, 1984; HAYASHI *et al.*, 1987), exercendo funções estruturais de união das microfibrilas de celulose adjacentes (FRY *et al.*, 1993; HAYASHI, 1989).

Como apresenta uma combinação de vários açúcares e possui em grande parte uma estrutura molecular amorfa, a hemicelulose é mais solúvel em água e apresenta maior facilidade em ser degradada que a celulose (SINGH e MISHRA, 1995).

Além de caráter estrutural, alguns polissacarídeos hemicelulósicos, como as galactomananas, xiloglucanas e arabinogalactomananas em sementes de plantas leguminosas ou mananas e glucomananas em sementes de gergelim e tomate respectivamente, possuem funções de polissacarídeos de reserva (LIMA, 2000).

Como esquematizado na Figura 5 as polioses são, geralmente, formadas com um grau de polimerização com variação entre 100 a 200 unidades de repetição, atingindo, no conjunto, uma massa molecular bem menor que a da celulose (MOUTTA, 2009). São classificadas em xilanas, um homopolímero de xilose, glucomananas e galactanas heteropolímeros que podem conter arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucurônico e grupos acetil ligados à cadeia principal (FENGEL e WEGENER, 1989). A hemicelulose consiste, principalmente, de xilanas, com monômeros de xilose unidos por ligações  $\beta$ -1,4 (NUNES SILVA 2009).

**Figura 5** - Representação esquemática de uma xilana de gramínea mostrando alguns grupos substituintes.



Fonte: NUNES SILVA, 2009.

Nota: Xyl = D-xilopirranose; Ara = L-arabinofuranose; (4-Me)-GlcA = ácido (4- O-metil)-D-glicopiranoúrico; Ac = acetil; FA = ácido ferúlico; DDFa = ácido desidroferúlico.

**Tabela 2-** Principal composição química da hemicelulose de materiais lignocelulósicos. (% por massa seca do material).

<b>Matéria prima</b>	<b>Xilose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Manose</b>	<b>Galactose</b>	<b>Ramose</b>	<b>AU</b>	<b>Acetato</b>
<b>Madeiras mole</b>							
<b>Pseudotsuga</b>	6,0	3,0	-	3,7	-	-	-
<b>Pinos</b>	5,3-10,6	2,0-4,2	5,6-13,3	1,9-3,8	-	2,5-6,0	1,2-1,9
<b>Madeira dura</b>							
<b>Eucalipto</b>	14-19,1	0,6-1,0	1,0-2,0	1,0-1,9	0,3-1,0	2,0	3,0-3,6
<b>Carvalho</b>	21,7	1,0	2,3	1,9	-	3,0	3,5
<b>Salgueiro</b>	11,7-17,0	2,1	1,8-3,3	1,6-2,3	-	-	-
<b>Materias agrícolas e agro-industriais</b>							
<b>Palha de cevada</b>	15,0	4,0	-	-	-	-	-
<b>Espiga de milho</b>	28,0-35,3	3,2-5,0	-	1,0-1,2	1,0	3	1,9-3,8
<b>Fibra de milho</b>	21,6	11,4	-	4,4	-	-	-
<b>Palha de milho</b>	14,8-25,2	2,0-3,6	0,3-0,4	0,8-2,2	-	-	1,7-1,9
<b>Caroço de azeitona</b>	2,0-3,7	1,1-1,2	0,2-0,3	0,5-0,7	0,3-0,5	1,2-2,2	-
<b>Casca de arroz</b>	17,7	1,9	-	-	-	-	1,6
<b>Palha de arroz</b>	14,8-23,0	2,7-4,5	1,8	0,4	-	-	-
<b>Bagaço de cana</b>	20,5-25,6	2,3-6,3	0,5-0,6	1,6	-	-	-
<b>Farelo de trigo</b>	16,0	9,0	-	1,0	-	2,0	0,4
<b>Palha de trigo</b>	19,2-21,0	2,4-3,8	0-0,8	1,7-2,4	-	-	-

Fonte: GÍRIO *et al.*, 2010.

Nota: AU – Ácidos Urônicos

A xilose é o principal açúcar constituinte da hemicelulose. O aproveitamento dessa fração é importante para que o processo de produção de etanol 2G seja viável.

Segundo Klock *et al.* (2005) e Gírio *et al.* (2010), encontram-se seis grupos bem definidos de hemicelulose ocorrentes nas plantas:

- **Xiloglucanas** é o tipo predominante de polissacarídeos hemicelulósicos nas plantas folhosas e, em menor ocorrência, nas gramíneas, constituídas por glicoses ligadas pelo carbono  $\beta$  - 1,4 na cadeia principal e 75% acoplado na cadeia lateral por xilose di ou triglicolisado, podendo conter também arabinose, galactose e fucose.

- **Glucouranoxilanas** são encontradas nas madeiras de folhosas entre 20 a 35 % de sua massa seca. São polímeros de xilose, associados com ácido poliglucurônico. São

polissacarídeos lineares, conectadas por ligações  $\beta$  - 1,4 entre as unidades de xilose. O grau médio de polimerização para as plantas folhosas está entre 100 e 200.

- **Galactoglucomananas** podem ocorrer em frações de até 10-25% nas madeiras coníferas. Constituídas por unidades de manose e glucose unidas por ligações  $\beta$  - 1,4 glucosídicas distribuídas linearmente ao longo da cadeia. Sua estrutura contém ainda unidades de galactose dispostas lateralmente à cadeia principal.

- **Glucomananas**, juntamente com as galactoglucomananas, são as principais polioses ocorrentes nas madeiras coníferas. São formadas por unidades de manose e glucose na proporção 3:1, respectivamente.

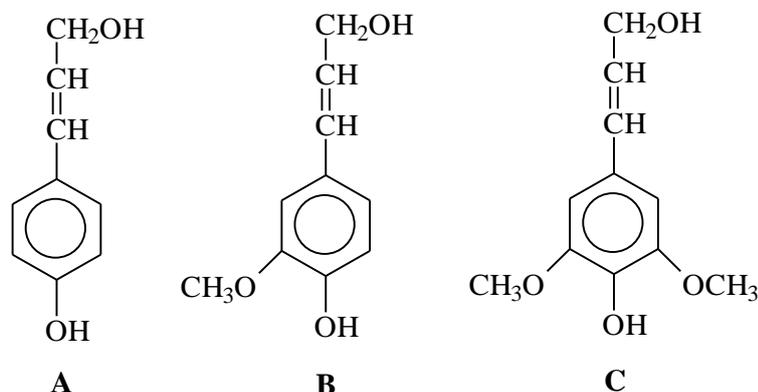
- **Arabinoxilanas** é a mais ocorrente estrutura hemicelulósica nos grãos e cereais: cerca de 0,15 a 30%, na cadeia principal. Contém xilopiranosose ligada por carbono  $\beta$  - 1,4 e, como substituintes, podem ocorrer arabinose, arabinofuranose e ácido O-glucopiranosose.

- **Arabinoglucuranoxilanas** são presentes nas madeiras coníferas, gramíneas e cereais em porcentagens que variam de 5 a 10 %. Contém  $\beta$  - 1,4 e xilopiranosose na cadeia principal, e seu grau de polimerização é de 50 a 185.

### 2.1.3 Lignina

A lignina é uma macromolécula tridimensional amorfa, altamente complexa e ramificada, que não pode ser isolada sem que a sua estrutura original seja alterada, sendo esta a principal dificuldade na elucidação da sua estrutura (SILVA *et al.* 2009). Sabe-se, porém, que a mesma resulta da condensação dos álcoois hidroxicinâmicos: p-cumarílico (A), coniferílico (B) e sinapílico (C) representados na Figura 6 (FIALHO *et al.*, 2010).

**Figura 6** - Alcoóis precursores da lignina: A – álcool p-cumarílico; B – álcool coniferílico; C – álcool sinapílico.



A lignina aumenta a resistência mecânica das plantas, atuando como um agente de endurecimento e protegendo a parede celular contra o ataque enzimático de microrganismos (SANDGREN, STAHLBERG e MITCHINSON, 2005).

A força de união entre as fibras de celulose e de lignina é ampliada devido à ocorrência de ligações covalentes entre os constituintes da lignina com a celulose e hemicelulose (JOHN e THOMAS, 2008).

Diferentemente da molécula de celulose, a lignina apresenta estrutura tridimensional muito complexa, com grau de polimerização em torno de 50 e massa molecular em torno de 90.000 (MOUTTA, 2009).

## **2.2 FONTES DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

Existem vários compostos lignocelulósicos que podem ser utilizados como fonte de biomassa para produção de etanol. No Brasil, os mais abundantes são: algodão, bagaço de cana, casca de aveia, espiga de milho, eucalipto, farelo de cevada, fibra de coco, fibra de bananeira, folhas e forragem de milho, juta (planta fibrosa cultivada no Amazonas), madeira dura, madeira mole, palha de arroz, palha de cevada, palha de sorgo, palha de trigo, rami (planta fibrosa muito usada no Continente Asiático), sisal (fibra têxtil derivada do agave), talo e sabugo de milho (CANILHA, 2006; MOUTTA, 2009; NUNES SILVA, 2009).

Para a maioria dos países tropicais, o bagaço de cana-de-açúcar é um dos materiais lignocelulósicos com maior potencial para bioconversão em etanol, uma vez que os mesmos apresentam alta concentração de carboidratos, baixo conteúdo relativo de lignina, e baixo custo de colheita, de transporte e de armazenagem (GOUVEIA, NASCIMENTO e SOUTO-MAIOR, 2009).

O bagaço (Figura 7) e a palha de cana-de-açúcar (Figura 8) representam, em média, 14% da planta, ou seja, um total de 280kg de material lignocelulósico por tonelada de cana processada (140 kg de palha e 140 kg de bagaço, chamada de matéria seca). A atual previsão do total de cana-de-açúcar produzido – safra 2012/13 – é de 595,13 milhões de toneladas, o que geraria um total de 167 milhões de toneladas dessa biomassa vegetal (CONAB, 2012).

A palha deixada no solo após a colheita mecanizada da cana-de-açúcar (Figura 8), tem a finalidade fertilizante, pois retorna os nutrientes via processo de mineralização, controla os processos erosivos, estabelece maior retenção de água e proporciona aumento na microbiota do solo (BERTONCINI, 2008).

**Figura 7-** Bagaço de cana-de-açúcar acumulado na indústria.



Fonte: <http://colunadosardinha.files.wordpress.com>, acesso em 22/07/2010.

**Figura 8-** Palha deixada no solo após a colheita de cana crua (sem queimar).



Fonte: (<http://www.colheitamecanizadacanaacrua.com.br>; acesso em 22/07/2010)

Já o bagaço (Figura 7) é utilizado em parte pela indústria sucroalcooleira para gerar energia elétrica pela queima por meio de sistema de caldeiras, por não oferecer custos de transporte e por encontrar-se disponível em grande quantidade. A queima de 6,5 toneladas de bagaço gera 1MWh de energia (NUNES SILVA, 2009). Entretanto, há um excedente de 10-30% dependendo do tipo de caldeira empregada que poderia ser destinado à bioconversão em etanol (CÂNDIDO *et al.*, 2009). Pode-se calcular um excedente de 8 a 24 milhões de toneladas para a safra de 2012/13. Segundo modelagens de Furlan *et al* (2012) para uma

biorrefinaria de produção de etanol 2G, uma fração desse excedente de bagaço deve ser destinado a geração de vapor para cobrir aos gastos energéticos acrescidos e o restante do excedente, deve ser empregado integralmente para as etapas seguintes de produção de etanol 2G.

## **2.3 PRODUTOS OBTIDOS A PARTIR DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS**

### **2.3.1 Etanol de celulose**

Na bioconversão em etanol, o primeiro passo é a transformação do material lignocelulósico em açúcares fermentescíveis. Esta etapa envolve a combinação dos pré-tratamentos físico e químico, a fim de romper a recalcitrância do material, e o tratamento hidrolítico, utilizando enzimas, para a subsequente liberação dos açúcares fermentáveis (GALBE, 2002). Por fim, pode-se utilizar microrganismos fermentadores desses açúcares e produzir etanol.

Segundo Van Maris *et al.* (2006), a hexose glicose representa 39% da composição molecular do bagaço de cana. No entanto, a mesma se encontra polimerizada formando as cadeias de celulose.

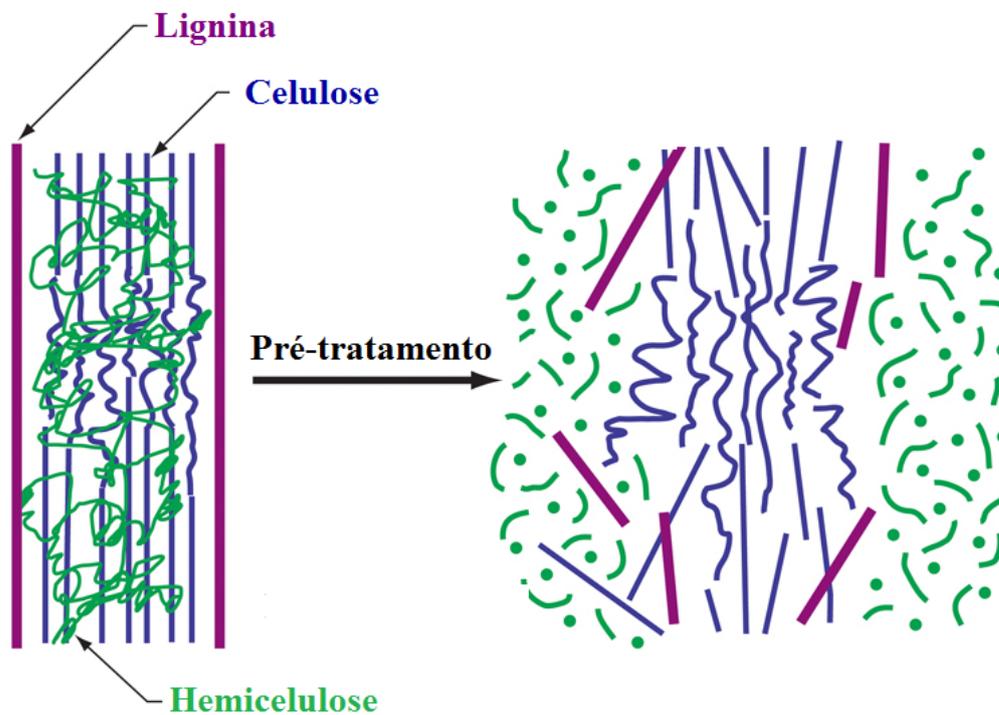
Para eliminar a recalcitrância dos materiais lignocelulósicos e disponibilizar os açúcares constituintes, torna-se necessário um pré-tratamento para romper a parede celular, bem como diminuir a cristalinidade da celulose e a associação com a lignina (WYMAN *et al.*, 2005). Após estes tratamentos, os constituintes celulose, hemicelulose e lignina se separam (Figura 9), permitindo assim que os complexos enzimáticos de celulases tenham acesso à macroestrutura da biomassa (MORAES, 2009).

Na próxima etapa, a hidrolítica, ocorre a conversão da celulose em glicose. Esse passo é uma difícil tarefa devido à cristalinidade do substrato. Porém complexos de enzimas celulases mostram-se capazes de catalisar a reação de hidrólise eficientemente e com a vantagem de não gerar compostos inibidores para a etapa fermentativa (MORAES, 2010).

Essa conversão dar-se-á pelo sinergismo de ação de três grupos principais de enzimas: 1) Endoglucanases ( $\beta$ -1,4-glicano-glicanoidrolase), as quais são responsáveis por dividir aleatoriamente a cadeia da celulose, possibilitando a formação de cadeias menores de celotriose, celobiose e glicose; 2) Exoglucanases ( $\beta$ -1,4-glicano-celobiohidrolases), as quais agem nas extremidades não redutoras das cadeias produzindo frações de celobiose ou glicose, e, por fim; 3) Glicosidases ( $\beta$ -glicosidases), as quais convertem as moléculas de celobiose em

duas moléculas de glicose (REYES; PERALTA-ZAMORA e DURÁN, 1998; ZHANG; HIMMEL; MIELENZ, 2006).

**Figura 9** - Fracionamento dos constituintes da biomassa após pré-tratamento.



Fonte: MORAES, 2009.

A glicose resultante da etapa hidrolítica é então fermentada a etanol. O microrganismo mais frequentemente utilizado para a fermentação de etanol em processos industriais a partir de hexoses é a *S. cerevisiae*, que também mostrou ser robusto e adequado para a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1993).

Há ainda um processo dito muito promissor para a produção de etanol de celulose que é chamado de SSF (Simultânea Sacarificação e Fermentação), ou seja, a junção das etapas de sacarificação (hidrólise) e de fermentação. Com isso consegue-se maiores rendimentos e produtividade em etanol e também menor consumo energético (SANCHEZ e CARDONA, 2008).

### 2.3.2 Produtos obtidos a partir de hemicelulose

A bioconversão de xilanas, principal componente da hemicelulose em produtos de valor agregado, requer várias etapas: (i) pré-tratamento (químico, físico ou biológico); (ii) a hidrólise dos polímeros para a produção de moléculas prontamente metabolizáveis (por

exemplo, açúcares hexoses ou pentoses); (iii ) bio-utilização destas moléculas para suportar o crescimento microbiano, ou para a produção de produtos químicos; e (iv) separação e purificação (HOWARD *et al.*, 2003).

O fracionamento da xilana pode ocorrer por hidrólise química utilizando ácido ou base, ou por enzimas hidrolíticas, as xilanases. Os produtos decorrentes são utilizados em vários segmentos da indústria: de papel, panificação, bebidas, alimentos, ração animal, farmacêutica e química fina (MANRICH, 2012). A seguir estão descritos alguns desses produtos.

### **2.3.2.1 Xilo-oligossacarídeos**

Os xilo-oligossacarídeos (XOS) são cadeias formadas por 2 a 7 unidades de xilose. Suas propriedades vêm ganhando espaço nas indústrias farmacêutica e química fina, e como ingrediente alimentar (MANRICH, 2012). Têm como principal característica a ação pré-biótica, sendo seletivamente fermentados por algumas bactérias intestinais, principalmente bifidobactérias e lactobacilos. Desse modo, favorecem a produção de ácidos graxos de cadeia curta que são benéficos à saúde humana (GULLÓN, 2011; AACHARY e PRAPULLA, 2011).

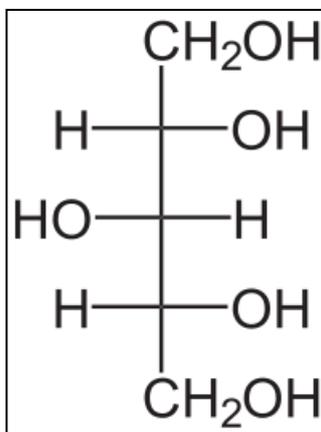
Os XOS podem ser obtidos por via enzimática ou por hidrólise ácida parcial da hemicelulose. Por rota enzimática, acontece o rompimento interno das cadeias por meio das endoxilanases. Pela via química, bastante utilizada, a xilana é parcialmente hidrolisada, entretanto pode ocorrer degradação dos açúcares com geração de compostos tóxicos como furfural e hidroximetil-furfural, bem como de derivados de lignina e de monossacarídeos, que devem ser separados do produto final (MANRICH, 2012).

### **2.3.2.2 Xilitol**

Xilitol é um poliól de cinco carbonos (Figura 10), usado como um adoçante alimentar natural (NIGAM e SINGH, 1995) e em formulações de cremes dentais, pois possui aplicações odontológicas como a remineralização dos dentes e propriedades antimicrobianas (ROBERTO, MUSSATO e RODRIGUES, DOMINQUEZ e DOMINQUEZ, 2003; PARAJO *et al.*, 1998). Também é bastante utilizado na indústria alimentícia: em gomas de mascar,

doces, refrigerantes e sorvetes. Garante uma sensação de agradável frescor devido a sua baixa temperatura de solução (DHIMAN, SCHARMA e BATTAN, 2001).

**Figura 10** - Estrutura molecular do xilitol.



Sua grande demanda pela indústria alimentícia e farmacêutica, levou ao desenvolvimento de processos de baixo custo para a produção de xilitol. A recuperação de xilitol a partir da fração de xilana é cerca de 50-60%, ou 8-15%, com base na matéria-prima utilizada (DHIMAN, SCHARMA e BATTAN, 2001).

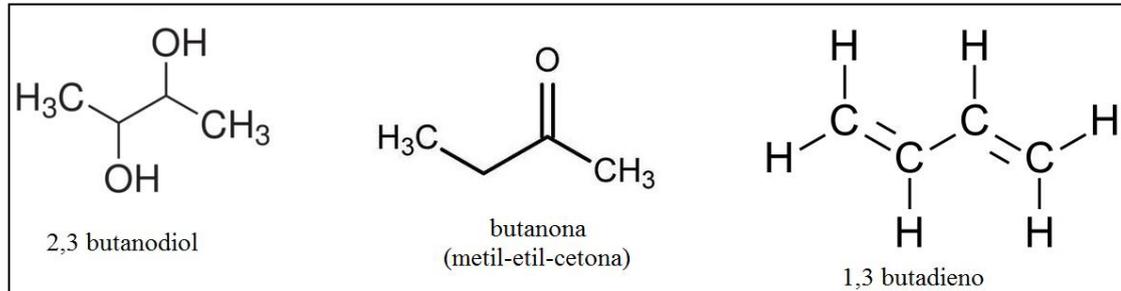
Xilitol é produzido industrialmente por hidrogenação catalítica da xilose pura, que é obtida por hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos (HYVÖNEM; KOIVISTOINEM e VOIROL, 1982).

Canilha (2006) mostrou que xilitol também pode ser bioconvertido a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo utilizando a levedura *Candida guilliermondii*.

### 2.3.2.3 Solventes e Matérias-Primas

O produto 2,3-butanodiol, obtido a partir do hidrolisado hemicelulósico, é um composto químico que pode ser utilizado como matéria-prima para muitas aplicações industriais, como: combustível, solvente líquido e precursor de vários polímeros sintéticos e resinas. A desidratação do 2,3-butanodiol produz o metil-etil-cetona, um solvente industrial muito mais apropriado devido ao seu menor ponto de ebulição. Após a desidratação do 2,3-butanodiol, produz-se o 1,3-butadieno, matéria-prima para produção de borracha sintética e também um monômero importante na indústria dos polímeros (HOWARD *et al.*, 2003). A estrutura química desses solventes é apresentada na Figura 11.

**Figura 11** - Solventes a partir de hidrolisados hemicelulósicos.



Fonte: Acervo próprio.

#### 2.3.2.4 Produtos diversos

Outros produtos de valor agregado a partir de hidrolisados de hemicelulose são relacionados a seguir.

O ácido láctico é utilizado nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética. É um componente do polilactato, um polímero biodegradável, produto para o qual é esperado o crescimento significativo no mercado.

O furfural é utilizado para a produção de vernizes, plásticos e pesticidas (ZEITCH, 2000; MONTANE *et al.*, 2002).

O ácido ferúlico pode ser convertido em ácido vanílico pela enzima estearase de *A. niger*, e então reduzido à vanilina, um conhecido aromatizante (PRIEFERT RABENHORST e STEINBUCHER, 2001).

Géis e filmes podem ser produzidos a partir de hemicelulose. Gabrielli *et al.* (2000) produziram hidrogéis de hemicelulose com quitosana em meio acidificado. Hartman, Albertsson e Sjöberg. (2006), desenvolveram um material derivado da hemicelulose com potencialidade para a produção de filmes com capacidade de barreira em relação ao oxigênio, por meio da benzilação da hemicelulose.

### 2.3.2.5 Etanol de Hemicelulose

A xilose presente na hemicelulose é o segundo maior componente do bagaço, representando cerca de 22,1% (VAN MARIS *et al.*, 2006).

Brienzo, Siqueira e Milagres (2009) analisaram a composição da hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar e verificaram as proporções de 80,9% de xilose, 3,8% de arabinose, 4,2% de glicose e 3,2% de ácido glucurônico.

A tecnologia de produção de etanol no Brasil a partir de hexoses (glicose e frutose) é bem consolidada, sendo caracterizada pelo uso de leveduras *S. cerevisiae* para a fermentação desses açúcares (CARVALHO JR. e GALVÃO, 2008). No entanto, para a xilose, uma aldose, não existe até o momento uma tecnologia de conversão em etanol escalonável plenamente estabelecida.

A xilose pode ainda ser usada como substrato na produção de xilitol, ácidos acético e lático, polímeros de plásticos biodegradáveis e resinas, dentre outras aplicações (LACHKE, 2002). Além disso, ao contrário da celulose e da lignina, a hemicelulose pode ser facilmente extraída da biomassa vegetal e hidrolisada aos seus açúcares constituintes, principalmente a xilose, por meio de lavagem a quente com solução de ácido diluído (UM e BAE, 2011). Essa fração rica em xilose é então passível de ser bioconvertida a etanol.

Embora *S. cerevisiae* seja o microrganismo mais cotado para a fermentação em análise, sabe-se que essa levedura não consegue fermentar xilose eficientemente de maneira natural (KUYPER *et al.*, 2004).

Uma forma de utilizar *S. cerevisiae* – que tem como especificidade robustez e características ideais para a fermentação alcoólica – é, primeiramente, isomerizar xilose em xilulose (açúcar fermentável pela *S. cerevisiae*) utilizando a enzima xilose isomerase e então, em uma segunda etapa, fermentar a xilulose a etanol (OLSSON e HAHN-HAGERDAL, 1996).

A dificuldade na produção de etanol a partir de xilose/xilulose é explicada pelas características do metabolismo dessas pentoses em leveduras, conforme esquematizado na Figura 12 e detalhado a seguir.

## 2.4 METABOLISMO DE XILOSE POR *S. CEREVISIAE*

O primeiro passo para a metabolização de um açúcar por um microrganismo é a entrada do mesmo na célula. Para *S. cerevisiae*, o sistema de transporte de xilose é o mesmo utilizado para a glicose. Porém, para pentoses, esse sistema funciona de forma muito ineficiente, apresentando uma velocidade até 200 vezes menor (KÖTTER e CIRIACY, 1993; SINGH e MISHRA, 1995).

*S. cerevisiae* transporta xilose por difusão facilitada quando cultivada em meio complexo com múltiplas fontes de carbono (BATT *et al.*, 1986; VAN ZYL *et al.*, 1989). Outro exemplo de transporte comum em leveduras é a difusão facilitada por sistemas nos quais a translocação do açúcar, através da membrana, é mediada por uma proteína transportadora (BARNETT, 1976; BARNETT, 1981; LAGUNAS, 1993). A difusão facilitada para xilose ocorre através dos transportadores de hexoses codificados pela família de genes HXT (KRUCKEBERG, 1996).

Em *S. cerevisiae*, os transportadores de hexoses exibem elevada afinidade (HXT2, HXT6 e HXT7) e baixa afinidade (HXT1, HXT3 e HXT4) pela glicose, e são ativos em condições de concentração baixa e alta de glicose, respectivamente (BISSON *et al.*, 1993; BOLES e HOLLENBERG, 1997; LEE *et al.*, 2002; WALSH *et al.*, 1994). As proteínas HXT1 e HXT3, de baixa afinidade, possuem  $K_{m_{glicose}}$  entre 50-100mM; HXT2 e HXT7 possuem valores de  $K_{m_{glicose}}$  moderadamente baixos (~cerca de 10mM) e HXT6 e HXT7 são transportadores de alta afinidade, com  $K_{m_{glicose}}$  de ~1-2mM (REIFENBERGER, BOLES e CIRIACY, 1997; SEDLAK e HO, 2004).

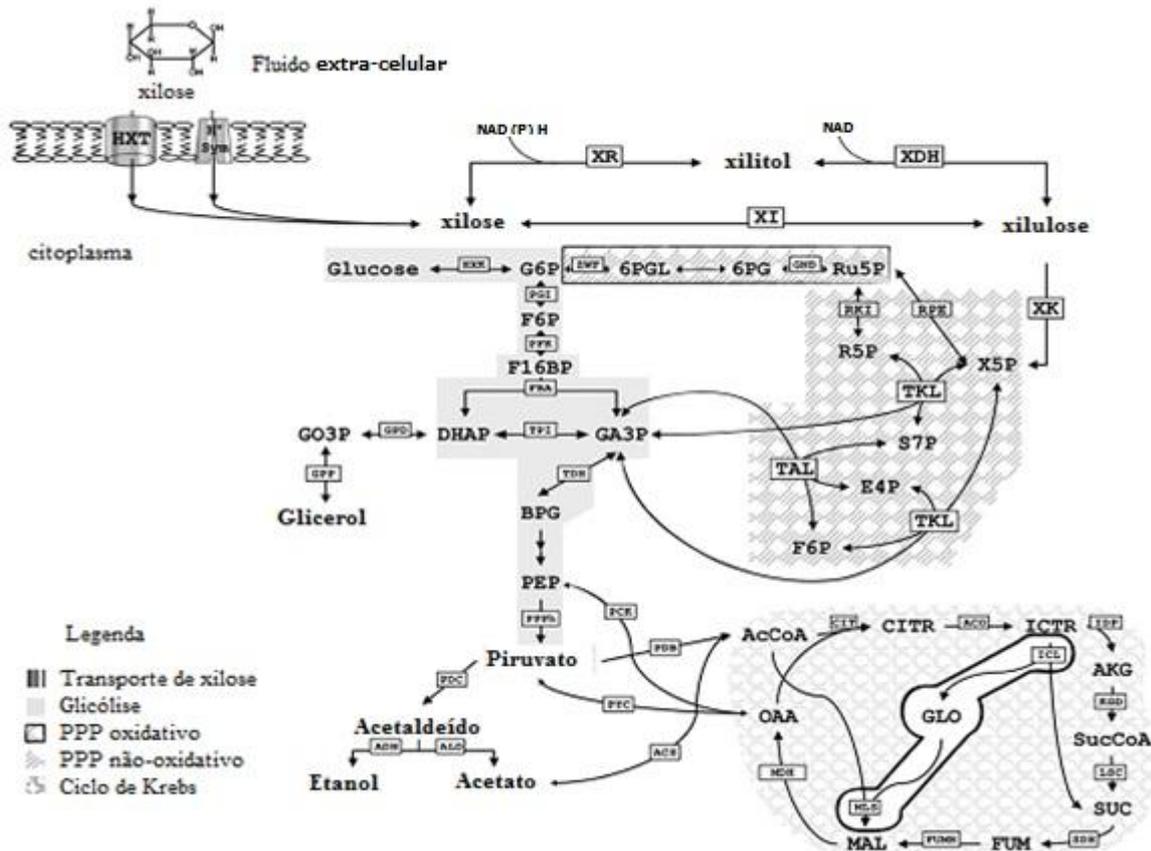
A afinidade preferencial dos transportadores pela xilose é bem menor do que para a glicose (KÖTTER e CIRIACY, 1993; LEE *et al.*, 2002), sendo os valores de  $K_{m_{xilose}}$  cerca de 5-200 vezes maiores (BERTILSSON ANDERSSON e LIDESPIRIT, 2009).

De um modo geral, os valores de  $K_m$  para o transporte de xilose variam entre 130 mM a 1,5 mM (PITKÄNEN *et al.*, 2005) e a captação de xilose é fortemente reprimida por glicose, por causa da competição pelo mesmo transportador (SEDLAK e HO, 2004). A literatura não trata especificamente do transporte de xilulose para o interior da célula. Supõe-se que a entrada dessa pentose ocorra por meio de algum sistema de difusão facilitada como por proteínas de transporte do gênero HXT.

Após o transporte para dentro da célula, o passo seguinte do catabolismo da xilose pelas leveduras é a formação de xilulose intracelular. Isso ocorre num processo

composto por duas etapas: redução de xilose a xilitol por xilose redutase (XR), com a participação de NADPH ou NADH e, na sequência, oxidação do xilitol a xilulose por xilitol desidrogenase (XDH), com a participação de NAD<sup>+</sup> (KÖTTER e CIRIACY, 1993).

**Figura 12** - Descrição geral da via metabólica de xilose encontrada em leveduras incluindo a xilose isomerase (XI) obtida por modificação genética.



Fonte: Adaptado de CHU e LEE, 2007.

Nota: HXT, transportadores de hexose; Sym, simporte; XR, xilose redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XI, xilose isomerase; XK, xiluloquinase; X5P, xilulose-5-fosfato; TKL, transcetolase; TAL, transaldolase; S7P, sedoheptulose-7-fosfato; GA3P, gliceraldeído-3-fosfato; RPE, L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase; Ru5P, L-ribulose 5-fosfato; RKI, ribose-5-fosfato isomerase; R5P, ribose-5-fosfato; E4P, eritrose 4-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; GND, 6-fosfogluconato desidrogenase; 6PG, 6-fosfo-D-Gluconato; 6PGL, 6-fosfo-D-glicono-1,5-lactona; ZWF, glicose-6-fosfato 1-desidrogenase; G6P, glicose-6-fosfato; HXK, hexoquinase; PFK, 6-fosfofrutoquinase; F6P, frutose-6-fosfato; F16BP, frutose 1,6-bifosfato; IGP, glicose-6-fosfato isomerase; FBA, frutose bifosfato aldolase; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GPD, glicerol-3-fosfato desidrogenase; GO3P, glicerol-3-fosfato; GPP, glicerol-3-fosfatase; TPI, triose-fosfato isomerase; TDH, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; BPG, 1,3-bisfosfoglicerato; PEP, piruvato fosfoenol; PPPh fosfoenolpiruvato fosfatase; PDC, piruvato descarboxilase; ADH, álcool desidrogenase; ALD, acetaldeído desidrogenase; ACS, CoA acetil-sintetase; PYC, piruvato carboxilase; PDB, subunidade beta piruvato desidrogenase; PCK, piruvato fosfoenol carboxiquinase; AcCoA, acetil coenzimaA.

Alternativamente, o xilitol produzido pela redução da xilose pode ser excretado para o exterior da célula. A xilulose intracelular é então fosforilada pela enzima xiluloquinase (XK) a xilulose-5-fosfato (X5P), precursor na rota pentose fosfato não oxidativa (PPP). Na interface dessa rota, as enzimas transcetolase (TKL) e L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase (RPE) catalisam intermediários para as rotas glicólise e pentose fosfato oxidativa respectivamente, que, após uma sequência de reações, levam à formação de piruvato (PITKÄNEN *et al.*, 2003). Em condições aeróbias, piruvato é oxidado pelo ciclo do ácido cítrico na cadeia respiratória (fosforilação oxidativa), levando à produção de CO<sub>2</sub>, água e ATP (CHU e LEE, 2007).

Em condições anaeróbias, o piruvato é descarboxilado pela piruvato descarboxilase (PDC) a acetaldeído, que então é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH). Pode ainda haver formação de glicerol e acetato como resultado de desequilíbrio redox gerado na primeira etapa do metabolismo do açúcar (MEINANDER *et al.*, 1996). A Figura 13 ilustra as principais etapas do catabolismo da xilose.

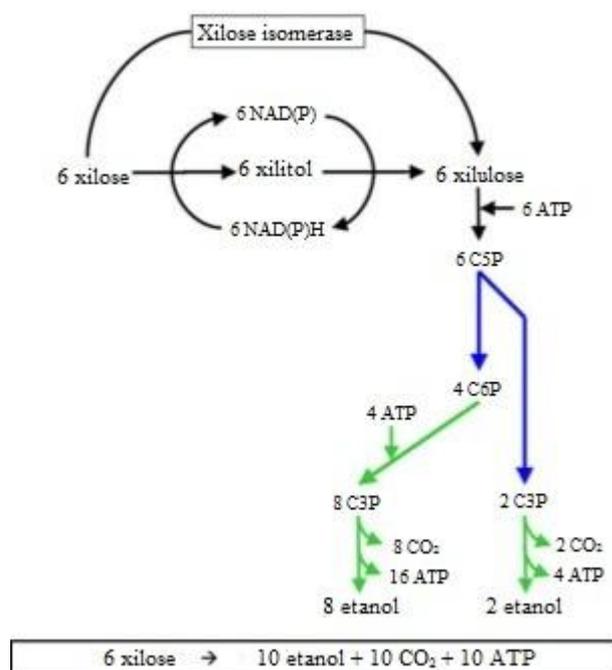
Em leveduras que metabolizam xilose via XR e XDH, o NADH em excesso resultante pode, em princípio, ser eficazmente removido por meio de adição de oxigênio. Estudos sobre os efeitos do oxigênio na fermentação de xilose pelas leveduras (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; GRANSTRÖM, OJAMO e LEISOLA 2001) mostraram que a formação de xilitol pode ser minimizada quando suficiente oxigênio é fornecido. No entanto, o fornecimento de oxigênio em excesso favorece a respiração mitocondrial em detrimento da fermentação alcoólica, o que reduziria o rendimento em etanol.

A regulação da fermentação alcoólica e da respiração celular é controlada por condições como presença ou ausência de oxigênio ou tipo e concentração de substrato, em um caso específico a fermentação alcoólica pode ocorrer quando há excesso de substrato mesmo em condições aeróbias é o chamado efeito *Crabtree* e várias leveduras exibem essa característica (MORAIS 2009).

Uma alternativa promissora proposta por Kuyper *et al.* (2004) é apresentada na Figura 13. De acordo com estes autores, uma fermentação alcoólica anaeróbica de xilose sem formação de xilitol só é possível quando as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) têm correspondência nas especificidades da coenzima. Isto ocorre na conversão de xilose em xilulose por xiloseisomerase (XI, EC 5.3.1.5) presente em algumas bactérias do domínio Archaea. Nenhum NADH excedente é gerado desde que os equivalentes de redução necessários para XR sejam gerados pela XDH. As reações oxidativas das

pentoses-fosfato não são necessárias em uma conversão redox neutra de xilose em xilulose. Só este cenário permite a ausência de subprodutos reduzidos (glicerol, xilitol) e a produção de quantidades equimolares de etanol e CO<sub>2</sub>.

**Figura 13** - Diferentes opções metabólicas para a fermentação alcoólica de xilose com um balanço redox.



Fonte: KUYPER *et al.*, 2004

Nota: As cores indicam as vias centrais no metabolismo de carboidratos; azul: reações de rearranjo no ciclo das pentoses-fosfato; verde: glicólise.

Abreviaturas: C6P: hexose-6-fosfato, C5P: pentoses-5-fosfato, e C3P:triose-3-fosfato. (a) NADPH-específica xilose redutase e NAD-específica xilitol desidrogenase (aeróbico). (b) NADPH-específica xilose redutase e NAD-específica xilitol desidrogenase (anaeróbico). (c) Xilose redutase com a especificidade do cofator duplo (NADPH / NADH) e NAD-específica xilitol desidrogenase. (d) Xilose redutase e xilitol desidrogenase combinados com especificidades no cofator (equivalente a xilose isomerase).

## 2.5 ESTRATÉGIAS PARA A OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE XILOSE

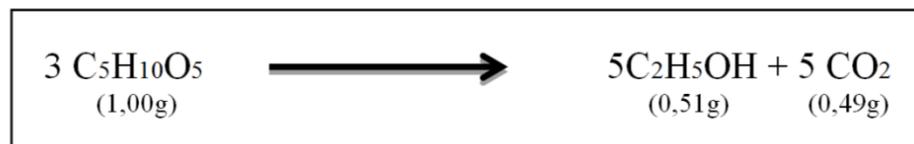
### 2.5.1 Conversão a etanol por microrganismos fermentadores de xilose

Bactérias, leveduras e fungos tanto naturalmente ocorrentes quanto recombinantes são os microrganismos mais cotados e eficientes para a fermentação de xilose em etanol, dentre os quais, alguns estudados na literatura estão apresentados na Tabela 3.

A produtividade volumétrica total de etanol, como referida na Tabela 3, é expressa em gramas por litro por hora e é definida como a concentração de etanol final dividido pelo tempo de fermentação total.

Segundo a equação química abaixo representada pelas fórmulas mínimas, a conversão de xilose em etanol tem um rendimento máximo teórico de 0,51 g de etanol para cada 1,00g de xilose. Esse é o mesmo rendimento para a glicose.

**Figura 14** - Equação estequiométrica de formação de etanol a partir de xilose.



Fonte: acervo próprio.

Apesar da abundância na natureza e da facilidade de obtenção, a assimilação de xilose e sua conversão, predominantemente em etanol, são observadas para poucas leveduras. Das 200 espécies de leveduras fermentativas facultativas que podem crescer em xilose, poucas catalisam a sua conversão anaeróbica em etanol (TOIVOLA *et al.*, 1984). Dentre as poucas com potencial para a obtenção de etanol, Olsson e Hahn-Hägerdal. (1996) mencionam leveduras do gênero *Candida* (espécies *blankii*, *famata*, *fructus*, *guilliermondii* e *sp*); *Kluyveromyces cellobiovorus* e *marxianus*; *Pichia segobiensis* e *stipitis* e *Schizosaccharomyces pombe*. Entretanto, *S. cerevisiae*, a levedura industrialmente mais empregada para a produção de etanol, não consegue metabolizar xilose de forma eficiente e conseqüentemente produzir etanol.

A modificação genética é um método muito utilizado para vencer esses obstáculos metabólicos impostos pelos microrganismos. Kuyper *et al.* (2004), após uma extensiva seleção de linhagens de *S. cerevisiae*, clonaram genes do fungo *Piromyces sp.* na levedura, com intuito de produzir a enzima xilose isomerase. Além disso, superexpressaram enzimas da rota pentose fosfato, xiluloquinase (EC 2.7.1.17), ribulose 5-fosfato-isomerase (EC 5.3.1.6), ribulose 5-fosfato-epimerase (EC 5.3.1.1), transcetolase (EC 2.2.1.1) e transaldolase (EC 2.2.1.2), as quais estão envolvidas na conversão de xilulose em intermediários glicolíticos. E, finalmente, suprimiram o gene que codifica a GRE3 aldose redutase para minimizar ainda mais a produção de xilitol. Após todas estas modificações, os autores observaram melhor consumo de xilose e maior rendimento em etanol, que alcançou 0,43 g.g<sup>-1</sup>, ficando próximo ao teórico. Surpreendentemente, a levedura conseguiu crescer

anaerobiamente em xilose. Porém, as fermentações foram muito longas e, conseqüentemente, com baixa produtividade em etanol, o que pode ser atribuído à baixa eficiência do sistema de transporte de xilose, não modificado pelos autores.

Dentre os organismos recombinantes, é importante destacar as bactérias *Escherichia coli* B, pLOI297, *E. coli* B KOll, *Klebsiella oxytoca* M5A1, por apresentarem os maiores valores em rendimento e produtividade em etanol, dentre os relacionados na Tabela 3. Esses microrganismos recombinantes foram construídos, inseridos genes *pdC* e *adh* de *Zymomonas mobilis*, possibilitando o desvio do metabolismo do piruvato para etanol ao invés de ácidos orgânicos, essa estratégia permitiu uma conversão de xilose em etanol com eficiência superior a 95% em relação ao rendimento teórico máximo (LIMA; TAKAHASHI E ALTERTHUM 2002).

Embora os microrganismos geneticamente modificados possuam características interessantes por conseguirem metabolizar eficientemente pentoses e hexoses, sua utilização em ambiente industrial é questionada, devido aos problemas relacionados à estabilidade genética, rendimento global em etanol e capacidade de sobrevivência em condições de fermentação industrial (DIEN *et al.*, 2003; JEFFRIES, 2006).

Uma alternativa para a produção de etanol a partir de xilose é a conversão de xilose em xilulose pela enzima glicose isomerase *ex-situ*, seguida pela fermentação desse açúcar pela *S. cerevisiae* a etanol (GONG *et al.*, 1981; CHANDRAKANT e BISARIA, 2000), analisada a seguir.

**Tabela 3 -** Microrganismos fermentadores de xilose.

Cultura	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento em etanol (g.g <sup>-1</sup> )	Produtividade em etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<b>Bactéria naturalmente ocorrente</b>				
<i>Bacillus macerans</i> DMS 1574	20	3,3	0,16	0,03
<i>Bacteroides polypragmatus</i> NCRCC 2288	44	6,5	0,15	0,09
<i>Clostridium saccharolyticum</i> ATCC 35040	25	5,2	0,21	0,05
<i>C. thermohydrosulfuricum</i> 39E	5	2,0	0,39	-
<i>Erwinia chrysanthemi</i> B374	5	-	0,23 <sup>a</sup>	-
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i> ATCC 31938	4	1,5	0,36	-
<b>Bactéria Recombinante<sup>b</sup></b>				
<i>Erwinia chrysanthemi</i> B374 (pdC)	5	-	0,44 <sup>a</sup>	-
<i>Escherichia coli</i> B, pLOI297 (pc/c, adhB)	80	39,2	0,49	0,70 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i> B KOll (pdC, adhB, frd-)	80	41,6	0,52	0,87
<i>Klebsiella oxytoca</i> M5A1 (pdC, ac/hB)	100	46,0	0,46	0,96
<i>K. planticola</i> SDF20 (pde, pf/)	17	7,7	0,44	0,18

Cultura	Xilose (g/L)	Etanol (g/L)	Rendimento em etanol (g.g <sup>-1</sup> )	Produtividade em etanol (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
<i>Zymomonas mobilis</i> CP4 (pZB5)	25	11	0,44	0,57
<b>Levedura naturalmente ocorrente</b>				
<i>Candida blankii</i> ATCC 18735	50	5,1	0,10	0,07
<i>C. famata</i>	20	3,9	0,20	0,07
<i>C. fructus</i> JCM-1513	20	4,7	0,24	0,02
<i>C. guilliermondii</i> ATCC 22017	40	4,5	0,11	0,04
<i>C. shehatae</i> CBS 4705	50	24,0	0,48	0,19
<i>C. shehatae</i> CSIR-Y492	90	26,2	0,29	0,66
<i>C. sp.</i> CSIR-62 A/2	50	20,1	0,40	0,42
<i>C. tenuis</i> CBS 4435 (11) <sup>d</sup>	20	6,4	0,32	0,03
<i>C. tropicalis</i> KY 5014 (2)	20	2,8	0,14	0,06
<i>Clavispora sp.</i> UWO(PS) 83-877-1 (11)	20	5,9	0,30	0,11
<i>Kluyveromyces cellobiovorus</i> KV 5199 (3)	20	4,4	0,22	0,09
<i>K. marxianus</i>	20	5,6	0,28	0,10
<i>Pachysolen tannophilus</i> NRRL Y-2460	20	6,2	0,31	0,06
<i>P. tannophilus</i> RL 171	50	13,8	0,28	0,28
<i>Pichia segobiensis</i> CBS 6857	20	5,0	0,25	0,02
<i>P. stipitis</i> CBS 5773 (5)	20	5,9	0,30	0,02
<i>P. stipitis</i> CBS 5776	50	22,3	0,45	0,34
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> ATCC 2478 (8)	50	5,0	0,10	0,07
<b>Levedura recombinante<sup>b</sup></b>				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (XYL 1, XYL 2)	21,7	1,6	0,07	0,07
<i>S. cerevisiae</i> TJ 1 (XYL I, XYL 2)	50	2,7	0,05	0,02
<i>S. cerevisiae</i> H560 (XYL 1, XYL 2)	49,2	0,3	0,01	0,01
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (xyl A)	50	21,0	0,42	0,19
<b>Fungos</b>				
<i>Aeurobasidium pullulans</i> (2)	20	4,2	0,21	0,09
<i>Fusarium avenaceum</i> VTT-D-80146 (5)	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. clamydosporum</i> VTT-D-77055	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. culmorum</i> VTT-D-80148 (3)	50	12,0	0,24	0,07
<i>F. graminearum</i> VTT-D-79129 (4)	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. lycopersici</i> ATCC 16417	50	16,0	0,32	0,17
<i>F. oxysporum</i> VTT-D-80134 (3)	50	25,0	0,50	0,17
<i>F. sambucium</i> VTT-D-77056	50	13,0	0,26	0,08
<i>F. solani</i> VTT-D-77057 (2)	50	11,0	0,22	0,07
<i>F. tricinetum</i> VTT-D-80139 (2)	50	7,0	0,14	0,04
<i>Monilia sp.</i>	50	12,6	0,25	0,08
<i>Mucor</i> 105 (2)	50	8,0	0,16	0,08
<i>Neurospora crassa</i> NCIM 870	20	6,9	0,35	0,04
<i>Paecilomyces sp.</i> NFI ATCC 20766	100	39,8	0,40	0,24

Fonte: OLSSON e HÄGERDAL, (1996)

Nota: <sup>a</sup>g de etanol/g de xilose consumida. <sup>b</sup>os genótipo relevantes estão indicados entre parênteses. pdc, piruvato descarboxilase; pfl, piruvato formatolase; adhB, álcool desidrogenase II; frd, fumarato redutase, pZB5 transporta os genes para a xilose isomerase, xilulokinase, transcetolase, e transaldolase, XYL 1, xilose redutase;

XYL 2, desidrogenase xilitol; xyl A, xilose isomerase. <sup>c</sup>Produtividade volumétrica máxima. <sup>d</sup> número entre parênteses denotam quantidade de linhagens estudadas.

### 2.5.2 Isomerização e fermentação simultâneas (SIF)

A isomerização da xilose em xilulose pela enzima xilose isomerase é uma reação reversível e o equilíbrio é favorável no sentido da formação da xilose. Por isso, executando a isomerização e fermentação em simultâneo, consegue-se deslocar o equilíbrio da reação de isomerização no sentido de formação de xilulose. No entanto, no caso do processo simultâneo, a escolha do pH e da temperatura precisa ser um compromisso entre os valores ótimos para a enzima e para o microrganismo (DU PREEZ, 1994).

O pH ótimo de fermentação para a levedura *S. cerevisiae* é 5,0, enquanto, para a isomerização, a enzima XI é mais ativa e estável a pH neutro. Da mesma forma, a enzima apresenta atividade máxima a ~80 °C, enquanto *S. cerevisiae* é normalmente cultivada na faixa de 30 a 37°C. Contudo, ambas, isomerização e fermentação, podem ocorrer a pHs intermediários entre 5,5 e 6,0 e à temperatura de 37 °C e, apesar das diferenças entre as velocidades de isomerização e fermentação, os rendimentos finais em etanol podem ser altos (LASTICK *et al.*, 1990). O uso de XI imobilizada permitiria a utilização de alta concentração do biocatalisador no reator, compensando as baixas velocidades de isomerização que ocorrem devido à operação em pH e temperatura abaixo dos valores ótimos para a enzima.

Chiang *et al.* (1981) realizaram experimentos SIF variando pH, temperatura e quantidades de levedura comercial de panificação e constataram que, na condição de isomerização e fermentação simultâneas de D-xilose por D-xilose isomerase e levedura, o pH ótimo foi 6 e a temperatura ótima foi 37 °C. Sob estas condições de fermentação ótimas, uma produção de 0,45 g de etanol, 0,1 g de xilitol e 0,02 g de glicerol por g de D-xilulose consumida foi observada.

Além do trabalho de Chiang *et al.* (1981), outros pesquisadores têm estudado a alternativa tecnológica da isomerização e fermentação simultâneas para obtenção de etanol a partir de hemicelulose ou xilose. A Tabela 4 apresenta as principais características de alguns desses trabalhos. Observa-se que a maioria dos experimentos foi conduzida em reatores convencionais (tipo tanque agitado), de pequeno volume, sem imobilização ou então utilizando casca de ovo como suporte. Consequentemente, valores de tempo de reação superiores a 24 horas são observados. Considerando a necessidade de oferecer uma alta carga

de enzima e de levedura para acelerar o processo, os dados reunidos na Tabela 4 sugerem um baixo potencial de *scale-up* para os processos convencionais de SIF.

**Tabela 4** - Estudos sobre a produção de etanol por isomerização e fermentação simultâneas.

Referência	GONG <i>et al.</i> (1981)	LASTICK <i>et al.</i> (1989)	CHANDRAKAN T <i>et al.</i> (2000)	NAKATA <i>et al.</i> (2009)
Processo	SIF	SIF	SICF	SIF
Pré-tratamento			hidrólise ácida	água quente comprimida
Fonte de Açúcares	xilose (120 g/L)	6% de xilose	xilose (70 g/L), glicose (30 g/L)	faia japonesa (3,78 g/L xilose)
Leveduras	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , de Panificação (4.10 <sup>8</sup> cél./massa seca/mL)	<i>S. pombe</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NRRL-2358)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (NBRC-0203)
Enzimas	xiloseisomerase (100 g/L)	xiloseisomerase (10 g/L)	xiloseisomerase (10 g/L)	β-isomerase, xilosidase xilose
Imobilização	Células de <i>Bacillus sp.</i>	Sem	casca de ovo (4,5 UI/g xilose inicial)	Sem
Volume Reacional		25 mL	100 mL	3 mL
Temperatura (°C)	40	35	30-35	40
pH	6	5,75	5	6
Agitação	650 rpm	Sem	Sem	Sem
Aeração	Anaeróbio	Anaeróbio	Anaeróbio	Anaeróbio
Período da SIF	24 horas	2 dias	72 horas	100 horas
Conversão	85%		42,8%	
Produto gerado		21,0 g/L de etanol	22,3 g/L de etanol	2,74 g/L de etanol
Subprodutos		3,5 g/L de xilitol		

Fonte: Acervo próprio.

Nota: SIF - Simultânea Isomerização e Fermentação, SICF - Simultânea Isomerização e Cofermentação, Todos os estudos conduzidos em batelada.

Por outro lado, Trovati (2001) e Giordano (1992) estudaram a sacarificação e fermentação simultâneas do amido de mandioca a fim de produzir etanol utilizando um sistema contínuo constituído por três reatores de leito fixo em série, contendo glucoamilase imobilizada em partículas de sílica e coimobilizada com *S. cerevisiae* em gel de pectina. Altos

valores de produtividade e rendimento em etanol, correspondente a 92% do teórico, foram alcançados nesse sistema, o qual foi operado por 275 h sem indicação de desestabilização.

### 2.5.2.1 Xilose Isomerase (XI)

A enzima XI é geralmente conhecida como glicose isomerase (EC 5.3.1.5) e faz parte do grupo cetol isomerase que possui por volta de 20 enzimas. Ao comparar as constantes cinéticas de xilose isomerases de diferentes microrganismos com D-glicose ou D-xilose como substrato, o quadro geral é uma  $V_{max}$  (velocidade máxima) de ordem de magnitude similar, mas um  $K_M$  (constante de Michaelis-Menten) de ordem de grandeza duas vezes maior quando o substrato é glicose. Contudo, o nome recomendado é xilose isomerase (TANAKA, TOSA e KOBAYASHI., 1993).

A XI é uma enzima intracelular produzida por uma série de microrganismos (*Streptomyces albus*, *Thermus aquaticus*, *Bacillus coagulans* e outros), por isso seu elevado custo. O pH ótimo da atividade enzimática varia de microrganismo para microrganismo, mas em geral está situado em torno de 7 a 9. Muitas aplicações da xilose isomerase têm temperatura ótima entre 75 e 85°C. Na maioria dos casos, a xilose isomerase possui uma estrutura tetramérica. Cátions metálicos divalentes ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Co^{2+}$ ) desempenham um papel importante na atividade da xilose isomerase e dependendo do cátion, pode contribuir para a termoestabilidade da enzima (EPTING, 2004).

Xilose isomerase é empregada industrialmente em larga escala no processo de produção de xaropes de glicose rico em frutose (OLIVIER DU TOIT, 1986), o qual consiste em 3 etapas: sacarificação do amido de milho, isomerização da D-glicose e tratamento do produto. A isomerização ocorre em reatores contínuos de leito fixo associados em série; o pH é o ótimo para a atividade da enzima; e a temperatura é a ambiente (exceto em casos de capacidade de produção limitada).

### 2.5.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Na biotecnologia e nos bioprocessos, a utilização de microrganismos tem imensa importância. Para o Brasil, o interesse é econômico e a levedura *S. cerevisiae* apresenta grande destaque principalmente na produção de pães, bebidas e etanol (SILVA, 2006).

*Saccharomyces cerevisiae* é um fungo unicelular haploide que se reproduz de forma assexuada por meio de brotamento, chamado também de crescimento vegetativo. A célula-mãe apresenta na parede celular uma saliência a qual cresce gradativamente e onde se origina uma nova célula. Os citoplasmas de ambas as células permanecem unidos durante algum tempo até que a abertura por onde há passagem de material intracelular se fecha, originando a célula-filha, fisiologicamente distinta da célula-mãe (SILVA, 2006).

Diferente do processo de produção de etanol dos EUA – o maior produtor deste biocombustível do mundo –, o Brasil utiliza o reciclo de células em que 90% da levedura é reutilizada de uma fermentação para a outra, resultando em condições fermentativas com alta densidade celular, cerca de 10-17% em massa úmida a qual contribui para tempos mais curtos de fermentação (em torno 6-11 horas) e alcançando concentrações de etanol entre 8-11% (v/v) (BASSO *et al.*, 2008).

Segundo Souza (2009), até a década de 90, a maioria das usinas utilizava exclusivamente levedura de panificação para o processo fermentativo. No entanto, constatou-se que a população inicial de levedura no início da safra era substituída por linhagens selvagens. Estas eram responsáveis por problemas fermentativos, como produção excessiva de espuma, velocidade de consumo reduzido dos açúcares e floculação (crescimento filamentoso), e subsequente decantação do fermento. Motivadas, as indústrias de etanol começaram a isolar suas linhagens nativas e, atualmente, algumas são largamente utilizadas pela maioria das usinas brasileiras. Assim, foram sendo nomeadas com as iniciais das unidades de origem onde foram isoladas, por exemplo: a levedura BG-1 (Usina Barra Grande), CAT-1 (Usina Catanduva), PE-2 (Usina da Pedra), SA-1 (Usina Santa Adélia), entre outras (BASSO *et al.*, 2008). As principais características das linhagens industriais atualmente empregadas nas usinas para produção de etanol a partir de sacarose estão relacionadas na Tabela 5.

**Tabela 5** - Características das espécies de *S. cerevisiae*.

Nome	pH	T (°C)	Assimilação específica	Prod. específica	Ye/s	Uso	ref.
<b>CEN.PK113-7D</b>	5	30	1,06 g sacarose. g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	–	0,36 g . g sacarose <sup>-1</sup>	Lab.	Basso <i>et al.</i> , (2011)
<b>BG-1</b>	4,5	40	0,42 g sacarose. g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,42 g et g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,48 g . g sacarose <sup>-1</sup>	Ind.	Souza (2007); Reis (2011)
<b>CAT-1</b>	4,8	37	0,38 g sacarose. g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,48 g et/ g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,48 g . g glicose <sup>-1</sup>	Ind.	Costa (2011); Reis (2011)
<b>PE-2</b>	4,8	37	0,38 g sacarose. g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,40 g et/ g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,49 g . g glicose <sup>-1</sup>	Ind.	Costa (2011); Reis (2011)
<b>SA-1</b>	–	–	0,95 g sacarose. g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,44 g et/ g <sub>seca</sub> <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	0,47 g . g glicose <sup>-1</sup>	Ind.	Reis (2011)

Nota: Lab = laboratorial, Ind = Industrial, g<sub>seca</sub> = massa de levedura seca, Ye/s = rendimento em etanol (g etanol. g substrato<sup>-1</sup>), Prod. específica = produtividade específica (g substrato. g<sub>seca</sub><sup>-1</sup>. h<sup>-1</sup>).

As linhagens PE-2, CAT-1 e BG-1 mostraram uma grande capacidade de competirem com as leveduras selvagens e sobreviverem ao processo fermentativo industrial. Na safra 2007/2008, as linhagens PE-2 e CAT-1 foram as mais utilizadas no Brasil em cerca de 150 destilarias, o que representou 60% do etanol combustível produzido no país (BASSO *et al.*, 2008).

Assim como a enzima, a linhagem de levedura utilizada é de crucial importância para o bom desempenho do processo SIF. Porém, estudos caracterizando a conversão de xilulose em etanol por *S. cerevisiae* são praticamente inexistentes, conforme mostra a Tabela 5. Por outro lado, há vários estudos descrevendo o consumo de sacarose ou glicose por diferentes linhagens industriais ou de laboratório de *S. cerevisiae* em condições fermentativas. Algumas das cepas mais mencionadas na literatura, juntamente com parâmetros que caracterizam o desempenho das mesmas, são apresentadas na Tabela 5.

É possível notar que as espécies possuem uma rápida velocidade de consumo de substrato (glicose ou sacarose) e produtividade em etanol superior a 0,4 g<sub>etanol</sub>/g<sub>substrato</sub>h<sup>-1</sup>, em pH abaixo de 5 e temperaturas entre 30 e 40 °C.

Para comparar a capacidade de fermentação de diferentes linhagens, pode ser calculada a produtividade específica, ou seja, a quantidade de etanol produzida por hora e por grama de massa de células. Esta é a medida mais apropriada para a comparação entre microrganismos, uma vez que a produtividade volumétrica é uma função da densidade celular (OLSSON e HÄGERDAL, 1996).

Outro parâmetro para avaliar linhagens é o rendimento. Pode-se comparar esse parâmetro a outros açúcares no caso de um processo SIF em que a levedura metaboliza pentoses, e revelar linhagens de *S. cerevisiae* que consumam xilulose e produzam preferencialmente etanol.

O microrganismo que tem grande importância para o processo de produção de etanol a partir de biomassa vegetal deve possuir algumas características como: tolerância a compostos tóxicos formados na etapa de pré-tratamento, termotolerância, tolerância a etanol, estabilidade e funcionalidade em faixas mais altas de pH, as quais, serão descritas a seguir.

Durante a etapa de pré-tratamento, podem ser gerados alguns produtos inibidores dos microrganismos fermentadores. Como principais inibidores, o 2-furaldeído (furfural) e o 5-hidroximetil-2-furaldeído (5- hidroximetilfurfural, HMF) são gerados principalmente no pré-tratamento com ácido diluído. Estes compostos danificam as paredes e as membranas celulares, inibem o crescimento celular, reduzem atividades enzimáticas, causam danos ao DNA, inibem a síntese de proteínas e RNA, e reduzem a produção de etanol (COSTA, 2011).

Na produção de etanol de segunda geração, a utilização de linhagens que suportem temperaturas maiores é de grande importância, haja vista que os processos intermediários (hidrólise e isomerização) de produção de etanol celulósico e hemicelulósico utilizam enzimas que possuem temperaturas ótimas de trabalho acima de 40°C. Com a utilização de microrganismos mais termotolerantes, pode-se então aperfeiçoar as etapas de hidrólise, no caso de SSF, ou de isomerização, no caso da SIF. Costa (2011) avaliou a capacidade fermentativa com glicose a 37 e a 42°C de algumas leveduras, dentre elas as leveduras industriais PE-2 e CAT-1. A maior temperatura, o autor constatou que o rendimento diminuiu 43%. Souza *et al.* (2007) realizaram ensaios fermentativos com a levedura BG-1 nas condições de 100 a 200 g/L de sacarose e temperaturas de 37 e 40 °C. O rendimento manteve-se em média  $0,45 \pm 0,02$  para as maiores temperaturas e ainda houve um aumento na produtividade volumétrica de até 24%.

A tolerância a etanol é um importante atributo para microrganismos que se queira empregar na produção de etanol em escala industrial. Com essa qualidade, consegue-se alcançar altos rendimentos em etanol, um importante fator no custo de produção desse biocombustível.

Segundo Stanley *et al.* (2010) e Birch e Walker (2000), etanol, em concentrações relativamente baixas, inibe a divisão celular, diminui o volume celular e, conseqüentemente, a taxa específica de crescimento. Já em altas concentrações, há aumento de morte e diminuição da viabilidade celular. Leveduras isoladas em unidades industriais apresentaram inibição das suas atividades fermentativas em batelada simples a 30°C em concentrações de etanol acima de 8% (v/v), em contrapartida, em concentrações inferiores a 4% (v/v) notou-se uma grande diminuição na formação de biomassa (PERES e LALUCE, 1998).

Estudos realizados por Costa (2011) com placas em meio sólido mostraram que as linhagens CAT-1 e PE-2 conseguem crescer em concentrações de etanol de até 10% (v/v) a 30°C. Souza *et al.* (2007) realizaram experimentos fermentativos com a linhagem BG-1 a 37°C e alcançaram 11,5% de etanol com viabilidade 90% após 6 horas de fermentação.

Outro fator muito importante na produção de etanol pelo processo SIF é o pH, lembrando a divergência na faixa de pH ótima de trabalho entre levedura e enzima, esta envolvida na reação de isomerização que requer pH's mais neutros.

Então almeja-se uma linhagem de levedura que melhor atue próximo a esta faixa de pH, já que o pH em um processo fermentativo atua no controle da contaminação bacteriana e tem efeito no crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM, BASSO e ALVES, 1996).

Existem poucos estudos realizados com leveduras em pH mais neutros. Dorta (2006) constatou queda de brotamento das células da linhagem PE-2 em pH 3,6 ao realizar experimentos fermentativos em condições de estresse como baixo pH, altas concentrações de sulfito, etanol e ácido acético. A produção de etanol por *S. cerevisiae* possui um pH ótimo de trabalho entre 4 e 5. Já em pH 7, há uma diminuição no rendimento em etanol com aumento da produção de ácido acético (SOUZA *et al.*, 2007).

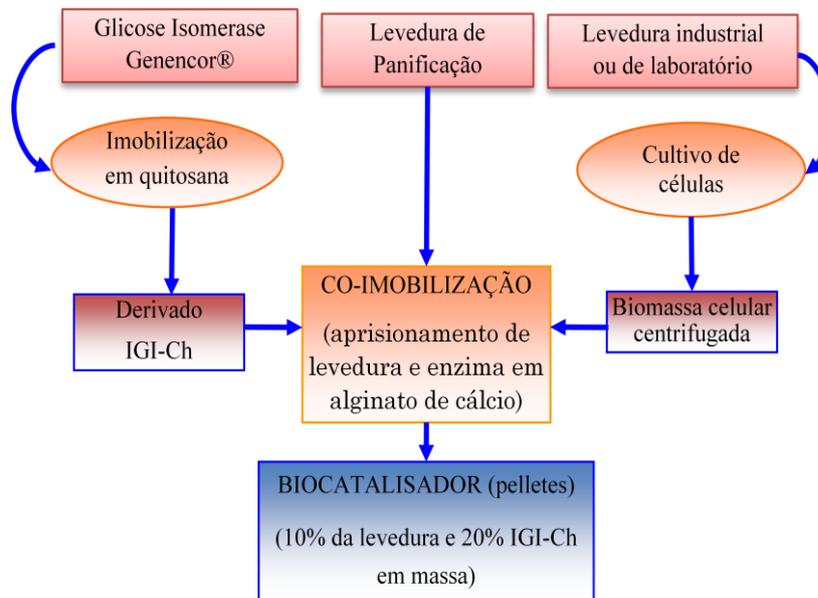
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 GLICOSE ISOMERASE IMOBILIZADA E MICRORGANISMOS

A enzima glicose isomerase da GENENCOR<sup>®</sup> imobilizada em quitosana (IGI-Ch) utilizada nos experimentos foi preparada segundo a metodologia descrita em Silva *et al.* (2012). Foram testadas leveduras de panificação de dois fabricantes (Fleischmann<sup>®</sup> e Itaiquara<sup>®</sup>) adquiridas em supermercados e quatro linhagens gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Andreas Karoly Gombert (DEQ/EP-USP). Três destas últimas linhagens são utilizadas em unidades sucroalcooleiras para a produção de etanol (BG-1, CAT-1 e PE-2). Já a linhagem CENPK.113-7D é comumente utilizada em laboratório para a manipulação genética.

A Figura 15 representa todas as etapas dos experimentos realizados no presente trabalho, as quais serão detalhadas posteriormente.

**Figura 15** – Procedimento experimental



Fonte: acervo próprio

Nota: IGI-Ch = Enzima Glicose isomerase imobilizada em quitosana.

##### 3.1.1 Preparo do suporte e imobilização da glicose isomerase

Quitosana 2% (m/m) foi solubilizada em ácido acético 2% (v/v), após homogeneização a 50°C adicionou-se 1,5 mL de KOH 0,5 M para cada 1 mL da solução de quitosana. A mistura permaneceu sob agitação durante 30 minutos promovendo a formação do gel. Em seguida adicionou-se glutaraldeído na proporção de 0,8 % (v/v) e manteve-se

agitação durante 30 minutos. Após isso, o gel ativado foi lavado com água destilada à temperatura ambiente até pH neutro.

Na etapa de imobilização à temperatura ambiente (25 °C), preparou-se uma solução enzimática contendo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mM) e  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2,5 mM) em pH 7, juntou-se a solução e o suporte ativado sob agitação mecânica durante 24 horas, na proporção de 10 mL da solução para cada 1 g de suporte ativado. A quantidade de enzima adicionada foi de 50 mg de proteína para cada grama de gel ativado. Transcorrido o tempo de imobilização o então chamado derivado (suporte+enzima) foi reduzido com borohidreto de sódio (1 mg/mL de suspensão) durante 30 minutos. Ao final, o derivado obtido foi lavado em filtro sob vácuo com tampão Tris maleato, 200 mM, pH 7, água destilada e tampão Tris maleato, 50mM, pH 7 para remoção de enzima residual e do borohidreto de sódio. O derivado foi armazenado a 4°C.

A atividade da enzima livre GENENCOR<sup>®</sup> era de aproximadamente 3400 UI/mL e se obteve derivado com 1300 UI/g de derivado, rendimento de imobilização de 99% e uma atividade recuperada de 98% (SILVA *et al.* 2012).

### 3.1.2 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Para os ensaios com leveduras de panificação, utilizou-se diretamente o fermento comercial prensado (umidade de ~70%). A suspensão homogênea resultante da mistura da levedura, com o derivado IGI, e com a solução de alginato de sódio foi então gotejada em solução de  $\text{MgCl}_2$  e  $\text{CaCl}_2$  ambos a 0,25 M, para obtenção de partículas esféricas (pelletes). O sistema utilizado para obtenção dos pelletes, ilustrado na Figura 15, era composto por uma bomba peristáltica e um aspersor de ar para acelerar a remoção da gota da ponteira. Após a obtenção dos pelletes, os mesmos foram recuperados por filtração e transferidos para a solução de cura. A cura das partículas ocorreu em repouso a 4°C durante a noite em solução contendo  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4 g/L,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L, uréia 3 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  2,5 g/L e extrato de levedura 4 g/L em pH 5,6.

Para as leveduras BG-1, CAT-1 e PE-2 e CEN.PK113-7D a biomassa requerida para a imobilização foi obtida pelo cultivo das mesmas em meio YPD (VAN DIJKEN *et al.*, 2000). Partindo de 3 mL da respectiva suspensão-estoque de levedura mantida em ultrafreezer a -80 °C, preparou-se um inóculo em 30 mL de meio previamente esterilizado composto por glicose 15 g/L, extrato de levedura 10 g/L e peptona 20 g/L a pH 6,0 num

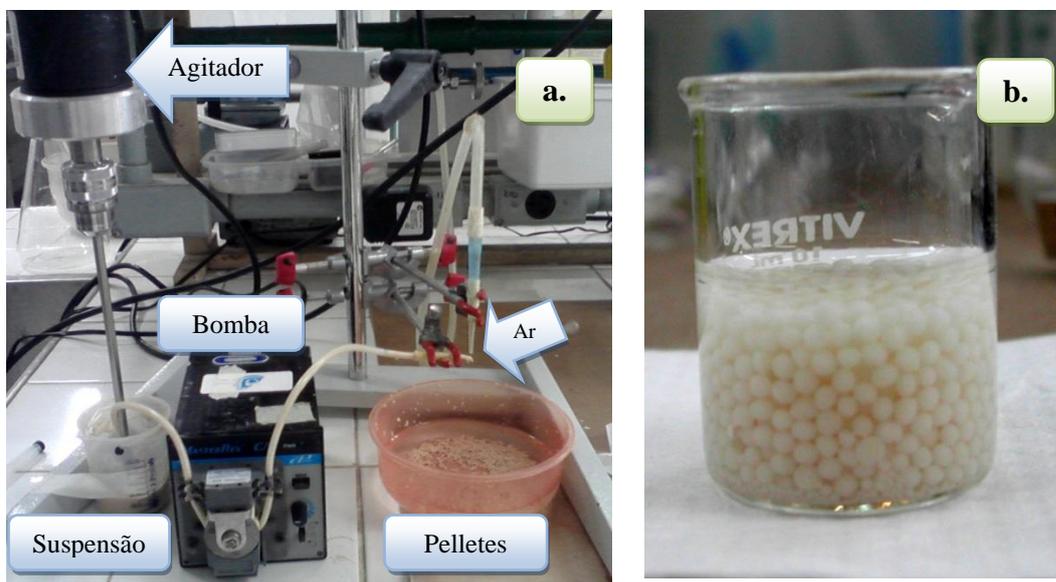
frasco de 125 mL. O sistema foi incubado a 250 rpm e 25°C durante a noite. Quando a densidade ótica (DO) da suspensão atingiu o valor 8, duas alíquotas de 10 mL foram transferidas para dois frascos de 500 mL contendo cada um deles 200 mL de meio de crescimento também estéril, composto por 50 g/L glicose, 15 g/L extrato de levedura e 30 g/L de peptona, pH 6,0. Os frascos foram incubados a 30°C e 250 rpm até DO ~29. Uma alíquota dessa suspensão foi separada para análise de viabilidade e concentração celular (por massa seca), enquanto o volume correspondente à massa de levedura desejada para a imobilização (~4,5 g) foi centrifugado por 15 minutos a 3220 x g e 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, a biomassa compactada foi ressuspensa em água destilada estéril e centrifugada novamente sob as mesmas condições descritas. Finalmente, a biomassa obtida após a lavagem foi então empregada para o preparo do biocatalisador, como descrito para as leveduras de panificação.

### 3.2 PREPARO DO BIOCATALISADOR

O Biocatalisador foi preparado utilizando um sistema composto por um agitador mecânico, mangueira de pequeno diâmetro, bomba peristáltica com controle de vazão e mangueira com corrente de ar como representado na Figura 16. O biocatalisador consiste de partículas de alginato contendo a enzima glicose isomerase imobilizada e *S. cerevisiae* coimobilizadas, na seguinte composição: 1% de alginato de sódio, 20% de IGI-ch (base úmida), ~10% de levedura (base seca) e 0,5% de carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Preparou-se uma suspensão dos componentes descritos, primeiramente pela solubilização do alginato de sódio em tampão fosfato 50 mM pH 8, seguido pela adição da IGI-ch e por último acrescentou-se a massa de levedura desejada e o CaCO<sub>3</sub>. A suspensão foi homogeneizada e através de uma bomba peristáltica e uma mangueira, com auxílio de uma corrente de ar, fez-se gotejar essa suspensão em um recipiente contendo solução de MgCl<sub>2</sub> e CaCl<sub>2</sub> (ambas a 0,25M) como apresentado na Figura 16

As cargas de enzima, levedura e CaCO<sub>3</sub> empregadas na preparação das micro-partículas foram definidas em estudos conduzidos pela Doutoranda Claudia Ramos da Silva e pela Mestranda Patrícia Marina de Aquino.

**Figura 16** - Sistema utilizado para a preparação do biocatalisador composto por glicose-isomerase imobilizada em quitosana coimobilizada com levedura em micro-partículas de alginato (a) e detalhe mostrando os pellets obtidos (b).



Fonte: Acervo próprio.

### 3.3 SIF (SIMULTÂNEA ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO) DE XILOSE: ESTUDOS PRELIMINARES

Os experimentos SIF foram realizados em tubos tipo falcon. Foi adicionado em cada tubo, meio contendo xilose comercial e pellets na proporção de 1:1 meio:pelletes Figura 17, os tubos foram vedados e incubados a 150 rpm e 35 (conjuntos C1, C2 e C4) ou 40 °C (conjunto C3). Cada experimento era composto por no mínimo 8 tubos que eram retirados em intervalos de tempo regulares e mantidos em banho de gelo. O sobrenadante recuperado de cada tubo era utilizado para medida do pH, sendo em seguida filtrado em membrana 0,2 µm. Parte do filtrado foi utilizada para análise de açúcares redutores (AR) e o restante foi congelado para análise posterior de açúcares e produtos da fermentação por CLAE. O acompanhamento da viabilidade das células de levedura presentes no biocatalisador foi realizado nos tempos 0 e 24 horas.

**Figura 17** - Sistema SIF, falcons contendo meio e pelletes na razão 1:1 incubados em shaker a 150 rpm e 35 °C.



Fonte: Acervo próprio.

Um total de 11 experimentos SIF em batelada foi realizado para atender aos objetivos propostos. O primeiro conjunto de SIFs (C1), composto por 6 experimentos, foi realizado para comparar a assimilação de xilose e a produção de etanol e xilitol em diferentes leveduras e assim identificar aquelas com maior potencial para uso no processo proposto. Já os estudos complementares conduzidos em seguida tiveram como objetivo definir algumas condições de cultivo em SIF. Assim, no segundo conjunto de SIFs (C2), consistindo de 2 experimentos, avaliou-se a influência da disponibilidade de oxigênio sobre o desempenho do processo para as leveduras Itaiquara e BG-1. Experimentos com maior disponibilidade de oxigênio (semi-aeróbios) foram conduzidos em tubos falcons de 50 mL, contendo 8 mL de meio+pelletes, enquanto os com menor disponibilidade de oxigênio (semi-anaeróbios) foram realizados em tubos falcons de 15 mL, contendo o mesmo volume de meio+pelletes. No terceiro conjunto de SIFs (C3), composto por 2 experimentos, avaliou-se a influência da temperatura sobre o desempenho do processo para as leveduras CEN.PK117-7D e Itaiquara<sup>®</sup>. A temperatura foi alterada para 40 °C, enquanto os experimentos dos conjuntos C1, C3 e C4 foram conduzidos a 35 °C. E por último, no estudo C4, composto por 1 experimento, avaliou-se a influência da concentração inicial de xilose sobre o desempenho do processo para a levedura Itaiquara<sup>®</sup>. A concentração inicial de xilose foi aumentada para 120 g/L, enquanto nos experimentos dos conjuntos C1 a C3, a metade desse valor foi utilizada. O procedimento experimental adotado é descrito a seguir.

Os ensaios preliminares de SIF foram realizados em tubos falcons de 50 mL (conjuntos C1, C3) ou 15 mL (conjunto C2 e C4), contendo volume reacional de 8 mL, consistindo em 4 g de biocatalisador e 4 mL de meio em pH 5,6. A composição do meio empregado nos experimentos dos conjuntos C1 a C3 era: xilose 120 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 4 g/L,

CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,2 g/L, ureia 3,0 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10,0 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2,5 g/L e antibiótico Kamoran 8 ppm. O meio era previamente filtrado em membrana 0,2 µm. No experimento C4, a concentração inicial de xilose no meio foi aumentada para 240 g/L. É importante ressaltar que os meios foram preparados com o dobro da concentração desejada, pois após a adição do meio de SIF aos pellets ocorria uma diluição, de cerca de duas vezes, na concentração do açúcar e dos demais componentes do meio, visto que os pellets possuíam umidade superior a 85%.

A Tabela 6 apresenta um resumo de todos os experimentos SIF em batelada realizados.

**Tabela 6** - Resumo de experimentos SIF em batelada.

Nº SIF	Conjunto de experimentos	Variável estudada	Levedura utilizada	Xilose inicial (g/L)	pH inicial	Temperatura (°C)
1	C1	Levedura	BG-1	69,8	5,3	35
2			CAT-1	62,0	5,6	35
3			PE-2	67,4	5,6	35
4			CEN.PK113-7D	70,0	5,5	35
5			Fleischmann®	63,5	5,6	35
6			Itaiquara®	70,0	5,6	35
7	C2	Concentração de O <sub>2</sub>	BG-1	65,4	5,5	35
8			Itaiquara®	67,2	5,5	35
9	C3	Temperatura	CEN.PK113-7D	70,0	5,5	40
10			Itaiquara®	70,0	5,3	40
11	C4	Conc. de xilose inicial	Itaiquara®	130,4	5,6	35

Legenda: Utilização da levedura

	Indústria alcooleira
	Laboratório
	Panificação

### 3.4 DISSOLUÇÃO DOS PELLETS PARA ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR

Para obtenção das suspensões contendo células livres para a análise de viabilidade celular após cada SIF, 0,5 g de pellets foram dissolvidos em 10 mL de solução de citrato de sódio 8%, sob agitação magnética à temperatura ambiente. Após a dissolução total

dos pellets e diluição adequada da suspensão, adicionou-se, solução corante azul de metileno e decorreu a análise de contagem e viabilidade celular.

### 3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

Concentração de açúcares redutores (AR): a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método DNS (MILLER, 1959) por leitura de absorbância em espectrofotômetro a 540 nm.

Concentração celular em densidade ótica (DO): a concentração celular foi avaliada pela medida de turbidez das suspensões contendo células. As amostras foram convenientemente diluídas para leitura máxima de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm até o valor de 0,8.

Concentração celular em massa seca (Cx): a concentração de biomassa em massa seca das suspensões celulares foi determinada por gravimetria, utilizando membranas de 0,45 µm previamente secas em estufa a 60 °C por 24 horas, pesadas em balança analítica. Um volume de suspensão de 2 mL foi filtrado e as membranas+biomassas retidas foram secas em estufa a 60 °C até massa constante.

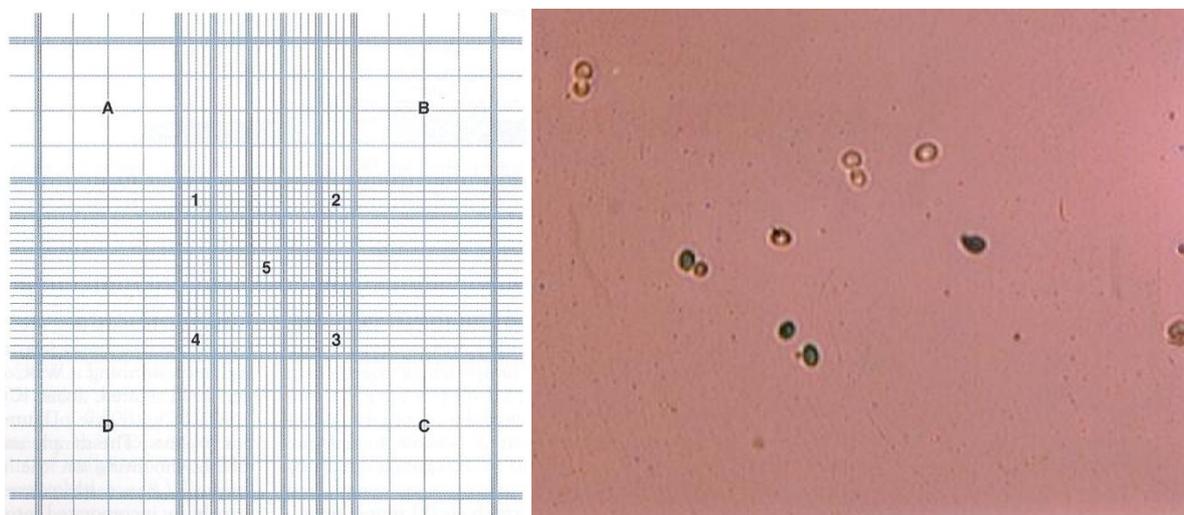
Concentrações de xilose e xilulose: as concentrações de xilose e xilulose foram quantificadas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando detector de índice de refração. Os isômeros foram separados em coluna Sugar-PAK I (Waters), utilizando água ultrafiltrada como fase móvel a 0,5 mL/min e temperatura de 80 °C.

Concentrações de produtos da SIF: as concentrações de xilitol, arabitól, glicerol, ácido acético e etanol foram determinadas por CLAE. Os compostos foram separados na coluna Aminex HPX87-H, a 65 °C. A fase móvel era H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM, cujo fluxo foi mantido em 0,6 mL.min<sup>-1</sup>. Detector de índice de refração foi usado para a análise.

Viabilidade celular: a análise de viabilidade foi executada pelo método de tingimento celular com azul de metileno e microscopia ótica, utilizando microscópio ótico (Olympus BX50) com aumento de 200 x. As suspensões de células adequadamente diluídas foram acrescidas de solução de azul de metileno na proporção 1:1 (susp. de cél. + sol. azul) homogeneizadas e deixado em repouso durante 5 minutos. A suspensão foi então novamente homogeneizada e uma alíquota foi adicionada em câmara de Neubauer, logo após procedeu-se a contagem das células em 4 campos da câmara (A,B,C e D Figura 17) o qual continha 0,1

mm de profundidade e volume de  $4.10^{-4}$  mL cada. As células com coloração azul apresentavam-se mortas e as não coradas vivas, como ilustra a Figura 18.

**Figura 18** - Câmara de Neubauer cada campo A,B,C ou D apresentam  $4.10^{-4}$  mL de volume (Imagem da esquerda). Zoom de células de levedura observadas em microscópio óptico (imagem da direita), as células mortas apresentavam-se coradas e as não coradas vivas.



Fonte: Acervo próprio.

### 3.6 CÁLCULOS REALIZADOS

A partir dos resultados obtidos nas SIFs com as diferentes cepas de *S. cerevisiae*, foram estimados a conversão de xilose, a seletividade em etanol, a produtividade e o rendimento em etanol e xilitol.

O cálculo de conversão (X) de substrato pelas leveduras foi realizado em cada respectivo tempo de reação a partir da concentração inicial de açúcares, segundo a Equação 1.

$$X(\%) = \frac{C_{S0} - C_S}{C_{S0}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:  $C_{S0}$  = concentração de xilose inicial,  $C_S$  = concentração de xilose + xilulose.

A produtividade de etanol (Pr) para cada tempo de reação, expressa em  $g.L^{-1}.h^{-1}$ , foi calculada segundo a equação 2.

$$Pr (g.L^{-1}.h^{-1}) = \frac{C_{ETOH}(t) - C_{ETOH}(t_0)}{t} \quad (2)$$

Onde:  $C_{ETOH}$  = concentração de etanol,  $t_0$  = tempo inicial,  $t$  = instante de tempo.

Para cada tempo de reação, a seletividade molar (S) em etanol, foi calculada em relação a todos os coprodutos quantificados, segundo a equação 3.

$$S (Mol. Mol^{-1}) = \frac{C_{ETOH} (t)}{\sum C_p (t)} \quad (3)$$

Onde:  $\sum C_p$  = somatória dos coprodutos, xilitol, glicerol, ácido acético e arabitol, t = instante de tempo.

Também foram estimados os rendimentos globais em etanol e xilitol ( $Y_{ETOH}$  e  $Y_{XOH}$ ) em relação ao açúcar consumido pelas equações 4 e 5, respectivamente. Foi escolhido o tempo de cultivo com maior produtividade de etanol para o cálculo de rendimento para os dois produtos.

$$Y_{ETOH} (g \cdot g^{-1}) = \frac{\Delta C_{ETOH}}{-\Delta C_{AT}} \quad (4) \quad Y_{XOH} (g \cdot g^{-1}) = \frac{\Delta C_{XOH}}{-\Delta C_{AT}} \quad (5)$$

Onde:  $\Delta C_{AT}$  = concentração de açúcares xilose e xilulose consumidos,  $\Delta C_{ETOH}$  = concentração de etanol produzido,  $\Delta C_{XOH}$  = concentração de xilitol produzido

A viabilidade celular (V) foi calculada segundo as equações 6 e 7. Primeiramente calculou-se a viabilidade ( $V_n$ ) em cada campo da câmara de Neubauer Figura 17 (com n variando de 1 a 4). Por fim, calculou-se a média das viabilidades V1 a V4.

$$V_n (\%) = \frac{Cél. Vivas}{Cél. Totais} \times 100 \quad (6)$$

$$V (\%) = \frac{V1 + V2 + V3 + V4}{4} \quad (7)$$

Onde: n = número de campos, Cél = número de células.

A produtividade específica ( $Pr_{esp}$ ), similar à produtividade mostrada na equação 2, porém em função das massa de células viáveis, foi calculada segundo a equação 8. Foi escolhido o tempo de cultivo com maior produtividade de etanol para o cálculo desse parâmetro.

$$Pr_{esp} (g_{ETOH} \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{m_{ETOH}}{m_{Cél} \times t} \quad (8)$$

Onde:  $m_{ETOH}$  = massa de etanol produzido final,  $m_{Cél}$  = massa viável final de células de levedura, t = tempo em horas.

A assimilação de substrato específica ( $Ass_{esp}$ ) foi calculada de acordo com a equação 9. Assim como a produtividade específica, esse parâmetro foi expresso em massa de células viáveis.

$$Ass_{esp} (g_s \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1}) = \frac{m_s}{m_{Cél} \times t} \quad (9)$$

Onde:  $m_s$  = massa de substrato consumido,  $m_{Cél}$  = massa viável de células de levedura final,  $t$  = tempo em horas.

O balanço de massa para o carbono nos experimentos foi calculado segundo as equações 10 e 11 a partir das massas de carbono presentes nos produtos e substratos no início e no final da SIF. A equação 12 expressa a percentagem de carbono recuperada em determinado experimento SIF.

$$mC_{subst\_cons} = \frac{m_{sub\_in} - m_{sub\_fin}}{MM_{sub}} \times MM_C \times n_{C\_sub} \quad (10)$$

$$mC_{prod\_form} = \sum \left( \frac{m_{prod\_fin} - m_{prod\_in}}{MM_{prod}} \times MM_C \times n_{C\_prod} \right)_i \quad (11)$$

$$Recuperação_C(\%) = \frac{mC_{prod\_form}}{mC_{subst\_cons}} \times 100 \quad (12)$$

onde:  $C$  = carbono,  $m$  = massa, sub = substratos (xilose e xilulose),  $MM$  = massa molar,  $n_C$  = número de átomos de carbono, prod = produtos ( $i$  = xilitol, arabitól, glicerol, ácido acético, etanol e  $CO_2$ )

Como substratos do processo SIF em questão são considerados os açúcares xilose e xilulose, e como produtos da SIF são considerados os compostos xilitol, arabitól, glicerol, ácido acético, etanol e  $CO_2$ . Para estimar a formação de  $CO_2$ , assumiu-se que a mesma ocorria nas reações de produção de etanol e de ácido acético a partir da xilulose, na proporção estequiométrica, conforme proposto por Kuyper *et al.* (2004).

Por fim pode-se calcular a perda de viabilidade em relação à inicial, para cada experimento de acordo com a Equação. 13.

$$Perda Vi (\%) = \frac{Vi - Vf}{Vi} \quad (13)$$

$V$  = Viabilidade,  $i$  = inicial,  $f$  = final

### 3.7 REPRODUTIBILIDADE DOS EXPERIMENTOS

Nos experimentos do conjunto C1, as SIF com as leveduras BG-1 e Itaiquara foram realizados em duplicata e alguns pontos importantes como 11 e 24 horas em foram

realizados em triplicata. Nos experimentos C3 e C4, todos os experimentos foram realizados em duplicata com repetição dos pontos importantes em triplicata.

Os experimentos SIF com as leveduras CAT-1, PE-2, CEN.PK113-7D e Fleischmann do conjunto C1, juntamente com os experimentos do conjunto C3 foram realizados apenas uma vez.

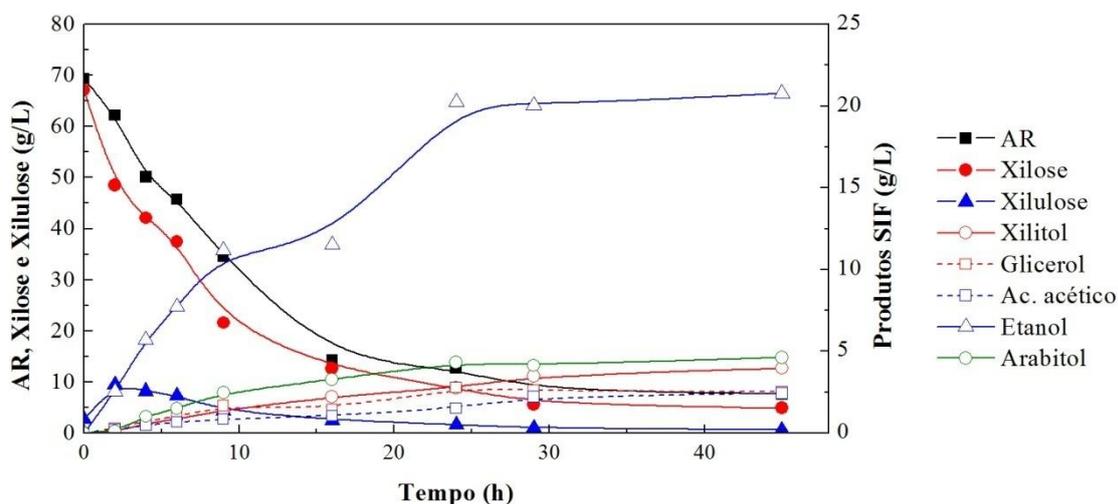
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 COMPARAÇÃO DA SIF DA XILOSE PARA DIFERENTES LEVEDURAS (C1)

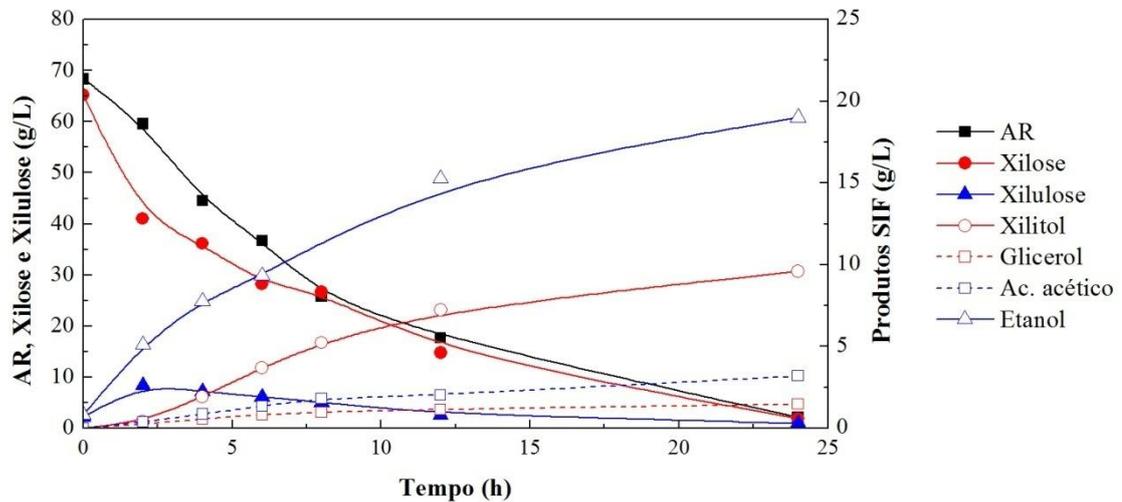
Neste item serão discutidos os resultados obtidos nas SIFs de xilose com as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* utilizadas: BG-1, CAT-1, PE-2 (industriais), Fleischmann<sup>®</sup>, Itaiquara<sup>®</sup> (panificação) e CEN.PK117-7D (laboratório), as quais foram conduzidas nas seguintes condições: concentração inicial de xilose de ~65 g/L, temperatura de 35 °C, em tubos falcon de 50 mL, contendo 8 mL de meio + pelletes (condição semi-aeróbia). As Figuras 19 a 24 apresentam o perfil de consumo de substrato e formação dos principais produtos (etanol, xilitol, arabitól, glicerol e ácido acético) em função do tempo de reação.

Durante os experimentos foram monitorados os açúcares redutores (AR), com o intuito de prever o consumo e esgotamento da xilose durante a SIF e estabelecer melhores tempos de coletas.

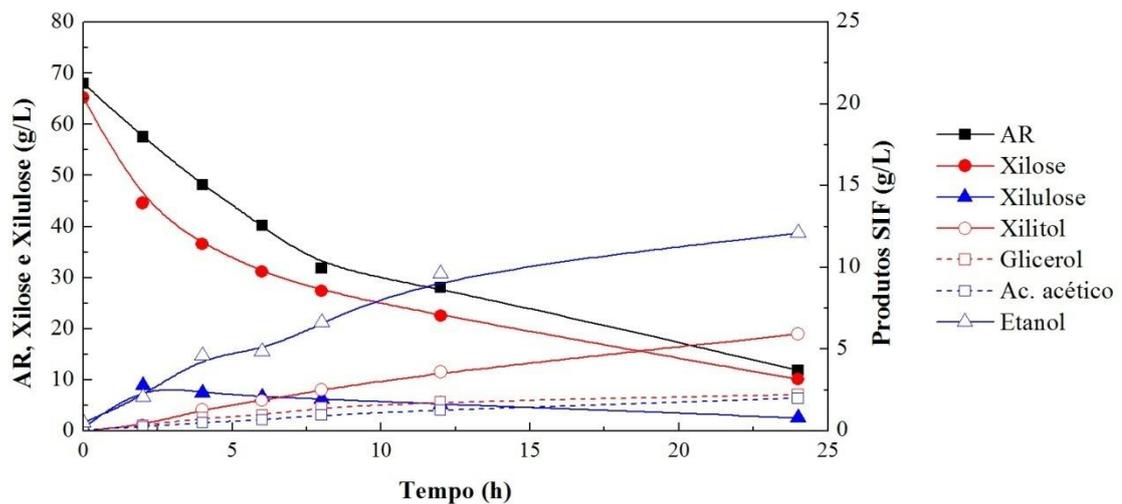
**Figura 19** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 69,8 g/L xilose em tubo falcon de 50mL com levedura BG-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



**Figura 20** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 62,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CAT-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



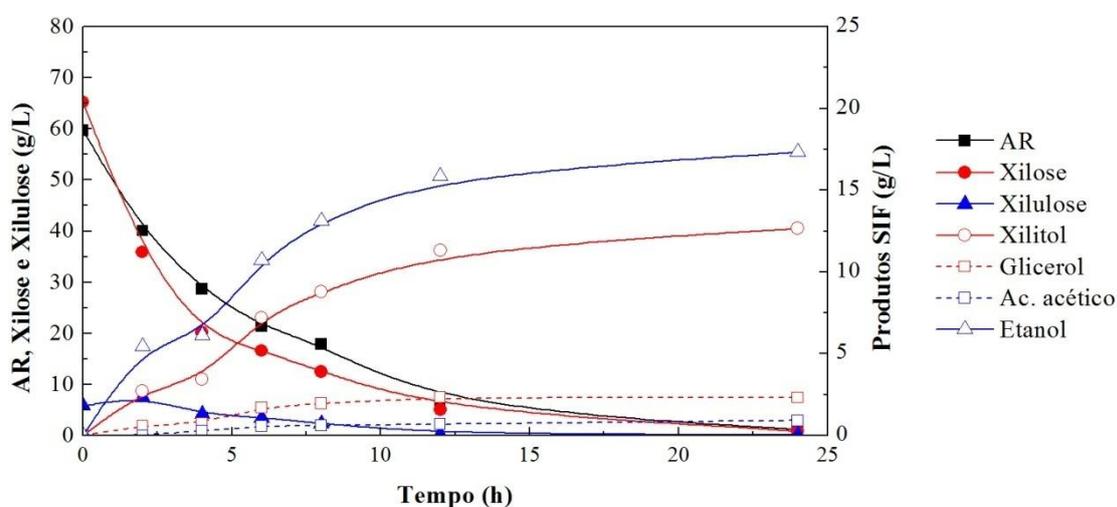
**Figura 21** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 67,4 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura PE-2. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



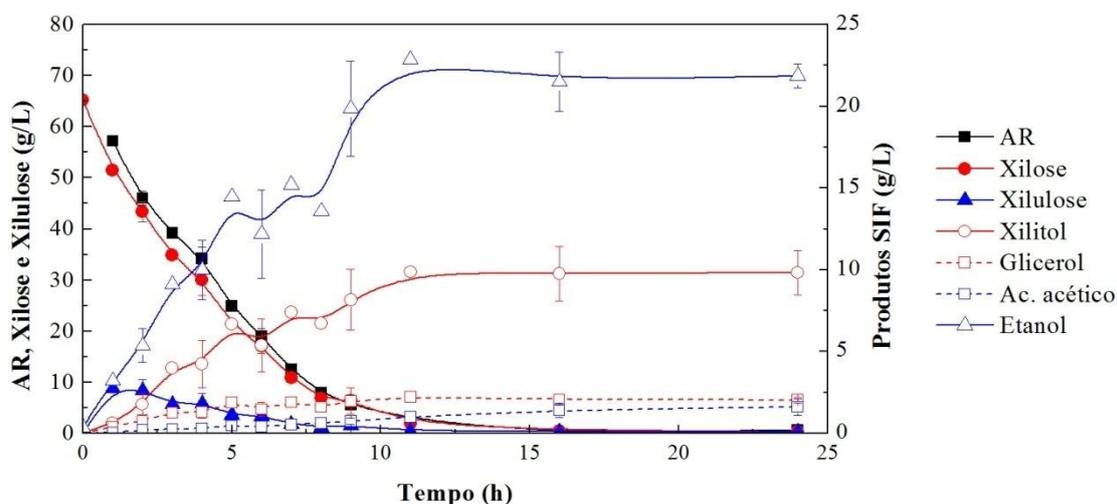
As leveduras industriais estudadas (Figuras 19, 20 e 21), apresentaram perfis de consumo de xilulose distintos entre si. CAT-1 foi a levedura mais eficiente em termos de consumo do substrato. Por outro lado, as SIF's com leveduras BG-1 e PE-2 foram consideravelmente mais

lentas no consumo de açúcar, e mesmo após 24 h de ensaio concentrações de xilose superiores a 10 g/L foram observadas em ambos os casos. a A linhagem PE-2 também apresentou as menores produções de etanol (12,1 g/L em 24 h) e xilitol. As leveduras BG-1 e CAT-1 foram as que obtiveram melhor resultado em produção de etanol, chegando a  $19,5 \pm 0,5$  g/L.

**Figura 22** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 63,5 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura Fleischmann. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.

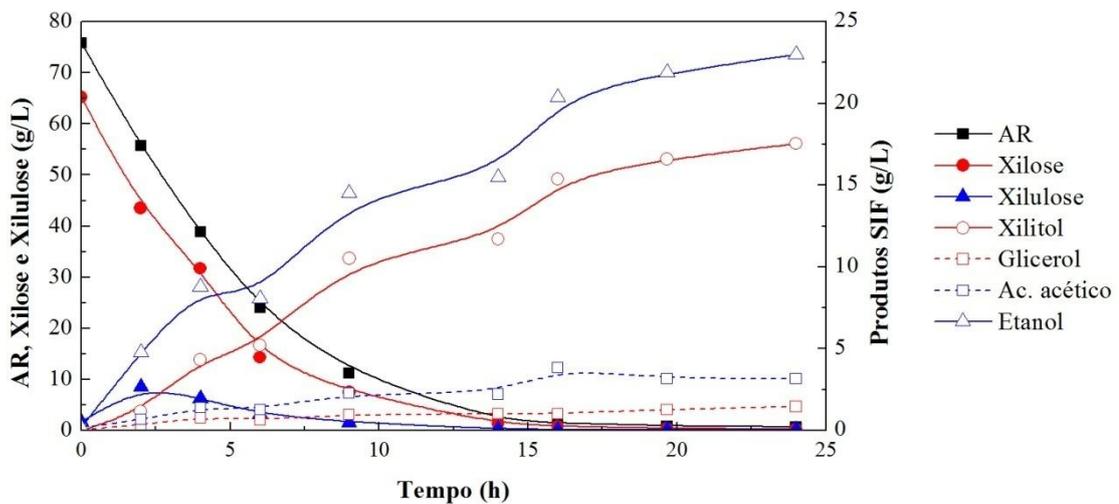


**Figura 23** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura Itaiquara. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



Entre as leveduras de panificação ambas (Figuras 22 e 23) apresentaram rápida assimilação de xilulose, causando o esgotamento da xilose em menos de 12 h de cultivo. A melhor produção de etanol ( $22,5 \pm 0,5$  g/L) foi alcançada na SIF com a levedura Itaiquara®, enquanto a maior produção de xilitol (12,7 g/L) foi observada com a Fleischmann®.

**Figura 24** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CEN.PK113-7D. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



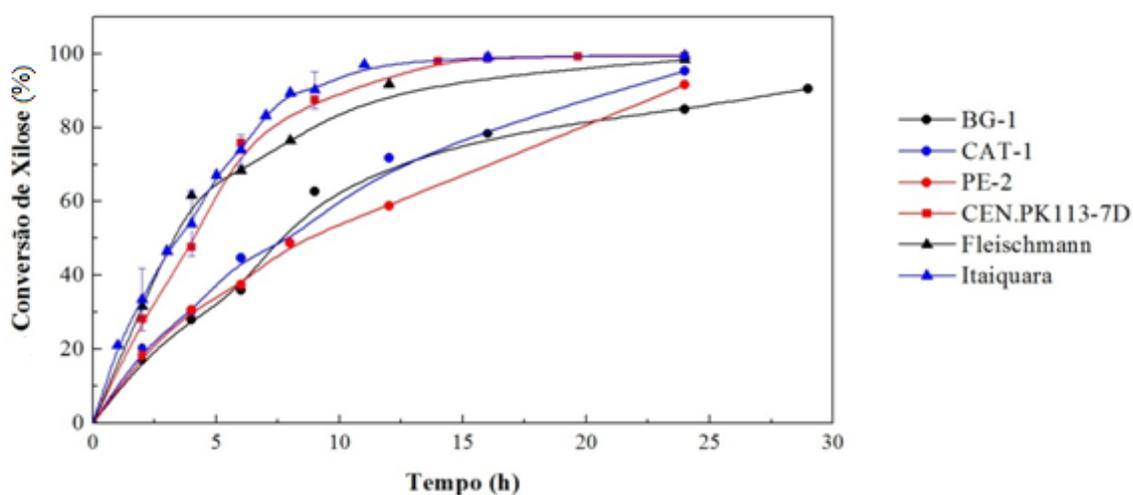
A cepa de laboratório CENPK.113-7D (Figura 24) apresentou perfil semelhante às de panificação, com consumo completo de xilose em ~ 14 h de cultivo, boa produção de etanol (~ 22 g/L) e a mais alta formação de xilitol (17,5 g/L) observada no conjunto C1. Em termos de conversão de xilose (Figura 25), pôde-se verificar que as leveduras de panificação e de laboratório foram mais eficientes e apresentaram perfis muito semelhantes de utilização de xilulose (Figuras 22, 23 e 24).

Os resultados apresentados nas Figuras 19 a 24 mostram que o processo SIF foi bem sucedido com todas as leveduras estudadas. Em todos os casos, etanol foi o principal produto formado, seguido por xilitol como segundo principal coproduto, enquanto glicerol e ácido acético acumularam em pequenas concentrações. A formação de arabitól também foi observada, mas apenas para a levedura BG-1.

As leveduras Itaiquara e CEN.PK113-7D foram capazes de converter cerca de 97% do açúcar em 11 a 14 horas, respectivamente, em um intervalo de tempo relativamente curto levando-se em consideração a fonte de carbono utilizada. Segundo Duarte, Lourenço e

Riveiro (2006) e Carvalho Jr e Galvão (2008), no processo industrial de etanol de primeira geração – no qual a levedura utiliza glicose e frutose – o tempo aproximado de uma batelada é de 8 a 12 horas com uma concentração de células de  $10^6$  a  $10^7$  células.ml<sup>-1</sup>, quantidade esta inferior à ordem de grandeza utilizada nos experimentos SIF em batelada deste trabalho de  $10^8$  a  $10^9$  células.ml<sup>-1</sup>.

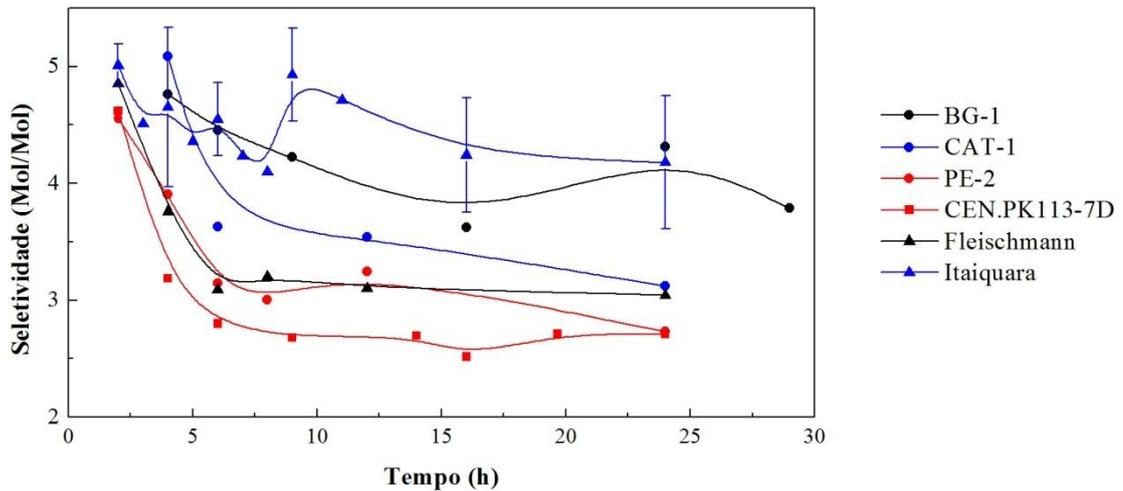
**Figura 25** - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose falcon de 50 mL para diferentes leveduras.



Para as leveduras industriais (BG-1, CAT-1 e PE-2), os perfis de conversão de xilose ao longo do tempo foram bastante similares entre si (Figura 25). Porém, essas leveduras foram mais lentas em comparação às demais. A levedura CAT-1, dentre as industriais, foi a mais rápida, apresentando conversão de ~95% após 24 horas de reação.

Durante este estudo, foi demonstrado que, independentemente da linhagem de *S. cerevisiae* utilizada, o produto majoritário da SIF de xilose era etanol. Porém, em termos de seletividade – definida como a razão entre o etanol produzido e a somatória dos demais compostos gerados no processo – as leveduras apresentaram perfis consideravelmente distintos (Figura 26).

**Figura 26** - Seletividade em Etanol no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose, falcon de 50 mL, para diferentes leveduras.



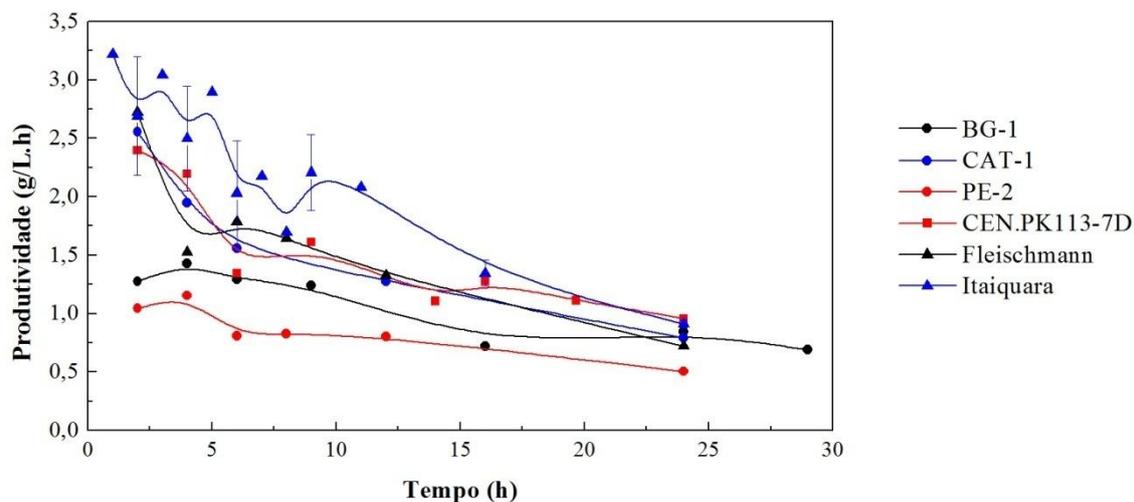
Observa-se na Figura 26, que as leveduras Itaiquara®, BG-1 e CAT-1 foram as mais seletivas para a conversão de xilose em etanol. Durante o período de cada SIF, essas linhagens produziram entre 3,5 e 4 mols de etanol para cada mol do total de outros produtos formados (xilitol, arabitol etc). A seletividade é um parâmetro de comparação importante, e pode ser utilizado como critério, juntamente com a conversão, para escolher a melhor linhagem produtora de etanol, que conseqüentemente geraria menos subprodutos.

As leveduras, Fleischmann®, PE-2 e CEN.PK113-7D apresentaram seletividade intermediária entre 1,5 e 3,0 mol.mol<sup>-1</sup>. Essas leveduras foram as que mais direcionaram a fonte de carbono para a produção de xilitol.

As produtividades em etanol para cada levedura estão apresentadas na Figura 27. Os valores deste parâmetro diminuem ao longo do tempo para todas as SIF, devido à diminuição na concentração de substrato.

Em todos os casos, a velocidade de reação estava limitada pela etapa de fermentação da xilulose pela levedura, pois a quantidade de enzima utilizada produziu a mesma quantidade de xilulose nos diferentes experimentos, no entanto observam-se diferentes produtividades, concluindo que cada linhagem apresentou diferente metabolismo da xilulose fornecida.

**Figura 27** - Produtividade em etanol no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose, falcon de 50 mL, para diferentes leveduras.



Em termos de produtividade, a SIF de xilose com a levedura Itaiquara® atingiu os melhores resultados. Observa-se na Figura 27 que o perfil de produtividade se manteve num patamar superior em comparação às demais leveduras. Já as leveduras BG-1 e PE-2 apresentaram os piores desempenhos.

Para facilitar a comparação do desempenho das diferentes leveduras testadas no processo SIF de xilose, foi atribuída uma pontuação, variando entre 0 e 3 para cada um dos critérios de desempenho avaliados: conversão de substrato (Conv.), seletividade (Sel.) e produtividade em etanol (Prod.). A manutenção da viabilidade celular ao longo das SIF's também é um fator importante para a seleção da levedura a ser utilizada em um processo contínuo, de longa duração e, por isso, também foi incluída como critério de desempenho. Conforme mostra a Tabela 7, a pontuação foi atribuída da seguinte maneira: 3 para os melhores resultados; 2 para bons resultados e 1 para resultados inferiores, para cada critério de desempenho avaliado. A coluna de *scores* é a soma total das pontuações.

**Tabela 7** - Avaliação do desempenho das diferentes leveduras testadas (conjunto de experimentos C1) utilizando classificação por *Scores*.

	<b>Conv.</b>	<b>Sel.</b>	<b>Prod.</b>	<b>Viab.</b>	<b>Scores</b>
<b>Itaiquara</b>	3	3	3	3	12
<b>CEN.PK113 7D</b>	3	2	2	3	10
<b>Fleischmann.</b>	3	2	2	3	10
<b>BG-1</b>	2	3	1	3	9
<b>CAT-1</b>	2	2	2	3	9
<b>PE-2</b>	2	2	1	3	8

Nota: Conv. – Conversão de substrato, Sel. – Seletividade, Prod. – Produtividade, Viab. – Viabilidade.

Portanto, a partir do critério de comparação estabelecido, conclui-se que a levedura de panificação Itaiquara® destaca-se em termos de produtividade, conversão e seletividade, como observado na Tabela 7 e nas Figuras de 25 a 27. Essa levedura foi, portanto, selecionada para a continuidade dos estudos. Também foram selecionadas as leveduras BG-1, devido à boa seletividade e CENPK.113-7D, devido aos bons valores de conversão e produtividade.

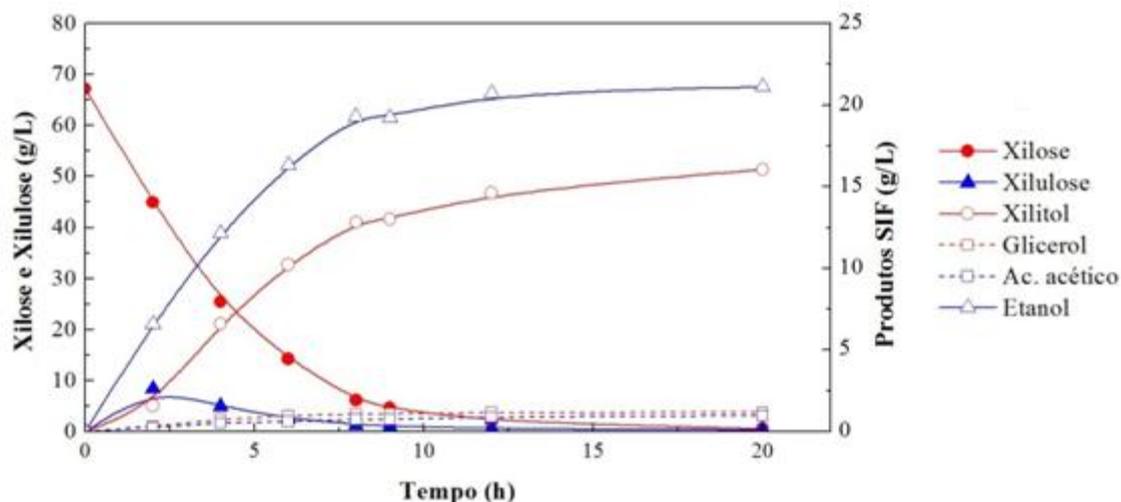
#### **4.2 INFLUÊNCIA DA DISPONIBILIDADE DE OXIGÊNIO (C2)**

O conjunto de experimentos C1 foi realizado em condição semi-aeróbia, já que apenas 16 % do volume frasco foi ocupado pelo meio + pelletes. Como a produção de etanol é favorecida em condições de menor disponibilidade de oxigênio, realizou-se SIF em batelada em frasco cônico de 15 mL, contendo o mesmo volume de meio + pelletes, o que proporcionou uma ocupação de mais de 50 % do volume do frasco. Essa condição foi denominada de semi-anaeróbia. Conforme relatado por Winkelhausen e Kuzmanova (1998) e Granström, Ojamo e Leisola (2001), a seletividade em etanol melhora quando há pouco oxigênio no meio, porém suficiente.

Foram escolhidas para os ensaios em condição semi-anaeróbia, a levedura Itaiquara por apresentar bons resultados de produtividade, seletividade e conversão e a levedura BG-1, que corresponde ao melhor resultado de seletividade.

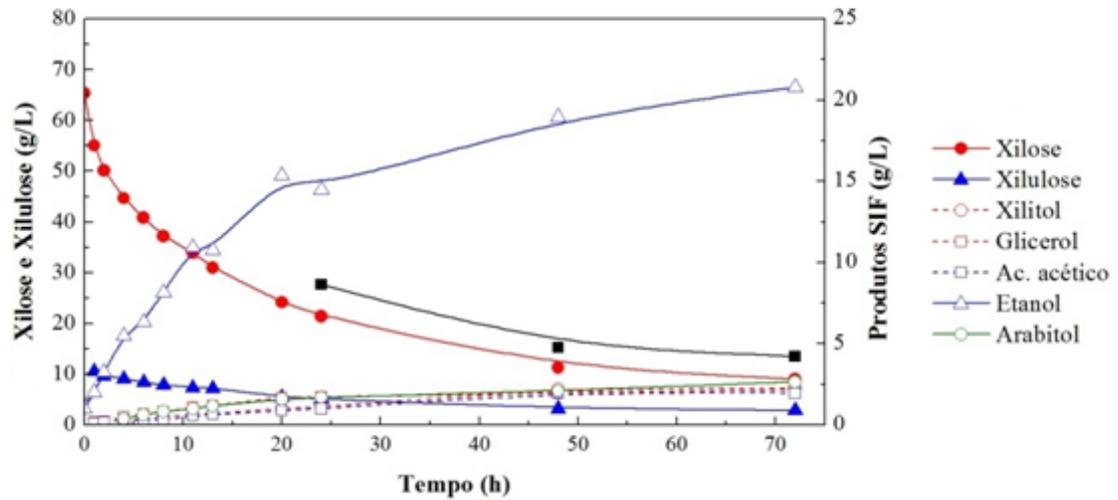
Os perfis de consumo de xilose e xilulose assim como de produção de etanol e xilitol para as duas leveduras escolhidas cultivadas em condições semi-aeróbias são mostrados nas Figuras 27 e 28. Comparando a Figura 28 com a Figura 23, ambas contendo dados de cultivo da levedura Itaiquara<sup>®</sup>, não se observa diminuição na produção de xilitol nem aumento na produção de etanol devido ao favorecimento do metabolismo anaeróbio. Nota-se também que a mudança na condição de cultivo não alterou o perfil de consumo das pentoses, que se esgotaram em ~ 9 h tanto no cultivo semi-aeróbio como no semi-anaeróbio, apresentando o mesmo perfil de conversão (Figura 30).

**Figura 28** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 67,2 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura Itaiquara<sup>®</sup>. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.

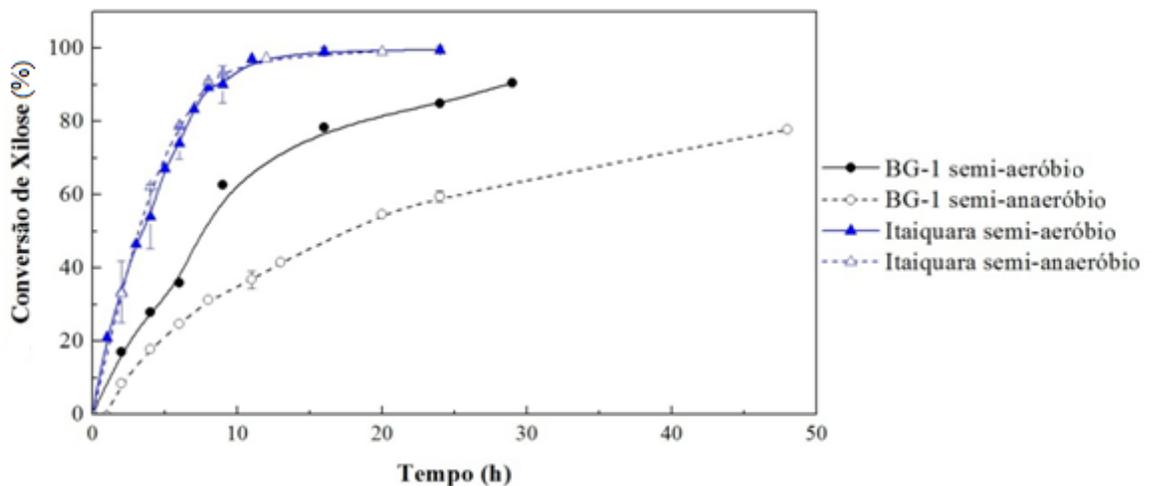


Porém, para a levedura BG-1, observa-se que a alteração na condição de cultivo afetou o metabolismo, que se tornou significativamente mais lento, embora sem expressivo aumento na produção de etanol (Figuras 29 e 19). Essa observação é confirmada na Figura 30, que mostra que a conversão dos açúcares no experimento semi-anaeróbio foi de no máximo 80 % com a levedura BG-1 após 50 h de SIF.

**Figura 29** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35 °C, 65,4 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura BG-1. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.

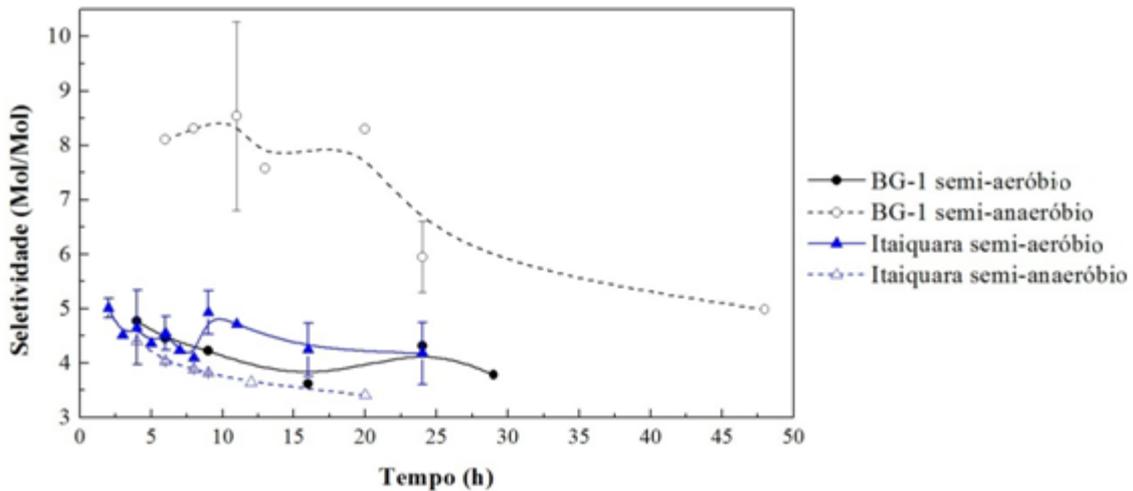


**Figura 30** - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, ~65 g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e BG-1 sob diferentes condições de disponibilidade de O<sub>2</sub>.

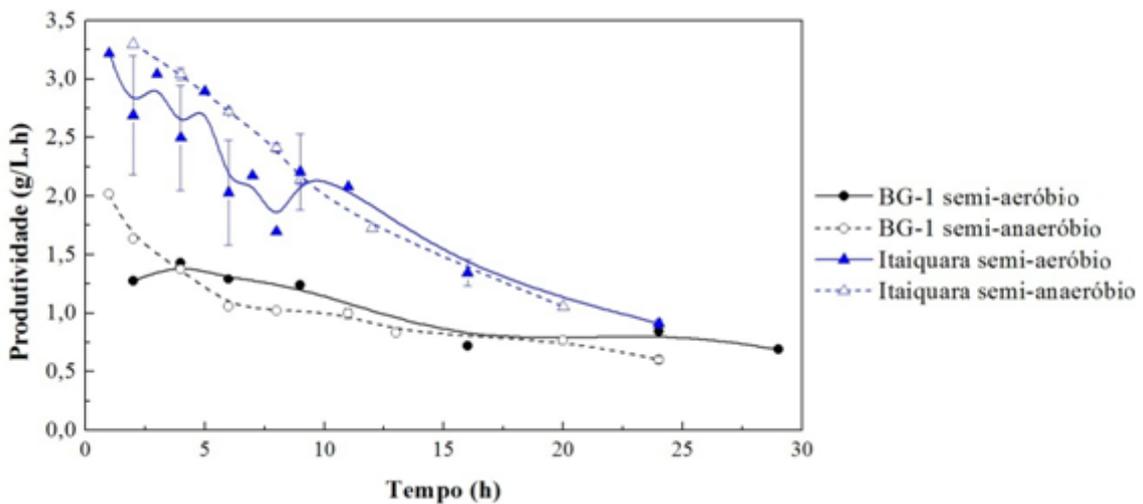


Em termos de seletividade, a Figura 31 demonstra que para a levedura Itaiquara essa variável foi favorecida pela condição semi-aeróbica, enquanto que para a levedura BG-1, ela foi maior na condição semi-anaeróbica. Finalmente, a Figura 32 mostra que a produtividade não foi alterada pela maior anaerobiose no experimento.

**Figura 31** - Seletividade em etanol no processo SIF a 35°C, ~65g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e BG-1 sob diferentes condições de disponibilidade de O<sub>2</sub>.



**Figura 32** - Produtividade em etanol no processo SIF a 35°C, 65g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e BG-1 sob diferentes condições de disponibilidade de O<sub>2</sub>.



Conclui-se que as leveduras estudadas não responderam como esperado à menor disponibilidade de oxigênio, não ocorrendo maior produção de etanol. De fato, embora a presença de oxigênio tenha sido maior nos experimentos conduzidos em falcons de 50 mL do que nos de 15 mL, as condições experimentais empregadas não permitiram discriminar nem controlar com precisão o nível de oxigênio presente. Por isso, estudos em biorreator em condições de controle adequado da concentração de oxigênio dissolvido são necessários para elucidar essa questão.

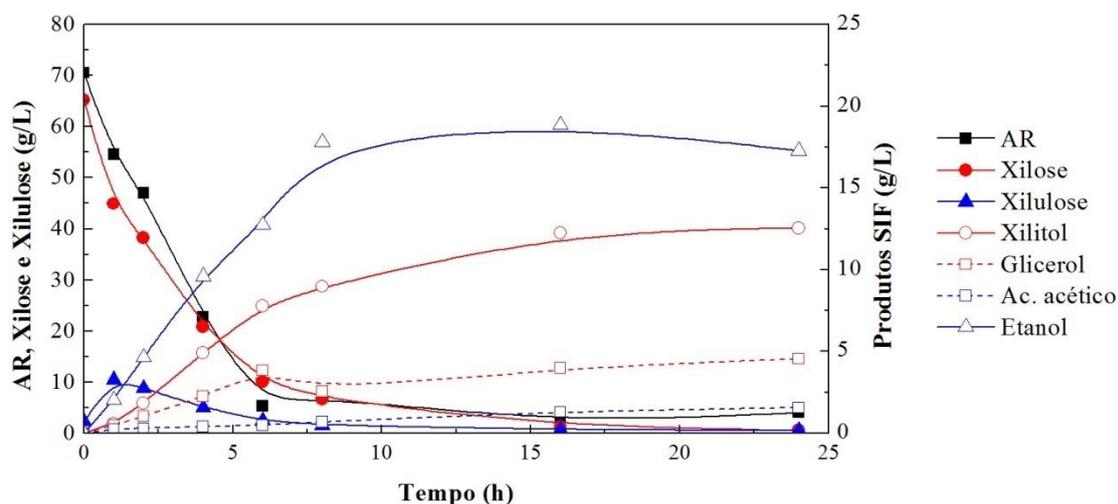
### 4.3 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA (C3)

Visto que a enzima XI possui uma temperatura ótima de isomerização próxima a 70°C, experimentos SIF à temperatura de 40°C foram realizados para promover um aumento na atividade dessa enzima e também para observar se as leveduras em estudo conseguiriam manter a viabilidade celular nessa condição de alta temperatura.

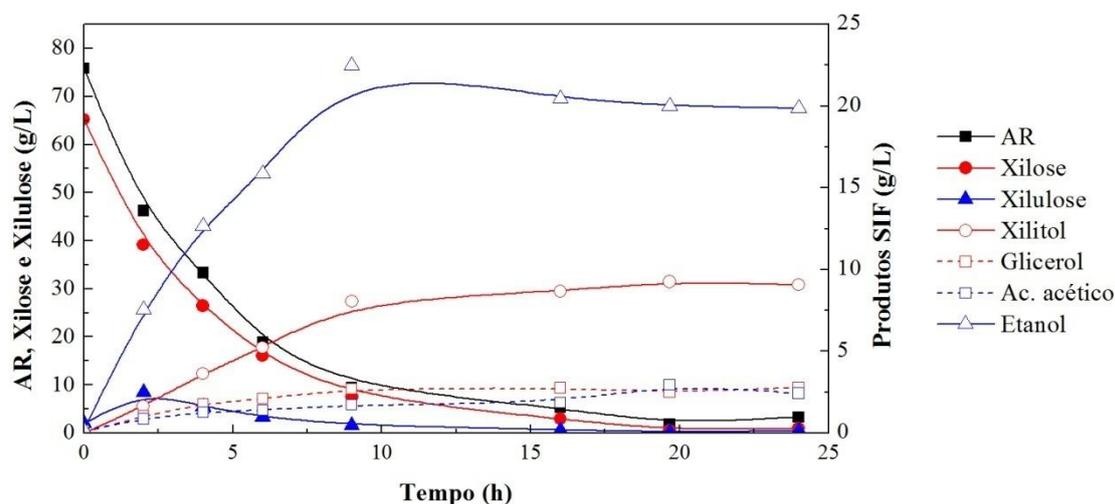
As leveduras Itaiquara e CEN.PK113-7D foram as selecionadas para o conjunto de experimentos SIF, pois a primeira apresenta o melhor desempenho em SIF enquanto a segunda apresentou bons perfis de produtividade e conversão. Os principais resultados obtidos durante as SIFs são reproduzidos nas Figuras 33 e 34, para as leveduras Itaiquara e CEN.PK113-7D, respectivamente. Para a levedura Itaiquara, o aumento de temperatura para 40 °C levou à perda significativa de viabilidade, que caiu para 8 % ao final do cultivo, enquanto nos experimentos a 35 °C esse valor permanecia em 96 %. Com exceção de um aumento na produção de glicerol em comparação com o observado na Figura 23, não houve grandes alterações nos perfis de produção de etanol e xilitol em relação ao experimento conduzido a 35 °C.

Já para a estirpe CEN.PK113-7D (Figura 34), a mudança de temperatura contribuiu para diminuir a produção de xilitol, sem alterações relevantes nos perfis de produção de etanol ou de consumo de pentoses em comparação com o experimento conduzido a 35 °C (Figura 24). A viabilidade celular para essa levedura nos experimentos com maior temperatura (40°C) manteve-se próximo a 90 %, mostrando que essa levedura tem características termotolerantes no processo SIF.

**Figura 33** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 40 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura Itaiquara<sup>®</sup>. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



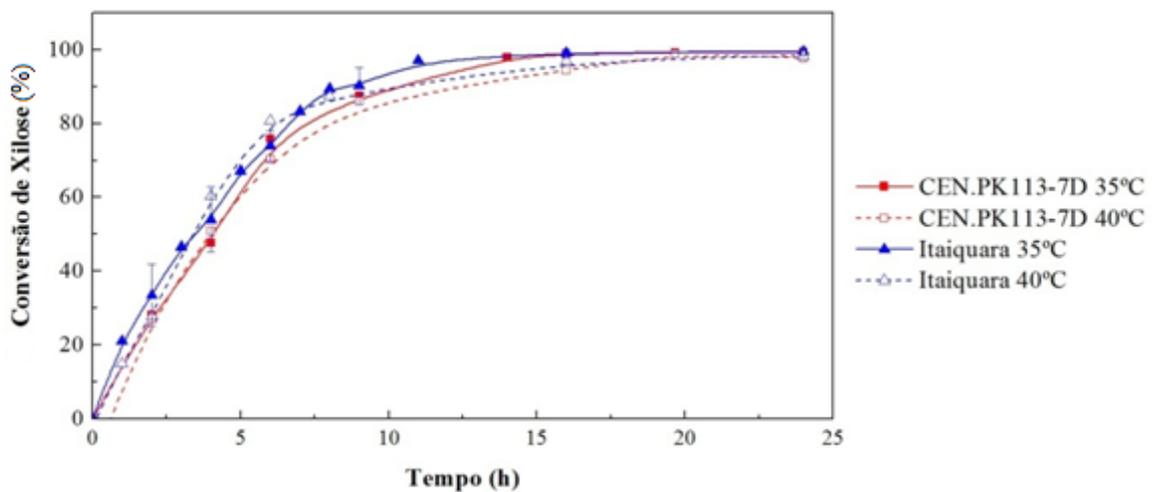
**Figura 34** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 40 °C, 70,0 g/L xilose em tubo falcon de 50 mL com levedura CEN.PK117-7D. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.



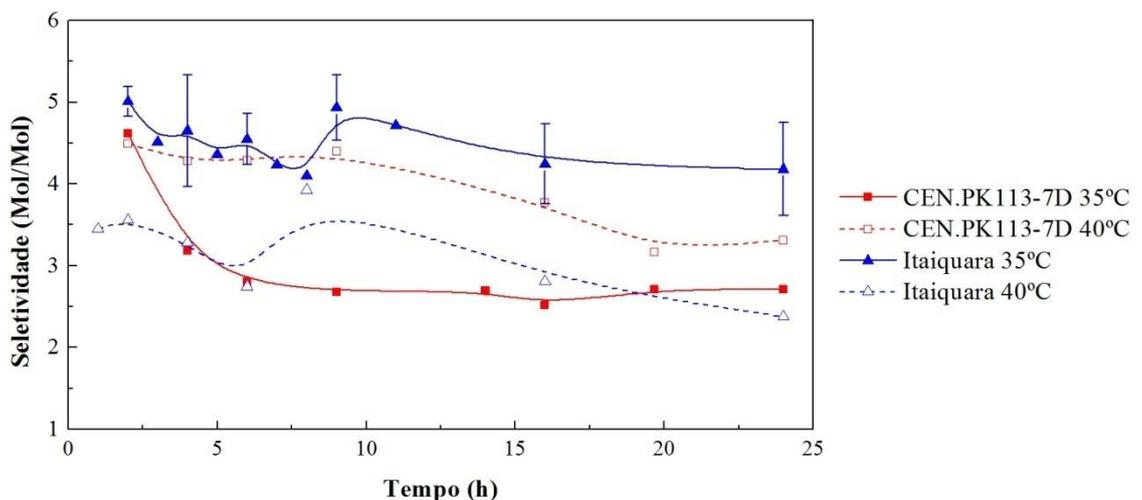
A comparação entre as SIF's realizadas a 35 e 40 °C em termos de conversão, seletividade e produtividade esta apresentada nas Figuras 35 a 37. Com exceção do aumento de seletividade observado para a levedura CEN.PK113-7D cultivada a 40 °C (Figura 36), não foram observadas outras alterações significativas nos perfis de conversão ou na produtividade devido à mudança na temperatura. Esse resultado pode ser explicado pelo fato que, mesmo a

40 °C, onde esperava-se uma melhora na atividade da enzima disponibilizando mais xilulose à levedura a SIF estava limitada pela reação fermentação e não pela isomerização. Além disso, embora o aumento da temperatura favoreça a conversão mais rápida de xilose em xilulose, ele afeta a viabilidade da levedura, reduzindo a velocidade da fermentação. Essas constatações preliminares estão sendo complementadas por experimentos conduzidos pela mestrandia Patrícia Marina de Aquino em diferentes temperaturas para diferentes leveduras. Porém, a partir dos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que a temperatura de 35 °C é melhor que a de 40 °C para a SIF de xilose com a levedura Itaiquara.

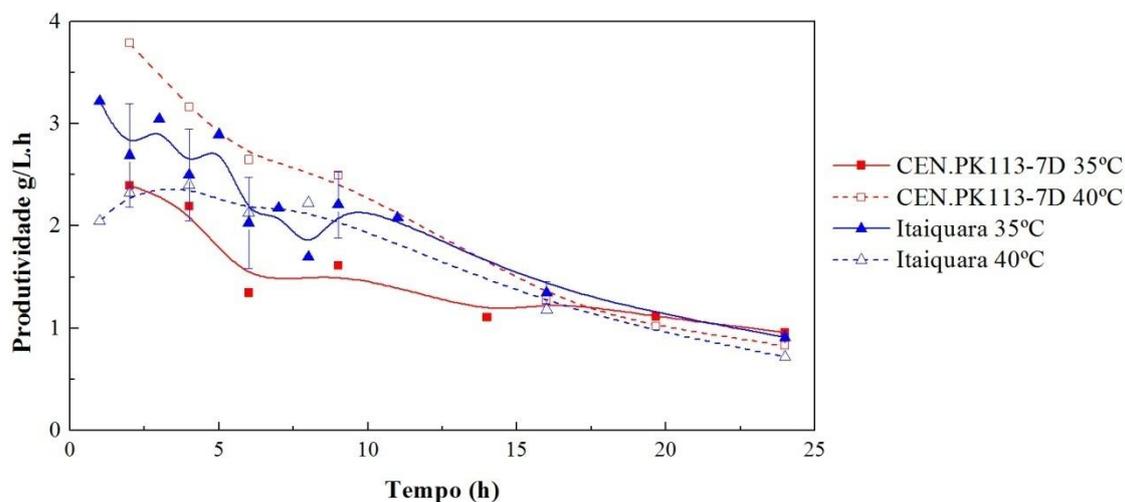
**Figura 35** - Conversão de xilose no processo SIF semi-aeróbio, a 70,0 g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e CEN.PK117-7D sob diferentes temperaturas.



**Figura 36** - Seletividade em etanol no processo SIF semi-aeróbio, a 70,0 g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e CEN.PK117-7D sob diferentes temperaturas.



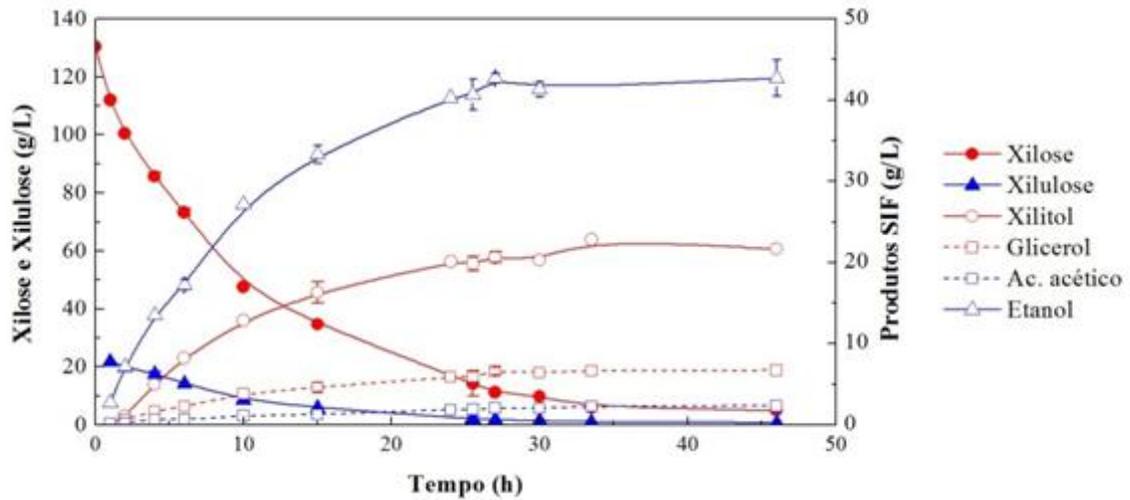
**Figura 37** - Produtividade em etanol no processo SIF semi-aeróbio, a 70,0 g/L xilose para as leveduras Itaiquara® e CEN.PK117-7D sob diferentes temperaturas.



#### 4.4 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE XILOSE (C4)

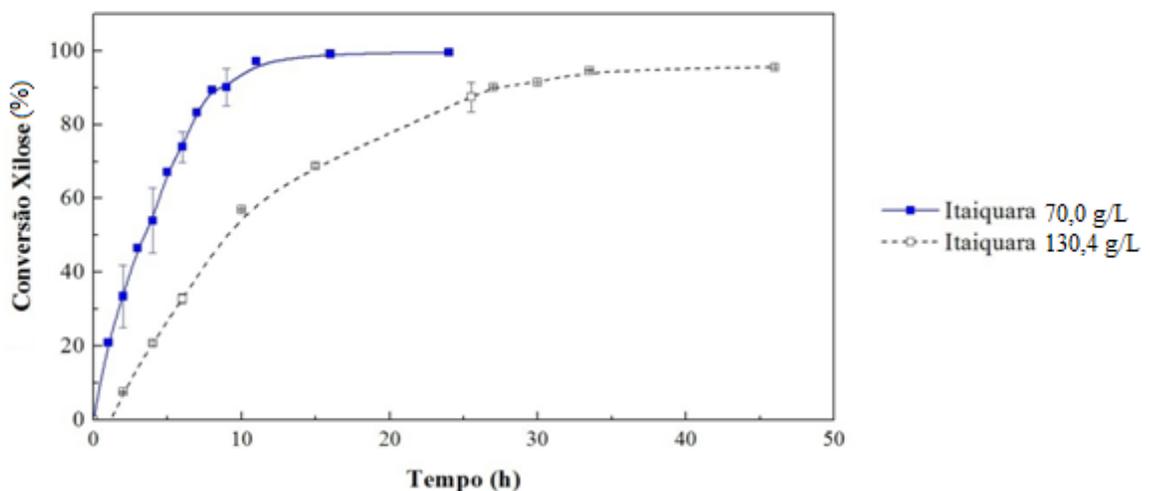
A última variável explorada foi a concentração inicial de xilose. Diante dos resultados relatados anteriormente, que reforçam a superioridade da levedura Itaiquara em relação às demais em processos SIF de xilose, a influência do aumento da concentração de xilose foi estudada apenas para a levedura em questão. Como esperado, a Figura 38 mostra o aumento do tempo necessário para o consumo da maior concentração de açúcar fornecido e as maiores concentrações de etanol, xilitol e glicerol alcançadas.

**Figura 38** - Perfil de consumo de substrato e formação de produtos na SIF 35°C, 130,4 g/L xilose em tubo falcon de 15 mL com levedura Itaiquara<sup>®</sup>. Razão biocatalisador/meio (1/1). Biocatalisador: 10% de levedura em massa seca e 20% de enzima IGI-ch.

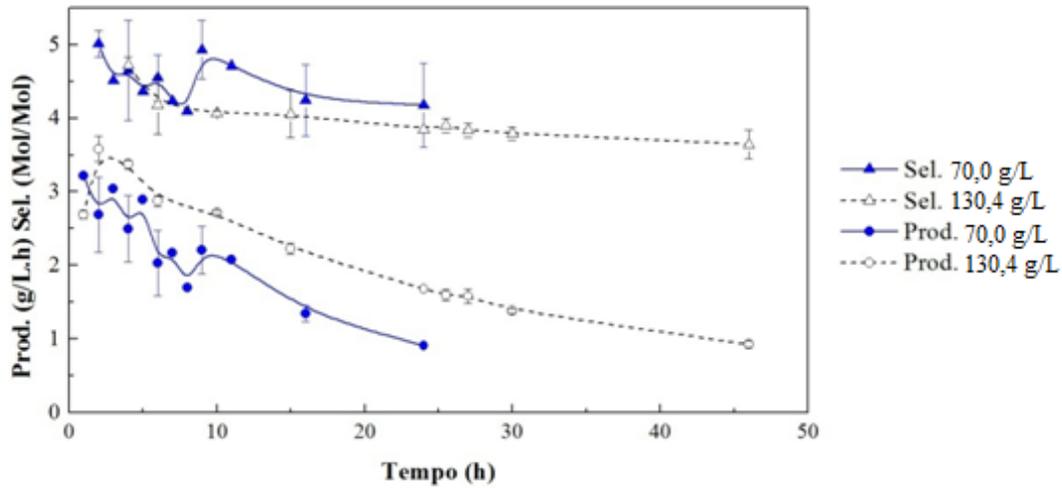


Na Figura 39, são mostrados os perfis de conversão para as SIF's com diferentes concentrações iniciais de xilose e na Figura 40, os perfis de produtividade e seletividade. Nota-se que o aumento da concentração inicial de xilose favorece discretamente a seletividade e a produtividade. Esse resultado preliminar indica que a SIF em batelada poderia ser operada numa concentração maior de xilose na alimentação, o que é interessante do ponto de vista de obtenção de uma maior concentração de etanol.

**Figura 39** - Conversão de xilose no processo SIF a 35 °C, semi-anaeróbio, para a levedura Itaiquara<sup>®</sup> e diferentes concentrações de xilose.



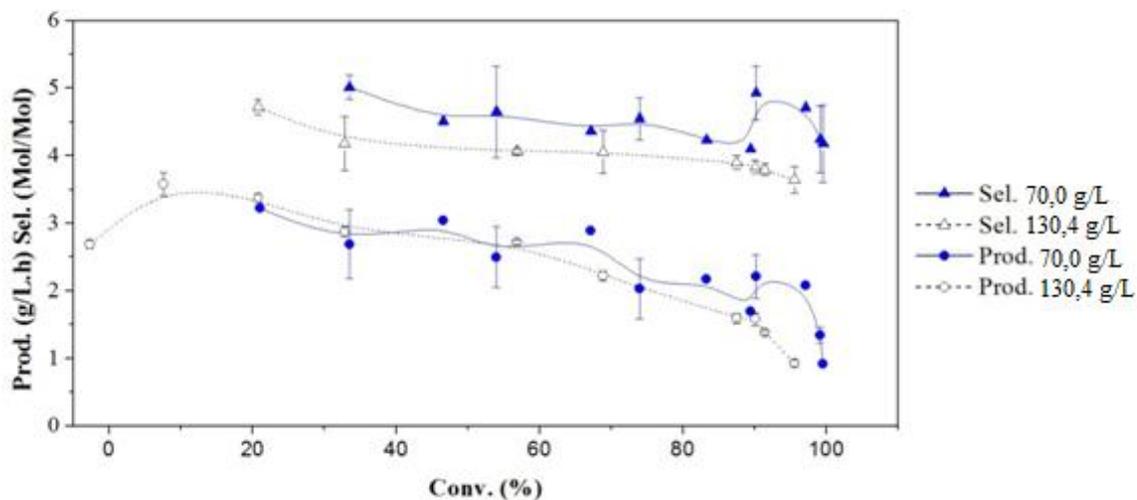
**Figura 40** - Seletividade em etanol e Produtividade em etanol no processo SIF a 35 °C, semi-anaeróbio, para a levedura Itaiquara<sup>®</sup> e diferentes concentrações de xilose.



Nota: **Prod.** = Produtividade em Etanol; **Sel.** = Seletividade em etanol.

A Figura 41 apresenta os parâmetros de produtividade e seletividade em função da conversão, a fim de permitir uma melhor comparação. Nota-se que para altas conversões (> 90%), a SIF com menor concentração de açúcar obteve resultados ligeiramente superiores em seletividade e produtividade.

**Figura 41** - Seletividade e Produtividade em etanol em função da conversão no processo SIF a 35 °C, semi-anaeróbio, para a levedura Itaiquara<sup>®</sup> e diferentes concentrações de xilose.



## 4.5 PANORAMA GERAL DOS ESTUDOS REALIZADOS

A partir das Equações de 1-13 e dos resultados apresentados nas Figuras de 18-40, foram calculados uma série de parâmetros para fins de comparação entre as diferentes linhagens de *S. cerevisiae* no processo SIF.

### 4.5.1 Balanço de massa de carbono

Utilizando as equações 10 a 12 foi calculada a recuperação de carbono em cada diferente experimento SIF. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

O balanço de carbono global de cada experimento foi calculado a partir das concentrações molares dos substratos consumidos e produtos gerados durante a reação de SIF, as quais foram mensuradas por cromatografia em fase líquida de alta eficiência. A estimativa da formação de CO<sub>2</sub> para inclusão no balanço de massa como produto da reação SIF foi baseada na estequiometria das reações de formação de etanol e ácido acético, conforme abordagem empregada por Kuyper *et al.* (2004) para a mesma finalidade.

A Tabela 8 mostra que a massa de carbono presente nos produtos é sempre menor do que a massa de C correspondente ao substrato consumido, levando a valores de recuperações entre 64 a 96%, dependendo das condições estudadas. A massa de carbono não recuperada está provavelmente associada ao cálculo subestimado da produção de CO<sub>2</sub>, que considerou apenas a formação associada à produção de etanol e ácido acético. Os experimentos dos conjuntos C1 e C3 foram realizados em presença de oxigênio, principalmente no início do cultivo e, portanto, houve produção de CO<sub>2</sub> por respiração. Mesmo para os experimentos C2 e C4, nos quais havia menor disponibilidade de oxigênio, a ocorrência de respiração durante o início dos experimentos não pode ser descartada. Da mesma forma, com a alta concentração de células empregadas nos experimentos, a produção de CO<sub>2</sub> pelo metabolismo endógeno também foi significativa. E, além disso, segundo Senac e Hahn-Hägerdal (1990), também pode ocorrer liberação de CO<sub>2</sub> no catabolismo da xilulose pela rota das pentoses fosfato (não oxidativa e oxidativa). Para elucidar as questões colocadas a respeito da produção de CO<sub>2</sub>, o monitoramento da produção de CO<sub>2</sub> durante os experimentos é necessário, o que é difícil de implementar para estudos conduzidos em frascos.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 8 mostra ainda que algumas condições de SIF influenciaram significativamente a recuperação do carbono. Comparando os conjuntos de experimentos C1 e C3, verifica-se que o aumento de temperatura reduziu em 12 % a recuperação do carbono para ambas leveduras. Isso pode ser atribuído ao aumento da contribuição do metabolismo endógeno em consequência do aumento da temperatura para 40°C. Observa-se ainda que a melhor recuperação foi registrada justamente para o experimento C4. Neste experimento, devido à alta concentração de xilose empregada, a formação de etanol foi favorecida desde o início do cultivo pelo chamado efeito *Crabtree*. Com isso, haveria um aumento da formação de CO<sub>2</sub> associada à formação de etanol e diminuição do CO<sub>2</sub> produzido por respiração.

**Tabela 8** - Recuperação de carbono para diferentes condições de SIF.

Conjunto experimentos	levedura	Xilose inicial (g/L)	Temperatura (C)	tempo (h)	Conv. Xilose (%)	Massa C <sub>in.</sub> (g)	Massa C <sub>fin.</sub> (g)	Recup. (%)
C1	BG-1	68,4	35	24	90	22,9	20,6	90,0
	CAT-1	62,0	35	24	95	23,7	20,5	86,7
	PE-2	67,4	35	24	92	21,0	13,4	64,0
	CEN.PK113-7D	70,0	35	16	99	26,4	24,5	92,8
	Fleischmann®	63,5	35	24	98	28,0	20,0	71,5
	Itaiquara®	70,0	35	11	97	25,2	23,3	92,4
C2	*BG-1	65,4	35	72	82	21,4	19,4	90,9
	*Itaiquara®	67,2	35	12	97	25,9	23,0	88,5
C3	CEN.PK113-7D	70,0	40	16	95	26,3	21,4	81,4
	Itaiquara®	70,0	40	16	97	26,3	21,2	80,6
C4	*Itaiquara®	130,4	35	27	90	47,0	45,4	96,5

Nota: \*SIF realizada em condição semi-anaeróbia tubo de 15mL, C = carbono in. = inicial, fin.= final

#### 4.5.2 Viabilidade e morfologia celular

Na Tabela 9 estão apresentados os dados iniciais e finais relativos à viabilidade e à concentração celular para as diferentes condições de SIF estudadas. Nota-se que no momento inicial, todos os experimentos apresentaram viabilidade alta (acima de 96%) e a

perda de viabilidade foi de no máximo 5 % para os experimentos realizados a 35 °C. Desta forma, pode-se concluir que as condições experimentais empregadas são adequadas para a preservação da viabilidade das células no período de tempo avaliado, de no máximo 48 h.

A perda mais expressiva de viabilidade foi observada nos experimentos conduzidos a 40°C (C3) para a levedura de panificação Itaiquara, com perda de mais de 90% de viabilidade comparada ao valor inicial. Entretanto a linhagem CEN.PK113-7D apresentou perda inferior a 9%, revelando que essa linhagem apresenta características termotolerantes.

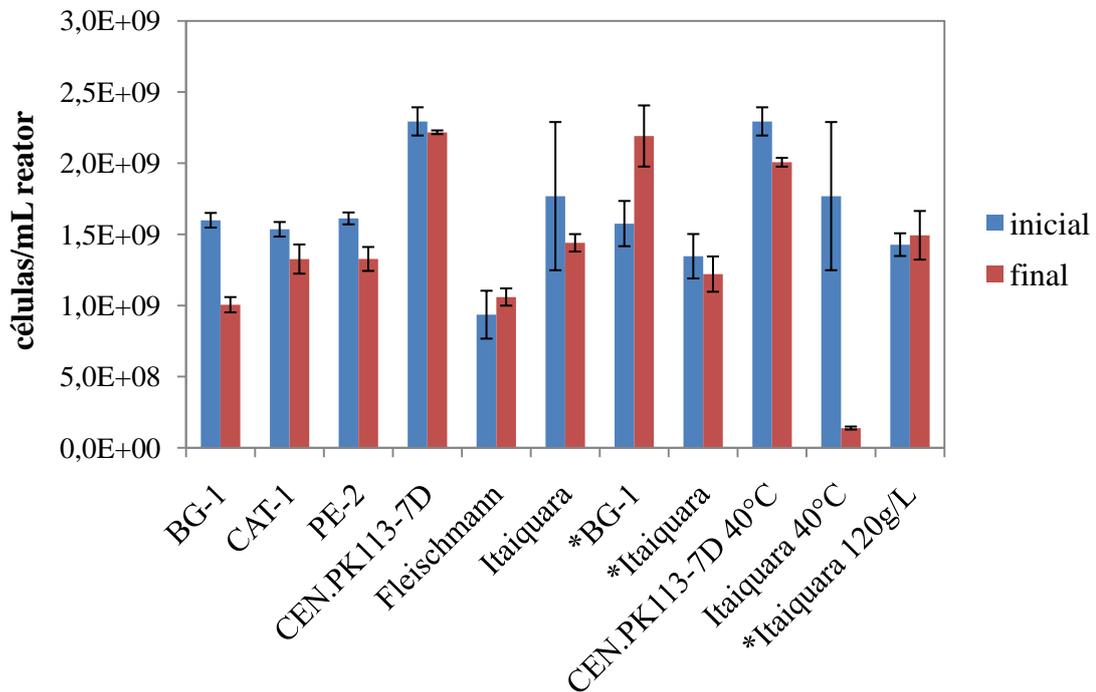
Nota-se ainda na Tabela 9 que houve variação significativa na concentração inicial de células nos experimentos realizados, com valores variando entre 1 e 2,3 (E+09) células/mL. Essa variação é inerente às diferenças na metodologia experimental empregada para a obtenção da massa de leveduras necessária para o preparo dos pellets. Enquanto as SIFs com as leveduras de panificação foram iniciadas usando diretamente uma massa previamente definida do produto comercial, a massa das demais leveduras foi obtida por cultivos individuais de cada cepa. No caso da levedura Fleischmann, que apresentou a menor concentração inicial, acredita-se que o produto comercial contenha outros sólidos, além das células da levedura, o que explicaria a menor concentração de células, apesar da mesma massa de levedura ter sido usada no preparo dos pellets dos experimentos SIF com as cepas Itaiquara e Fleischmann.

A partir dos dados apresentados na Tabela 9 em relação às concentrações finais e iniciais de células é possível fazer algumas considerações a respeito da ocorrência (ou não) de crescimento celular). Para facilitar essa análise, foi construída a Figura 42. Para a maioria dos experimentos, a variação entre a concentração inicial e final está dentro do erro experimental associado à metodologia de contagem e a ocorrência de crescimento não foi observada. Considerando-se a alta concentração de células empregada em todos os experimentos, esse resultado já era esperado, pois a demanda de energia para a manutenção celular era muito elevada. Apenas para a levedura BG-1, quando cultivada em condições semi-anaeróbias, registrou-se crescimento celular mais expressivo em experimento prolongado, com duração de 70 h. Considerando que o tempo de duplicação para *S. cerevisiae* em xilulose é de 34 horas (RICHARD *et al.* 2000), acredita-se que nesse experimento o tempo de cultivo e a disponibilidade de substrato permitiram que a observação de crescimento. Já para os demais experimentos, conduzidos por 24 horas, o tempo talvez não tenha sido suficiente para observar a ocorrência de crescimento.

**Tabela 9** - Viabilidade e concentração de células para diferentes condições de SIF.

Conjunto de experimentos	Levedura	Tempo (h)	Xilose inicial (g/L)	Temperatura (°C)	Vi (%)	Vf (%)	Perda Vi (%)	Cél./ mL reator (inicial)	Cél./ mL reator (final)
<b>C1</b>	BG-1	24	69,8	35	97,6±1,23	95,4±0,90	2,30	1,60±0,05 (E+09)	1,01±0,05 (E+09)
	CAT-1	24	62,0	35	97,6±0,88	97,9±0,85	-0,32	1,54±0,05 (E+09)	1,33±0,10 (E+09)
	PE-2	24	67,4	35	98,2±0,12	98,0±1,10	0,28	1,61±0,04 (E+09)	1,33±0,08 (E+09)
	CEN.PK113-7D	24	70,0	35	97,5±1,13	97,2±0,91	0,38	2,29±0,10 (E+09)	2,22±0,01 (E+09)
	Fleischmann	24	63,5	35	96,9±1,24	92,0±4,75	5,05	0,94±0,17 (E+09)	1,06±0,06 (E+09)
	Itaiquara	24	70,0	35	99,3±0,87	98,3±2,22	1,03	1,77±0,52 (E+09)	1,44±0,06 (E+09)
<b>C2</b>	*BG-1	72	65,4	35	99,2±0,68	97,5±1,10	1,77	1,58±0,16 (E+09)	2,19±0,22 (E+09)
	*Itaiquara	24	67,2	35	98,9±0,30	97,8±1,37	1,05	1,35±0,16 (E+09)	1,22±0,12 (E+09)
<b>C3</b>	CEN.PK113-7D	24	70,0	40	97,5±1,13	89,1±2,55	8,64	2,29±0,10 (E+09)	2,01±0,03 (E+09)
	Itaiquara	24	70,0	40	99,3±0,87	7,5±3,96	92,49	1,77±0,52 (E+09)	0,14±0,01 (E+09)
<b>C4</b>	*Itaiquara	27	130,4	35	98,9±0,99	97,8±2,19	1,06	1,43±0,08 (E+09)	1,49±0,17 (E+09)

Nota: \*SIF realizada em condição semi-anaeróbia tubo de 15mL, Vi = Viabilidade inicial, Vf= Viabilidade final

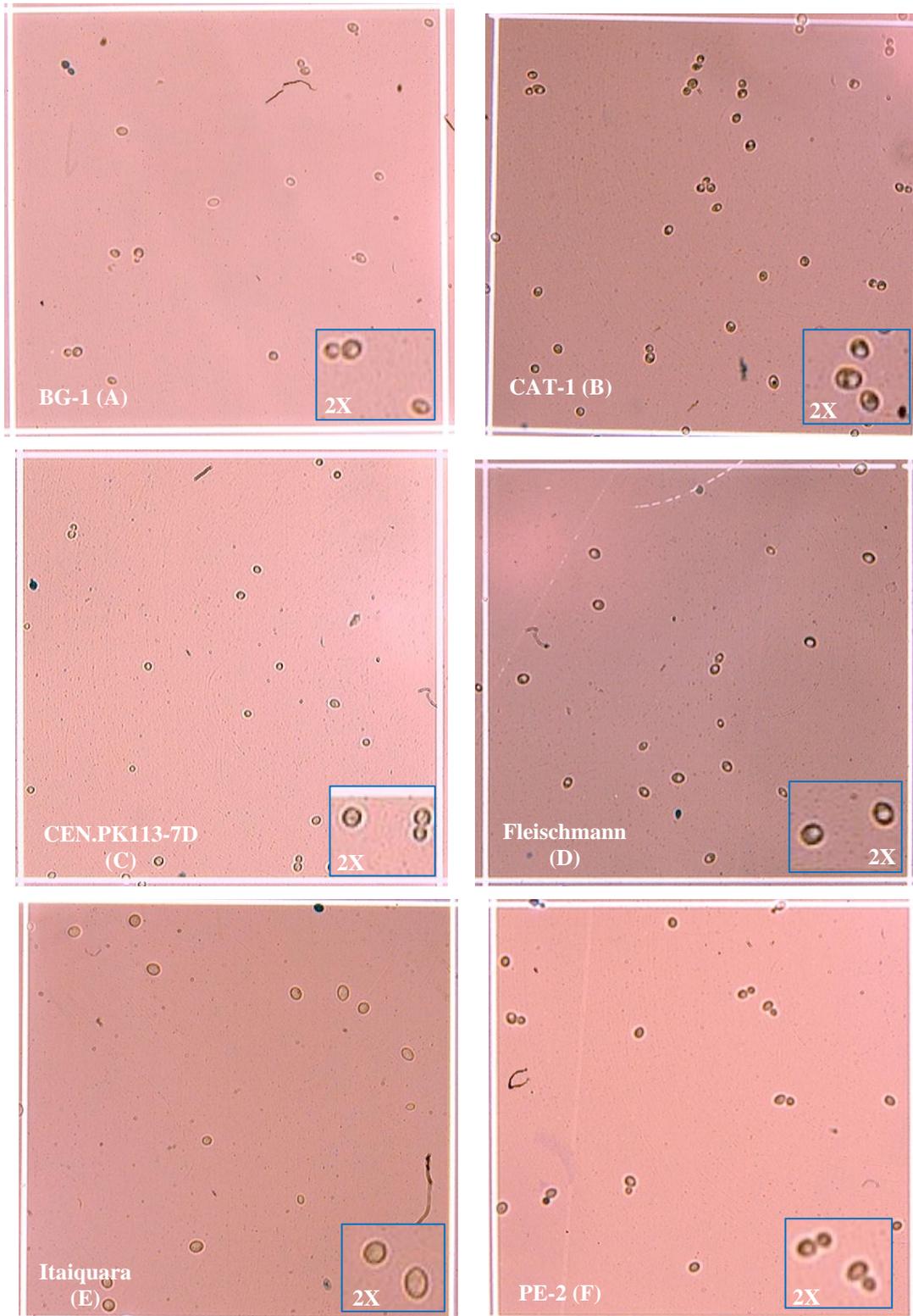
**Figura 42** - Concentração celular para cada diferente SIF.

Nota: \*SIF realizada em condição semi-anaeróbia tubo de 15mL.

Para avaliar as características principais da morfologia celular das leveduras estudadas durante as SIFs de xilose, imagens obtidas em microscópio ótico foram reunidas na Figura 43. É possível observar que as leveduras BG-1 Itaiquara, Fleischmann e PE-2 possuem formas ovaladas, enquanto as leveduras CEN.PK113-7D e CAT-1 são mais esféricas. A levedura Itaiquara possui tamanho um pouco mais avantajado e a levedura CEN.PK113-7D um tamanho pouco inferior que as demais. O menor tamanho da levedura CEN.PK113-7D explica também as maiores concentrações iniciais de células nos experimentos SIF C1 e C3 realizados com essa linhagem, conforme mostram a Tabela 9 e a Figura 43. Como os experimentos SIF foram padronizados em termos de massa de levedura usada na imobilização, células de menor tamanho resultariam em concentração – em nº de células – maior.

**Figura 43** – Diferentes linhagens utilizadas nos experimentos SIF (A) BG-1, (B) CAT-1, (C) CEN.PK113-7D, (D) Fleischmann, (E) Itaiquara, (F) PE-2.

Todas as imagens das leveduras apresentadas, são respectivas ao tempo 24 horas de cada experimento.



Nota: o quadro inferior de cada imagem apresenta zoom de 2x

A partir dos dados de concentração final de células viáveis apresentados na Tabela 9 é possível expressar os parâmetros produtividade e velocidade de assimilação de xilulose em termos específicos, ou seja, em função da massa viável de levedura (Tabela 10). Esses resultados podem ser comparados com os correspondentes listados na Tabela 5, extraídos da literatura, relativos ao cultivo anaeróbico das leveduras em glicose ou sacarose como substrato. Para as leveduras BG-1 CAT-1 e PE-2 nota-se que a velocidade de assimilação específica foi 8,5 vezes, em média, menor quando utilizado o substrato xilulose. Já a produtividade específica foi, em média, 33 vezes menor. Isso comprova a dificuldade do transporte e catabolismo da xilulose pela levedura para a produção de etanol e a necessidade de uso de alta carga de células num processo SIF.

Na Tabela 10 observa-se ainda que a levedura Itaiquara foi a que mais se destacou nos parâmetros específicos, seguido da levedura de laboratório CEN.PK113-7D. Para as leveduras industriais, o destaque foi para a levedura CAT-1.

Analisando as diferentes condições de SIF, observa-se um decréscimo de ~60% e ~19% dos parâmetros de velocidade de assimilação e produtividade específicas para as leveduras BG-1 e Itaiquara, respectivamente, na condição de menor disponibilidade de oxigênio (SIF semi-anaeróbia). Esses resultados sugerem que o nível de oxigênio influencia de forma diferente cada linhagem e que sua diminuição afeta a produtividade e a velocidade de assimilação de xilulose.

Na condição de maior temperatura, a levedura Itaiquara apresentou uma queda na velocidade de assimilação e na produtividade específicas de 44%, o que é explicado pela alta perda de viabilidade celular nessa condição. Já para a levedura de laboratório, não se observou influência da temperatura na produtividade ou velocidade de assimilação, reforçando a característica termotolerante dessa linhagem.

**Tabela 10** - Produtividade e velocidade de assimilação específicas para diferentes condições de SIF.

Conjunto de experimentos	Levedura	xilose inicial (g/L)	Temperatura °C	tempo (h)	Lev. Imob. (gM.S.)	$Pr_{esp.} (g_{ETOH} \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1})$	$Ass_{esp} (g_s \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1})$
C1	BG-1	69,8	35	24	0,4515	1,25±0,35 (E-02)	3,63±1,06 (E-02)
	CAT-1	62,0	35	24	0,3337	1,90E-02	5,91E-02
	PE-2	67,4	35	24	0,4102	0,98E-02	5,01E-02
	CEN.PK113-7D	70,0	35	16	0,3848	2,65E-02	9,29E-02
	Fleischmann	63,5	35	24	0,3234	1,79E-02	6,44E-02
	Itaiquara	70,0	35	11	0,3805	4,37±1,27 (E-02)	13,61±3,47 (E-02)
C2	*BG-1	65,4	35	72	0,4164	0,55±0,06 (E-02)	1,43±0,06 (E-02)
	*Itaiquara	67,2	35	12	0,3903	3,54±0,08 (E-02)	11,08±0,07 (E-02)
C3	CEN.PK113-7D	70,0	40	16	0,3779	2,71E-02	9,15E-02
	Itaiquara	70,0	40	16	0,4002	2,36E-02	7,90E-02
C4	*Itaiquara	130,4	35	27	0,3681	3,43±0,21 (E-02)	9,45±0,01 (E-02)

Nota: \*SIF realizada em condição semi-anaeróbia tubo de 15 mL,

Lev. Imob. (gM.S.) – Massa de levedura viável imobilizada nos pellets em cada SIF

$Pr_{esp.} (g_{ETOH} \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1})$  – Produtividade específica de etanol,  $g_{ETOH}$  = g de etanol,  $g_{Cél}$  = massa de células, h = horas

$Ass_{esp} (g_s \cdot g_{Cél}^{-1} \cdot h^{-1})$  – Assimilação específica de substrato,  $g_s$  = g de xilose + xilulose,  $g_{Cél}$  = massa de células, h = horas.

### **4.5.3 Comparação entre o processo SIF estudado e as alternativas de aproveitamento de xilose apresentadas na literatura**

Para facilitar a comparação com os resultados relatados na literatura para a produção de etanol utilizando as mesmas leveduras no processo convencional (a partir de glicose ou sacarose), os principais resultados obtidos em todos os experimentos realizados, assim como as condições experimentais empregadas, foram resumidos na Tabela 11. Comparando os valores apresentados na Tabela 11 com os da Tabela 5, algumas considerações preliminares podem ser feitas a respeito da produção de etanol pelo processo SIF. O rendimento em etanol do processo SIF é cerca de 30 % menor do que a média dos valores de rendimento para o processo convencional de produção de etanol, tendo glicose ou sacarose como substratos (Tabela 5). Essa diferença é explicada pela expressiva formação de xilitol – e arabitól no caso específico da BG-1 – uma característica do metabolismo de xilose/xilulose em leveduras (CHIANG *et al.*, 1982).

Analisando apenas os dados apresentados na Tabela 11, para as SIFs realizadas em diferentes condições de temperatura, presença de oxigênio e concentração de xilose, conclui-se que conversões de xilose de no mínimo 82% foram atingidas, comprovando que todas as leveduras utilizadas são capazes de consumir xilulose. Mesmo a 40°C, onde a viabilidade celular caiu consideravelmente, houve consumo de xilulose e formação de etanol. Os dados apresentados na tabela reforçam que a levedura Itaiquara é, sem dúvida, a mais adequada, dentre as estudadas, para a condução da SIF de xilose.

Os dados resumidos na Tabela 11 também podem ser comparados com outros processos de obtenção de etanol a partir de xilose relatados na literatura para outros microrganismos ou ainda diferentes linhagens de *S. cerevisiae*, inclusive geneticamente modificadas, alguns desses dados estão reunidos na Tabela 12. Constata-se que o sistema de SIF de xilose com o biocatalisador desenvolvido no atual estudo apresentou desempenho similar ou superior em produtividade, conversão, rendimento e concentração de etanol em relação aos obtidos em estudos na literatura com outras leveduras, *S. cerevisiae* inclusive organismos geneticamente modificados.

Os produtos etanol e xilitol estão expressos para o tempo de produtividade máxima em etanol assim como os parâmetros conversão de xilose, produtividade e

seletividade em etanol. Já os rendimentos em etanol e xilitol foram calculados nos tempos respectivos aos maiores valores observados (maior rentabilidade).

**Tabela 11** - Resumo de parâmetros calculados para diferentes SIF's variando Temperatura (°C), Concentração inicial de Xilose e diferentes volumes de tubo reator.

Levedura	Tempo (h)	(°C)	Xilose inicial (gxL <sup>-1</sup> )	Etanol (gxL <sup>-1</sup> )	Xilitol (gxL <sup>-1</sup> )	Conversão (%)	Prod. Etanol (gxL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Seletividade	Y <sub>E/S</sub>	Y <sub>X/S</sub>	pH <sub>i</sub> -pH <sub>f</sub>	Viab. (%)
<b>BG-1</b>	24	35	69,8	20,3	2,8	90	0,8±0,24	4,3±1,27	0,35±0,005	0,07±0,029	5,3-5,4	95,4
<b>*BG-1</b>	72	35	65,4	20,8	2,3	82	0,3±0,03	5,1±0,65	0,39±0,010	0,04±0,002	5,5-5,1	97,5
<b>CAT-1</b>	24	35	62,0	19,0	9,6	95	0,8	3,1	0,32	0,16	5,6-5,6	98,2
<b>CEN.PK117-7D</b>	16	35	70,0	20,4	15,4	99	1,3	2,5	0,32	0,24	5,5-5,3	97,2
<b>CEN.PK117-7D</b>	16	40	70,0	20,5	8,7	95	1,3	3,8	0,30	0,14	5,5-5,5	89,1
<b>Fleischmann®</b>	24	35	63,5	17,3	12,7	98	0,7	3,0	0,28	0,20	5,6-4,9	92,0
<b>Itaiquara®</b>	11	35	70,0	22,9	9,9	97	2,1±0,32	4,7±0,40	0,31±0,004	0,14±0,013	5,6-5,4	98,3
<b>*Itaiquara®</b>	12	35	67,2	20,7	14,6	97	1,7±0,04	3,6±0,02	0,32±0,004	0,24±0,001	5,5-5,4	97,8
<b>Itaiquara®</b>	16	40	70,0	18,9	12,3	97	1,2	2,8	0,30	0,19	5,3-5,6	7,45
<b>*Itaiquara®</b>	27	35	130,4	42,7	20,6	90	1,6±0,04	3,8±0,10	0,34±0,02	0,17±4,8E-4	5,6-5,2	97,8
<b>PE-2</b>	24	35	67,4	12,1	5,9	92	0,5	2,7	0,20	0,10	5,6-5,2	98,0

Fonte: Produção do autor

Nota: \*SIF realizada em tubo de 15 mL (semi-anaeróbia), Prod. Etanol = produtividade volumétrica de etanol, Y<sub>E/S</sub>=Rendimento: Etanol/Substrato, Y<sub>X/S</sub>=Rendimento: Xilitol/Substrato, Seletividade para Etanol referente a outros compostos produzidos, i= inicial, f= final, Viab. (%) = viabilidade celular no tempo final da SIF, Composição dos pellets = 10% massa seca de levedura para 20%enzima úmida, Relação pellets meio 1:1, volume total de 8 mL.\*SIF realizada em falcon de 15 mL (semianaeróbica), Demais SIF's realizadas em falcon de 50 mL (microaeróbica).

**Tabela 12** - Parâmetros de diferentes microrganismos por diferentes processos na conversão de xilose em etanol.

Levedura	Conc. levedura (gxL <sup>-1</sup> )	Xilose inicial (gxL <sup>-1</sup> )	Conv. (%)	Tempo (h)	Etanol (gxL <sup>-1</sup> )	Prod. (gxL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>E/S</sub>	Xilitol (gxL <sup>-1</sup> )	pH	Temperatura (°C)	OBS:	Ref
Itairara®	1,6x10 <sup>9</sup> cel/mL	70	97	11	22,9	2,1	0,31	9,9	5,5	35	pH controlado	Presente trabalho
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	4x10 <sup>8</sup> cel/mL	120	39	10	18	1,8	0,38	Nr	6	40	pH controlado	GONG <i>et al.</i> , 1981
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> YSC2, tipo II (Sigma Aldrich)	200	39	46	10	5,5	0,55	0,39	1,18	4,5	34	Inibição da XI por xilitol	YUAN <i>et al.</i> , 2012
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3	60	100	48	21	0,43	0,35	8	5,7	35	pH controlado	LASTICK <i>et al.</i> , 1989
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *	20	65	75,4	48	12	0,25	0,25	9,5	5,3	35	Redução no pH	SILVA <i>et al.</i> , 2012
<i>Scheffersomyces myces (Pichia stipitis)</i> UFMG-HMD-15.2	12,9	50	84,5	24	12,3	0,51	0,24	1,9	6	-	Fermentação	CADETE <i>et al.</i> , 2012
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MN8140XX	50	50	65,5	12	10,7	0,89	0,21	6	6,1	30	Fermentação recombinante com XR, XDR e XK **	KATO <i>et al.</i> , 2012

Nota: \* *Saccharomyces cerevisiae*: levedura de panificação, Conc. = concentração, Prod. = produtividade, Y<sub>E/S</sub> = rendimento em etanol, Nr = não reportado.

\*\*Linhagem diploide de *Saccharomyces cerevisiae* com expressão de xilose redutase(XR), xilitol desidrogenase (XDR) heteróloga de *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, e superexpressão de xiluloquinase(XK), Y<sub>E/S</sub> : rendimento em etanol da concentração de xilose inicial.

Fonte: Adaptado de AQUINO, 2012.

## 5 CONCLUSÕES

Tanto o *screening* por leveduras com maior afinidade pela xilulose assim como a identificação das condições de cultivo que favoreçam a produção de etanol e uma melhor compreensão do metabolismo desse açúcar por *S. cerevisiae* são fundamentais para o estabelecimento de um processo industrial baseado no aproveitamento da fração hemicelulósica para a produção de etanol.

Os resultados obtidos com os experimentos SIF empregando 6 diferentes linhagens de *S. cerevisiae* demonstram que há diferenças significativas na assimilação de xilulose e na produção de etanol a partir desse açúcar. Das linhagens testadas e nas diferentes condições de cultivo utilizadas, a levedura de panificação Itaiquara® demonstrou ser a mais adequada para o processo SIF a 35°C devido aos resultados superiores de conversões 90 a 99% e assimilação de substrato e de produção de etanol chegando a uma concentração de até 42,7 g/L, além do bom rendimento em etanol até 0,39 , exibido pela mesma. A levedura CEN.PK113-7D apresentou características termotolerantes no processo SIF, pois manteve sua viabilidade celular, produtividade e assimilação específicos nos experimentos realizados a 40°C

Estudos exploratórios a respeito da influência do nível de aerobiose, da temperatura e da concentração de xilose mostraram que as diferentes cepas de leveduras estudadas conseguem metabolizar a xilulose e convertê-la em etanol nas mais diversas condições. No entanto, verifica-se a necessidade de experimentos adicionais, conduzidos em biorreatores em condições controladas de pH e fornecimento de oxigênio, para se chegar a conclusões mais fundamentadas sobre a influência dessas variáveis e estabelecer condições de operação que favoreçam a seletividade em relação à formação de etanol, minimizando a produção de xilitol.

A boa recuperação de carbono na faixa de 80,6 a 96,5% no balanço material realizado para a maioria dos experimentos SIF demonstra consistência dos dados experimentais obtidos pela metodologia experimental proposta. Apenas os experimentos SIF realizados com as leveduras PE-2 e Fleischmann apresentaram recuperação de carbono inferior a 72%, esses resultados podem ser explicados, pois, não foram quantificados todos os produtos provenientes do metabolismo prejudicando o cálculo de recuperação de carbono.

As informações coletadas nos experimentos preliminares permitem definir condições de operação para uma SIF contínua de xilose em reator de leito fixo e excluir outras. A alta perda de viabilidade observada no experimento conduzido a 40 °C define como limite máximo a temperatura de 35 °C. E, para a levedura Itaiquara, considerando uma alimentação contendo 60 g/L de xilose, o tempo de residência no sistema constituído por 3 reatores em série deve ser de aproximadamente 10 h (ou 3,3 h em cada reator).

### SUGESTÕES PARA A CONTINUIDADE DO TRABALHO

Estudos complementares são necessários para consolidar algumas das possibilidades levantadas no presente trabalho a respeito da influência das condições de cultivo sobre a produção de etanol, visando à otimização do processo SIF de xilose. Dentre os muitos aspectos que poderiam ser explorados mais detalhadamente, destacam-se:

- repetição dos experimentos com todas as linhagens de levedura em condições mais próximas da anaerobiose, utilizando falcons de 15 mL contendo 12 mL de volume reacional,
- realização dos experimentos em condições próximas da anaerobiose em temperaturas de 40°C para as leveduras industriais;
- expandir o *screening* por leveduras que apresentem assimilação de xilulose e produção de etanol, incluindo outras espécies além da *S. cerevisiae*, preferencialmente identificadas como termotolerantes e que possam ser cultivadas em pH mais próximo do valor ótimo para a isomerização.

Verificou-se ainda que a inexistência de estudos específicos sobre o metabolismo de xilulose por *S. cerevisiae* dificultou a interpretação dos resultados e a identificação das condições de cultivo que favoreceriam a seletividade em etanol. Por isso, sugere-se que experimentos com xilulose como substrato sejam realizados em condições controladas (biorreator) para a caracterização do metabolismo desse açúcar por *S. cerevisiae*.

Finalmente, sugere-se a continuidade dos testes de operação dos reatores de leito fixo associados em série, já iniciados, para que o desempenho do processo SIF contínuo em diferentes condições de operação possa ser avaliado. Dentre as possibilidades de estudo que poderiam ser exploradas, destacam-se: i) o uso de altas concentrações de xilose na alimentação, que poderia favorecer alta produção de etanol e minimizar os riscos de contaminação; ii) a avaliação da manutenção da viabilidade das leveduras em longos períodos

de operação contínua; iii) a operação do reator com perfis oscilatórios de temperatura, mantendo-a em 40 °C por um período curto, seguido pela redução para 35 °C por um período mais prolongado, alternadamente.

## 6 REFERÊNCIAS

AACHARY, A.A.; PRAPULLA,S.G; Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety** 10(2-6), 2011.

AMORIM, H. V., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., Processos de Produção de Álcool – Controle e Monitoramento, FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba – São Paulo, 103 p; 1996

BARNETT, J. A.; The Utilization of Sugars by Yeast, **Advanced Carbohydrates Chemistry Biochemistry**, v32, 125-234, 1976.

BARNETT, J. A.; The Utilization of Disaccharides and Some Sugars by Yeast, **Advanced Carbohydrates Chemistry Biochemistry**, v39, 347-404, 1981.

BASSO, LUIZ C.; AMORIM, HENRIQUE V. DE; OLIVEIRA, ANTONIO J. DE; LOPES, MARIO L.; Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil, **FEMS Yeast Re**, p.1155–1163, 2008.

BASSO, T. O.; KOK, S.; DARIO, M.; ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J.-M.; GOMBERT, A. K.; VANMARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield,2011.

BATT, C.A.; CARVALLO, S; EASSON, D.D.; AKEDO, M.; SINSKEY, A.J.: Direct evidence for a xylose metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Bioeng**; v28 p549–53, 1986.

BERTILSSON, M., ANDERSSON, J., LIDESPIRIT. Modeling simultaneous glucose and xylose uptake in *Saccharomyces cerevisiae* from kinetics and gene expression of sugar transporters. **Bioprocess. Biosyst. Eng.** v.31, n.4, p.369–377, 2008.

BERTONCINI, E. I. In: ASPECTOS AMBIENTAIS DA CADEIA DO ETANOL DE CANA-DE-AÇÚCAR. Painel IV: Geração de Resíduos da Indústria da Cana-de-açúcar, 2008. Disponível em: <http://www.apta.sp.gov.br/cana>. Acesso em Janeiro 2013.

BIRCH, R. M.; WALKER, G. M. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb Technol** [S.I.], v. 26, n. 9-10, p. 678-687, 2000.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic material: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 3, n. 2, p. 90-104, Apr. 1981.

BISSON, L.F.; COONS, D.M.; KRUCKEBERG, A.L.; LEWIS DA. Yeast sugar transporters. **Crit Rev Biochem Mol Biol** v.28: p.259–308. 1993.

BOLES E.; HOLLENBERG, C.P.: The molecular genetics of hexose transport in yeasts. **FEMS Microbiol Rev**;21:85–111, 1997.

BRIENZO, M; SIQUEIRA, A. F.; MILAGRES, A. M. F.; Search for optimum conditions of sugarcane bagasse hemicelluloses extraction. **Biochemical Engineering Journal**, n. 46, p. 199-204, 2009.

BUDRIENE, S.; GOROCHOVCEVA, N.; ROMASKEVIC, T.; YUGOVA, L. V.; MIEZELIENE, A.; DIENYS, G. ZUBRIENE, A. Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization, *Central Eur. J. of Chem.*, v. 3 (1), p. 95–105, 2005.

CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43135, jan. 2012.

CÂNDIDO, Rafael Garcia; DA SILVA, Vinícius Fernandes Nunes; OLIVEIRA, Luís Ricardo Martins; GONÇALVES, Adilson Roberto; ROCHA, George Jackson de Moraes. Estudo comparativo de pré-tratamentos do bagaço de cana visando à obtenção de etanol celulósico, In: XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 2009, Natal, Brasil.

CANILHA, Larissa. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

CARVALHO JR A. M.; GALVÃO A. C.; Bioetanol de cana-de-açúcar : energia para o Desenvolvimento sustentável / organização BNDES e CGEE. – Rio de Janeiro : BNDES, 316 p. 2008.

CHANDRAKANT, P.; BISARIA, V. S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 301-309, 2000.

CHIANG, L.C.; GONG, C.S.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. A. A. Potter Engineering Center, Purdue University, Laboratory of Renewable Resources Engineering, West Lafayette, 1981.

CHIANG, L. C., *et al.* Ethanol production from pentoses by immobilized microorganisms. **Enzyme and Microbial Technology**, p. 93-95, v. 4, 1982.

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

CONAB, 2012. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento de safra brasileira : cana-de-açúcar, terceiro levantamento, dezembro/2012 - Companhia Nacional de Abastecimento. – Brasília : Conab 2012.

CONVERSE, A. O.; WARE, W. On the reactivity of cellulosic substrates in enzymatic hydrolysis. In: **Iea/Biofor - Workshop On Applications Of Biotechnology In Bioenergy Systems**, Ottawa. Canadá. 1994.

COSTA, D. A. Caracterização de leveduras termotolerantes para produção de etanol celulósico. 2011, p.61, dissertação (*Magister Scientiae*), Universidade Federal De Ouro Preto (Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas), Ouro Preto, 2011.

DHIMAN, S.S.; SCHARMA, J.; BATTAN, B.; Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. **BioResources** 3,4(1377-1402), 2001.

DIEN, B. S. *et al.* Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, p. 258–266, 2003.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26.** 2006. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.

DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous Culture of Flocculent Yeast for Ethanol production.** Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

DU PREEZ, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. **Enzym Microb Technol**, v.16, p. 944–956, 1994.

EPTING, K. L. Biochemical, Biophysical and Biotechnological Studies of Class II Xylose Isomerases from Hyperthermophilic Thermotoga Species. Tese de Doutorado, North Carolina State University, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions.** Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FIALHO, Lucimar Lopes; DA SILVA, Wilson Tadeu Lopes; MILORI, Debora M. B.; SIMOES, Marcelo Luiz; MARTIN-NETO, Ladislau; SAAB, Sergio da Costa. Interferência da Lignina na Quantificação de Radicais Livres no Processo de Compostagem. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 364-369, 2010.

FRY, S.C.; YORK, W.S.; ALBERSHEIM P.; DARVILL, A.; HAYASHI, T.; JOSELEAU, J-P; KATO, Y; PCREZ, LORENCES E, MACLACHLAN GA, MCNEIL M, MORT AJ, REID JSG, SEITZ HU, SELVENDRAN RR, VORAGEN AGJ, WHITE AR An unambiguous nomenclature for xyloglucan-derived oligosaccharides. *Physiol Plant* 89 1-3, 1993.

GABRIELII, I.; GATENHOLM, P.; GLASSER, W.G.; JAIN, R. K.; KENNE, L.; Separation, characterization and hydrogel-formation of hemicelluloses from aspen wood, **Carbohydrate. Polymers**. 43, 367-374. 2000.

GALBE M, Z. G.; A review of the production of ethanol from softwood. **Appl Microbiol Biotechnol** v.59, p.618–628, 2002.

GIORDANO, R. L. C. Estudo da coimobilização de glicoamilase e levedura para a fermentação alcoólica de matéria-prima amilacea. Tese de Doutorado, São Paulo, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 1992.

GÍRIO F.M., C. FONSECA, F. CARVALHEIRO, L.C. DUARTE, S. MARQUES, R. BOGEL-LUKASIK, Hemicelluloses for fuel ethanol: A review, **Bioresource Technology**, Laboratório Nacional de Energia e Geologia, I.P., Unidade de Bioenergia, Estrada do Paço do Lumiar 22, p26, Lisboa, Portugal, 2010.

GOLDEMBERG, José. Biomassa e energia **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587. março, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brasil, 2009.

GOLDESTEIN, I.S. **Organic Chemicals from Biomass**. Boca Raton, FL: CRC Press, p.320 1981.

GONG, C.S. *et al.* Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 430-436, 1981.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A.M; ROCHA G. J. M.; Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife – PE, Brasil, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Campus I, Lorena – SP, Brasil 2009.

GRANSTRÖM, T., OJAMO, H. and LEISOLA, M.; Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 55, p. 36–42. 2001.

GULLÓN, P.; SALAZAR, N.; MUNOZ, M.J.; GUEIMONDE, M.; RUAS-MADIEDO, P.; REYES- GAVILÁN, C.G.; PARAJÓ, J.C.; Assessment on the fermentability of Xylooligosaccharides from rice husks; **Bioresources** 6,3 (3096-3114), 2011.

HARTMAN, J.; ALBERTSSON, A.-C.; SJÖBERG, J.; **Biomacromolecules** 2006, 7, 1983.

HAYASHI, T.; MACLACHLAN, G. A.; Pea xyloglucan and cellulose. I. Macromolecular organization. **PL Physiol**.p. 75, 596-604, 1984.

HAYASHI, T.; MARSDEN, M.P.F.; DELMER, D.P.; Pea xyloglucan and cellulose. V. Xyloglucan-cellulose interactions *in vitro* and *in vivo*. **Plant Physiol** 83: 384-389, 1987.

HAYASHI, T.; Xyloglucans in the primary cell wall. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* p.40: 139-168, 1989.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; VAN JANSEN, R. E. L.; HOWARD, S.; Lignocellulose biotechnology: Issues of bioconversion and enzyme production," *African J. Biotechnol.* 2, 602-619, 2003.

HYVÖNEM, L.; KOIVISTOINEM, P; VOIROL, F.; Food technological evaluation of xylitol. *Advances in Food Research*, v.28, p.373-403, 1982.

JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 17, p. 320–326, 2006.

JOHN, M. J.; THOMAS, S.; *Carbohydr. Polym.*, p.71, 343. 2008

KATO, H. et al. Improvements in ethanol production from xylose by mating recombinant xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 94, n. 6, p. 1585-92, jun. 2012.

KLOCK U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ J. A.; ANDRADE A. S. Química Da Madeira, 3ª. Ed. Departamento De Engenharia E Tecnologia Florestal, Curitiba, 2005

KÖTTER, P.; CIRIACY M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 38, p. 776-783, 1993.

KRUCKEBERG, A.L.; The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol*;166:283–92, 1996.

KUYPER M.; WINKLER, A. A.; VAN DIJKEN J. P.; PRONK, J. T. Minimal metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic xylose fermentation: a proof of principle. *FEMS Yeast Research*, 4 655–664, 2004.

LACHKE, A. Biofuel from D-xylose Fermentation: a proof. T. Minimal metabolicmpus I, CP 2002.

LAGUNAS, R.; Sugar Transport in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEMS Microbiology Rev.* v104, 229-242, 1993

LASTICK, S. M. *et al.* Simultaneous fermentation and isomerization of xilose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 30, p. 574-579, 1989.

LASTICK, S. M.; MOHAGHEGHI, A.; TUCKER, M. P.; GROHMANN, K. Simultaneous fermentation and isomerisation of xylose to ethanol at high xilose concentrations. *Applied Biotechnology and Bioengineering* v.24/25, p.431–439, 1990.

LEE, W.J.; KIM, M.D.; RYU, Y.W.; BISSON, L.F.; SEO, J.H.: Kinetic studies on glucose and xylose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl Microbiol Biotechnol**; p.60:186–91, 2002.

LIMA, D. U.; **Polissacarídeos De Reserva De Parede Celular Em Sementes. Estrutura, Metabolismo, Funções E Aspectos Ecológicos**, Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica de São Paulo, Bras. Fisiol. Veg., 12(Edição Especial): p.137-162, São Paulo-SP, 2000.

LIMA, K. G. C.; TAKAHASHI C. M.; ALTERTHUM F.; Produção de etanol por *Escherichia coli K011*, **Biocombustíveis: Ciência & Desenvolvimento**, p.4, n. 27, 2002.

MANRICH, A. **Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de lignocelulósicos pré-tratados com xilanases imobilizadas e estabilizadas**, tese (doutorado) São Carlos: UFSCar, p. 103, 2012.

MARTINS, R. E. **Estudo da Imobilização de Celulase em Géis de Quitosana**, Dissertação (mestrado em Engenharia Química) UFSCar. São Carlos, p.98, 2007.

MEINANDER, N. *et al.* A heterologous reductase affects the redox balance of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 142, p. 165-172, 1996.

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

MONTANE, D., SALVADO, J., TORRAS, C., AND FARRIOL, X. High-temperature dilute-acid hydrolysis of olive stones for furfural production, **Biomass Bioenergy** v.22, p.295-304, 2002.

MORAES, G. S., **Efeito dos Diferentes Tratamentos Químicos na Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar**. Relatório de Iniciação Científica – Fundação Educacional do Município de Assis, Química Industrial, Assis, p.27, 2009.

MORAES, G. S.; **Estudo Do Pré-Tratamento Alcalino do Bagaço de Cana-De-Açúcar Para Posterior Hidrólise Utilizando Enzima Livre e Imobilizada. Trabalho de Conclusão de Curso (Química Industrial) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA/Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA**. 64p, 2010.

MORAIS, M. R., **Produção de Etanol em Meio Sintético com Recuperação de Fermento Entre Bateladas Sucessivas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, 122p., 2009.

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

NAKATA, T.; MIYAFUJI, H.; SAKA, S. Ethanol production with b-xylosidase, xilose isomerase, and *Saccharomyces cerevisiae* from the hydrolysate of Japanese beech after hot-compressed water treatment. **The Japan Wood Research Society**, v.55, p.289–294, 2009.

NIGAM, P., SINGH, D.: Processes for fermentative production of xylitol: a sugar substitute. **Process Biochem.**, v.30, p.117- 124, 1995.

NUNES SILVA, V. F.; **Estudos de pré-tratamentos e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico.** Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de Lorena– Universidade de Sao Paulo, Lorena, p.116, 2009.

OLIVEIRA, F. M. V. **Estudo de diferentes condições de pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar no processo de obtenção de bioetanol.** 2007. 49p. Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade de Pernambuco, Recife, 2007.

OLIVIER, S. P.; DU TOIT, P. J.; Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. II. Optimization of the xylose isomerase reaction for isomerization of xylose as well as sugar cane bagasse hydrolyzate to xilulose, laboratory-scale units. **Biotechnol Bioeng**, v. 28, p.684–699, 1986.

OLSSON L, HAHN-HÄGERDAL B.; Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochem**, v.28, p.249–257, 1993.

OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B.; Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, 312–331, 1996.

PARAJO, J. C.; DOMINQUEZ, H. D.; DOMINQUEZ, J. M.; Biotechnological production of Xylitol. Part 1: Interest of Xylitol and fundamentals of its biosynthesis, **Biores. Technol.** v.65, p.191-201, 1998.

PERES, M. F. S.; LALUCE, C. Ethanol tolerance of thermotolerant yeasts cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 85, n.4, p. 388-397, 1998.

PITKÄNEN JP, RINTALA E, ARISTIDOU A, RUOHONEN L, PENTTILA M. Xylose chemostat isolates of *Saccharomyces cerevisiae* show altered metabolite and enzyme levels compared with xylose, glucose, and ethanol metabolism of the original strain. **Appl Microbiol Biotechnol**;67:827–37, 2005.

PITKÄNEN, JUHA-PEKKA. *et al.* Metabolic flux analysis of xylose metabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using continuous culture. **Metabolic Engineering**, v. 5 p. 16–31, 2003.

**PLANT STRUCTURE** - [www.nature.com/nature/journal/v454/n7206/images/nature07190-f2.2.jpg&imgrefurl](http://www.nature.com/nature/journal/v454/n7206/images/nature07190-f2.2.jpg&imgrefurl) (acesso em Janeiro de 2013).

PRIEFERT, H.; RABENHORST, J.; STEINBUHEL, A. Biotechnological production of vanillin, **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.56, p.296-314. (2001).

REIFENBERGER, E., BOLES, E., CIRIACY, M.: Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem.** v. 245, n. 2, p.324–333, 1997.

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isolados de processos fermentativos para a produção de etanol. 2011, p. 80, dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2011.

REYES, Juan; PERALTA-ZAMORA, Patrício; DURAN, Nelson. Hidrolise Enzimática de Casca de Arroz Utilizando-se Celulases. Efeito de Tratamentos Químicos e fitotoquímicos. **Química Nova**, v. 21, no. 2, p. 140-143, 1998.

RICHARD, P. et al. The role of xylulokinase in *Saccharomyces cerevisiae* xylulose catabolism. **FEMS Microbiology Letters**, v. 190, p. 39-43, 2000.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B.; Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor, **Indust. Crops. Prod.** v.17, p.171-176, 2003.

ROEHR M. **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. Weinheim WILEYVCH, 2001.

ROSA, S. E. S.; GARCIA J. L. F.; O etanol de segunda geração: limites e oportunidades, **Revista do BNDES**, p115-156 32, dezembro 2009.

SANCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour Technol** [S.I.], v. 99, n. 13, p. 5270-95, Sep 2008.

SANDGREN, M.; STAHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: improved thermal stability, and ligand complexes. **Biophysies & Molecular Biology**, v. 89, p. 245/291, 2005.

SEDLAK, M., HO, N.W.: Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose cofermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. **Yeast**, v. 21, n. 8, p. 671–684, 2004.

SENAC, T.; HAHN-HÄGERDAL, B. Intermediary Metabolic Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermentating *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p 120-126, jan. 1990.

SILVA, C.R., ZANGIROLAMI, T. C., MATUGI, K., GIORDANO, R. C., GIORDANO, R. L. C. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p.35-42, 2012.

SILVA, M. G. E.; SILVA JR, J. L.; PINTO JR, C. R. T.; Produção de Etanol de Segunda Geração: Uma Revisão, Pensamento Plural: **Revista Científica da UNIFAE**, São João da Boa Vista, v.4, n.2,p59-71, 2010.

SILVA, PAULA CRISTINA DA, , Caracterização de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* quanto a filamentação induzida por alcoóis e deficiência de nutrientes, Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ- 62p, Piracicaba, 2006.

SILVA R.; SHIRANI K. H.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A. F.; Aplicações de Fibras Lignocelulósicas na Química de Polímeros e em Compósitos, **Química Nova**, v. 32, n. 2, 661-671, 2009.

SINGH, A.; MISHRA, P.: Microbial pentose utilization. **Elsevier Science**, Amsterdam-Tokyo 1995.

SOUZA, C. S.; Avaliação da Produção de Etanol em Temperaturas Elevadas por uma Linhagem de *S. cerevisiae*, tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação Inter unidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.

SOUZA, C. S.; OLIVEIRA, K. F.; TREVISAN, H. C.; LALUCE, C. A Strategy to Compare Yeast Strains and Improve Cell Survival in Ethanol Production Processes above 30°C. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.), 2007.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **J Appl Microbiol** [S.I.], v. 109, n. 1, p. 13-24, 2010.

SUAREZ, Paulo A. Z.; SANTOS, André L. F.; RODRIGUES, Juliana P.; ALVES, Melquizedeque B.. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras, desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v. 32, n. 3, abril, p. 768-775, 2009.

TANAKA, A.; TOSA, T.; KOBAYASHI, T. Industrial Application of Immobilized Biocatalysts. **Marcel Dekker**, INC. Nova Iorque, 1993.

TOIVOLA, A. *et al.* Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1221–1223, 1984.

TORRESI, S.I. C.; PARDINI, V. L.; FERREIRA, V. F.; **Biomassa renovável e o futuro da indústria química**, Quim. Nova, Vol. 31, No. 8, 1923, 2008.

TROVATI, J.: Produção de etanol a partir de amido utilizando levedura e amiloglucosidase coimobilizadas em gel de pectina. Dissertação de Mestrado, Sao Carlos, Universidade Federal de Sao Carlos - UFSCar, 2001.

UM, BYUNG-HWAN; BAE, SUNG-HO. Statistical methodology for optimizing the dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 5, p. 1172- 1176, 2011.

VAN DIJKEN J.P.; BAUER J., BRAMBILA L.; DUBOC P.; FRANCOIS J.M., GANCEDO C.; GIUSEPPIN M.L.F., HEIJNEN J.J.; HOARE M.; LANGE H.C.; MADDEN E.A., NIEDERBERGER P.; NIELSEN J.; PARROU J.L.; PETIT T.; PORRO D.; REUSS M.; VAN RIEL N.; RIZZI M.; STEENSMA H.Y.; VERRIPS C.T.; VINDELOV J.; PRONK J.T. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Enzyme and Microbial Technology**. v.26, p. 706-714, 2000.

VAN MARIS, A. J.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A.; 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** [S.I.], v. 90, n. 4, p. 391-418, Nov 2006.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G.; KOCK, J.L.: D-xylose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **J Gen Microbiol**, 135:2791–8, 1989.

WALSH, M.C.; SMITS, H.P.; SCHOLTE, M.; SMITS, G.; VAN DAM, K.: Rapid kinetics of glucose uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia Microbiol** (Praha) v. 39, p.557–9, 1994.

WINKELHAUSEN, E. e KUZMANOVA, S.; Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **J. Ferment. Bioeng.** v.86, p.1–14, 1998.

WOOD, T. M.; SADDLER, J. N. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. **Methods in Enzymology**. v.160, p.3-11, 1988.

WYMAN, Charles E.; DALE, Bruce E.; ELANDER, Richard T.; HOLTZAPPLE, Mark; LADISCH, Michael R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

ZHANG, Percival Y.-H.; HIMMEL, Michael E.; MIELENZ, Jonathan R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, **Biotechnology Advances**, v. 24, , p. 452-481, 2006.

ZHANG, Yi-Heng Percival. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, 2008, p. 367-375.

ZEITCH, K. J., The Chemistry and Technology of Furfural and its Many By- Products, **Zeitch (eds.) Elsevier**. pp. 358, 2000.