



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR *Spathaspora arborariae* E
Candida guilliermondii A PARTIR DE HIDROLISADO DE CASCA DE SOJA**

ILANA HENDIRA NEUMANN BOEIRA

Bióloga – UFRGS

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
MARÇO – 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL POR *Spathaspora arborariae* E
Candida guilliermondii A PARTIR DE HIDROLISADO DE CASCA DE SOJA**

ILANA HENDIRA NEUMANN BOEIRA

Bióloga – UFRGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
MARÇO – 2013

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Capes, Pró-reitoria de Pós Graduação e Pró-reitoria de Pesquisa pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilização de infra-estrutura.

Ao professor e orientador Marco Antônio Záchia Ayub, pelos ensinamentos e pela excelente orientação.

À minha co-orientadora, Priscila Brasil de Souza Cruz, pelo acompanhamento integral na execução desse trabalho e pela excelente orientação.

À professora Simone Hickmann Flôres, pela ajuda em toda parte estatística com muita paciência.

Aos colegas do BiotecLab, pela amizade e companhia. Em especial a Lílian Hickert e Fernanda Pereira, que ajudaram a realizar parte deste trabalho e madrugaram muitas segundas-feiras comigo com muito humor, apesar dos erlens e falcons virados. A Nicole Sehnem e Daiane Lopes, pelo apoio e auxílio na realização das atividades.

A minha bolsista de iniciação Karoline Barbisan Vieira que me ajudou muito na realização deste trabalho.

A pessoas muito especiais, minha irmã Luara, meu pai Luiz Henrique e a Claudete, que me incentivaram e apoiaram em todos os momentos. A todos meus amigos que de uma forma ou outra me apoiaram.

Ao meu namorado Richard Renck, pelo amor, carinho, compreensão e descontração. Obrigada por me acalmar e aturar durante todo o mestrado.

Produção de etanol e xilitol por *Spathaspora arborariae* e *Candida guilliermondii* a partir de hidrolisado de casca de soja.¹

Autor: Ilana Hendira Neumann Boeira

Orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

RESUMO

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais são fontes abundantes e de baixo custo para produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado, como xilitol e etanol. O presente trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de etanol e xilitol mediante o cultivo de *Candida guilliermondii* e *Spathaspora arborariae* sobre hidrolisado de casca de soja (HCS). *S. arborariae* foi cultivada em biorreatores submersos sobre meio sintético e HCS, em condições anaeróbias (150 rpm) e microaerófilas (180 rpm e 0,33 vvm). Em meio sintético a cepa apresentou maior produtividade em etanol ($0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sob microaerofilia. Porém, quando cultivada sobre HCS o metabolismo foi altamente afetado. Verificou-se que a adição de cloreto de alumínio ao meio sintético não afetou a produção de biomassa e viabilidade celular. No entanto, há inibição celular com o aumento da pressão osmótica dos meios, sendo a sua tolerância máxima de $1390 \text{ mOsm kg}^{-1}$. Em relação a *C. guilliermondii*, foi realizado o planejamento Plackett-Burman para determinar o efeito da suplementação do HCS sobre a produção de etanol. A suplementação do hidrolisado não se mostrou necessária. Um segundo planejamento experimental foi realizado para otimizar as condições de fermentação de temperatura, pH e concentração de inóculo. O ponto máximo de resposta foi em $28 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5,0 e 10^9 UFC mL^{-1} , respectivamente. Após foram realizados cultivos sobre HCS ácido-enzimático nas condições otimizadas, resultando em alta produtividade em etanol ($1,4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) com rendimento de $0,41 \text{ g g}^{-1}$, representando 80,4 % de eficiência quando comparado com o rendimento teórico.

¹ Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia de Alimentos, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93 p.) Março, 2013.

Ethanol and xylitol production by *Spathaspora arborariae* and *Candida guilliermondii* from soybean hull hydrolysate.¹

Author: Ilana Hendira Neumann Boeira

Supervisor: Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

ABSTRACT

Lignocellulosic agro-industrial residues are abundant supplies of carbohydrates and a low cost substrate for the biotechnological production of compounds of high added value such as xylitol and ethanol. This study aimed at the investigation on the biotechnological production of ethanol and xylitol by cultivation of *Candida guilliermondii* and *Spathaspora arborariae* in soybean hull hydrolysate (SHH). *S. arborariae* was cultivated in submerged bioreactors on SHH and semi-synthetic medium under anaerobiosis (150 rpm) and microaerobiosis conditions (0.33 vvm and 180 rpm). On semi-synthetic medium, the strain showed higher ethanol productivity ($0.22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) under microaerobiosis. However, when grown on hydrolysate metabolism was highly affected. It was found that concentrations up to 300 mg L^{-1} of aluminum chloride in semi-synthetic medium did not affect biomass production and cell viability. But increasing the osmotic pressure of the medium caused cellular inhibition, with maximum yeast tolerance of $1390 \text{ mOsm kg}^{-1}$. Plackett-Burman design was performed to determine the effect of supplementation on the production of ethanol by *C. guilliermondii* on SHH. It was found that supplementation was not necessary. A second experimental design was carried out to optimize the fermentation conditions of temperature, pH and inoculum size. The best conditions were $28 \text{ }^\circ\text{C}$, pH 5.0 and 10^9 CFU mL^{-1} , respectively. Finally, cultivations in acid-enzymatic SHH under the optimized conditions were run, resulting in high volumetric productivity ($1.4 \text{ L g}^{-1} \text{ h}^{-1}$), with ethanol yield of 0.41 g g^{-1} , representing 80.4 % efficiency compared with the theoretical yield.

¹ Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) March, 2013.

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Biomassa	4
2.2. Materiais lignocelulósicos	5
2.2.1. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos	7
2.2.2. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a etanol	9
2.3. Fatores que afetam o crescimento celular e a fermentação	12
2.3.1. Concentração de alumínio	12
2.3.2. Pressão osmótica do meio	13
2.3.3. Efeitos da temperatura, pH e concentração de inóculo em processos fermentativos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Casca de Soja	17
3.2. Condições de hidrólise ácida da casca de soja	18
3.2.1. Condições de hidrólise enzimática da casca de soja	18
3.3. Micro-organismos e inóculo	19
3.4. Condições de cultivo de <i>S. arborariae</i>	20
3.4.1. Ensaios em biorreatores de cultivo submerso em meio sintético e hidrolisado de casca de soja	20
3.4.2. Ensaios em agitador orbital sobre meio sintético	21
3.4.2.1. Determinação da tolerância de <i>S. arborariae</i> a diferentes concentrações de alumínio	22
3.4.2.2. Determinação da tolerância de <i>S. arborariae</i> à pressão osmótica	22
3.5. Condições de cultivo de <i>C. guilliermondii</i>	23
3.5.1. Efeito da suplementação do HCS na produção de etanol	23
3.5.2. Otimização das condições fermentativas	25
3.5.3. Cultivo em hidrolisado ácido-enzimático de casca de soja nas condições otimizadas	27

3.6.	Métodos analíticos.....	27
3.6.1.	Determinação da concentração celular.....	27
3.6.2.	Determinação da concentração de açúcares, etanol e xilitol.....	28
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1.	Consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol por <i>S. arborariae</i> em biorreatores de cultivo submerso.....	31
4.1.1.	Bioconversão de açúcares e produção de etanol e xilitol por <i>S. arborariae</i> sobre meio sintético.....	32
4.1.2.	Bioconversão de açúcares e produção de etanol e xilitol por <i>S. arborariae</i> sobre hidrolisado de casca de soja.....	39
4.2.	Ensaio de <i>S. arborariae</i> sobre meio sintético em agitador orbital.....	44
4.2.1.	Tolerância de <i>S. arborariae</i> a concentrações crescentes de alumínio.....	44
4.2.2.	Tolerância de <i>S. arborariae</i> à pressão osmótica.....	48
4.3.	Otimização da bioconversão dos açúcares presentes no hidrolisado de casca de soja a etanol por <i>C. guilliermondii</i>	52
4.3.1.	Efeito da suplementação do hidrolisado de casca de soja sobre a produção de etanol.....	53
4.3.2.	Otimização das condições fermentativas através do planejamento composto central.....	56
4.3.2.1.	Análise dos efeitos das variáveis sobre a produtividade em etanol (Q_P).....	62
4.3.2.2.	Análise dos efeitos das variáveis sobre o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$).....	67
4.3.3.	Cultivo em hidrolisado enzimático de casca de soja nas condições otimizadas.....	70
5.	CONCLUSÕES.....	77
6.	PERSPECTIVAS.....	79
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
	APÊNDICE 1.....	90
	APÊNDICE 2.....	91
	APÊNDICE 3.....	92

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Safra de soja em 2011 no Brasil (IBGE, 2011). 6
- Figura 2.** Metabolismo de xilose e arabinose por leveduras em integração com a via das pentoses-fosfato e glicólise até a produção de etanol. Abreviações: AR, L-arabinose (aldose) redutase; LAD, L-arabinitol-4-desidrogenase; LXR, L-xilulose redutase; XR, D-xilose (aldose) redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XK, D-xiluloquinase (adaptado de Wohlbach et al., 2011). 10
- Figura 3.** Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de etanol e xilitol por *S. arborariae* cultivada sobre meio sintético X₂₈G₈ em biorreatores, sob condições de anaerobiose e microaerofilia. Glicose (□); xilose (○); etanol (▲); xilitol (●); células viáveis (*). Resultados são a média de duplicatas. 33
- Figura 4.** Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de etanol por *S. arborariae* cultivada sobre HCS em biorreatores nas condições de anaerobiose e microaerofilia. Glicose (□); xilose (○); etanol (▲); células viáveis (*). Resultados são a média de duplicatas. 40
- Figura 5.** Cromatograma do hidrolisado de casca de soja com o tempo de retenção dos compostos analisados. 42
- Figura 6.** Produção de biomassa (g L⁻¹) de *S. arborariae* em meio sintético com 0 (□), 50,25 (●), 100,5 (▲), 150,75 (*) e 201 mg L⁻¹ (◆) de alumínio (Al³⁺), em 12 h de cultivo. Resultados são a média de duplicatas. 46
- Figura 7.** Cinética da produção de biomassa (g L⁻¹) de *S. arborariae* em 72 h de cultivo em meio sintético com pressão osmótica de 194 (□), 497 (●), 1094 (▲), 1390 (*), 1685 (x), 2145 (■) e 2700 mOsm kg⁻¹ (◆). Resultados são a média de duplicatas. 48
- Figura 8.** Taxa de crescimento máxima de *S. arborariae* (h⁻¹) em concentrações crescentes de NaCl em meio sintético. Resultados são a média de duplicatas. ... 49
- Figura 9.** Valores observados versus valores preditos para produtividade em etanol (Q_P). 61
- Figura 10.** Valores observados versus valores preditos para rendimento em etanol (Y_{P/S}). 61
- Figura 11.** Superfície de resposta com as variáveis pH e Inóculo, gerada para a produtividade em etanol (Q_P) em HCS por *C. guilliermondii*. 63
- Figura 12.** Superfície de resposta com as variáveis Inóculo e Temperatura, gerada para a produtividade em etanol (Q_P) em HCS por *C. guilliermondii*. 64
- Figura 13.** Superfície de resposta com as variáveis pH e temperatura (°C), gerada para rendimento em etanol (g g⁻¹) em HCS por *C. guilliermondii*. 68
- Figura 14.** Superfície de resposta com as variáveis inóculo e temperatura, gerada para rendimento em etanol (g g⁻¹) em HCS por *C. guilliermondii*. 69
- Figura 15.** Cinética de consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol por *C. guilliermondii* cultivada sobre HCS-AE em agitador orbital. Glicose (□); xilose (○); arabinose (△); etanol (▲); xilitol (●). Resultados são a média de triplicatas. 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química da casca de soja (CASSALES, 2010).	17
Tabela 2. Ensaio contendo doses crescentes de alumínio (Al^{3+}) em meio sintético. .	22
Tabela 3. Ensaio contendo meio sintético com pressão osmótica (PO) crescente....	23
Tabela 4. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento Plackett-Burman.	24
Tabela 5. Esquema da matriz do planejamento Plackett-Burman de 11 ensaios, com as variáveis independentes codificadas.....	24
Tabela 6. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e seus valores reais.	26
Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e quatro pontos centrais com as variáveis independentes codificadas.	26
Tabela 8. Resultados obtidos para concentração ($g L^{-1}$), rendimento ($g g^{-1}$) e produtividade ($g L^{-1} h^{-1}$) em xilitol e etanol a partir de glicose e/ou xilose por <i>S. arborariae</i> em anaerobiose e microaerofilia sobre meio sintético.	34
Tabela 9. Resultados obtidos para concentração ($g L^{-1}$), rendimento ($g g^{-1}$) e produtividade ($g L^{-1} h^{-1}$) de etanol por <i>S. arborariae</i> em anaerobiose e microaerofilia sobre HCS e meio sintético.	41
Tabela 10. Composição de minerais da casca da soja (Cassales, 2010).....	45
Tabela 11. Esquema da matriz do planejamento Plackett–Burman com as variáveis independentes codificadas e reais ($g L^{-1}$) e o resultado de concentração ($g L^{-1}$), rendimento ($Y_{P/S}$, $g g^{-1}$) e produtividade (Q_P , $g L^{-1} h^{-1}$) em etanol.	53
Tabela 12. Efeitos estimados para concentração, produtividade (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol com confiança de 90 % ($p = 0,1$).	54
Tabela 13. Matriz do planejamento composto central com as variáveis independentes reais e o resultado de produtividade (Q_P , $g L^{-1} h^{-1}$) e rendimento ($Y_{P/S}$, $g g^{-1}$) em etanol.	57
Tabela 14. Efeitos estimados para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$). Em destaque vermelho representa as variáveis estatisticamente significativas com confiança de 95 % ($p = 0,05$).	58
Tabela 15. Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos modelos reduzidos para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) para as variáveis estatisticamente significativas com confiança de 80 % e 89 %, respectivamente.	59
Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$).	60
Tabela 17. Resultados obtidos pelo caminho de ascendência máxima em relação à produtividade (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol. Os resultados são a média de triplicatas.	66
Tabela 18. Resultados obtidos para produção, produtividade (Q_P), rendimento ($Y_{P/S}$) e eficiência de conversão (η) em etanol e xilitol em frascos agitados com HCS-AE.	71
Tabela 19. Resultados de produtividade (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol a partir de diferentes tipos de biomassa por leveduras.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

(L)	Linear
(Q)	Quadrático
AR	L-arabinose (aldose) redutase
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DO	Densidade ótica
FPU	Atividade em papel de filtro
GDL	Graus de liberdade
HCS	Hidrolisado ácido de casca de soja
HCS-AE	Hidrolisado de casca de soja ácido-enzimático
HMF	Hidroximetilfurfural
LAD	L-arabinitol 4-desidrogenase
LXR	L-xilulose redutase
MQ	Média quadrática
MS	Meio sintético
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
Q_P	Produtividade volumétrica
rpm	Rotações por minuto
SQ	Soma quadrática
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
vvm	Volume de ar/ volume de meio/minuto
Y_{P/S}	Rendimento de conversão
YM	Meio extrato de levedura e extrato de malte
g	Aceleração da gravidade
b	Coefficiente de regressão do modelo
η	Eficiência de conversão
μ_m	Taxa específica máxima de crescimento
x₁	Nível codificado de pH
x₂	Nível codificado de temperatura
x₃	Nível codificado de inóculo

1. INTRODUÇÃO

O aumento das áreas de plantio afeta o meio ambiente de forma expressiva, no que diz respeito à substituição de áreas ocupadas por florestas nativas ou por plantações de culturas como cana de açúcar e soja. Atualmente, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na área de produção de compostos utilizando como precursores hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Esses materiais englobam basicamente resíduos agroindustriais como cascas, palhas e bagaços. O acúmulo desses materiais na natureza gera problemas de cunho ambiental, devido à decomposição descontrolada do mesmo, e de cunho econômico com a perda de potenciais recursos energéticos, tendo em vista que apenas uma pequena parcela desses resíduos é aproveitada no beneficiamento de rações animais e adubos ecológicos.

A produção biotecnológica de etanol e xilitol a partir de resíduos agroindustriais é uma alternativa promissora, pois esses resíduos possuem baixo valor econômico e poderiam diminuir a competição entre alimentos e combustíveis. A soja é a planta mais amplamente cultivada no mundo, sendo o maior produtor do mundo os Estados Unidos (35 %) e em segundo lugar o Brasil, representando 27 % da produção mundial. O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado produtor de soja no Brasil, responsável por

aproximadamente 16 % da produção. No ano de 2011, aproximadamente 263,7 milhões de toneladas de soja foram produzidos no mundo, o que gerou um acúmulo de cerca de 21,1 milhões de toneladas de casca de soja, um dos principais resíduos do beneficiamento dessa cultura e um problema na esfera ambiental para a indústria processadora de soja.

Para que os resíduos lignocelulósicos sejam bioconvertidos, é necessária a utilização de pré-tratamentos, que liberem os açúcares fermentescíveis existentes na composição dos materiais lignocelulósicos. Esses pré-tratamentos podem ser realizados mediante hidrólise química ou enzimática. Uma técnica fundamentada e bastante difundida é a hidrólise ácida diluída. Através dela ocorre a liberação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e outros) constituintes da hemicelulose. Sendo o hidrolisado hemicelulósico rico principalmente em pentoses, como a xilose.

Tanto etanol quanto xilitol, um composto amplamente usado na indústria alimentícia e farmacêutica, podem ser formados no processo fermentativo dos materiais lignocelulósicos. No entanto a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos requer a presença de micro-organismos que fermentem tanto as hexoses quanto as pentoses do meio. Atualmente diversas pesquisas têm direcionado esforços para solucionar este gargalo biotecnológico da produção de etanol de segunda geração.

A conversão de resíduos agroindustriais mediante processos biotecnológicos permite, também, o desenvolvimento de tecnologia e ciência em países subdesenvolvidos, onde este tipo de material é mais abundante justamente pelo fato de esses países apresentarem grandes produções

agrícolas, matérias-primas, e baixas produções de materiais manufaturados, cujo valor agregado é superior.

O presente trabalho teve como objetivo geral ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de etanol a partir da bioconversão de hidrolisado de casca de soja por leveduras. Os objetivos específicos compreenderam a avaliação do perfil fermentativo de *Spathaspora arborariae*, uma linhagem recentemente isolada de madeira em decomposição nos ecossistemas da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil e nunca testada em processos biotecnológicos utilizando hidrolisado de casca de soja. A resistência da cepa a potenciais inibidores celulares foi avaliada a partir de experimentos em meio sintético. Além disso, experimentos cultivando-se *Candida guilliermondii* sobre hidrolisado de casca de soja foram realizados. Foi estudada primeiramente a relevância que a suplementação do hidrolisado possui sobre a produção de etanol e após, as condições de cultivo foram otimizadas para aplicação em hidrolisado ácido-enzimático de casca de soja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa

Devido à diminuição de reservas de combustíveis fósseis e a preocupação em diminuir as emissões de dióxido de carbono, fontes alternativas de energia devem ser renováveis, sustentáveis e eficientes, ter custo conveniente e seguro (Chum & Overend, 2001). O bioetanol é um combustível renovável que utiliza como matéria-prima a biomassa vegetal, e os compostos liberados na sua combustão são sequestrados pelos novos plantios, fechando o ciclo do carbono, e, portanto, não contribuindo com o efeito estufa. A emissão de CO₂ proveniente de seu ciclo de vida até a queima do combustível é até 84 % inferior à da gasolina (CTBE, 2012).

A biomassa vegetal é composta por duas classes. A primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose, provenientes do milho e da cana de açúcar, respectivamente, e são amplamente utilizados pelas indústrias alimentícias, portanto o seu uso para bioconversão a etanol pode provocar conflito com a produção de alimentos. A segunda classe é composta pelas partes estruturais da planta, é o caso da lignocelulose, que é formada por açúcares mais complexos e de difícil acesso (Octave & Thomas, 2009).

2.2. Materiais lignocelulósicos

A produção de etanol de primeira geração por substratos derivados da cana, em países como o Brasil, e amido de milho nos EUA, são econômicos e atualmente as maiores fontes de etanol. Porém o grande volume de biomassa consiste de lignocelulose, presentes em resíduos agroindustriais, como bagaço, farelo, palha, casca e fibras. A utilização destes resíduos para a produção de etanol de segunda geração é uma tecnologia promissora e está se tornando amplamente aceito, pois pode contribuir para reduzir os impactos negativos sobre o ambiente, não concorre para uso como alimento e representa uma matéria-prima abundante (Cassman and Liska, 2007).

A soja (*Glycine max*) é a planta mais amplamente cultivada no mundo, sendo o maior produtor mundial os Estados Unidos (35 %) e em segundo lugar o Brasil, representando 27 % da produção global (USDA, 2012). O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado produtor de soja no Brasil, responsável por aproximadamente 16 % da produção (IBGE, 2011). A Figura 1 ilustra a produção de soja, em toneladas, no Brasil em 2011.

A casca de soja é o principal subproduto da indústria de soja e constitui cerca de 8 % de toda a semente (Gnanasambandan & Proctor, 1999), representando aproximadamente 21,1 milhões de toneladas de casca de soja produzidas a cada ano no mundo.

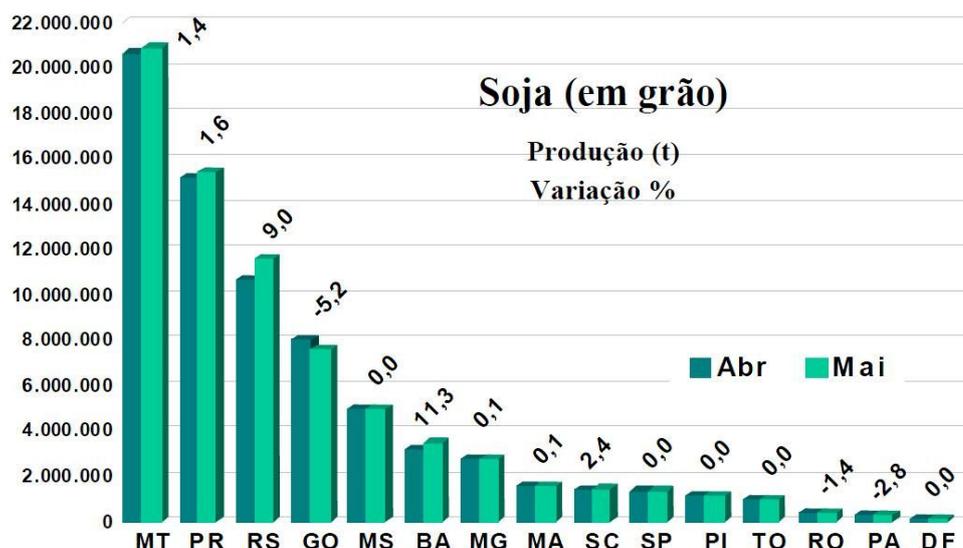


Figura 1. Safra de soja em 2011 no Brasil (IBGE, 2011).

A fração insolúvel da parede celular da casca de soja é constituída por aproximadamente 44 % de celulose, 27 % de hemicelulose e 9 % de lignina (Cassales, 2010) e, portanto, sua hidrólise pode gerar monossacarídeos que são substratos com potencial para serem bioconvertidos a produtos de valor agregado, como o etanol e xilitol.

Considerando que a hemicelulose é o segundo polímero mais abundante em materiais lignocelulósicos, inclusive na casca de soja, a conversão de biomassa em energia útil só se tornará economicamente viável se tanto as hexoses (glicose, manose e galactose) como as pentoses (xilose, arabinose) forem convertidas a etanol.

2.2.1. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentescíveis ou aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática (Lee, 1997). A celulose possui regiões cristalinas e amorfas, sendo que a forma cristalina é mais resistente à degradação química, microbiana e enzimática.

A cristalização natural da lignocelulose e a sua resistência à hidrólise são os maiores obstáculos na produção de açúcares fermentescíveis de forma economicamente viável (Kumar et al., 2008). Os pré-tratamentos se fazem necessários, pois provocam efeitos como o aumento na acessibilidade na área de superfície, redução na cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização da hemicelulose e/ou lignina e a modificação da estrutura da lignina (Margeot et al., 2009).

Uma técnica fundamentada e bastante difundida é a hidrólise ácida diluída. Através dela ocorre a liberação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose, galactose e outros) constituintes da hemicelulose. O pré-tratamento com ácidos diluídos envolve o uso de ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico e tem sido citado como o melhor tipo de pré-tratamento para resíduos agroindustriais (Silverstein et al., 2007).

O emprego de hidrólise ácida diluída apresenta várias vantagens quando comparada à utilização dos ácidos concentrados (Sun & Cheng, 2002). Ácidos concentrados são tóxicos, perigosos, corrosivos, requerendo reatores resistentes à corrosão. Além disso, os ácidos concentrados devem ser

recuperados após a hidrólise a fim de tornar o processo economicamente viável (Sivers & Zacchi, 1995). A hidrólise em condições menos severas (temperatura inferior a 160 °C em processo por batelada e alto teor de sólidos, 10 % a 40 %) pode atingir altas taxas de conversão de xilana em xilose (McMillan, 1994).

Um fator importante a ser considerado é que durante a hidrólise ácida diluída, dependendo das condições empregadas, compostos secundários dos açúcares e da lignina podem ser gerados, inibindo o crescimento de micro-organismos fermentadores que serão utilizados posteriormente a esta etapa (Mussatto & Roberto, 2004). Segundo Palmqvist & Hahn-Hägerdal (2000) quando altas temperaturas e pressões são utilizadas no pré-tratamento, xilose e glicose podem ser degradadas em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, os quais podem ser posteriormente degradados em ácido fórmico e ácido levulínico, respectivamente. Além desses compostos outras substâncias tóxicas aos micro-organismos podem ser formadas durante a hidrólise como compostos fenólicos que são gerados a partir da quebra parcial da lignina, ácidos siríngico, vanílico, palmítico, entre outros.

Diversas operações realizadas ao longo do processo de obtenção do hidrolisado configuram como métodos físicos ou químicos de tratamento de destoxificação. A concentração por evaporação a vácuo, usada com o objetivo de aumentar a concentração dos açúcares, por exemplo, também é considerada um método físico de destoxificação, pois, dependendo das condições aplicadas (temperatura e pressão) ocorre a redução de compostos voláteis, tais como, ácido acético e furfural (Mussatto & Roberto, 2004). A

precipitação de compostos tóxicos mediante ajuste de pH para os valores ideais de cultivo consiste em método químico de destoxificação (Martinez et al., 2001).

A fração celulósica dos resíduos agroindustriais pode ser convertida em glicose por hidrólise enzimática, utilizando celulases (Mosier et al., 2005), porém esse processo possui alto custo (Sun & Cheng, 2002). Embora as enzimas do complexo celulolítico não possam penetrar rapidamente a barreira de lignina e sejam lentas no ataque à cristalinidade da celulose, podem converter a celulose em glicose de forma mais seletiva que o ataque ácido, com a formação de poucos subprodutos (além das condições mais brandas de processo). Em consequência, a hidrólise enzimática da biomassa normalmente envolve o pré-tratamento para romper o selo de lignina e destruir a cristalinidade da celulose (Sundstrom et al., 1981).

A celulose, quando totalmente hidrolisada, libera basicamente glicose. Numa hidrólise parcial da celulose há a formação de celobiose, que pode atuar como inibidor da enzima celulase, responsável pela quebra do material celulósico em glicose (Pereira Jr. et al., 2008).

2.2.2. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a etanol

O rendimento teórico em etanol a partir de xilose é de $0,51 \text{ g g}^{-1}$, igual ao rendimento teórico a partir de glicose. Ou seja, 100 gramas de glicose ou xilose irá produzir 51,4 g de etanol e 48,8 g de dióxido de carbono. Isso irá ocorrer se a xilose for convertida a xilulose (um isômero da mesma) sem

acúmulo de xilitol (Figura 2), e a xilulose-5-P for convertida em frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato pela via da pentose fosfato sem a reciclagem oxidativa ou desequilíbrio do cofator. Esses intermediários são convertidos em etanol e dióxido de carbono via glicólise e fermentação alcoólica (Slininger et al. 1985; Prior et al. 1989; Hahn-Hägerdal et al. 1994). Porém na prática os micro-organismos utilizam uma parte da glicose para o crescimento e o rendimento real é inferior, já que parte do carbono é desviado para produção e manutenção de células e a reciclagem via pentose fosfato ocorre para suprir a demanda de NADPH.

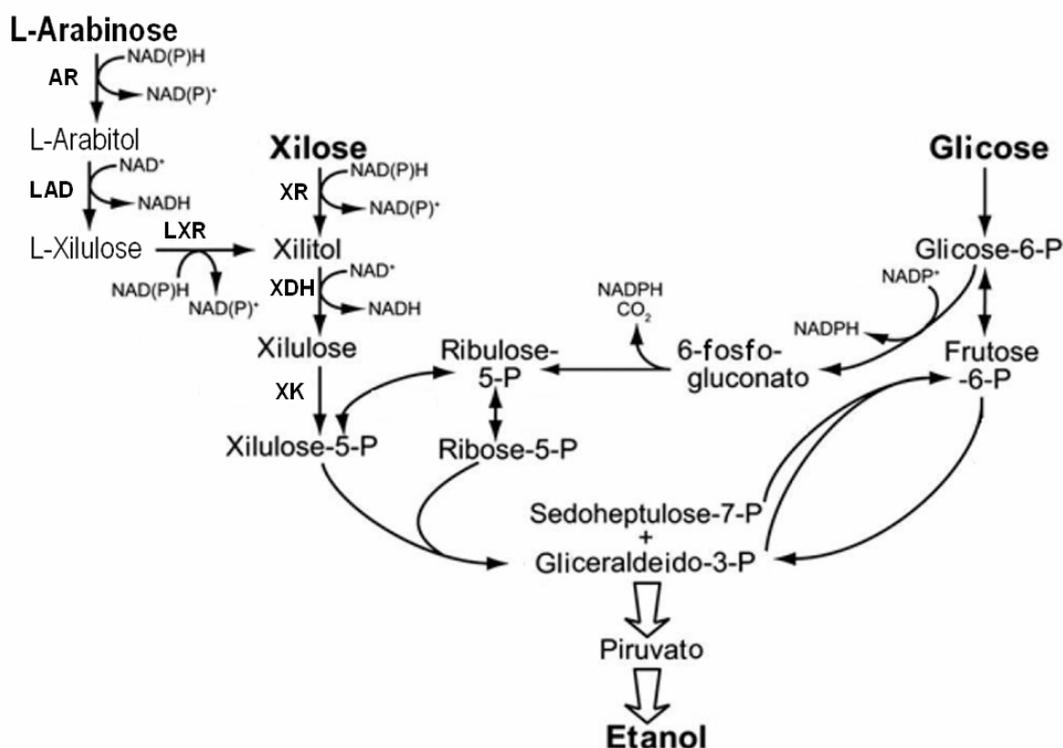


Figura 2. Metabolismo de xilose e arabinose por leveduras em integração com a via das pentoses-fosfato e glicólise até a produção de etanol. Abreviações: AR, L-arabinose (aldose) redutase; LAD, L-arabinitol-4-desidrogenase; LXR, L-xilulose redutase; XR, D-xilose (aldose) redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XK, D-xiluloquinase (adaptado de Wohlbach et al., 2011).

A conversão de hidrolisados lignocelulósicos a etanol ou xilitol depende da habilidade dos micro-organismos em fermentar diferentes açúcares resultantes da hidrólise. Entretanto, as pentoses não são metabolizadas pelos micro-organismos mais comumente usados para a fermentação industrial, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

Embora os microrganismos assimilem e fermentem mais prontamente glicose do que xilose, existem em menor número bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de assimilar xilose e converter a xilitol ou etanol, dependendo basicamente do microrganismo e das condições de cultivo empregadas (Jeffries, 1983). Em geral, dentre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol. Sendo que as leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras, como *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. biodinii* e *C. mogii* (Winkelhausen & Kuzmanova, 1998).

Muitas leveduras são conhecidas por converter xilose a etanol, incluindo gêneros como *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Schawannyomyces*, entre outras. Dentre elas, as espécies reconhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são *P. stipitis*, *P. tannophilus* e *C. shehatae*, no entanto, têm um rendimento relativamente baixo e baixa tolerância aos inibidores (Tian et al., 2009). A levedura *S. arborariae* é uma linhagem recentemente isolada de madeira em decomposição nos ecossistemas da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil (Cadete et al., 2009). Essa cepa produz praticamente a mesma quantidade de etanol e biomassa

utilizando como fonte de carbono glicose ou xilose, sendo assim promissora para conversão de hidrolisados lignocelulósicos.

2.3. Fatores que afetam o crescimento celular e a fermentação

Diversos fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) afetam o rendimento da fermentação. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e biomassa (Lima et al., 2001).

2.3.1. Concentração de alumínio

A toxidez do alumínio é considerada um importante fator limitante da produtividade de muitas culturas, pois altas concentrações desse metal no meio de cultivo são prejudiciais para as leveduras, causando danos à membrana celular (Amorim, 2005). Apesar disso, informações sobre a toxicidade de alumínio em leveduras são pouco documentadas e mais escassas ainda em processos biotecnológicos industriais.

A ação tóxica do alumínio ocorre na sua forma ionizada Al^{3+} devido à condição de acidez em fermentações e é caracterizada pela redução da viabilidade celular, possivelmente pela redução da concentração de trealose e

glicogênio celular, com impactos negativos sobre a produção de etanol (Angeloni, 2009). Aranha (2002) sugere a possibilidade de redução do crescimento da biomassa estar relacionada à inibição causada pelo íon Al^{3+} em etapas da glicólise.

Níveis potencialmente tóxicos de alumínio foram encontrados em mostos industriais de produção de álcool combustível, gerando acúmulo desse metal nas células de leveduras submetidas à ciclos fermentativos (Angeloni, 2009). Em análises conduzidas pelo Centro Tecnológico da Copersucar, Aranha (2002) detectou teores médios de alumínio de 156 mg L^{-1} em caldos destinados à fermentação. O alumínio é o principal metal encontrado na casca de soja e a sua concentração no hidrolisado de casca de soja concentrado 2 vezes é de aproximadamente 178 mg L^{-1} (Cassales, 2010).

Basso (2006) demonstrou que mostos industriais, empregados em várias destilarias do estado de São Paulo, apresentaram concentrações de alumínio oscilando entre 8 e 40 mg L^{-1} , atingindo até 130 mg L^{-1} , quando é normalmente associada à queda da viabilidade celular da levedura.

2.3.2. Pressão osmótica do meio

A concentração de solutos do meio de cultivo desempenha um papel crucial no crescimento microbiano. Para muitos micro-organismos, meios hipertônicos ou hiperosmóticos resultam na perda de água a partir do citoplasma, fazendo com que ocorra retração do volume celular (plasmólise). Dentro de amplos limites, a parede celular impede a ruptura da célula (Smits et

al., 1999). Conforme a osmolaridade do ambiente circundante aumenta, a pressão de turgor cai e o crescimento diminui ou cessa (Moat et al., 2002).

Uma das características dos hidrolisados provenientes de resíduos lignocelulósicos é a pressão osmótica elevada. Os íons inorgânicos que estão presentes nesses hidrolisados vêm a partir da matéria-prima, de produtos químicos adicionados durante o pré-tratamento e hidrólise, assim como para ajustar o pH antes e durante a fermentação. A adição de sais resulta em uma maior pressão osmótica, podendo resultar em um efeito inibitório em concentrações de íons suficientemente elevadas (Helle et al., 2003).

S. cerevisiae é relativamente tolerante a sais comparada a outras leveduras, tais como *Schizosaccharomyces pombe* e *P. stipitis*, porém menos tolerante do que várias espécies de *Candida* (revisado por Wadskog & Adler, 2003). *S. cerevisiae* pode crescer em glicose em uma solução 1,5 M de NaCl. No entanto, um fator mais importante do que a concentração absoluta de sódio é a razão intracelular de Na^+/K^+ , que deve ser mantida baixa. K^+ é preferida pelas células de levedura como cátion intracelular, pois é mais compatível com as funções celulares. Na^+ pode inibir certas enzimas em concentrações mais baixas do que K^+ .

De acordo com Liu et al. (2006), a pressão osmótica de 2108 mOsm kg^{-1} é suficiente para inibir o crescimento de leveduras, inclusive para espécies osmofílicas como *Candida krusei*. Segundo D'Amore et al. (1988) a diminuição do crescimento celular e nas taxas de fermentação de *S. cerevisiae* está associada com o aumento na pressão osmótica.

Alguns autores estudaram o efeito da pressão osmótica sobre o cultivo de *S. cerevisiae*. A exposição de linhagens desta levedura a altas pressões osmóticas incluíram efeitos tais como: taxa de crescimento reduzida, diminuição na viabilidade, maior consumo de energia, acúmulo intracelular de trealose, perda de pressão de turgor e plasmólise (Morris et al., 1986; Cahill et al., 2000; Beney et al., 2001; Pratt et al., 2003; Devantier et al., 2005; Sigler et al., 2009). É importante fixar que os experimentos envolveram a exposição das células de levedura principalmente a soluções concentradas de sorbitol, NaCl ou metanol.

A pressão osmótica representa um grande desafio para a produção eficiente de etanol, já que o meio impõe estresse severo nas células de levedura, levando a perda de viabilidade celular durante a fermentação.

2.3.3. Efeitos da temperatura, pH e concentração de inóculo em processos fermentativos

A maioria dos micro-organismos têm uma faixa relativamente estreita de pH dentro da qual crescem melhor, tendendo a ser mais baixa para fungos do que para bactérias. O pH do meio possui impacto na carga elétrica da superfície das células (e na influência sobre o comportamento, tais como floculação e adesão) e sobre sua capacidade em manter o pH intracelular desejável, que irá influenciar na carga de macromoléculas (especialmente as enzimas) e, dessa forma, na sua função (Bamforth, 2005).

Macromoléculas, especialmente proteínas, são propensas à desnaturação pelo calor, e isto conseqüentemente limita as temperaturas que podem ser toleradas. Os micro-organismos têm uma temperatura mínima à qual o crescimento pode ocorrer, abaixo da qual os lipídeos das membranas são insuficientemente fluidos (Bamforth, 2005). Além disso, a temperatura afeta o metabolismo de leveduras e, como resultado, a formação de metabólitos secundários, tais como glicerol, ácido acético, ácido succínico, entre outros (Lafon-Lafourcade, 1983).

A quantidade de inóculo é um dos fatores mais importantes que influenciam a fermentação industrial, incluindo a duração da fase lag, taxa de crescimento específico, produção de biomassa e a qualidade do produto final (Van Hoek et al., 2000; Sen & Swaminathan, 2004). Obter dados sobre o impacto da quantidade do inóculo sobre o crescimento celular e do metabolismo é de grande importância para o processo industrial de fermentação a etanol, no entanto é ainda pouco caracterizado (Verbelen et al., 2009). Fermentação em elevada densidade celular é uma das estratégias promissoras para melhorar a produtividade do produto final, encurtar o tempo de fermentação e reduzir o volume de fermentador na indústria. É descrito na literatura (D'Amore et al., 1989) que a taxa e a concentração de etanol produzido aumentam com o aumento da quantidade de inóculo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Casca de Soja

A casca de soja (*Glycine max*) utilizada nos experimentos foi cedida pela Companhia Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., localizada no município de Esteio, RS. A casca foi moída em partículas menores que 1 mm de diâmetro e armazenada a temperatura ambiente até a realização das hidrólises. A Tabela 1 apresenta a composição química da casca de soja, determinada por Cassales (2010).

Tabela 1. Composição química da casca de soja (CASSALES, 2010).

Componentes	Concentração (%)
Celulose	39,7
Hemicelulose	25,5
Lignina	9,1
Glicose	39,7
Xilose	19,6
Arabinose	5,9
Ácido acético	0,6
Hidroximetilfurfural	0,4
Furfural	0,8
Extrativos	3,2
Cinzas	0,6
Proteína	13,1

3.2. Condições de hidrólise ácida da casca de soja

Para a liberação dos açúcares fermentescíveis a casca de soja sofreu hidrólise ácida diluída com ácido sulfúrico (1 % do volume total) em autoclave (PHOENIX), formando um hidrolisado hemicelulósico, constituído essencialmente de pentoses. A hidrólise foi realizada utilizando frascos Erlenmeyers de 2 L em temperatura de 122 °C a 1,1 atm, relação sólido-líquido de 1:8,8 e tempo de reação 40 min. Tais condições foram obtidas por Cassales (2010), que otimizou a hidrólise ácida da casca de soja.

A fração líquida resultante da hidrólise ácida foi recuperada por filtração e concentrada sob vácuo em um evaporador a 60 °C, a fim de aumentar a concentração de açúcares. Após a concentração, o pH foi ajustado a 5,0 com NaOH sólido, centrifugado a 3.000 g por 20 min (HITACHI, HIMAC CR 21E) e esterilizado em autoclave por 30 min a 0,5 atm. O hidrolisado hemicelulósico obtido (HCS) foi utilizado para os ensaios com a cepa *S. arborariae* e para os experimentos de suplementação e otimização fermentativa para o cultivo de *C. guilliermondii*.

3.2.1. Condições de hidrólise enzimática da casca de soja

A fração sólida proveniente da hidrólise ácida foi lavada com água até atingir pH neutro. A hidrólise enzimática da celulose foi realizada numa proporção sólido-líquido de 1:20, utilizando tampão de fosfato-citrato (pH 4,8) e um complexo enzimático celulolítico proveniente de culturas de *Penicillium echinulatum* S1M29, e foi usado na proporção de 15 FPU g⁻¹ de matéria seca.

A enzima foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Aldo José Pinheiro Dillon da Universidade de Caxias do Sul (UCS, RS). O meio foi incubado em agitador orbital a 50 °C, 120 rpm, durante 72 h. O sobrenadante foi concentrado em rota-vapor a 70 °C a fim de aumentar a concentração de açúcares.

Como o hidrolisado enzimático é resultante da hidrólise de celulose, contém predominantemente glicose e é pobre em pentoses. Portanto, o hidrolisado foi misturado com a fração líquida do hidrolisado ácido na proporção 1:1, obtendo as concentrações finais de açúcares (g L^{-1}): glicose, 44; xilose, 15; arabinose, 6; ácido glucurônico, 22; celobiose, 7. Esse hidrolisado, proveniente da mistura do hidrolisado ácido e enzimático (HCA-AE), foi utilizado para o cultivo de *C. guilliermondii* sob as condições otimizadas de fermentação.

A concentração de compostos tóxicos formados durante a hidrólise no HCS final foi determinada em (g L^{-1}): HMF, 0,58; furfural, 0,08; ácido acético, 1,3.

3.3. Micro-organismos e inóculo

As leveduras utilizadas nos experimentos foram: *Candida guilliermondii* (BL 13), cepa pertencente à coleção do Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos (BiotecLab) localizado no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade do Rio Grande do Sul (UFRGS); e *Spathaspora arborariae* HM19.1A, cepa gentilmente cedida pelo professor Dr. Carlos Augusto Rosa do Departamento de Microbiologia da

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A levedura *S. arborariae* foi recentemente isolada de amostras de madeira em decomposição coletadas no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque Estadual do Rio Doce, localizados em Minas Gerais (Cadete et al., 2009). As leveduras foram enviadas para o DSMA (Desenvolvimento Sustentável e Monitoramento Ambiental, Mogi das Cruzes, SP) para identificação taxonômica através do sequenciamento de DNA da região ribossomal e foram conferidas como sendo as espécies determinadas.

O pré-inóculo foi preparado através do cultivo das leveduras em meio YM (g L^{-1}): glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 28 °C por 12 h. As células foram recolhidas por centrifugação a 3000 *g* por 15 min. O *pellet* formado foi lavado com solução salina e suspenso com o meio de fermentação. Os inóculos foram padronizados para que a concentração celular da suspensão atingisse densidade óptica (DO_{600}) igual a 1. O volume de inóculo perfazia 10 % do volume total de cultivo.

3.4. Condições de cultivo de *S. arborariae*

3.4.1. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso em meio sintético e hidrolisado de casca de soja

As fermentações foram realizadas em biorreatores de cultivo submerso com capacidade total para 2 L (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha), contendo 1,3 L de meio sob condições anaeróbias

(150 rpm) e microaerófilas (180 rpm e 0,33 vvm). Os fermentadores foram equipados com controladores de temperatura, agitação, aeração e pH, bem como 2 turbinas do tipo Rushton com 6 pás planas.

Utilizou-se como meio o hidrolisado hemicelulósico de casca de soja concentrado 2 vezes (HCS) e, para efeitos de comparação de cinética de cultivo, foram realizados cultivos contendo meio sintético denominado $X_{28}G_8$, simulando a proporção de açúcares do hidrolisado, composto por ($g L^{-1}$): glicose, 8; xilose, 28; peptona, 5; extrato de levedura, 3.

Amostras foram retiradas a cada 3 h nas primeiras 12 h de cultivo e após em intervalos de 12 h. A concentração celular foi determinada através do método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e as concentrações de açúcares, xilitol e etanol no meio foram determinadas através de análise cromatográfica. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

3.4.2. Ensaio em agitador orbital sobre meio sintético

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio sintético em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm e 28 °C. Para os ensaios foi utilizado meio sintético designado $X_{14}A_{10}G_3$, com concentrações de açúcares semelhantes ao HCS ($g L^{-1}$): xilose, 14; arabinose, 10; glicose, 3; peptona, 5; extrato de levedura, 3.

Alíquotas foram coletadas para determinação da concentração celular através da densidade óptica (DO_{600}) e convertidas em valores de

concentrações de biomassa (g L^{-1}). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

3.4.2.1. Determinação da tolerância de *S. arborariae* a diferentes concentrações de alumínio

Com o objetivo de avaliar a capacidade da cepa de resistir a diferentes concentrações de alumínio, foram conduzidos cultivos em meios acrescidos com cloreto de alumínio na forma hexaidratada ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) até a concentração de 201 mg L^{-1} de alumínio (Al^{3+}). A relação de ensaios e concentrações de alumínio está ilustrada na Tabela 2. As células foram cultivadas por 12 h e amostras foram retiradas durante os cultivos para estimativa da produção de biomassa.

Tabela 2. Ensaios contendo doses crescentes de alumínio (Al^{3+}) em meio sintético.

Ensaio	Al^{3+} (mg L^{-1})
1	0
2	50,25
3	100,50
4	150,75
5	201,00

3.4.2.2. Determinação da tolerância de *S. arborariae* à pressão osmótica

Para avaliar a resistência da cepa à pressão osmótica, foi conduzido cultivos em frascos Erlenmeyer contendo meios com pressão osmótica de até $2700 \text{ mOsm kg}^{-1}$. As células foram cultivadas por 72 h. Utilizou-se cloreto de

sódio (NaCl 5 M) para aumentar a pressão osmótica dos meios. A Tabela 3 apresenta a pressão osmótica dos ensaios e a concentração de NaCl em cada meio. Foram retiradas amostras durante o crescimento (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48 e 72 h) para estimativa do crescimento de biomassa.

Tabela 3. Ensaios contendo meio sintético com pressão osmótica (PO) crescente.

Ensaio	PO (mOsm kg⁻¹)	NaCl (g L⁻¹)
Controle	194	0
1	497	11,7
2	1094	35,1
3	1390	46,8
4	1685	58,5
5	2145	81,8
6	2700	105,2

3.5. Condições de cultivo de *C. guilliermondii*

Os cultivos de *C. guilliermondii* foram realizados em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 60 mL de hidrolisado em agitador orbital (Marconi, MA 830) com agitação de 180 rpm por 72 h. Amostras foram recolhidas ao longo de todos os cultivos para determinação de glicose, xilose, etanol e xilitol.

3.5.1. Efeito da suplementação do HCS na produção de etanol

O delineamento estatístico Plackett-Burman (PBD, Plackett-Burman Design) foi utilizado para identificar os nutrientes que possuem efeito significativo sobre a produção de etanol quando suplementados ao HCS. Para isso, foram testados as seguintes variáveis: milhocina; extrato de levedura;

peptona; e tween 80. Cada variável independente foi investigada quanto a presença (+1) e ausência (-1) dos nutrientes em cultivos utilizando HCS, como mostrado na Tabela 4. A escolha dos níveis das variáveis foi feita com base na literatura e em experimentos realizados anteriormente pelo grupo do BiotecLab (ICTA/UFRGS).

A Tabela 5 apresenta as variáveis selecionadas e a matriz do planejamento PBD para a realização de 8 ensaios e 3 pontos centrais. Os cultivos foram realizados a 28 °C, em duplicata.

Tabela 4. Níveis das variáveis utilizadas no planejamento Plackett-Burman.

Fatores	Níveis	
	- 1	+ 1
Extrato de Levedura (g L ⁻¹)	0	4
Milhocina (g L ⁻¹)	0	4
Peptona (g L ⁻¹)	0	5
Tween 80 (g L ⁻¹)	0	0,4

Tabela 5. Esquema da matriz do planejamento Plackett-Burman de 11 ensaios, com as variáveis independentes codificadas.

Ensaio	Variáveis			
	Extrato de Levedura	Milhocina	Peptona	Tween 80
1	+1	-1	-1	+1
2	+1	+1	-1	-1
3	+1	+1	+1	-1
4	-1	+1	+1	+1
5	+1	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1	+1
7	-1	-1	+1	-1
8	-1	-1	-1	-1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

O teste t de Student foi realizado para determinar a significância de cada variável estudada. Após foi determinado o valor de p na tabela de distribuição de t para determinar o nível de significância das variáveis sobre a concentração, produtividade e rendimento em etanol.

3.5.2. Otimização das condições fermentativas

Após a análise dos resultados do primeiro planejamento experimental (PBD), um segundo planejamento experimental foi realizado objetivando a otimização das condições de cultivo de *C. guilliermondii* sobre HCS, considerando a suplementação apenas com as variáveis que se apresentarem significativas para a produção de etanol.

Para o planejamento aplicado neste trabalho, com relação às análises estatísticas a serem efetuadas, foram definidas as variáveis independentes: temperatura; pH; e concentração de inóculo. A tabela 6 apresenta os níveis para os fatores e seus valores reais. A metodologia de superfície de resposta (RSM, Response Surface Methodology) foi empregada utilizando o planejamento fatorial 2^3 com pontos axiais e 4 pontos centrais, totalizando 18 ensaios, apresentados na Tabela 7 em modelo de matriz codificada. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 6. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e seus valores reais.

Fatores	Níveis				
	- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
pH	4,16	4,5	5,0	5,5	5,84
Temperatura (°C)	23	25	28	31	33
Inóculo (UFC mL ⁻¹)	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁹

Tabela 7. Matriz do planejamento fatorial completo 2^3 com pontos axiais e quatro pontos centrais com as variáveis independentes codificadas.

Ensaio	Variáveis		
	pH	Temperatura	Inóculo
1	-	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,68	0	0
10	+1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	+1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	+1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0

Os dados experimentais foram analisados pelo método de regressão de superfície de resposta. Este método baseia-se na utilização de um modelo polinomial para calcular a resposta prevista que inclui todos os termos de interação:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{33} \cdot x_3^2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde \hat{y} é a resposta prevista, b_0 , b_1 , b_2 , b_3 , b_{11} , b_{22} , b_{33} , b_{12} , b_{13} e b_{23} são os coeficientes de regressão, e x_1 , x_2 e x_3 são os níveis codificados das variáveis independentes.

A fim de confirmar os resultados obtidos e validar o modelo estatístico, realizaram-se cultivos em triplicata nas condições de maior resposta e comparou-se a similaridade com o resultado anterior.

3.5.3. Cultivo em hidrolisado ácido-enzimático de casca de soja nas condições otimizadas

As condições de máxima produção de etanol estabelecidas pelo planejamento fatorial utilizando HCS foram aplicadas em cultivo sobre HCS-AE, pois este hidrolisado possui maior concentração de açúcares e melhor representa a composição da casca de soja (39,7 % de glicose e 19,6 % de xilose). Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Determinação da concentração celular

As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro) no comprimento de onda de 600 nm e posteriormente convertidas em valores de concentrações de biomassa (g L^{-1})

através da reta padrão estabelecida com a levedura (Apêndice A). A concentração de biomassa foi calculada por peso seco (g L^{-1}) utilizando estufa (Fanem 315 SE) a $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ até obtenção de peso constante.

A viabilidade celular foi determinada por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) através de diluição seriada, seguida de plaqueamento em duplicata em meio YMA, composto por (g L^{-1}): ágar, 20; glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3. As culturas foram incubadas durante 48 h a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6.2. Determinação da concentração de açúcares, etanol e xilitol

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, etanol, glicerol e xilitol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando H_2SO_4 (5 mM) como eluente, com fluxo de $0,6\text{ mL min}^{-1}$ e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de $20\text{ }\mu\text{L}$.

Para realização das análises cromatográficas, as amostras provenientes dos cultivos foram centrifugadas por 15 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 3000 g . Quando em cultivo sobre meio sintético o sobrenadante foi filtrado em membrana de éster de celulose com poro de $0,2\text{ }\mu\text{m}$ e quando em cultivo sobre hidrolisado as amostras foram filtradas em filtro "Sep-Pack" C18 (Millipore).

3.7.3. Determinação de pH e Pressão Osmótica

O pH foi determinado em pHmetro (PHTEK, PHS 3B) e a pressão osmótica foi determinada em osmômetro (VAPRO 5520).

3.8. Determinação dos parâmetros fermentativos

A produtividade volumétrica (Q_P , g L⁻¹ h⁻¹), rendimento ($Y_{P/S}$, g g⁻¹) em etanol e xilitol e eficiência de conversão (η , %) dos açúcares em produtos foram calculados pelas seguintes equações:

$$Q_P = \frac{(C_{Pf} - C_{Pi})}{t} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Y_{P/S} = \frac{(C_{Pf} - C_{Pi})}{(C_{Si} - C_{Sf})} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que:

C_{Pf} = concentração final de produto

C_{Pi} = concentração inicial de produto

C_{Si} = concentração inicial de substrato

C_{Sf} = concentração final de substrato

t = tempo em horas

$Y_{m\acute{a}x}$ = rendimento máximo teórico

A eficiência de conversão (η) foi calculada a partir do valor teórico de 0,51 g g⁻¹ de etanol por glicose e de 0,917 g g⁻¹ de xilitol por xilose, descrito por Barbosa et al. (1988). A taxa específica máxima de crescimento (μ_m) foi calculada por regressão linear dos valores logarítmicos naturais de peso seco a partir da fase exponencial das curvas de crescimento.

3.9. Análise estatística

A análise dos resultados obtidos dos planejamentos experimentais foi realizada por meio do programa "Statistica" versão 7. Os resultados foram expressos em tabelas, curvas e gráficos. Quando necessário, o método para a análise estatística de variância ANOVA foi utilizado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol por *S. arborariae* em biorreatores de cultivo submerso

A levedura *S. arborariae* HM19.1A produz praticamente a mesma quantidade de biomassa e etanol utilizando como fonte de carbono glicose ou xilose. No entanto, como típico de outras leveduras fermentadoras de xilose (Panchal et al., 1988; Sanchez et al., 2002; Stambuck et al., 2003), essa espécie tem uma clara preferência para a fermentação de glicose (Cadete et al., 2009).

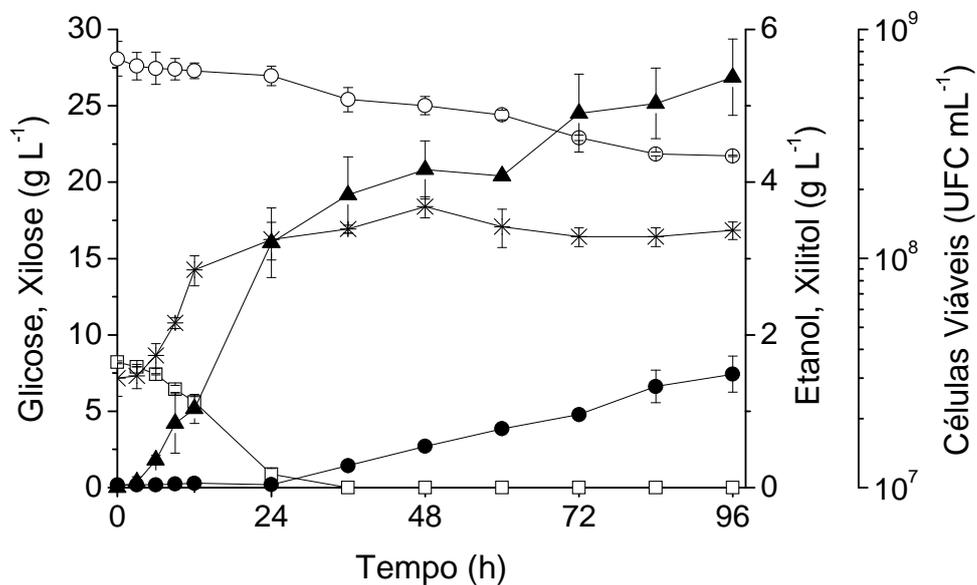
Com o intuito de avaliar a capacidade de conversão dos açúcares fermentescíveis por *S. arborariae* para produzir etanol e xilitol, ensaios utilizando meio sintético X₂₈G₈ e HCS foram realizados em biorreatores de cultivo submerso sob condições anaeróbias (150 rpm) e microaerófilas (180 rpm e 0,33 vvm), a 28 °C.

4.1.1. Bioconversão de açúcares e produção de etanol e xilitol por *S. arborariae* sobre meio sintético

Os resultados referentes ao consumo de açúcares, produção de álcoois e número de células viáveis dos cultivos sobre meio sintético em biorreatores nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho encontram-se na Figura 3. A Tabela 8 apresenta os resultados de concentração, produtividade e rendimento em etanol e xilitol a partir de glicose e/ou xilose, para ambas as condições.

Segundo Cadete et al. (2009), *S. arborariae* não metaboliza arabinose e segundo Pereira (2010), a levedura tem preferência pelo consumo de glicose e xilose e baixo rendimento de etanol a partir de arabinose, de 0,04 g g⁻¹ e 0,09 g g⁻¹ em anaerobiose e aerobiose, respectivamente. Portanto, a arabinose não foi adicionada ao meio de cultura para a realização dos experimentos.

Anaerobiose



Microaerofilia

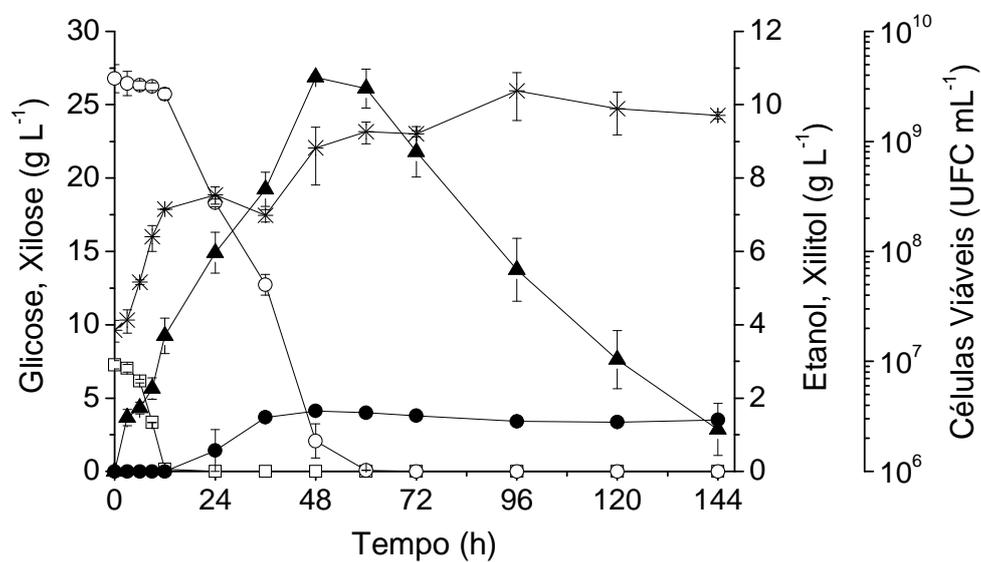


Figura 3. Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de etanol e xilitol por *S. arborariae* cultivada sobre meio sintético X₂₈G₈ em biorreatores, sob condições de anaerobiose e microaerofilia. Glicose (□); xilose (○); etanol (▲); xilitol (●); células viáveis (*). Resultados são a média de duplicatas.

Tabela 8. Resultados obtidos para concentração (g L^{-1}), rendimento (g g^{-1}) e produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) em xilitol e etanol a partir de glicose e/ou xilose por *S. arborariae* em anaerobiose e microaerofilia sobre meio sintético.

Condição	Produto	Substrato	Concentração	$Y_{P/S}$	Q_P
Anaerobiose					
Etanol	Total		5,37	0,39	0,06
		Glicose	3,21	0,44	0,13
		Xilose	2,16	0,41	0,03
	Xilitol		1,49	0,28	0,02
Microaerofilia					
Etanol	Total		10,75	0,34	0,22
		Glicose	3,70	0,52	0,31
		Xilose	7,05	0,30	0,20
	Xilitol		1,65	0,07	0,03

Para os cálculos de produtividade e rendimento a partir de glicose ou xilose partiu-se do princípio que o metabolismo de xilose é inibido pela presença de glicose (Klein, 1998). Dessa forma, o etanol produzido até o total consumo de glicose é proveniente desse açúcar, considerando que a concentração de xilose metabolizada até então é baixa e pouco significativa para a produção de etanol. A partir do momento que a glicose é consumida do meio, o etanol formado após é proveniente da fermentação de xilose. A xilose irá ser convertida em etanol e/ou xilitol.

A repressão catabólica ocorre pela inibição da transcrição de diversos genes quando micro-organismos como *S. cerevisiae* são cultivados em fontes de carbono facilmente fermentáveis, como a glicose. Entre os genes que são reprimidos encontram-se genes relacionados com o catabolismo de açúcares de fermentação lenta, genes da gliconeogênese e funções mitocondriais. A glicose é responsável por aumentar a taxa de

degradação de proteínas e inibição de enzimas alvo para que a utilização preferencial como fonte de carbono seja a glicose (Klein, 1998).

Sob anaerobiose (Figura 3) a glicose foi esgotada do meio em 24 horas de cultivo, entrando em fase estacionária e produzindo $3,2 \text{ g L}^{-1}$ de etanol com rendimento de $0,44 \text{ g g}^{-1}$. Após, a levedura passou a consumir lentamente a xilose, convertendo o açúcar predominantemente em álcoois, uma vez que o número de células viáveis permaneceu constante. A xilose foi metabolizada a etanol e xilitol, com rendimento total de conversão em produtos de $0,69 \text{ g g}^{-1}$, com maior concentração ($2,17 \text{ g L}^{-1}$) e rendimento em etanol ($0,41 \text{ g g}^{-1}$), porém com baixa produtividade ($0,03 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Ao final do cultivo foram produzidos $5,37 \text{ g L}^{-1}$ de etanol, com rendimento e produtividade em etanol de $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e $0,06 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Tabela 8). O cultivo foi de 96 horas, não obtendo o total consumo de xilose e a máxima produção de etanol. Dessa forma, cultivos em anaerobiose não são eficientes para a produção de etanol por *S. arborariae* em meios com predominância de xilose como substrato.

Eliasson et al. (2000) realizou estudo utilizando *S. cerevisiae* recombinante contendo genes de *P. stipitis* para metabolizar xilose, sobre meio de cultivo composto por glicose e xilose e uma produtividade de $0,38 \text{ g g}^{-1}$ de etanol foi obtida, semelhante ao encontrado no presente trabalho. Segundo Skoog & Hahn-Hägerdal (1988), a produção de etanol a partir de pentoses por leveduras está estritamente ligada à presença de oxigênio em baixas concentrações. Em estudo realizado por Kötter & Ciriacy (1993) em condições

anaeróbias, as cepas recombinantes de *S. cerevisiae* não crescem em meio contendo xilose como substrato.

Na condição de microaerofilia (Figura 3) os açúcares foram rapidamente metabolizados. A glicose foi totalmente convertida em 12 h de cultivo e a xilose em 60 h, obtendo 10,75 g L⁻¹ de etanol em 48 h com rendimento e produtividade total de 0,34 g g⁻¹ e 0,22 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente. Observou-se que a levedura teve preferência na conversão de xilose a etanol, produzindo 7 g L⁻¹ de etanol a partir de xilose e apenas 1,65 g L⁻¹ de xilitol, sendo este produzido quando a glicose foi esgotada do meio. O rendimento total da conversão de xilose em produtos (etanol e xilitol) foi de 0,37 g g⁻¹, menor que o obtido em anaerobiose (0,88 g g⁻¹), assim como o rendimento total em etanol, pois com a presença de oxigênio o açúcar é utilizado para a produção de células. No entanto, com pequenas concentrações de oxigênio foi possível a total conversão dos açúcares em 48 h de cultivo, produzindo o dobro de etanol em comparação com os cultivos em anaerobiose, que possui produtividade baixa e em 96 h consumiu apenas 40 % de todos os açúcares.

Os resultados conferem com os obtidos por Pereira (2010), que observou o maior consumo dos açúcares (glicose e xilose) por *S. arborariae* em condições de microaerofilia e, apesar da condição de anaerobiose formar uma maior concentração de etanol, apresentou uma baixa produtividade volumétrica (0,08 g L⁻¹ h⁻¹). No presente estudo a condição de microaerofilia produziu mais etanol, provavelmente devido à predominância de pentose no meio, enquanto que o meio sintético utilizado por Pereira (2010) era constituído

de 28 g L⁻¹ de glicose e 30 g L⁻¹ de xilose, sendo assim o etanol produzido proveniente principalmente da hexose.

O oxigênio é aparentemente necessário para o transporte de certos dissacarídeos em muitas leveduras, embora não o seja para glicose (Kluyver & Custers, 1940; Sims & Barnett, 1977). Em um estudo sobre o requerimento de oxigênio no transporte de xilose para dentro da célula (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1990), a taxa de captação em condições de aerobiose foi maior em comparação com cultivos em anaerobiose, indicando que o oxigênio induz ou ativa o sistema de transporte.

Na condição de microaerofilia se atingiu a maior produção de xilitol (1,65 g L⁻¹), assim como para Pereira (2010), que obteve 2,37 g L⁻¹. Os resultados indicam que *S. arborariae* possui clara preferência para a produção de etanol a partir de xilose, tanto em anaerobiose como em microaerofilia, acumulando pequenas concentrações de xilitol no meio. Após os açúcares serem totalmente consumidos, o etanol presente no meio começou a ser metabolizado como fonte de carbono com a presença de oxigênio, já o xilitol não foi consumido. Quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns micro-organismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, isso foi demonstrado em micro-organismos como *Pachysolen tannophilus* (Maleszka & Schneider, 1982), *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* (Schirmer-Michel et al., 2008).

Em experimento realizado por Fromanger et al. (2010) cultivando *C. shehatae* sobre xilose em condições de microaerofilia (0,6 vvm e 400 rpm), foi verificada uma produtividade de etanol semelhante e de xilitol inferior a este

trabalho, obtendo produtividades volumétricas em etanol e xilitol de $0,32 \text{ g g}^{-1}$ e $0,04 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente.

Em microaerofilia a levedura passou de $2 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ para $3 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, enquanto que em anaerobiose a levedura obteve menor produção de células, iniciando em $3 \times 10^7 \text{ UFC mL}^{-1}$ e atingindo $1 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$. Há o desvio da rota metabólica para a produção de células na presença de oxigênio através da respiração (Moat et al., 2002), sendo assim cultivos anaeróbios são preferíveis para a produção de etanol. Porém sem oxigênio a conversão de xilose em etanol se torna um processo lento para *S. arborariae* e outras leveduras (Skoog & Hahn-Hägerdal, 1988).

Zhang et al. (2010) apresentaram valores semelhantes na produtividade de etanol e maiores para xilitol utilizando *S. cerevisiae* (NAN-127) modificada contendo as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR-XDH). A levedura foi cultivada em meio contendo glicose e xilose a 200 rpm e com taxas de aeração de 0,02 vvm a 0,05 vvm, obtendo rendimentos em etanol de $0,41 \text{ g g}^{-1}$ a $0,37 \text{ g g}^{-1}$ e para xilitol de $0,47 \text{ g g}^{-1}$ a $0,39 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente para a menor e maior aeração.

As espécies de leveduras reconhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são *P. stipitis*, *P. tannophilus* e *C. shehatae*. Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com rendimentos de $0,3 \text{ g g}^{-1}$ a $0,44 \text{ g g}^{-1}$ (Stambuck et al., 2008). A levedura estudada no presente trabalho fermenta tanto hexose como pentose a etanol

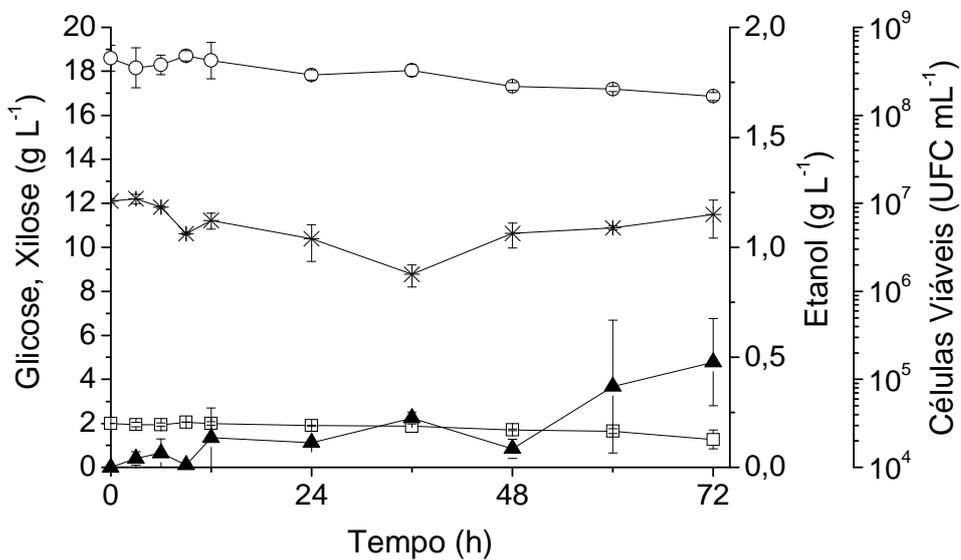
com rendimento e produtividade equivalentes a outras espécies eficientes na conversão de xilose a etanol. Portanto, maiores estudos foram realizados com esta a cepa a fim de avaliar a sua capacidade de fermentar os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos.

4.1.2. Bioconversão de açúcares e produção de etanol e xilitol por *S. arborariae* sobre hidrolisado de casca de soja

Ensaio utilizando HCS em biorreatores de cultivo submerso sob as mesmas condições de aeração (150 rpm; 180 rpm e 0,33 vvm) foram realizados. Os cultivos sobre meio sintético X₂₈G₈, serviram como base para a análise do metabolismo de *S. arborariae* sobre o hidrolisado.

A Figura 4 apresenta os resultados referentes ao consumo de açúcares, produção de álcoois e número de células viáveis nos cultivos sobre HCS em anaerobiose e microaerofilia. Os valores obtidos de produção, produtividade e rendimento em etanol e xilitol final e a partir de glicose e xilose separadamente para ambas as condições, encontram-se na Tabela 9.

Anaerobiose



Microaerofilia

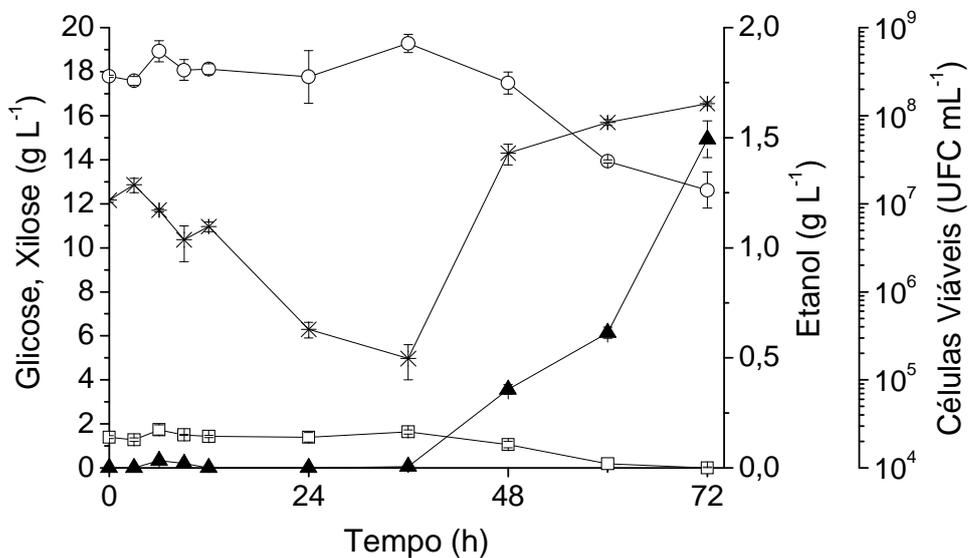


Figura 4. Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de etanol por *S. arborariae* cultivada sobre HCS em biorreatores nas condições de anaerobiose e microaerofilia. Glicose (□); xilose (○); etanol (▲); células viáveis (*). Resultados são a média de duplicatas.

Tabela 9. Resultados obtidos para concentração (g L^{-1}), rendimento (g g^{-1}) e produtividade ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) de etanol por *S. arborariae* em anaerobiose e microaerofilia sobre HCS e meio sintético.

		Concentração	$Y_{P/S}$	Q_P
Anaerobiose	HCS	0,48	0,19	0,007
	Meio Sintético	5,37	0,39	0,06
Microaerofilia	HCS	1,49	0,23	0,021
	Meio Sintético	10,75	0,34	0,22

Por limitação da técnica, o tempo de retenção de arabinose se sobrepôs ao de xilitol, gerando um só pico. Para não subestimar ou superestimar a concentração desses açúcares os cromatogramas não foram manipulados. A Figura 5 apresenta um cromatograma de cultivo em hidrolisado de casca de soja, onde é possível constatar que o xilitol forma um ombro no pico de arabinose, não sendo possível muitas vezes realizar a sua quantificação. Os tempos de retenção para cada composto analisado estão marcados na figura. Além disso, pela técnica utilizada, os açúcares manose e galactose possuem o mesmo tempo de retenção que a xilose, criando somente um pico para esses três compostos. O mesmo ocorreu para Yoo (2011), onde os picos de xilose, galactose e manose nos cromatogramas obtidos por análise por HPLC dos hidrolisados apresentaram tempos de retenção muito próximos para serem decompostos em picos individuais.

Schirmer-Michel et al. (2008) determinou a concentração de açúcares presentes no hidrolisado de casca de soja concentrado 2 vezes e obteve (g L^{-1}): xilose, 14,5; arabinose, 12; manose, 7,2; glicose, 1,4. Se somarmos as concentrações de xilose e manose obtemos $21,7 \text{ g L}^{-1}$. A

composição do hidrolisado é semelhante ao do presente trabalho, quantificado em $18,2 \text{ g L}^{-1}$ de xilose, 12 g L^{-1} de arabinose e $1,7 \text{ g L}^{-1}$ de glicose.

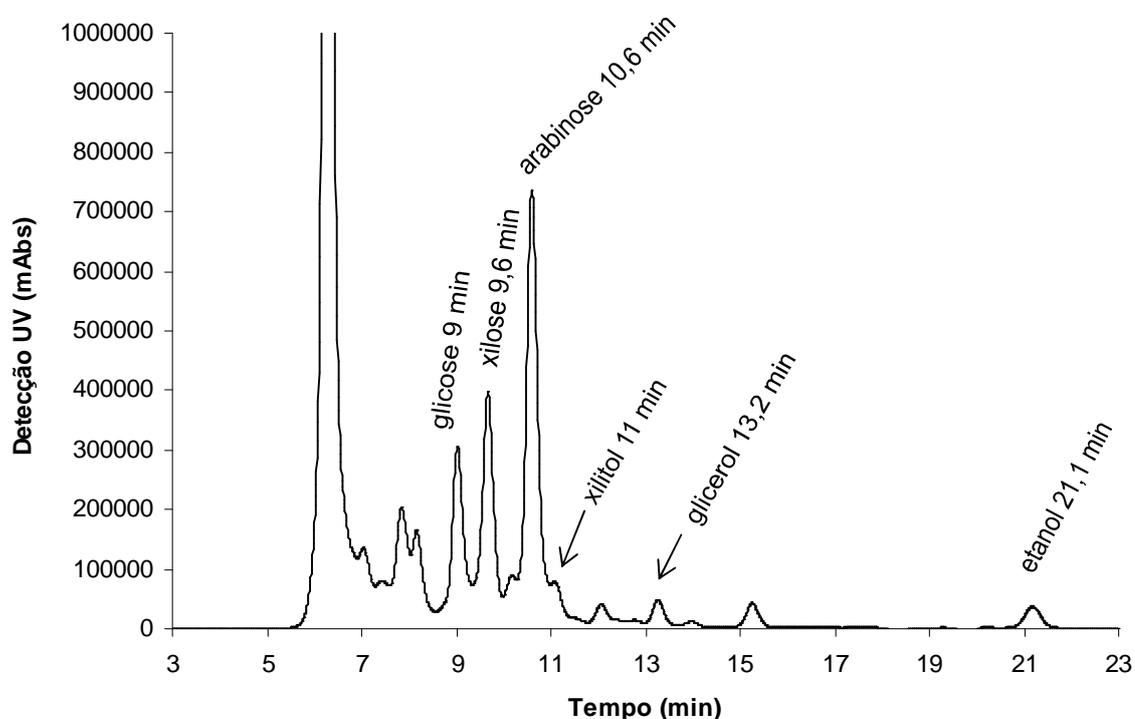


Figura 5. Cromatograma do hidrolisado de casca de soja com o tempo de retenção dos compostos analisados.

O metabolismo de *S. arborariae* foi altamente afetado quando cultivada sobre hidrolisado de casca de soja, principalmente na ausência de oxigênio. Em anaerobiose a levedura não foi capaz de converter eficientemente os açúcares, consumindo apenas 36,6 % de glicose e 9,3 % de xilose e manose. Já em microaerofilia, houve o completo consumo de glicose e 29 % de xilose e manose (Figura 4). A arabinose não foi consumida em nenhum dos cultivos. Para ambas as condições, a produtividade caiu consideravelmente, aproximadamente 10 vezes, comparando com os cultivos em meio sintético

(Tabela 9). O rendimento também foi menor nos cultivos sobre HCS, provavelmente devido ao desvio da rota metabólica para a manutenção celular.

Após a inoculação de um meio de cultura, as células de levedura têm normalmente que se adaptar ao novo meio. A duração da fase lag depende do micro-organismo, da viabilidade e quantidade de inóculo, de alterações na composição de nutrientes, das condições de cultivo ou a incubação em condições ambientais de estresse (Vogel & Todaro, 2007). Pode-se observar na Figura 4 que houve a morte celular pela diminuição das células viáveis e uma longa fase lag, provavelmente devido a um estresse ambiental. Após 36 h de cultivo em microaerofilia o número de células começa a aumentar, ou seja, houve uma adaptação da levedura ao hidrolisado. A partir desse tempo os açúcares começam a ser consumidos e etanol produzido sob microaerofilia, porém é um processo lento.

A fermentação do hidrolisado de casca de soja pela cepa estudada não é viável. O cultivo em microaerofilia nas condições aplicadas pode não ter oxigenação suficiente, sendo necessária maior oxigenação quando em cultivo sobre hidrolisado. Outros fatores podem estar influenciando na viabilidade da cepa, sendo assim necessários maiores estudos para determinar os fatores limitantes para o cultivo de *S. arborariae* sobre hidrolisados lignocelulósicos.

Os resultados são diferentes ao obtidos por Hickert (2010), que avaliou a capacidade de fermentação do hidrolisado de casca de arroz (HCA) por *S. arborariae* em agitador orbital a 180 rpm e 30 °C, apresentando fase log acentuada e rendimento de 0,45 g g⁻¹ e produtividade de 0,16 g L⁻¹ h⁻¹ em etanol.

Uma das características dos hidrolisados provenientes de diferentes resíduos lignocelulósicos é a alta pressão osmótica. Segundo Hickert (2010), a pressão osmótica do hidrolisado de casca de arroz é de 1539 mOsm kg⁻¹ e ainda assim a população de células de levedura foi capaz de se multiplicar e manter o crescimento constante. A pressão osmótica foi determinada para o HCS sendo de 1461 mOsm kg⁻¹, semelhante ao hidrolisado de casca de arroz.

4.2. Ensaio de *S. arborariae* sobre meio sintético em agitador orbital

Com o objetivo de definir a causa pela qual a cepa estudada não se desenvolve no hidrolisado de casca de soja, experimentos em meio sintético foram realizados em frascos erlenmeyers agitados. Primeiramente analisando o efeito de concentrações de alumínio no meio sobre a viabilidade celular, já que o HCS possui altas concentrações desse metal, enquanto que em hidrolisado de casca de arroz não (Hickert, 2010). Após, o impacto da pressão osmótica do meio sobre a levedura foi testado.

4.2.1. Tolerância de *S. arborariae* a concentrações crescentes de alumínio

O alumínio é o principal metal encontrado na casca de soja (Tabela 10) e a sua concentração no hidrolisado de casca de soja utilizado para o presente trabalho é de aproximadamente 178 mg L⁻¹, podendo ser tóxico para os micro-organismos. Portanto o impacto da concentração de alumínio sobre

as células de *S. arborariae* foi testado em meio sintético e assim determinar se a sua concentração no HCS é o fator limitante para o crescimento da levedura.

Tabela 10. Composição de minerais da casca da soja (Cassales, 2010).

Minerais	Concentração % (mg kg ⁻¹)
Fósforo	0,0019
Potássio	0,013
Cálcio	0,0057
Magnésio	0,0026
Enxofre	0,0014
Ferro	0,0013
Zinco	61
Cobre	9
Manganês	30
Sódio	10
Cromo	3
Alumínio	713

A Figura 6 apresenta os resultados de produção de biomassa por *S. arborariae* em meio sintético com concentração de até 201 mg L⁻¹ de alumínio (Al³⁺) em 12 horas de cultivo.

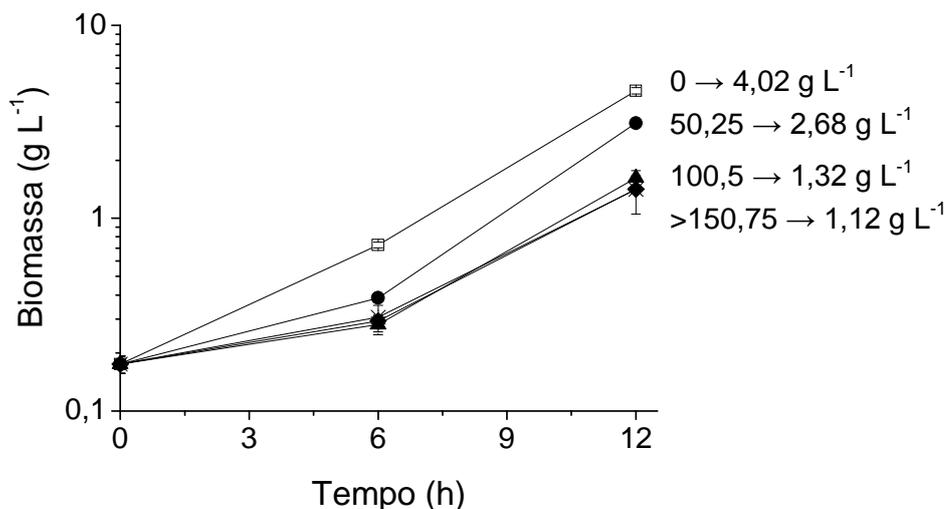


Figura 6. Produção de biomassa ($g L^{-1}$) de *S. arborariae* em meio sintético com 0 (\square), 50,25 (\bullet), 100,5 (\blacktriangle), 150,75 ($*$) e 201 $mg L^{-1}$ (\blacklozenge) de alumínio (Al^{3+}), em 12 h de cultivo. Resultados são a média de duplicatas.

Verificou-se que à medida que as concentrações de Al^{3+} aumentaram houve a diminuição na produção de biomassa, como pode ser observado na Figura 6. Nas concentrações de 150,75 $mg L^{-1}$ e 201 $mg L^{-1}$ de alumínio, semelhante à concentração determinada para o HCS e considerada tóxica para muitos micro-organismos, houve a produção de 1,12 $g L^{-1}$ de biomassa em 12 h de cultivo, enquanto que no meio sem adição de alumínio a produção foi de 4,02 $g L^{-1}$ de biomassa. A multiplicação da levedura é afetada pela presença de alumínio no meio, porém as maiores concentrações desse metal não foram suficientes para inibir totalmente a multiplicação da levedura.

Os resultados sugerem que a presença de alumínio no HCS, apesar de reduzir a produção de biomassa, não é o fator limitante para o seu desenvolvimento e, portanto, outros fatores devem estar influenciando o

metabolismo da levedura e, associados à concentração de alumínio, inibindo o seu crescimento no hidrolisado.

Amorim & Basso (1990) relatam que concentrações acima de 10 mg L⁻¹ já exercem ação depressiva sobre a fermentação alcoólica. Faria (2010) estudou os efeitos deletérios de diferentes concentrações de alumínio no crescimento de biomassa e viabilidade da levedura *S. cerevisiae* PE-2 e concluiu que o alumínio apresentou citotoxicidade no desenvolvimento da levedura em dose igual ou superior a 50 mg L⁻¹. Além disso, o ácido cítrico e magnésio, mesmo promovendo uma pequena queda da viabilidade das leveduras, demonstraram claramente serem eficazes como mecanismos de proteção, minimizando os efeitos deletérios do alumínio. Comparando com outras leveduras, *S. arborariae* possui alta tolerância a concentrações de alumínio no meio já que mantém a capacidade de se multiplicar até mesmo em concentrações de 201 mg L⁻¹ de alumínio, inclusive sem a suplementação com elementos protetores do efeito tóxico causado pelo alumínio, como relatado por Faria (2010).

A partir destes experimentos foi possível determinar se a presença de alumínio no meio inibe o metabolismo de *S. arborariae*, podendo assim a sua concentração no HCS ser a causa da levedura não ser capaz de se multiplicar nesse hidrolisado. Em meio sintético houve diferença na multiplicação celular de *S. arborariae* entre o controle e os ensaios com adição de alumínio, comprovando que a sua concentração de 178 mg L⁻¹ no HCS contribui para inibir o desenvolvimento da levedura.

4.2.2. Tolerância de *S. arborariae* à pressão osmótica

Como o alumínio não inibiu totalmente a multiplicação celular da levedura, o efeito da pressão osmótica do meio foi estudado. A Figura 7 mostra o comportamento de *S. arborariae* quanto a produção de biomassa em meio sintético em pressões osmóticas de até 2700 mOsm kg⁻¹ em 72 h de cultivo. O meio sem adição de NaCl foi usado como controle e apresentou pressão osmótica de 194 mOsm kg⁻¹.

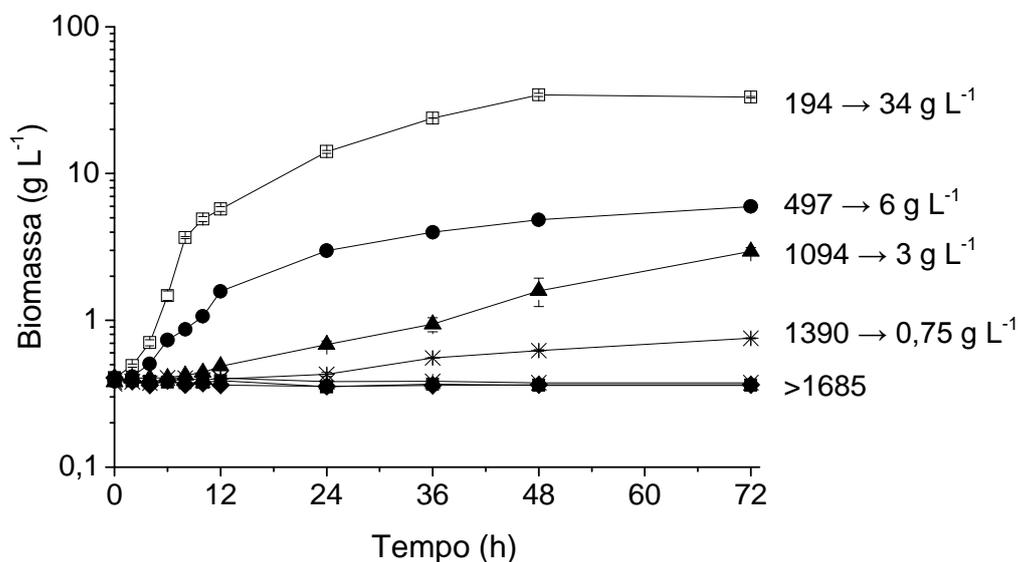


Figura 7. Cinética da produção de biomassa (g L⁻¹) de *S. arborariae* em 72 h de cultivo em meio sintético com pressão osmótica de 194 (□), 497 (●), 1094 (▲), 1390 (*), 1685 (x), 2145 (■) e 2700 mOsm kg⁻¹ (◆). Resultados são a média de duplicatas.

Há claramente o declínio da multiplicação celular com o gradativo aumento da pressão osmótica dos meios, aumentando a duração da fase lag e diminuindo a produção de biomassa. A tolerância máxima de *S. arborariae* à pressão osmótica está na faixa entre 1094 mOsm kg⁻¹ e 1390 mOsm kg⁻¹, onde ainda possui uma pequena capacidade de se multiplicar.

O ensaio controle (194 mOsm kg^{-1}) produziu aproximadamente 34 g L^{-1} de biomassa em 48 h de cultivo, enquanto que a produção máxima dos demais cultivos diminuiu consideravelmente, chegando a 6 g L^{-1} , 3 g L^{-1} e $0,75 \text{ g L}^{-1}$ para os ensaios com pressão osmótica de 497 mOsm kg^{-1} , $1094 \text{ mOsm kg}^{-1}$ e $1390 \text{ mOsm kg}^{-1}$, respectivamente.

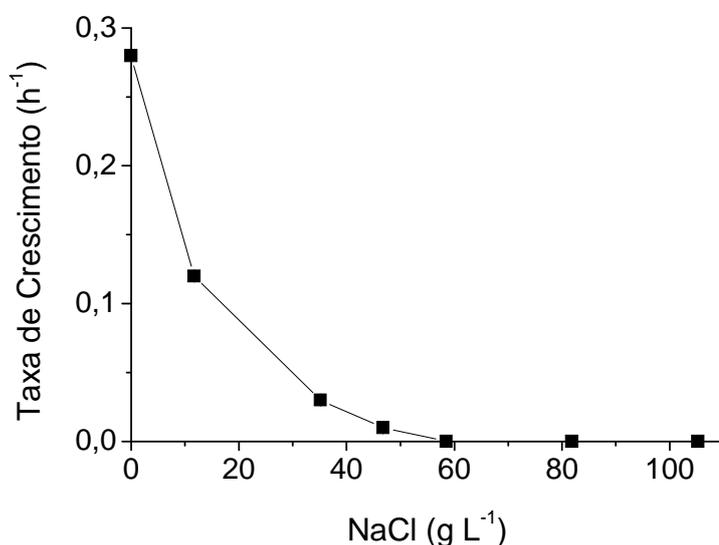


Figura 8. Taxa de crescimento máxima de *S. arborariae* (h^{-1}) em concentrações crescentes de NaCl em meio sintético. Resultados são a média de duplicatas.

A taxa específica máxima de crescimento de *S. arborariae* (h^{-1}) nas diferentes concentrações de NaCl está apresentada na Figura 8, onde se pode observar o declínio da taxa de crescimento relacionado ao aumento da concentração de sal no meio. Esses resultados estão de acordo com os achados de Albers & Larsson (2009), que avaliaram 6 cepas de *S. cerevisiae* em relação a sua taxa de crescimento e extensão da fase lag, em condições de estresse osmótico sob a forma de elevadas concentrações de sal (NaCl),

usando meio sintético rico YPD (extrato de levedura, peptona, glicose). Os autores observaram uma clara inibição das cepas estudadas conforme a concentração de NaCl dos meios aumentou. O crescimento de duas cepas, Modo e X2180, foi suportado em uma taxa próxima a $0,1 \text{ h}^{-1}$ até mesmo em 100 g L^{-1} de NaCl. Em contraste, as cepas JBA e CEN-PK apresentaram taxas de crescimento próximas a zero nas concentrações máximas de NaCl e fase lag muito longa, aproximadamente de 40 h.

Como o hidrolisado apresenta baixas concentrações de tóxicos (Tabela 1), a diferença no crescimento celular pode estar relacionada à elevada pressão osmótica do mesmo. A pressão osmótica do hidrolisado ($1461 \text{ mOsm kg}^{-1}$) é em torno de 7 vezes maior do que a determinada para o meio sintético (194 mOsm kg^{-1}) e encontra-se próxima à tolerância máxima de *S. arborariae*, podendo pequenas variações da pressão osmótica desse hidrolisado causar grande influência na viabilidade celular e, conseqüentemente, na conversão dos açúcares a etanol.

Maiorella et al. (1984) investigaram a inibição de *S. cerevisiae* por diferentes sais e descobriram que a inibição diminuiu na seguinte ordem: CaCl_2 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NaCl}$, $\text{NH}_4\text{Cl} > \text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{MgCl}_2 > \text{MgSO}_4 > \text{KCl}$. Vriesekoop et al. (2002) examinaram os efeitos de Na^+ e Cl^- em *Z. mobilis* e provaram que tanto o Na^+ quanto Cl^- inibiram o crescimento, o consumo de glicose e produção de etanol, no entanto o Na^+ exibiu efeito inibitório mais severo. Foi determinada a pressão osmótica de $1359 \text{ mOsm kg}^{-1}$ do HCS antes de ter seu pH corrido pela adição de NaOH sólido, levemente inferior à pressão osmótica do HCS final ($1461 \text{ mOsm kg}^{-1}$). A adição de Na^+ ao meio de cultivo

através da correção do pH não influenciou significativamente na pressão osmótica do meio, portanto a alta pressão osmótica deve ser proveniente da hidrólise ou da própria matéria-prima, a casca de soja.

Segundo Hohmann (2002), as células de levedura podem desenvolver mecanismos para se ajustar, dentro de certos limites, à alta osmolaridade externa e manter ou restabelecer a água no interior da célula. Adaptação à osmolaridade elevada é um processo ativo baseado na detecção de alterações osmóticas e respostas celulares adequadas destinadas a manter a atividade celular. Adaptação após um choque hiperosmótico pode levar várias horas (Blomberg & Adler, 1992; Mager & Varela, 1993; Hohmann, 1997). O mesmo pode estar acontecendo com *S. arborariae*, em que, após uma longa fase lag, as células entram na fase exponencial, porém com crescimento reduzido, comparado aos obtidos nos cultivos com baixa pressão osmótica.

Beney et al. (2001) observou que o aumento da pressão osmótica resultou na diminuição da viabilidade celular em *S. cerevisiae*. Pratt et al. (2003) examinaram os efeitos da pressão osmótica sobre o volume e viabilidade celular das cepas de *S. cerevisiae* Lager e Ale, demonstrando que a exposição ao estresse osmótico resultou em mudanças significativas na forma e características das células. Reduções acentuadas na viabilidade foram evidentes ao final do período de cultivo (96 horas), sendo proposto que durante a plasmólise, visível na superfície celular, a parede celular tem um papel significativo na sobrevivência das células durante o estresse osmótico.

S. arborariae é uma espécie de difícil aplicação prática na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, que apresentam alta pressão

osmótica. No entanto possui características interessantes, como a capacidade de converter xilose em etanol com grande eficiência e assim pode constituir uma fonte de genes, enzimas e/ou transportadores de açúcares para engenharia de outras cepas, podendo maximizar a produção de etanol a partir de biomassa renovável (Hahn-Hägerdal et al., 2007; Stephanopoulos, 2007; Stambuk et al., 2008).

Visto que *S. arborariae* não foi eficiente para a conversão dos açúcares presentes no HCS a etanol ou xilitol, outra levedura passou a ser estudada, já que o objetivo central do presente trabalho era a bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a etanol.

4.3. Otimização da bioconversão dos açúcares presentes no hidrolisado de casca de soja a etanol por *C. guilliermondii*

A levedura *C. guilliermondii* é conhecida pela sua capacidade de converter xilose a xilitol, como relatado por diversos autores (Roberto et al., 1996; Silva & Roberto, 2001; Mussato et al., 2006), no entanto, há poucos relatos sobre a produção de etanol por essa levedura.

O isolado *C. guilliermondii* BL13 é uma levedura osmotolerante e apresentou ser promissora para a produção de etanol a partir de hidrolisados lignocelulósicos em experimentos anteriores realizados pelo grupo e, portanto, foi selecionada para os ensaios de otimização do meio e das condições de cultivo.

4.3.1. Efeito da suplementação do hidrolisado de casca de soja sobre a produção de etanol

Para determinar se a suplementação do HCS é necessária e quais os meios possuem efeito sobre a produção de etanol por *C. guilliermondii* BL 13, foi realizado o planejamento Plackett-Burman com as variáveis independentes: milhocina; extrato de levedura; peptona; e tween 80. O planejamento Plackett-Burman permite que os efeitos principais de cada fator sejam determinados individualmente, admitindo-se que os efeitos de interação sejam desprezíveis (Neto et al., 2010). A Tabela 11 apresenta as variáveis e os resultados para cada ensaio.

Tabela 11. Esquema da matriz do planejamento Plackett–Burman com as variáveis independentes codificadas e reais (g L^{-1}) e o resultado de concentração (g L^{-1}), rendimento ($Y_{P/S}$, g g^{-1}) e produtividade (Q_P , $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$) em etanol.

Ensaio	Extrato de				Concentração	$Y_{P/S}$	Q_P
	Levedura	Milhocina	Peptona	Tween 80			
1	+1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	+1 (0,4)	3,056	0,357	0,127
2	+1 (4)	+1 (4)	-1 (0)	-1 (0)	3,154	0,319	0,131
3	+1 (4)	+1 (4)	+1 (5)	-1 (0)	3,804	0,408	0,159
4	-1 (0)	+1 (4)	+1 (5)	+1 (0,4)	2,715	0,285	0,113
5	+1 (4)	-1 (0)	+1 (5)	+1 (0,4)	3,545	0,468	0,148
6	-1 (0)	+1 (4)	-1 (0)	+1 (0,4)	3,024	0,308	0,126
7	-1 (0)	-1 (0)	+1 (5)	-1 (0)	2,733	0,319	0,114
8	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	3,705	0,446	0,154
9	0 (2)	0 (2)	0 (2,5)	0 (0,2)	3,633	0,376	0,151
10	0 (2)	0 (2)	0 (2,5)	0 (0,2)	3,374	0,388	0,141
11	0 (2)	0 (2)	0 (2,5)	0 (0,2)	3,495	0,393	0,146

Nutrientes específicos, como o nitrogênio, elementos traço e vitaminas, são necessários para obter uma rápida fermentação e alta

concentração de etanol, desejáveis para minimizar os custos de capital e energia. A literatura sobre fermentação de pentoses fornece principalmente dados experimentais em meios sintéticos ou hidrolisados lignocelulósicos suplementados por meios complexos, como peptona e extrato de levedura (Olsson & Hähn-Hagerdal, 1996). A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos demanda outras exigências ao micro-organismo do que quando em meio sintético. Portanto, os efeitos da adição de nutrientes no hidrolisado devem ser analisados. A Tabela 12 apresenta os efeitos estimados das variáveis para concentração, produtividade e rendimento em etanol.

Tabela 12. Efeitos estimados para concentração, produtividade (Q_p) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol com confiança de 90 % ($p = 0,1$).

		Efeito	Desvio Padrão	t(8)	p	R ²
Concentração	Média	3,2944	0,1266	26,0248	0,0000	0,2721
	Extrato de Levedura	0,3455	0,2969	1,1638	0,2887	
	Milhocina	-0,0855	0,2969	-0,2880	0,7830	
	Peptona	-0,0355	0,2969	-0,1196	0,9087	
	Tween 80	-0,2640	0,2969	-0,8893	0,4081	
Q_p	Média	0,1373	0,0053	26,0248	0,0000	0,2721
	Extrato de Levedura	0,0144	0,0124	1,1638	0,2887	
	Milhocina	-0,0036	0,0124	-0,2880	0,7830	
	Peptona	-0,0015	0,0124	-0,1196	0,9087	
	Tween 80	-0,0110	0,0124	-0,8893	0,4081	
Y_{P/S}	Média	0,3697	0,0171	21,6382	0,0000	0,4337
	Extrato de Levedura	0,0483	0,0401	1,2055	0,2734	
	Milhocina	-0,0675	0,0401	-1,6852	0,1429	
	Peptona	0,0125	0,0401	0,3118	0,7657	
	Tween 80	-0,0181	0,0401	-0,4524	0,6669	

Para as análises estatísticas, as variáveis foram testadas no nível de confiança de 90 % ($p < 0,1$) a fim de não subestimar a importância dos

nutrientes sobre a resposta. A análise dos resultados provou que nenhuma variável foi estatisticamente significativa para concentração, rendimento ou produtividade em etanol, devido aos baixos coeficientes de determinação (R^2) e altos valores p das variáveis, indicando uma alta variabilidade nas respostas e que não pode ser explicada pelos modelos.

Nutrientes complexos, tais como peptona, raramente podem ser adicionados devido ao seu custo elevado, mas através da sua adição é possível identificar um fator limitante, por exemplo, uma vitamina, e ser acrescentado separadamente. Porém o hidrolisado de casca de soja não requer suplementação, sugerindo que os nutrientes essenciais já estão presentes no HCS, uma vez que esse substrato é rico em nitrogênio e possui diversos minerais na sua composição química (Cassales, 2010), suprimindo os requisitos para o metabolismo da levedura.

Como a adição dos meios estudados ao HCS não aumentou a resposta, o hidrolisado utilizado para os experimentos subseqüentes não foi suplementado, mostrando que a utilização de HCS é interessante e vantajosa para processos fermentativos, uma vez que não requer suplementação, tornando o processo menos oneroso.

Mussatto & Roberto (2005), avaliaram o metabolismo de *C. guilliermondii* FTI 20037 quanto à suplementação de nutrientes (amônia, cloreto de cálcio e de extrato de farelo de arroz) em hidrolisado de palha de arroz. A suplementação teve um forte efeito inibidor sobre a utilização de xilose, provavelmente devido ao desequilíbrio entre a nutrição iônica, o que se refletiu na baixa tolerância ao meio ambiente. A necessidade de adição de

nutrientes a hidrolisados formulados a partir de outros materiais lignocelulósicos pode ser devido à sua baixa quantidade de cinzas, cerca de 4 % em bagaço de cana de açúcar, madeira e outros (Kuhad & Singh, 1993). De acordo com Kaddam et al. (2000), a palha de arroz continha uma grande quantidade de minerais, oligoelementos e vitaminas nas cinzas.

Após, foi realizado um planejamento composto central para otimizar as condições fermentativas de temperatura, pH e concentração de inóculo, partindo do princípio que todas as 3 variáveis influenciam significativamente na resposta, como é de conhecimento geral e observado na literatura para diversas leveduras (Lafon-Lafourcade, 1983; D'Amore et al., 1989; Van Hoek et al., 2000; Sen & Swaminathan, 2004; Bamforth, 2005; Laluce et al., 2009; Verbelen et al., 2009).

4.3.2. Otimização das condições fermentativas através do planejamento composto central

A Tabela 13 mostra a matriz do planejamento e os resultados observados experimentalmente em cada combinação de níveis para a temperatura, pH e concentração de inóculo. Ao todo, foram realizados 18 ensaios, sendo 4 repetições no ponto central. A partir dessa matriz foram realizados os testes estatísticos e os resultados para produtividade e rendimento em etanol foram analisados separadamente.

Tabela 13. Matriz do planejamento composto central com as variáveis independentes reais e o resultado de produtividade (Q_P , g L⁻¹ h⁻¹) e rendimento ($Y_{P/S}$, g g⁻¹) em etanol.

Ensaio	pH	Temperatura	Inóculo	Q_P	$Y_{P/S}$
1	4,5	25	10 ⁶	0,10	0,28
2	5,5	25	10 ⁶	0,10	0,26
3	4,5	31	10 ⁶	0,11	0,34
4	5,5	31	10 ⁶	0,11	0,33
5	4,5	25	10 ⁸	0,19	0,29
6	5,5	25	10 ⁸	0,18	0,26
7	4,5	31	10 ⁸	0,20	0,27
8	5,5	31	10 ⁸	0,20	0,26
9	4,16	28	10 ⁷	0,07	0,35
10	5,84	28	10 ⁷	0,11	0,36
11	5,0	23	10 ⁷	0,15	0,33
12	5,0	33	10 ⁷	0,21	0,30
13	5,0	28	10 ⁵	0	0,34
14	5,0	28	10 ⁹	0,24	0,30
15	5,0	28	10 ⁷	0,12	0,25
16	5,0	28	10 ⁷	0,12	0,27
17	5,0	28	10 ⁷	0,12	0,27
18	5,0	28	10 ⁷	0,12	0,30

A Tabela 14 apresenta os efeitos estimados das variáveis independentes e de suas interações, tendo como resposta a produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$), com limite de confiança de 95 % ($p = 0,05$). A qualidade de ajuste dos modelos foi avaliada pelo coeficiente de determinação (R^2), uma maneira de avaliar o quanto a variabilidade medida pode ser explicada por fatores experimentais e as suas interações nas respostas observadas. Os dados fornecidos pelos modelos indicam que 92 % e 80 % da variabilidade em resposta à produtividade e ao rendimento em etanol, respectivamente, podem ser explicadas pelos modelos, indicando que os modelos quadráticos representam bem a relação entre os efeitos e a resposta.

Tabela 14. Efeitos estimados para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$). Em destaque vermelho representa as variáveis estatisticamente significativas com confiança de 95 % ($p = 0,05$).

		Efeito	Desvio Padrão	t(8)	p	R ²
Q_P	Média/Interação	0,1191	0,012	9,9365	0,0000	0,9205
	(1) pH (L)	0,0084	0,013	0,645	0,537	
	pH (Q)	-0,0134	0,0135	-0,9894	0,3514	
	(2) Temperatura (L)	0,0221	0,013	1,7004	0,1275	
	Temperatura (Q)	0,0504	0,0135	3,7274	0,0058	
	(3) Inóculo (L)	0,1104	0,013	8,4929	0,0000	
	Inóculo (Q)	0,0079	0,0135	0,5828	0,5761	
	1 x 2	0,0025	0,017	0,1473	0,8866	
	1 x 3	-0,0025	0,017	-0,1473	0,8866	
	2 x 3	0,0025	0,017	0,1473	0,8866	
$Y_{P/S}$	Média/Interação	0,3350	0,0118	28,4584	0,0000	0,7933
	(1) pH (L)	-0,0201	0,0128	-1,5754	0,1538	
	pH (Q)	-0,0103	0,0133	-0,7726	0,462	
	(2) Temperatura (L)	0,021	0,0128	1,6488	0,1378	
	Temperatura (Q)	-0,0528	0,0133	-3,9746	0,0041	
	(3) Inóculo (L)	-0,0117	0,0128	-0,914	0,3874	
	Inóculo (Q)	-0,0351	0,0133	-2,6404	0,0297	
	1 x 2	0,0075	0,0167	0,4499	0,6647	
	1 x 3	-0,0025	0,0167	-0,15	0,8845	
	2 x 3	-0,0375	0,0167	-2,2493	0,0546	

A análise de variância (ANOVA) foi calculada, resultando em F calculado de 10,3 para Q_P e 3,41 para $Y_{P/S}$, maior que o F tabelado (3,39), provando que os modelos propostos possuem significância estatística. Para os demais testes estatísticos elaboraram-se modelos reduzidos, excluindo os efeitos não significativos por apresentarem alto valor p . A partir dos modelos reduzidos se obteve os efeitos estimados das variáveis independentes estatisticamente significativas para produtividade e rendimento em etanol (Tabela 15).

Tabela 15. Efeitos estimados e coeficientes de regressão dos modelos reduzidos para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) para as variáveis estatisticamente significativas com confiança de 80 % e 89 %, respectivamente.

		Efeito	Desvio Padrão	t(8)	p	Coeficientes de Regressão	R^2
Q_P	Média/Interação	0,1233	0,0079	15,7003	0,0000	0,1233	0,9124
	pH (Q)	-0,0150	0,0109	-1,3789	0,1912	-0,0075	
	(2) Temperatura (L)	0,0221	0,0107	2,0643	0,0595	0,0111	
	Temperatura (Q)	0,0488	0,0109	4,4758	0,0006	0,0244	
	(3) Inóculo (L)	0,1104	0,0107	10,3104	0,0000	0,0552	
$Y_{P/S}$	Média/Interação	0,3294	0,0084	39,2164	0,0000	0,3294	0,7504
	pH (L)	-0,0201	0,0115	-1,7561	0,1045	-0,0101	
	(2) Temperatura (L)	0,0210	0,0115	1,8380	0,0909	0,0105	
	Temperatura (Q)	-0,0506	0,0117	-4,3466	0,0010	-0,0253	
	Inóculo (Q)	-0,0329	0,0117	-2,8259	0,0153	-0,0165	
	2 x 3	-0,0375	0,0150	-2,5074	0,0275	-0,0188	

Em relação ao modelo para produtividade em etanol (Q_P), a variável pH (Q) apresentou valor p de aproximadamente 0,19 e os seus efeitos não devem ser subestimados e, portanto, foi incluída no modelo e o limite de confiança do modelo foi estendido para 80 % ($p = 0,2$). Observa-se que o valor do coeficiente de determinação R^2 foi de aproximadamente 91 %, indicando que o modelo quadrático reduzido se mantém confiável. Já o modelo para rendimento em etanol ($Y_{P/S}$) foi analisado ao nível de confiança de 89 % ($p = 0,11$) a fim de incluir o efeito linear de pH e apresentou coeficiente de determinação R^2 de aproximadamente 75 %, portanto o modelo reduzido permanece confiável.

Para confirmar se os modelos quadráticos reduzidos possuem significância estatística aplicou-se a análise de variância (Tabela 16), resultando em F calculado de 33,84 para Q_P e de 7,22 para $Y_{P/S}$, maior que F tabelado (3,18 e 3,11, respectivamente), refletindo a significância estatística

das equações dos modelos. O valor de F calculado e o tamanho relativamente pequeno do erro indicam que os modelos são adequados para descrever a resposta de produtividade e rendimento em etanol de *C. guilliermondii* nas condições estudadas e poderão ser utilizados para a criação de superfícies de resposta.

Tabela 16. Análise de variância (ANOVA) para produtividade (Q_P) e rendimento em etanol ($Y_{P/S}$).

		SQ	GDL	MQ	F calculado	F tabelado
Q_P	Regressão	0,0529	4	0,0132	33,8417	3,1791
	Resíduo	0,0051	13	0,0004		
	Total	0,0580	17			
$Y_{P/S}$	Regressão	0,0161	5	0,0032	7,2170	3,1059
	Resíduo	0,0054	12	0,0004		
	Total	0,0215	17			

SQ = Soma quadrática; GDL = Graus de liberdade; MQ = Média quadrática.

Os gráficos dos valores preditos versus os valores observados para produtividade e rendimento estão representados nas Figuras 9 e 10, respectivamente. A reta representa a regressão linear dos dados e deve ser uma diagonal. Pode-se observar que os valores preditos se aproximam dos valores observados para produtividade (Q_P) e, portanto, os resíduos estão bem distribuídos (Figura 9). Já para rendimento ($Y_{P/S}$), os valores observados seguem a reta de tendência, porém a variabilidade é maior em comparação ao modelo para produtividade (Figura 10).

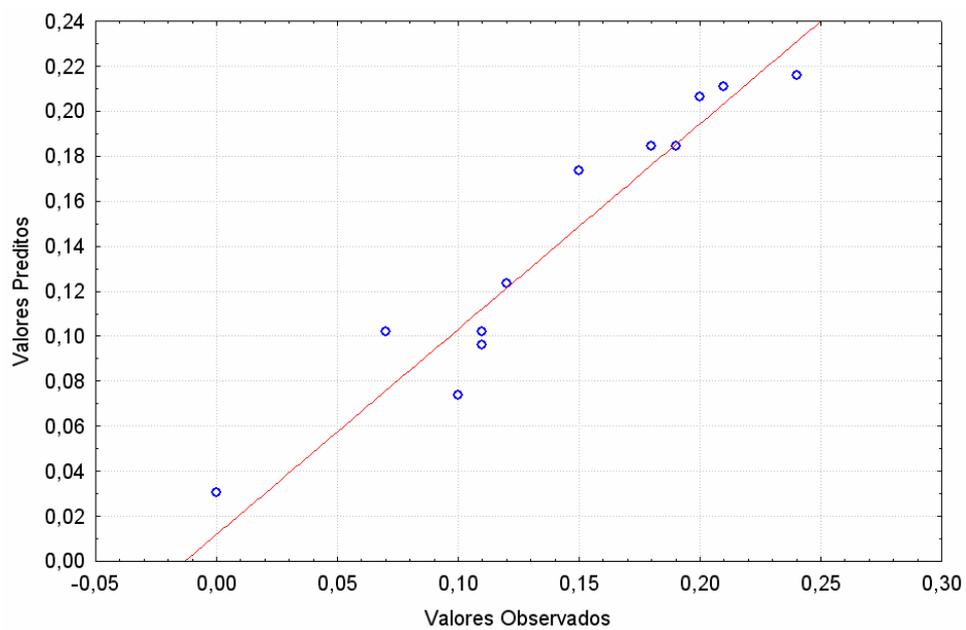


Figura 9. Valores observados versus valores preditos para produtividade em etanol (Q_P).

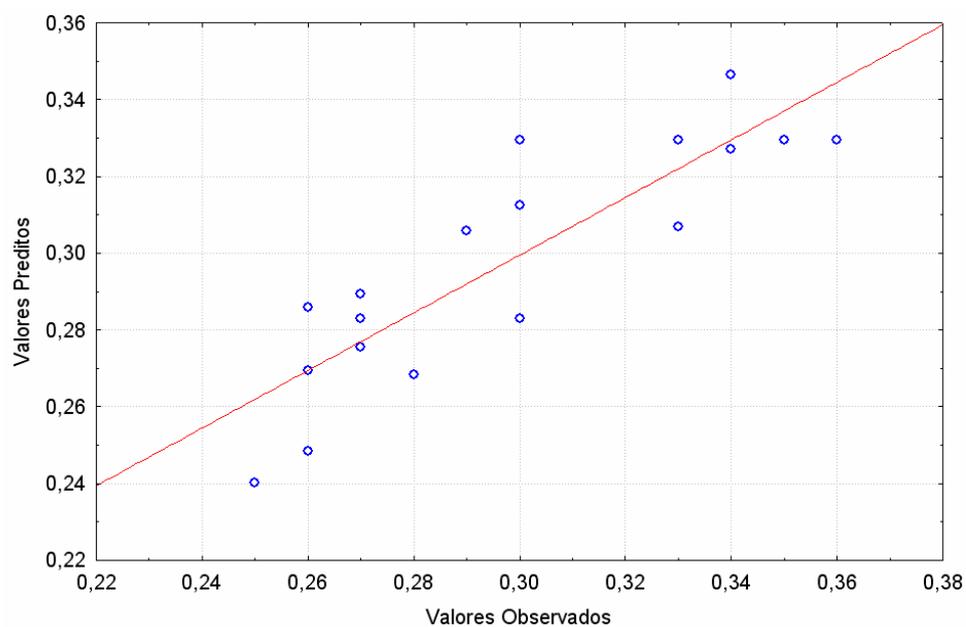


Figura 10. Valores observados versus valores preditos para rendimento em etanol ($Y_{P/S}$).

Analisando os efeitos estimados (Tabela 15), observa-se que a temperatura e o inóculo influenciaram de forma mais significativa nas respostas de produtividade e rendimento. A temperatura, tanto linear quanto quadrática, possui efeito sobre as respostas e pequenas modificações podem ter grande impacto na produção de etanol. O fator inóculo (L) foi o que teve maior efeito sobre a produtividade em etanol. Observa-se ainda há interação entre as variáveis temperatura e inóculo em relação ao rendimento em etanol.

Os resultados das análises de regressão são mostrados na Tabela 15. De acordo com os coeficientes de regressão dos efeitos significativos, propõem-se as seguintes equações para os modelos quadráticos:

$$Q_P = 0,123 - 0,007x_1^2 + 0,011x_2 + 0,024x_2^2 + 0,055x_3 \quad \text{(Eq. 5)}$$

$$Y_{P/S} = 0,329 - 0,010x_1 + 0,011x_2 - 0,025x_2^2 - 0,017x_3^2 - 0,019x_2x_3 \quad \text{(Eq. 6)}$$

Onde Q_P é produtividade em etanol ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$), $Y_{P/S}$ é rendimento em etanol (g g^{-1}) e x_1 , x_2 e x_3 são os níveis codificados de pH, temperatura e inóculo, respectivamente.

4.3.2.1. Análise dos efeitos das variáveis sobre a produtividade em etanol (Q_P)

A partir do modelo reduzido foram geradas as superfícies de resposta em relação à concentração de inóculo e pH (Figura 11) e em relação à concentração de inóculo e temperatura (Figura 12).

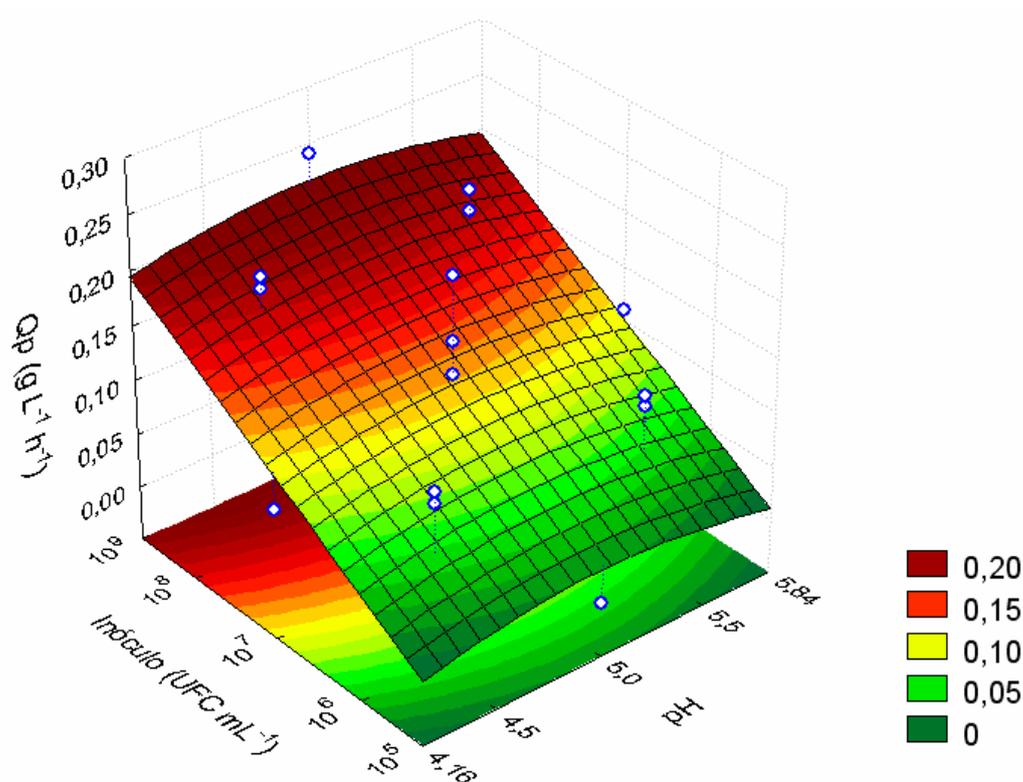


Figura 11. Superfície de resposta com as variáveis pH e Inóculo, gerada para a produtividade em etanol (Q_p) em HCS por *C. guilliermondii*.

Pode-se observar pela superfície de resposta (Figura 11) que o pH tem pouca influência na resposta dentro da faixa estudada, ou seja, a levedura tolera pH de 4,16 a 5,84 e variações entre esses valores não terão grande impacto na produtividade em etanol. A levedura apresentou melhores resultados em pH 5,0. É possível verificar ainda que maiores concentrações de inóculo aumentam a produtividade em etanol.

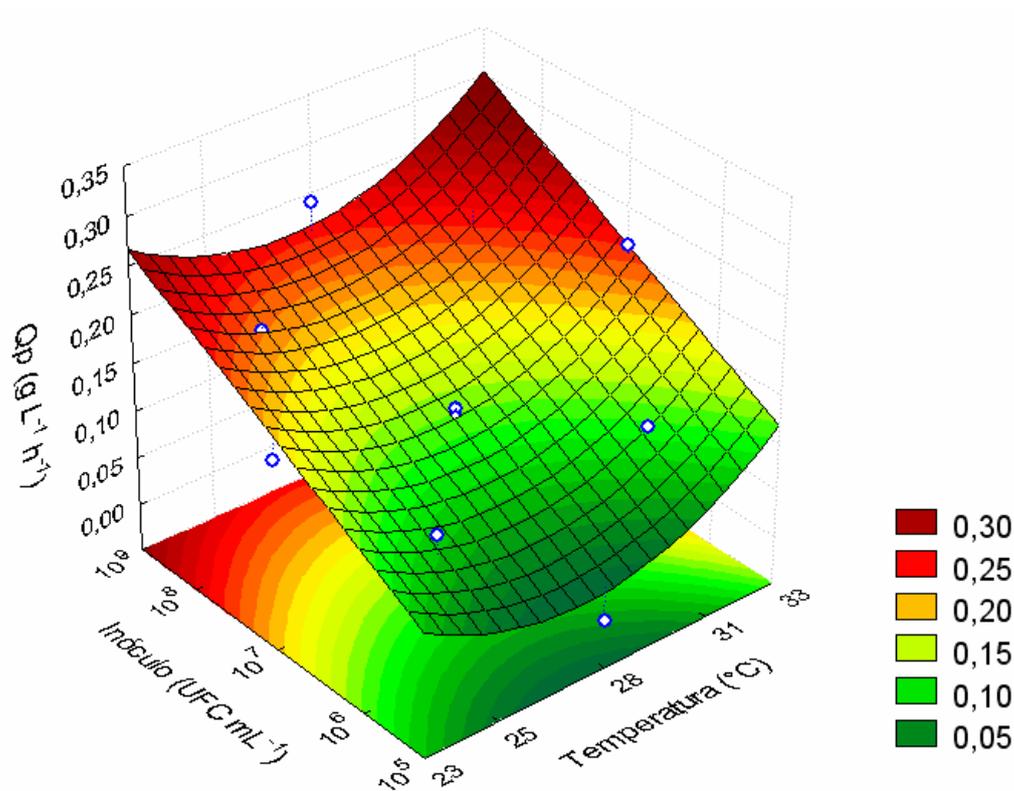


Figura 12. Superfície de resposta com as variáveis Inóculo e Temperatura, gerada para a produtividade em etanol (Q_p) em HCS por *C. guilliermondii*.

Na Figura 12 também é possível observar que maiores produtividades em etanol podem ser obtidas aumentando a quantidade de inóculo. O inóculo irá definir a velocidade de conversão de açúcares a etanol, pois altas concentrações de inóculo diminuem o tempo de fermentação. Estes resultados são consistentes com os obtidos por Laopaiboon et al. (2007), que investigaram a produção de etanol a partir de suco de sorgo sacarino por *S. cerevisiae* com concentrações de inóculo de 1×10^6 UFC mL⁻¹, 1×10^7 UFC mL⁻¹ e 1×10^8 UFC mL⁻¹. A quantidade de inóculo não afetou a concentração final de etanol, porém afetou significativamente a taxa de consumo de

substrato e produtividade em etanol, obtendo maiores produtividades com a maior concentração de inóculo.

A máxima produtividade em etanol foi obtida com a maior concentração de inóculo (1×10^9 UFC mL⁻¹) em pH 5,0 e temperatura de 28 °C. Porém, o modelo predito indica como ponto crítico um ponto fora da região estudada. Por esta razão, foi utilizado o método do caminho de ascendência máxima com o intuito de buscar novas regiões de estudo para as variáveis independentes inóculo e temperatura. O caminho de ascendência máxima é realizado sequencialmente ao longo de um caminho de ascendência na direção do máximo aumento da resposta (Montgomery, 1997).

A ascendência máxima foi determinada algebricamente a partir dos coeficientes do modelo, apresentados na Equação 5, partindo do ponto de máxima produtividade de etanol do planejamento, fixando o pH no ponto central (5,0) para a realização dos experimentos. Foi definido esse ponto de partida a fim de comparar os resultados obtidos no caminho de ascendência máxima com os resultados do planejamento fatorial e realizar a validação estatística do modelo.

O deslocamento foi feito ao longo dos eixos de temperatura (x_2) e inóculo (x_3), calculando a razão entre os valores dos coeficientes lineares de inóculo (b_3) e temperatura (b_2), adquiridos pelo modelo (Eq. 5), obtendo a seguinte equação:

$$\frac{b_3}{b_2} = \frac{0,055}{0,011} = \frac{+1}{+0,2} \quad \text{(Eq. 7)}$$

O que significa que para cada unidade avançada no eixo do inóculo (b_3) devemos avançar 0,2 unidades ao longo do eixo da temperatura (b_2) para a ascendência máxima referente à produtividade em etanol. Foram realizados ensaios até inóculo de 1×10^{10} UFC mL⁻¹, pois acima desse valor torna-se inviável o cultivo devido a quantidade demasiada de biomassa. A Tabela 17 apresenta os resultados de produtividade e rendimento em etanol ao longo da trajetória de ascendência máxima.

Tabela 17. Resultados obtidos pelo caminho de ascendência máxima em relação à produtividade (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol. Os resultados são a média de triplicatas.

Ensaio	Inóculo (UFC mL ⁻¹)	Temperatura (°C)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
1	10 ⁹	28,0	0,21	0,36
2	10 ¹⁰	28,6	0,18	0,29

O ponto de máxima resposta do planejamento composto central foi de 0,24 g L⁻¹ h⁻¹ em etanol. Já no delineamento de ascendência máxima se obteve produtividade de 0,21 g L⁻¹ h⁻¹ em etanol para os cultivos com inóculo de 10⁹ UFC mL⁻¹, enquanto que os cultivos com inóculo de 10¹⁰ UFC mL⁻¹ resultaram em produtividade de 0,18 g L⁻¹ h⁻¹ em etanol (Tabela 17). Os resultados dos ensaios com 10⁹ UFC mL⁻¹ indicam que a repetição do ponto máximo foi consistente e replicável, com diferença de apenas 12 %, validando assim o modelo proposto e comprovando que maiores concentrações de inóculo propiciam menores tempos de fermentação.

Segundo Laluce et al. (2009), curtos tempos de fermentação foram obtidos usando grandes quantidades de inóculo para iniciar a fermentação em batelada por uma cepa modificada de *S. cerevisiae*. No entanto, as condições para o crescimento e metabolismo em altas densidades celulares são menos favoráveis devido ao acesso dificultado aos nutrientes, limitações de espaço e interações celulares (Jarzebski et al., 1989). O mesmo pode estar acontecendo no presente estudo, pois comparando os resultados dos dois ensaios de ascendência máxima, há uma diminuição na resposta quando a concentração de inóculo aumenta para 10^{10} UFC mL⁻¹, possivelmente devido à competição por substrato entre as células.

Seguindo o modelo (Figura 12), a levedura obteria maiores resultados nos valores máximos e mínimos de temperatura e com maior concentração inicial de células. Este comportamento pode ser melhor explicado através do modelo proposto para rendimento em etanol.

4.3.2.2. Análise dos efeitos das variáveis sobre o rendimento em etanol ($Y_{P/S}$)

A partir do modelo reduzido foram geradas superfícies de resposta em relação ao pH e temperatura (Figura 13) e à concentração de inóculo e temperatura (Figura 14).

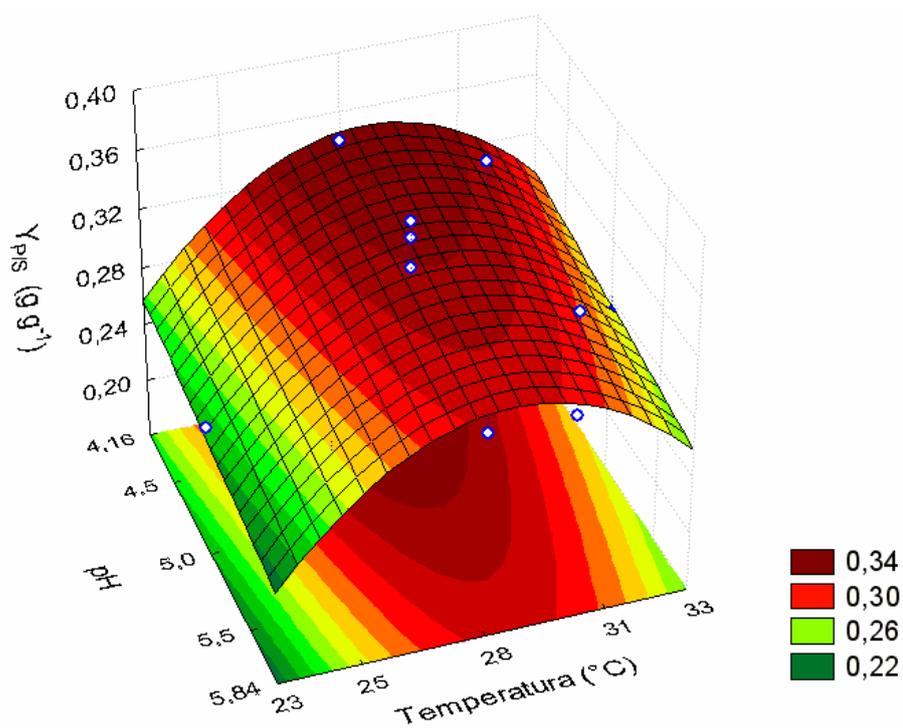


Figura 13. Superfície de resposta com as variáveis pH e temperatura ($^{\circ}\text{C}$), gerada para rendimento em etanol (g g^{-1}) em HCS por *C. guilliermondii*.

Observa-se através da Figura 13 que a faixa de maior resposta de rendimento em etanol está entre temperaturas de 27°C e 30°C e pH ácido entre 4,16 e 5,2. Aumentando ou diminuindo os valores de temperatura há uma diminuição no rendimento, havendo preferência por temperaturas mais elevadas. Estes resultados estão de acordo com o trabalho realizado por Laluce et al. (2009), que otimizou a temperatura para a produção de etanol por *S. cerevisiae* e relatou aumento da produção até uma temperatura limite de 32°C , sendo que acima dessa temperatura as concentrações de etanol diminuiram, apresentando efeito negativo sobre a viabilidade celular.

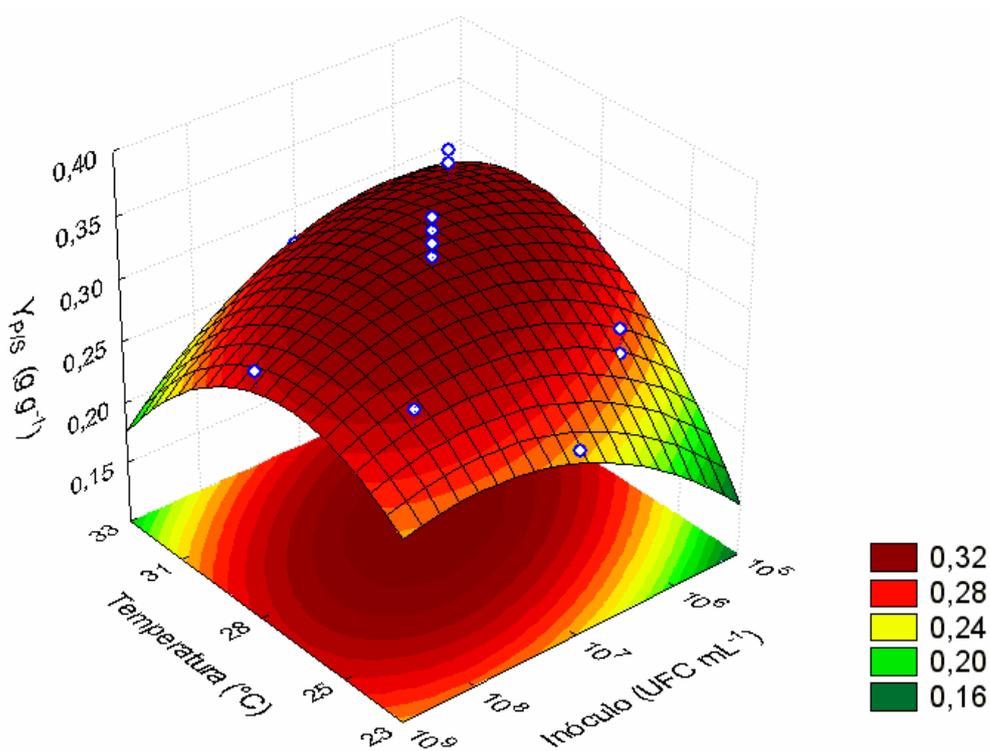


Figura 14. Superfície de resposta com as variáveis inóculo e temperatura, gerada para rendimento em etanol ($g g^{-1}$) em HCS por *C. guilliermondii*.

Na superfície apresentada na Figura 14 também é possível observar que até uma quantidade crítica, o aumento da quantidade do inóculo possui efeito positivo sobre o rendimento em etanol. No entanto, uma quantidade muito elevada de inóculo afeta negativamente a produção de etanol. A máxima produtividade em etanol foi obtida com a maior quantidade de inóculo, porém para o rendimento de conversão os maiores resultados foram obtidos na faixa de 1×10^6 UFC mL⁻¹ e 5×10^7 UFC mL⁻¹, possuindo interação com a temperatura.

O mesmo foi descrito por outros autores, como Mendonça et al. (2009) e Yamada et al. (2011), que avaliaram o efeito da concentração inicial de inóculo sobre a produção de etanol, utilizando a cepas de *S. cerevisiae*. Os

autores demonstraram que o aumento do inóculo de 5 g L⁻¹ para 15 g L⁻¹ propiciou a diminuição do tempo de fermentação (de 12 h para 7 h), porém a produção e rendimento em etanol foram reduzidos, provavelmente devido ao maior gasto energético para a manutenção das células (Mendonça et al., 2009). Yamada et al. (2011) descreveram que, embora a produtividade de etanol a partir de arroz integral ao longo de um período de 24 h foi maior para o inóculo de 20 % em comparação com o inóculo de 10 %, no entanto o rendimento em etanol obtido utilizando inóculo de 10 % foi mais elevado.

4.3.3. Cultivo em hidrolisado enzimático de casca de soja nas condições otimizadas

A casca de soja possui 39,7 % de glicose, 19,6 % de xilose e 5,9 % de arabinose, enquanto que o HCS-AE possui 41,9 % de glicose, 15,2 % de xilose e 6,4 % de arabinose, representando bem as concentrações de açúcares da casca. Foram realizados cultivos sobre esse hidrolisado objetivando a rápida conversão dos açúcares a etanol por *C. guilliermondii* BL 13, utilizando assim as condições de máxima produtividade em etanol obtido pelo planejamento composto central: 28 °C, pH 5,0 e inóculo de 1 x 10⁹ UFC mL⁻¹. Além disso, modelo para produtividade apresentou maior significância estatística e, portanto, foi escolhido.

A cinética de conversão de açúcares em produtos, resultante da fermentação em HCS-AE, está representada na Figura 15. A Tabela 18

apresenta os valores de produção máxima, produtividade e rendimento em etanol e xilitol.

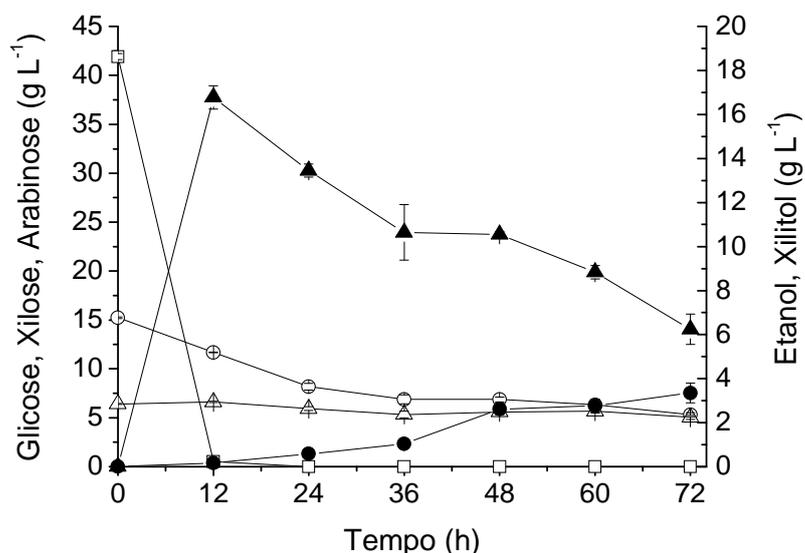


Figura 15. Cinética de consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol por *C. guilliermondii* cultivada sobre HCS-AE em agitador orbital. Glicose (□); xilose (○); arabinose (△); etanol (▲); xilitol (●). Resultados são a média de triplicatas.

Tabela 18. Resultados obtidos para produção, produtividade (Q_P), rendimento ($Y_{P/S}$) e eficiência de conversão (η) em etanol e xilitol em frascos agitados com HCS-AE.

	Produção (g L ⁻¹)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	η (%)
Etanol	16,8	1,40	0,41	80,4
Xilitol	4,15	0,05	0,46	50,2

Os cultivos com *C. guilliermondii* apresentaram alta produtividade em etanol (1,4 g L⁻¹ h⁻¹) sobre HCS-AE, consumindo toda a glicose presente no meio (41,9 g L⁻¹) em 12 h de cultivo com produção de 16,8 g L⁻¹ de etanol. O rendimento da conversão foi de 0,41 g g⁻¹, com eficiência de 80,4 % comparada com o rendimento teórico em etanol. Após a glicose ser totalmente

consumida, o etanol presente no meio começou a ser utilizado como fonte de carbono juntamente com a xilose devido à presença de oxigênio no cultivo.

Resultados semelhantes foram encontrados por Yamada et al. (2011), que cultivaram *S. cerevisiae* sobre arroz integral, obtendo produtividade em etanol de $1,8 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com inóculo de 20 % em comparação com o inóculo de 10 % ($1,2 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), apresentando rendimentos em etanol de aproximadamente 85 %.

Valores similares aos encontrados no presente estudo foram obtidos por outros autores, como Laopaiboon et al. (2007), que cultivou *S. cerevisiae* sobre suco de sorgo sacarino em concentração inicial de células otimizada de $1 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$, resultando em rendimento de $0,42 \text{ g g}^{-1}$ e produtividade de $1,67 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em etanol. Yang et al. (2011) utilizaram *Pichia stipitis* para produção de etanol a partir de espiga de milho enzimaticamente hidrolisada sem detoxicação. Os resultados experimentais em frascos agitados apresentaram rendimento em etanol de $0,45 \text{ g g}^{-1}$, correspondendo a 88 % do rendimento teórico com uma produtividade de $0,89 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Segundo Li et al. (2011), *S. cerevisiae* foi usada para produzir etanol a partir de hidrolisado enzimático de palha de milho não-detoxicado. O rendimento em etanol a partir do hidrolisado não suplementado foi de $0,47 \text{ g g}^{-1}$ com produtividade de $0,72 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. O presente trabalho apresentou menor rendimento, porém produtividade em etanol maior do que obtido pelos autores citados.

A quantidade de inóculo foi investigado por Roberto et al. (1996) quanto o seu efeito sobre a produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. O aumento da densidade de

células inicial de $0,67 \text{ g L}^{-1}$ para $2,41 \text{ g L}^{-1}$ não mostrou um efeito positivo na bioconversão, já que reduziu tanto a taxa de utilização de xilose quanto de produção de xilitol. Estes resultados estão de acordo com os encontrados no presente trabalho, em que a xilose é lentamente convertida em xilitol mesmo após toda a glicose do meio ter sido consumida (Figura 15).

De acordo com Yablochkova et al. (2004), que estudaram as interações entre volume da cultura e velocidade de agitação e mediram as taxas de transferência de oxigênio nesses sistemas, a condição utilizada no experimento pode ser classificada como microaerofilia, ou seja, há limitação de oxigênio durante o cultivo. A arabinose presente no meio não foi utilizada assim como encontrado por outros autores (Roberto et al., 1996; Schirmer-Michel et al., 2008). Este comportamento pode ser atribuído possivelmente à baixa disponibilidade de oxigênio, uma vez que uma concentração mais elevada de inóculo tende a reduzir o nível de oxigênio do meio (Roberto et al., 1996).

Inúmeras causas são atribuídas para a ineficiente incorporação das moléculas derivadas da metabolização da xilose, na rota bioquímica central, que culmina na formação de etanol. A causa mais importante consiste no desequilíbrio redox entre os co-fatores das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, o qual ocorre sob condições limitadas de oxigênio, necessárias para que o substrato seja convertido em etanol e não a biomassa. Outra causa consiste nas limitações metabólicas que ocorrem a partir da xilitol desidrogenase, incluindo a etapa de conversão de xilulose a xilulose-5-fosfato catalisada pela xiluloquinase (Walfridsson et al., 1995).

Schirmer-Michel et al. (2008) cultivou *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 utilizando hidrolisado de casca de soja e obteve produção de etanol a partir das hexoses em condições anaeróbias, sendo que a xilose não foi metabolizada na ausência de oxigênio. O mesmo comportamento foi observado por Furlan et al. (1994), cultivando *C. parapsilosis* em meio sintético (50 g L⁻¹ de xilose) em condições anaeróbias.

Sabe-se há muito tempo que muitas leveduras podem assimilar certos mono e oligossacarídeos aerobicamente, mas não por via anaeróbia. Estas leveduras são ainda capazes de fermentar a glicose, bem como um ou mais componentes desses oligossacarídeos. De acordo com Barnett (1976), a maioria das espécies de leveduras não é capaz de metabolizar xilose anaerobicamente, o qual é explicado fisiologicamente pelo efeito Kluyver (Hiroshi, 2003), o qual tem sido descrito em muitas leveduras para a utilização de galactose, maltose, rafinose, lactose, sacarose, celobiose, entre outros.

Em relação à produção de xilitol, os cultivos atingiram rendimento de 0,46 g g⁻¹ em 72 h de cultivo, representando eficiência de conversão de 50 % em relação ao rendimento teórico em xilitol. Os resultados estão de acordo com Roberto et al. (1996), que cultivou *C. guilliermondii* FTI 20037 em condições semelhantes sobre hidrolisado de palha de arroz e obteve rendimento em xilitol de 0,47 g g⁻¹ e eficiência de 51 % em 72 h de cultivo com a maior quantidade de inóculo (2,41 g L⁻¹). Os resultados confirmam que altas concentrações iniciais de células influenciam negativamente a bioconversão de pentoses a xilitol.

A tabela 19 apresenta comparações gerais dos resultados utilizando diversos tipos de biomassa e da sua fermentação a etanol.

Tabela 19. Resultados de produtividade (Q_P) e rendimento ($Y_{P/S}$) em etanol a partir de diferentes tipos de biomassa por leveduras.

Substrato	Cepa	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Referências
Amido/Sacarose				
Sorgo doce	<i>S. cerevisiae</i>	0,42	1,67	Laopaiboon et al. (2007)
Arroz integral	<i>S. cerevisiae</i>	0,43	1,2	Yamada et al. (2011)
Lignocelulose				
Casca de soja	<i>C. guilliermondii</i>	0,41	1,4	Este trabalho
Espiga de milho	<i>P. stipitis</i>	0,45	0,89	Yang et al. (2011)
Palha de milho	<i>S. cerevisiae</i>	0,47	0,72	Li et al. (2011)
Bagaço de cana de açúcar	<i>C. shehatae</i>	0,28	0,20	Chandel et al. (2013)
	<i>S. cerevisiae</i>	0,46	0,47	

No presente estudo foi possível atingir maiores produtividades em etanol a partir de casca de soja em comparação com outras biomassas lignocelulósicas, como espiga e palha de milho e bagaço de cana de açúcar (Yang et al., 2011; Li et al., 2011; Chandel et al., 2013), todos hidrolisados enzimáticos que irão originar etanol de segunda geração. Além disso, os resultados obtidos a partir de casca de soja sem suplementação podem ser comparados com as obtidas de biomassa constituída de sacarose ou amido, como o sorgo doce e arroz integral, respectivamente, e que podem ser utilizados para a produção de etanol de primeira geração (Laopaiboon et al., 2007; Yamada et al., 2011). A produtividade é equivalente ou até mesmo superior a esses substratos, com rendimento semelhante.

A levedura *C. guilliermondii* BL 13 apresentou ser promissora para a produção de etanol a partir de hidrolisado ácido-enzimático de casca de soja, com curto tempo de fermentação e alta eficiência de conversão. Sendo assim, experimentos adicionais devem ser realizados em biorreatores de cultivo submerso a fim de analisar o efeito da aeração no cultivo e atingir a máxima conversão tanto de hexoses como pentoses a etanol.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que *S. arborariae* HM19.1A tem sua produção de biomassa reduzida com a presença de alumínio (Al^{3+}) no meio, porém conserva sua capacidade de multiplicação celular até mesmo em concentrações de 201 g L^{-1} desse metal. No entanto, não tolera pressão osmótica superior a $1390 \text{ mOsm kg}^{-1}$, sendo assim uma levedura não osmofílica e de difícil aplicação prática em fermentação alcoólica de hidrolisados lignocelulósicos. Porém *S. arborariae* constitui uma fonte de genes relacionados ao metabolismo de pentoses e poderá ser aplicada em engenharia metabólica.

Quanto à *C. guilliermondii* BL 13, pode-se concluir que maiores concentrações de inóculo aos que vinham sendo utilizados pelo grupo BiotecLab (ICTA/UFRGS) contribuem para a maior produtividade em etanol a partir de HCS, atingindo a máxima produtividade com inóculo de $1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$, pH 5,0 e temperatura média de $28 \text{ }^\circ\text{C}$.

Foi estabelecido um processo eficiente de produção de etanol a partir do cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado ácido-enzimático de casca de soja com alta produtividade ($1,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em comparação com produtividades obtidas a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas, com

rendimento de $0,41 \text{ g g}^{-1}$, sem a necessidade de qualquer tratamento de desintoxicação ou suplementação nutricional. A levedura estudada foi suficientemente robusta e capaz de produzir etanol a partir de biomassa. Além disso, o resíduo lignocelulósico utilizado neste estudo apresentou ser um substrato com grande potencial para bioprocessos após tratamento com hidrólise ácida diluída e enzimática, adequado para utilização como matéria-prima para produção de bioetanol. Porém, maiores estudos necessitam ser realizados para otimizar a conversão das pentoses presentes no HCS-AE a etanol e/ou xilitol.

6. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser aplicados em biorreatores de cultivo submerso, juntamente com a avaliação de diferentes condições de aeração e agitação. Testar ainda a troca da condição de cultivo de anaerobiose para microaerofilia ou aerobiose após atingir a máxima produção de etanol, a fim de converter o restante dos açúcares do hidrolisado, xilose e arabinose, em produtos de valor agregado, como etanol e xilitol.

Considerando os investimentos em novas tecnologias para produção de biocombustíveis através de resíduos lignocelulósicos, um dos objetivos deste projeto é investir no aproveitamento total da casca de soja através da utilização da técnica de hidrólise enzimática com variadas enzimas, em combinação com os processos já desenvolvidos pelo grupo. Para que o processo de produção de combustível de segunda geração obtenha um aumento na produtividade dos processos fermentativos, é fundamental o investimento em pesquisas relacionadas aos processos de culturas com biocatalisadores imobilizados. Tais sistemas ainda dependem de otimização e poderão ser utilizados com vantagem em comparação aos modelos convencionalmente utilizados nas indústrias, como é o caso do processo em batelada com células livres.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERS, E.; LARSSON, C. A comparison of stress tolerance in YPD and industrial lignocellulose-based medium among industrial and laboratory yeast strains. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 36. p. 1085-1091. 2009.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C. Efeitos tóxicos do alumínio na fermentação do caldo com fermento TA. In: **Fermentec: Relatório de pesquisa**. Piracicaba: Fermentec, 1990. p. 38-44.

AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005. 448 p.

ANGELONI, L. H. P. **Bioacúmulo de alumínio e seus efeitos tóxicos na fermentação alcoólica em linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae***. 2009. 125 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

ARANHA, D. A. D. **Efeitos do alumínio sobre a fermentação alcoólica**. 2002. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2002.

BAMFORTH, C. W. **Food, Fermentation and Micro-organisms**. Ames: Blackwell Science Ltd, 2005. 236 p.

BARBOSA, M. F. S; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from Dxylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 3. p. 241-25. 1988.

BARNETT, J. A. The utilization of sugar by yeasts. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**. v. 32. p. 125–234. 1976.

BASSO, L. C. Fisiologia e Ecologia Microbiana. In: WORKSHOP – PRODUÇÃO DE ETANOL, I., 2006, Lorena. **Anais...** Lorena: PE, 2006. p. 7.

BENEY, L.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 56. p. 513–516. 2001.

BLOMBERG, A.; ADLER, L. Physiology of osmotolerance in fungi. **Advances in Microbial Physiology**. v. 33. p. 145–212. 1992.

CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Research**. v. 9. p. 1338–1342. 2009.

CAHILL, G.; MURRAY, D. M.; WALSH, P. K.; DONNELLY, D. Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 58. p. 14-20. 2000.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CASSMAN, K. G.; LISKA, A. J. Food and fuel for all: realistic or foolish. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. v. 1. p. 18-23. 2007.

CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. F. A.; ANJOS, V.; BELL, M. J. V.; RODRIGUES, L. N.; SINGH, O. V.; ROSA, C. A.; PAGNOCCA, F. C.; SILVA, S. S. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v. 6. p. 1-15. 2013.

CHUM, H. L.; OVEREND, R. P. Biomass and renewable fuels. **Fuel Processing Technology**. v. 71. p. 187-195. 2001.

CTBE – LABORATÓRIO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO BIOETANOL. **Bioetanol**. Disponível em: <<http://www.bioetanol.org.br>>. Acesso em: 10 set. 2012.

CUNHA-PEREIRA, F.; HICKERT, L. R.; SEHNEM, N. T.; SOUZA-CRUZ, P. B.; ROSA, C. A.; AYUB, M. A. Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 4218–4225. 2011.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; STEWART, G. G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied Environmental Microbiology**. v. 54. p. 110-114. 1988.

D'AMORE, T.; CELOTTO, G.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 11. p. 411-416. 1989.

DEVANTIER, R.; PEDERSEN, S.; OLSSON, L. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 68, p. 622-629. 2005.

ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C. F.; HAHN-HAGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 66. p. 3381-3386. 2000.

FARIA, F. P. **Alumínio: ação tóxica sobre a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e o efeito protetor do ácido cítrico e magnésio**. 2010. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2010.

FROMANGER, R.; GUILLOUET, S. E.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUVE, C.; CAMELEYRE, X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. v. 37. p. 437-445. 2010.

FURLAN, S. A.; BOUILLLOUD, P.; CASTRO, H. F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**. v. 29. p. 657-662. 1994.

GNANASAMBANDAN, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**. v. 65. p. 461-467. 1999.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 16. p. 933-943. 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**. v. 24. p. 549-556. 2006.

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

HELLE, S.; CAMERON, D.; LAM, J.; WHITE, B.; DUFF, S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 33. p. 786-792. 2003.

HICKERT, L. R. **Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras.** 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

HIROSHI, F. The Kluyver effect revisited. **FEMS Yeast Research.** v. 3. p. 327–331. 2003.

HOHMANN, S. Shaping up: the response of yeast to osmotic stress. In: Hohmann, S.; Mager, W. H. **Yeast stress responses.** R.G. Austin, Tex: Landes, 1997. p. 101-145.

HOHMANN S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 66. p. 300-372. 2002.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE: Estatística da Produção Agrícola Maio de 2011.** Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 30 out. 2012.

JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modeling of ethanol fermentation at high yeast concentrations. **Biotechnology and Bioengineering.** v. 34. p. 1225-1230. 1989.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology.** v. 27. p. 1-32. 1983.

KLEIN, C. J.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. **Microbiology.** v. 144. p. 13-24. 1998.

KLUYVER, A. J.; CUSTERS, M. T. J. The suitability of disaccharides as respiratory and assimilation substrates for yeasts which do not ferment these sugars. **Antonie van Leeuwenhoek.** v. 6. p. 121-162. 1940.

KÖTTER, P; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v. 38. p. 776-783.1993.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Review Biotechnology.** v. 13. p. 151-172. 1993.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology.** v. 35. p. 377-391. 2008.

LAFON-LAFOURCADE, S. Wine and brandy. In: REHM, H. J.; REED, G. Food and Feed Production with Microorganisms. **Biotechnology**. Verlag Chemie: Weinheim, 1983. v. 5, p. 81-163.

LALUCE, C.; TOGNOLLI, J. O.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; MORAIS, M. R. Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 83. p. 627-637. 2009.

LAOPAIBOON, L.; THANONKEO, P.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Ethanol production from sweet sorghum juice in batch and fed-batch fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 23. p. 1497-1501. 2007.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**. v. 56. p. 1-24. 1997.

LI, Y.; GAO, K.; TIAN, S.; ZHANG, S.; YANG, X. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* Y5 for ethanol production from enzymatic hydrolysate of non-detoxified steam-exploded corn stover. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 10548–10552. 2011.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotechnologia industrial. III: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 3.

LIU, H. J.; LIU, D. H.; ZHONG, J. J. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. **Process Biochemistry**. v. 41. p. 473-476. 2006.

MAGER, W. H.; VARELA, J. C. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. **Molecular Microbiology**. v. 10. p. 253-258. 1993.

MAIORELLA, B. L.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 26. p. 1155-1166. 1984.

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

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 20. p. 372-380. 2009.

MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M. E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R. P. **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. American Chemical Society, USA, 1994. p. 293-324.

MENDONÇA, J. C. M.; ANDRADE, L. A.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Contribuição ao estudo da fermentação alcoólica em altas concentrações iniciais de sacarose. In: VIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2009, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia, Minas Gerais. 2009.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. **Microbial Physiology**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 2002. 736 p.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. 4th ed. New York: Wiley, 1997. 720 p.

MORRIS, G. J.; WINTERS, L.; COULSON, G. E.; CLARKE, K. J. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**. v. 129. p. 2023-2034. 1986.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. v. 96. p. 673-686. 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. v. 93. p.1-10. 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48. p. 497-502. 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Bookman, 2010. 414 p.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**. v. 91. p. 659-664. 2009.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**. v. 74. p. 25-33. 2000.

PANCHAL, C. J.; BAST, C. J.; RUSSELL, I.; STEWART, G. G. Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 34. p. 1316-1320. 1988.

PEREIRA, F. C. **Avaliação da Capacidade de Bioconversão de Hexoses e Pentoses em Bioetanol por *Spathaspora arborariae***. 2010. 119 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PEREIRA, J. R. N.; COUTO, M. A. P. G.; SANTA ANNA, L. M. M. **Series on Biotechnology**: Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. v. 2. 47 p.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**. v. 33. p. 305–325. 1946.

PRATT, P. L.; BRYCE, J. H.; STEWART, G. G. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 109. p. 218-228. 2003.

PRIOR, B. A.; KILIAN, S. G.; DUPREEZ, J. C. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Process Biochemistry**. v. 24. p. 21-32. 1989.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**. v. 16. p. 348-350. 1996.

SANCHEZ, S.; BRAVO, V.; CASTRO, E.; MOYA, A. J.; CAMACHO, F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 77. p. 641-648. 2002.

SCHIRMER-MICHEL, Â. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. v. 84. p. 223-228. 2008.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**. v. 21. p. 141-148. 2004.

SIGLER, K.; MATOULKOVÁ, D.; DIENSTBIER, M.; GABRIEL, P. Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82. p. 1027-1035. 2009.

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**. v. 98. p. 3000-3011. 2007.

SIMS, A. P.; BARNETT, J. A. The Requirement of Oxygen for the Utilization of Maltose, Cellobiose and D-Galactose by Certain Anaerobically Fermenting Yeasts (Kluyver Effect). **Microbiology**. v. 106. p. 277-288. 1977.

SIVERS, M. V.; ZACCHI, G. A. techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**. v. 51. p. 43-52. 1995.

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

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of oxygenation on xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 56. p. 3389-3394. 1990.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; OKOS, M. R.; LADISCH, M. R. Comparative evaluation of ethanol production by xylosefermenting yeasts presented high xylose concentrations. **Biotechnology Letters**. v. 7 p. 431-436. 1985.

SMITS, G. J.; KAPTEYN, J. C.; ENDE, H. VAN DEN; KLIS, F. M. Cell wall dynamics in yeast. **Current Opinion in Microbiology**. v. 2. p. 348-352. 1999.

STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 105. p. 255-263. 2003.

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

STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. **Science**. v. 315. p. 801-804. 2007.

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

SUNDSTROM, D. W.; KLEI, H. E.; COUGHLIN, R. W.; BIEDERMAN, G. J.; BROUWER, C. A. Enzymatic hydrolysis of cellulose to glucose using immobilized β -glycosidase. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 23. p. 473-485. 1981.

TIAN, S.; ZHOU, G.; YAN, F.; YU, Y.; YANGO, X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**. v. 27. p. 656-660. 2009.

USDA – United States Department of Agriculture. Foreign Agriculture Service: Production, Supply and Distribution Online. Oilseeds. Washington, 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

VAN HOEK, P.; HULSTER, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 68. p. 517-523. 2000.

VERBELEN, P. J.; DEKONINCK, T. M.; SAERENS, S. M. G.; VAN MULDER, S. E.; THEVELEIN, J. M.; DELVAUX, F. R. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 82. p. 155-167. 2009.

VOGEL, H. C.; TODARO, C. C. **Fermentation and Biochemical Engineering Handbook: Principles, process design and equipment**. 2th ed. Westwood, New Jersey: William Andrew, 2007. 828 p.

VRIESEKOOP, F.; RASMUSSEN, M.; PAMMENT, N. B. Respective effects of sodium and chloride ions on filament formation and growth and ethanol production in *Zymomonas mobilis* fermentations. **Letters in Applied Microbiology**. v. 35. p. 27-31. 2002.

WADSKOG, I.; ADLER, L. Ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* under NaCl stress. In: HOHMAN, S.; MAGER, W. H. **Yeast stress response**. Springer-Verlag: Berlin, 2003. p. 201-240.

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

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

WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 108. p. 13212-13217. 2011.

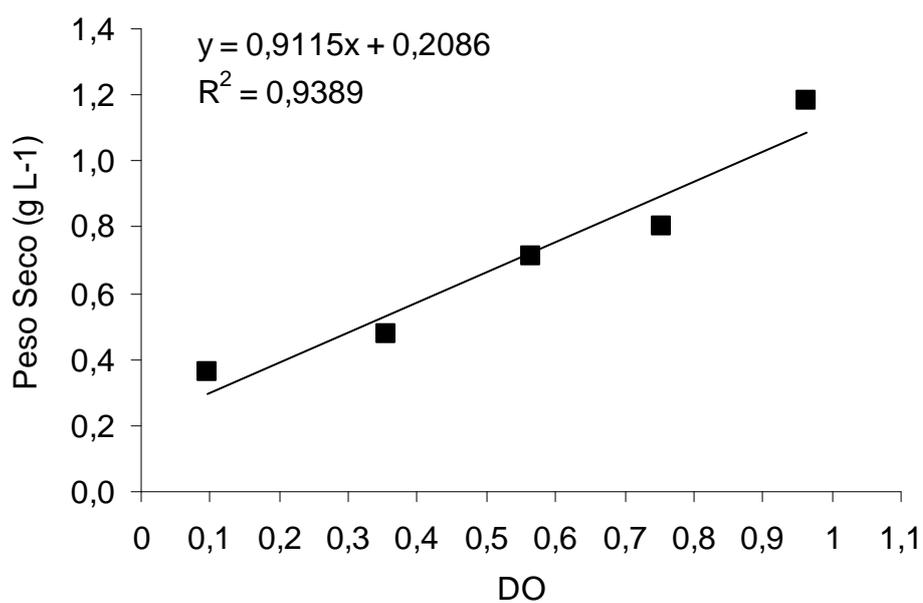
YAMADA, R.; YAMAKAWA, S. I.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct and efficient ethanol production from high-yielding rice using a *Saccharomyces cerevisiae* strain that express amylases. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 48. p. 393-396. 2011.

YANG, X.; ZHANG, S.; ZUO, Z.; MEN, X.; TIAN, S. Ethanol production from the enzymatic hydrolysis of non-detoxified steam-exploded corn stalk. **Bioresource Technology**. v. 102. p. 7840-7844. 2011.

YOO, J. **Technical and economical assessment of thermo-mechanical extrusion pretreatment for cellulosic ethanol production**. 2011. 114 f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Department of Grain Science and Industry, College of Agriculture, Kansas State University, Manhattan, 2011.

ZHANG, X. R.; SHEN, Y.; SHI, W. L.; BAO, X. M. Ethanol cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. **Bioresource Technology**. v. 101. p. 7093-7099. 2010.

APÊNDICE 1

Reta padrão de *S. arborariae*

Valores das leituras de densidade óptica (DO_{600}) em relação aos valores de concentrações de biomassa ($g L^{-1}$) através da reta padrão estabelecida com *S. arborariae*.

APÊNDICE 2

Composição dos meios de cultivo utilizados no trabalho (g L⁻¹)

HCS – Hidrolisado de Casca de Soja: xilose, 14; arabinose, 10; glicose, 3.

HCS-AE – Hidrolisado de Casca de Soja Ácido-Enzimático: glicose, 44; xilose, 15; arabinose, 6.

YM – Yeast Malt, meio sintético para pré-inóculo: glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3.

YMA – Yeast Malt Agar, meio sintético sólido para contagem de colônias: ágar, 20; glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3.

X₂₈G₈ – Meio sintético simulando a composição do HCS concentrado 4 vezes: xilose, 28; glicose, 8; peptona, 5; extrato de levedura, 3.

X₁₄A₁₀G₃ – Meio sintético simulando a composição do HCS: xilose, 14; arabinose, 10; glicose, 3; peptona, 5; extrato de levedura, 3.

APÊNDICE 3

Equações utilizadas no trabalho

$$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x_1 + b_2 \cdot x_2 + b_3 \cdot x_3 + b_{11} \cdot x_1^2 + b_{22} \cdot x_2^2 + b_{33} \cdot x_3^2 + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + b_{13} \cdot x_1 \cdot x_3 + b_{23} \cdot x_2 \cdot x_3 \quad (\text{Eq. 1})$$

$$Q_P = \frac{(C_{Pf} - C_{Pi})}{t} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$Y_{P/S} = \frac{(C_{Pf} - C_{Pi})}{(C_{Si} - C_{Sf})} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$Q_P = 0,123 - 0,007x_1^2 + 0,011x_2 + 0,024x_2^2 + 0,055x_3 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$Y_{P/S} = 0,329 - 0,010x_1 + 0,011x_2 - 0,025x_2^2 - 0,017x_3^2 - 0,019x_2x_3 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$\frac{b_3}{b_2} = \frac{0,055}{0,011} = \frac{+1}{+0,2} \quad (\text{Eq. 7})$$

C_{Pf} = concentração final de produto

C_{Pi} = concentração inicial de produto

C_{Si} = concentração inicial de substrato

C_{Sf} = concentração final de substrato

t = tempo em horas

$Y_{m\acute{a}x}$ = rendimento máximo teórico

x_1 = pH

x_2 = temperatura

x_3 = inóculo