

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

Tese de Doutorado

**Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico
de bagaço de cana de açúcar por linhagens de *Cyberlindnera*
xylosilytica e *Wickerhamomyces rabaulensis***

Fernanda Palladino Pedroso

Belo Horizonte - MG

2018

Fernanda Palladino Pedroso

**Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico
de bagaço de cana de açúcar por linhagens de *Cyberlindnera*
xylosilytica e *Wickerhamomyces rabaulensis***

Tese de Doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de
Minas Gerais
Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa

Co-Orientadora: Dra. Raquel Miranda Cadete – Departamento de Microbiologia –
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Co-Orientadora: Prof^ª. Dra. Rita de Cássia L. B. Rodrigues – Departamento de
Biotecnologia – Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo (USP)

Belo Horizonte

2018

Agradecimentos

A Deus por abrir os caminhos e estar sempre presente em minha vida. Agradeço pelo fortalecimento nos momentos difíceis, por trazer paz, sabedoria quando parecia ser impossível. Por guiar e colocar pessoas maravilhosas no caminho.

Ao Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG- pela oportunidade da realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Carlos Augusto Rosa pela oportunidade de cursar o doutorado sob sua orientação e pela confiança e amizade que contribuiu para minha formação profissional e pessoal, minha sincera gratidão.

A prof. Dra. Rita de Cássia L. B. Rodrigues que durante a caminhada esteve ao meu lado, com muita paciência, amizade e carinho, pelos ensinamentos e contribuições para minha formação e conhecimento, meu MUITO OBRIGADA.

A Dra. Raquel Cadete por todo o ensinamento, paciência e dedicação.

Aos professores do Departamento de Microbiologia, em especial ao Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca e a prof^{ta}. Dra. Simone Gonçalves dos Santos que foram pessoas essenciais para a etapa final deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório Ana Raquel, Thais e em especial ao Jamil, que sempre estiveram ao meu lado, ensinando e incentivando.

Aos colegas e amigos do laboratório em especial a Marina Moura, Carla Lara, Katharina Barros, Isabel Sabino, que mesmo nos momentos difíceis estavam do meu lado com uma palavra de conforto.

Aos funcionários do Departamento pela atenção e dedicação, em especial ao Odilon, Débora e Thiago.

Ao meu querido esposo Sinval Pedroso da Silva por todo apoio, dedicação, paciência, carinho e compreensão.

Aos meus pais Maria de Lourdes e Roberto, aos meus irmãos Angela/Marcelo e Roberto/Joelma e aos meus sobrinhos Lucas, Antonella e Miguel, pelo apoio e dedicação, que mesmo de longe estavam sempre comigo.

Aos meus “pais mineiros” Da. Aurea e Sr. Laerte, pela amor e carinho.

A minha amiga-irmã Bruna Ventura por toda a força, carinho e amizade.

Aos amigos Dr. Reginaldo Gama, Janusa Lage Silvério e Dr. João Vinicius, pela amizade e carinho.

Aos meus colegas e amigos da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), por todo apoio e amizade.

Em especial à Banca Examinadora: Dra. Inayara Cristina Alves Lacerda, Dra. Fátima de Cássia Oliveira Gomes, Dr. Luciano Gomes Fietto, Dr. Ernesto Acosta Martinez, Dr. Beatriz Martins Borelli, por terem aceitado o convite, em especial ao Dr. Luiz Henrique Rosa, relator da minha tese, por sempre estar tão disponível a ajudar.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A empresa Endress Hauser pela doação do eletrodo de oxigênio, que foi essencial para a finalização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Biomassa lignocelulósica	3
2.2 Bagaço de cana de açúcar	7
2.3 Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de biomassa lignocelulósica	9
2.3.1 Pré-tratamento	9
2.3.2 Hidrólise ácida	12
2.4 Xilitol	16
2.4.1 Características e propriedades do xilitol	16
2.4.2 Aplicações do xilitol	19
2.4.3 Produção de xilitol	21
2.5. Suplementação no meio de cultivo	29
2.6 Experimentos fatoriais	32
2.7 Ampliação de Escala	33
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Seleção das linhagens de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e de <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i> quanto à produção de xilitol em meio complexo.	37
4.1.1 Leveduras	37
4.1.2 Curva de calibração - peso seco x densidade ótica	38
4.1.3 Preparo do inóculo	38
4.1.4 Meio e Condições de cultivo	39
4.2 Estudo do efeito da suplementação na bioconversão de xilose à xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	39
4.2.1 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	39
4.2.2 Metodologia estatística: avaliação da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	40

4.2.3 Condições de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	42
4.3 Estudo do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar. ..	42
4.3.1 Metodologia estatística: avaliação do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar.....	42
4.4 – Avaliação em biorreator de bancada do desempenho da levedura que apresentou maior bioconversão de xilose em xilitol em condições previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.....	44
4.4.1 Características gerais do biorreator.....	44
4.4.2 Preparo do Inóculo e meio de cultivo	45
4.5 Métodos analíticos.....	46
4.5.1 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, etanol e xilitol.....	46
4.5.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}).	46
4.5.3 Cálculo dos parâmetros de conversão.....	47
4.6 Análises estatísticas	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 Conversão de Xilose em Xilitol em meio complexo.	49
5.2 Planejamento fatorial 2^3 para selecionar fontes de nitrogênio adequadas para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.....	53
5.3 Planejamento fatorial 2^2 para selecionar a concentração celular e o volume de meio adequadas para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. ..	64
5.4 Avaliação em biorreator de bancada do desempenho da <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.....	72
6. CONCLUSÕES.....	78
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	80
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE 1	102
APÊNDICE 2	109
APÊNDICE 3	118
APÊNDICE 4	121
APÊNDICE 5	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química percentual em termos de celulose, hemicelulose e lignina de alguns materiais lignocelulósicos.	4
Tabela 2: Frações, polímeros, composição química e enzimas que atuam na hidrólise da parede celular da cana de açúcar.	9
Tabela 3: Composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar em reator piloto obtido por hidrólise ácida.....	14
Tabela 4: Características e propriedades físico-químicas do xilitol.	17
Tabela 5: Características dos processos químicos e biológicos para a produção de xilitol. 23	
Tabela 6: Microrganismos fermentadores de xilose e produtores de xilitol.	24 23
Tabela 7: Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p) de leveduras comumente estudadas quanto à produção de xilitol a partir de resíduos agroalimentares.	25 24
Tabela 8: Composição do Farelo de arroz.....	31
Tabela 9: Linhagens de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e de <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i> utilizadas no estudo da produção de xilitol em meio complexo contendo xilose (YPX).	37
Tabela 10: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo para suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.	41
Tabela 11: Planejamento fatorial 2^3 , com quatro repetições no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado na produção de xilitol pelas leveduras <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	41
Tabela 12: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo para avaliação do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar.	43
Tabela 13: Planejamento fatorial 2^2 , com quatro repetições no ponto central, para a avaliação do efeito do volume de meio e da concentração celular do hidrolisado na produção de xilitol pelas leveduras <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	43
Tabela 14: Variações da vazão de ar e frequência de agitação e seus respectivos valores de kLa	45
Tabela 15: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL^{-1} de xilose, inóculo de $0,5 \text{ gL}^{-1}$, em 48 hs de cultivo das linhagens de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	50

Tabela 16: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL ⁻¹ de xilose, inóculo de 0,5 gL ⁻¹ , em 72 hs de cultivo, das linhagens de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> e <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	51
Tabela 17: Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2 ³ com 4 repetições no ponto central para os três fatores (X ₁ , X ₂ e X ₃) e respostas para cada levedura (Y ₁ , Y ₂ , Y ₃ e Y ₄) no tempo de 72h.	55
Tabela 18: Estimativas dos efeitos dos fatores e interações para a produção de xilitol (gL ⁻¹) pelas leveduras UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747 (<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>), UFMG-CM-Y309, UFMG-CM-Y409 (<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>).	56
Tabela 19: Coeficientes de regressão para a resposta produção de xilitol pelas linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	58
Tabela 20: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-Y309- <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> seguindo um planejamento fatorial 2 ³ com 4 repetições no ponto central.	59
Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-Y409 de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> seguindo um planejamento fatorial 2 ³ com 4 repetições no ponto central.	60
Tabela 22: Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2 ² com 4 repetições no ponto central para a avaliação do efeito do volume de meio (V*) e concentração celular (C*) para a produção de xilitol pelas leveduras <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	65
Tabela 23: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-309 <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> seguindo um planejamento fatorial 2 ² com 4 repetições no ponto central, no tempo de 96 hs.	69
Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-409 <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> seguindo um planejamento fatorial 2 ² com 4 repetições no ponto central, no tempo de 120 h.	69
Tabela 25: Coeficientes de regressão para a resposta produção de xilitol pelas linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	70
Tabela 26: Parâmetros fermentativos para o cultivo de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.	74

Tabela 27: Parâmetros fermentativos do cultivo de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> para a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.	76
Tabela 28: Média dos Parâmetros fermentativos utilizando 0,5 gL ⁻¹ de biomassa inicial e 60gL ⁻¹ de xilose – <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	103
Tabela 29: Média dos Parâmetros fermentativos utilizando 0,5 gL ⁻¹ de biomassa inicial e 60gL ⁻¹ de xilose – <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	105
Tabela 30: Teste de Tukey para Produtividade em 48 hs.....	110
Tabela 31: Teste de Tukey de conversão de Xilose em Xilitol em 48 hs.	112
Tabela 32: Teste de Tukey de Produtividade em 72 hs.....	114
Tabela 33: Teste de Tuckey de conversão de Xilose em Xilitol em 72 hs.....	116
Tabela 34: Dados de cultivo para o tempo de 72 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.....	118
Tabela 35: Dados fermentativos para o tempo de 96 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.....	119
Tabela 36: Dados fermentativos para o tempo de 120 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico.....	120
Tabela 37: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL ⁻¹ de xilose, inóculo de 1,0 gL ⁻¹ , em cultivo da linhagem de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y309).....	121

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica.	3
Figura 2: Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal.....	6
Figura 3: Produção de cana de açúcar em milhões de toneladas por regiões do Brasil na safra 2017/2018.	7
Figura 4: Composição da biomassa lignocelulósica do bagaço de cana de açúcar.....	8
Figura 5: Esquema do fracionamento dos principais componentes da biomassa lignocelulósica no processo de pré-tratamento.....	10
Figura 6: Precursores dos inibidores microbianos que podem ser formados durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos.	13
Figura 7: Modelo molecular do xilitol – Software ACD/Chemsketch – vs. 4.55.....	16
Figura 8: Exemplos de produtos formulados a base de xilitol.	19
Figura 9: Esquema simplificado do metabolismo de xilose por leveduras.	27
Figura 10: Ilustração do biorreator – Biostat A - Sartorius.....	44
Figura 11: Interações dos fatores significativos na resposta produção de xilitol para as linhagens leveduras UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	62
Figura 12: Superfície de resposta para a produção de xilitol (gL^{-1}) pelas linhagens UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	63
Figura 13: Perfis de xilose (-■-), xilitol (-●-) e biomassa celular (--▲--) em cultivo com <i>C. xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar com diferentes concentrações celulares e disponibilidade inicial de oxigênio: (A) 1gL^{-1} e 25 mL; (B) 1gL^{-1} e 75 mL; (C) 10gL^{-1} e 25 mL; (D) 10gL^{-1} e 75 mL.	67
Figura 14: Perfis de xilose (-■-), xilitol (-●-) e biomassa celular (--▲--) em cultivo com <i>C. xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y409) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar com diferentes concentrações celulares e disponibilidade inicial de oxigênio: (A) 1gL^{-1} e 25 mL; (B) 1gL^{-1} e 75 mL; (C) 10gL^{-1} e 25 mL; (D) 10gL^{-1} e 75 mL.	67
Figura 15: Superfície de resposta para a produção de xilitol (gL^{-1}) pelas linhagens UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	71
Figura 16: Consumo de ácido acético no biorreator (-●- $\text{kLa } 21,60\text{h}^{-1}$, --●-- $\text{kLa } 35,64\text{h}^{-1}$), pH (-■- $\text{kLa } 21,60\text{h}^{-1}$, --■-- $\text{kLa } 35,64\text{h}^{-1}$) e concentração celular (-▲- $\text{kLa } 21,60\text{h}^{-1}$, --▲-- $35,64\text{h}^{-1}$) por <i>Cyberlindnera xylosilytica</i> (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar em biorreator.	75

RESUMO

PALLADINO, F. **Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis***. 2018. 170f. Tese (Doutorado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2018.

No Brasil, o setor agroindustrial gera subprodutos, como o bagaço de cana, que após ser processado despertam grande interesse econômico e social. O bagaço de cana é um material lignocelulósico que após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído pode liberar de sua fração hemicelulósica açúcares fermentescíveis, como a D-xilose que pode ser bioconvertida a xilitol, produto de elevado valor agregado com uso farmacêutico e alimentício. *Candida tropicalis* é a espécie mais estudada nesta bioconversão por produzir o xilitol como principal produto do metabolismo de xilose. No entanto, o isolamento e obtenção de novas linhagens ou espécies de leveduras produtoras de xilitol têm recebido destaque nos últimos anos. Neste contexto, este trabalho propôs investigar a produção de xilitol por leveduras das espécies *Cyberlindnera xylosilytica* (cinco linhagens) e *Wickerhamomyces rabaulensis* (onze linhagens) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (HHBC). Inicialmente, selecionou-se as melhores produtoras de xilitol em cultivos conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio complexo YPX (D-xilose 60 gL⁻¹, peptona 20 gL⁻¹, extrato de levedura 10 gL⁻¹). As melhores produtoras de xilitol foram *Cyberlindnera xylosilytica*: UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409; e *Wickerhamomyces rabaulensis*: UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747. Estas leveduras foram selecionadas para cultivos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio HHBC, em que foi avaliado a influência da suplementação na produção de xilitol usando planejamento fatorial 2³ completo (fatores estudados e seus níveis: sulfato de amônio (0-2 gL⁻¹), extrato de farelo de arroz (5-10 gL⁻¹) e extrato de levedura (1-2 gL⁻¹)). As linhagens *C. xylosilytica*, UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, foram as melhores produtoras de xilitol em cultivos suplementados com uma fonte alternativa de nitrogênio (extrato de farelo de arroz, 10 gL⁻¹) e pela redução da fonte de nitrogênio mais cara (extrato de levedura, 1 gL⁻¹). Neste caso, a *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-409 apresentou maior valor na produção de xilitol (14,06 gL⁻¹; Y_{p/s}=0,63 gg⁻¹; Q_p = 0,20 gL⁻¹h⁻¹). Na sequência, foram realizados cultivos com as duas linhagens de *C. xylosilytica* para avaliar a influência da concentração de inóculo e disponibilidade de oxigênio em frascos Erlenmeyers de 125 mL variando volume de HHBC (25, 50 ou 75 mL) com uso de um planejamento fatorial 2² completo. A linhagem UFMG-CM-Y309 apresentou máxima produção de xilitol (22,13 gL⁻¹, Y_{p/s}=0,75 gg⁻¹ e Q_p= 0,18 gL⁻¹h⁻¹) com o uso de 1,0 gL⁻¹ de inóculo e 25 mL de meio HHBC e foi selecionada para cultivos em biorreator de bancada (2L). Foi avaliada em biorreator de bancada o desempenho da *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em condições previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar e constatou-se que em condição de menor transferência de oxigênio (k_{LA} de 21,60 h⁻¹) a produção em xilitol foi similar aos ensaios em frascos Erlenmeyers. A condução do processo em menor transferência de oxigênio favoreceu a manutenção da velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_x = 0,050 h⁻¹) em níveis mais baixos do que na condição de maior transferência de oxigênio dissolvido no meio (k_{LA} de 35,60 h⁻¹) e com isso favoreceu-se a produção de xilitol (19,56 g/L) por *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em biorreator de bancada.

Palavras-chave: *Cyberlindnera xylosilytica*; *Wickerhamomyces rabaulensis*; hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar; xilitol; biorreator.

ABSTRACT

PALLADINO, F. Evaluation of xylitol production in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis* strains. 2018. 170f. Thesis (Doctorate in Microbiology). Federal University of Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte, 2018.

In Brazil the agroindustrial sector generates byproducts, such as sugarcane bagasse which after correct processing and destination arouse great economic and social interest. The sugarcane is a lignocellulosic material, which after pretreatment with dilute sulfuric acid, can release fermentable sugars from its hemicellulosic fraction, such as D-xylose that can be bioconverted to xylitol, a high added value product with pharmaceutical and food use. *Candida tropicalis* is the most studied species in this bioconversion for producing xylitol as the main product of xylose metabolism. However, the isolation and obtaining of new xylitol-producing strains or species have been highlighted in recent years. In this context, this work proposes the investigation of xylitol production by strains of the yeast species *Cyberlindnera xylosilytica* (five strains) and *Wickerhamomyces rabaulensis* (eleven strains) using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (HHBC). Initially, the best xylitol producers were cultured in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of complex medium YPX (D-xylose 60 gL⁻¹, 20 gL⁻¹ peptone, 10 gL⁻¹ yeast extract). The best producers of xylitol were *Cyberlindnera xylosilytica*: UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409, and *Wickerhamomyces rabaulensis*: UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747). These yeasts were selected for cultures in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of HHBC medium, in which carried out the influence of supplementation in the xylitol production using complete factorial design (factors studied and their levels: ammonium sulphate (0 -2 gL⁻¹), rice bran extract (5-10 gL⁻¹), and yeast extract (1-2 gL⁻¹). *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-309 and UFMG-CM-Y-409 strains were the best xylitol producers in cultures supplemented with an alternative source of nitrogen (rice bran extract, 10 gL⁻¹) and for the reduction of the more expensive nitrogen source (yeast extract, 1.0 gL⁻¹). In this case, *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-409 stands out as the largest producer of xylitol (P 14.06 gL⁻¹, Y_{p/s} 0.63 gg⁻¹, Q_p 0.20 gL⁻¹h⁻¹). Afterwards, cultures were carried out with two strains *C. xylosilytica* to evaluate the influence cell concentrations and oxygen availability in 125 mL Erlenmeyer flasks varying HHBC volume (25, 50 or 75 mL) using complete factorial design 2². The strain UFMG-CM-Y309 showed maximum yield of xylitol (22.13 gL⁻¹, Y_{p/s} 0.75 g/g⁻¹ and Q_p 0.18 gL⁻¹h⁻¹) with the use of 1.0 gL⁻¹ of inoculum and 25 mL of HHBC medium and was selected for cultures in bench bioreactor (2L). The performance of *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) under pre-selected conditions in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate was evaluated in bench bioreactor and it was found that under conditions of lower oxygen transfer (k_{La} 21.60 h⁻¹) the production of xylitol was similar to the assays in Erlenmeyer flasks. The conduction of the process in lower oxygen transfer favored the maintenance of the maximum specific rate of cell growth (μ_x = 0.050 h⁻¹) at lower levels, than in condition of greater oxygen transfer dissolved in the medium (k_{La} of 35.60 h⁻¹) and with this, the production of xylitol (19.56 gL⁻¹) by *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) in a bench bioreactor was favored.

Keywords: *Cyberlindnera xylosilytica*; *Wickerhamomyces rabaulensis*; sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate; xylitol; bioreactor.

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os materiais lignocelulósicos, subprodutos florestais e agroindustriais, representam a maior e mais barata fonte de matéria orgânica da biosfera. A correta destinação destes resíduos no meio ambiente é um grande problema devido às dificuldades observadas nos processos de reciclagem e reaproveitamento destes materiais. A constituição rica em carboidratos permite que tais subprodutos sejam fontes de açúcares que podem servir como matéria prima em processos biológicos para a produção de produtos com alto valor comercial. Isto tem contribuído para intensificar a busca pelo desenvolvimento de tecnologias capazes de gerar tais produtos a partir destes resíduos, contribuindo-se para um correto processamento dos mesmos.

Para o aproveitamento dos subprodutos lignocelulósicos da biomassa vegetal em processos de bioconversão, é necessária a hidrólise dos principais componentes da lignocelulose, as frações celulósica e hemicelulósica. A hidrólise ácida é um método empregado como forma de obtenção de hidrolisados hemicelulósicos para a utilização em diferentes bioprocessos. Hidrolisados hemicelulósicos são ricos em pentoses, tendo como destaque a xilose, a principal matéria prima para a produção do xilitol, o qual consiste em um poliálcool utilizado nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica, classificado como adoçante capaz de substituir a sacarose. É um produto tolerado por diabéticos e tem muitas aplicações clínicas, como no tratamento da osteoporose, pacientes com fibrose cística, doenças respiratórias, otites, tratamento de vaginoses e propriedades anti-cariogênicas. O xilitol é atualmente produzido em escala industrial a partir de processo químico por meio da hidrogenação catalítica da xilose pura obtida por meio da hidrólise de materiais lignocelulósicos. Entretanto, a produção de xilitol por via química depende do rendimento do processo, da pureza da solução inicial de xilose, da purificação para remoção de resíduos do catalisador e de subprodutos gerados durante o processo de hidrogenação o que resulta no aumento de tempo e custo de processamento. O desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para a produção de xilitol vem sendo estudado em conjunto devido à preocupação com o uso sustentável de recursos naturais. Um dos processos mais atrativos atualmente é a via biotecnológica de produção, utilizando-se microrganismos, que apresenta vantagens em relação à via química como o uso de condições mais brandas de pressão e temperatura e a não necessidade de se utilizar a xilose pura para a conversão, uma vez que estes são capazes de converter diretamente a

xilose, presente em hidrolisados hemicelulósicos, em xilitol. Entre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol, *Candida tropicalis* e *Meyerozyma (Candida)* são as espécies mais estudadas, porém novos estudos têm direcionado a atenção para a avaliação de outras espécies de leveduras como potenciais produtoras de xilitol, tais como linhagens dos gêneros *Cyberlindnera*, *Wickerhamomyces*, *Scheffersomyces* e *Spathaspora*.

À partir do contexto apresentado, este trabalho propôs a obtenção de xilitol à partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por linhagens das espécies *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. Para isso, foram realizados cultivos em meio de cultura contendo xilose como única fonte de carbono, utilizando-se cinco linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e onze linhagens *Wickerhamomyces rabaulensis* para selecionar as melhores produtoras de xilitol. Em seguida foram realizados cultivos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar com as linhagens selecionadas para avaliação da influência da suplementação de nutrientes na obtenção de xilitol, utilizando-se um planejamento fatorial 2^3 , com o objetivo de selecionar a melhor suplementação para esta produção. Após esta seleção, foram realizados ensaios de cultivo variando-se disponibilidade de oxigênio e concentração celular, utilizando-se a melhor suplementação e as melhores linhagens de levedura, determinadas na etapa anterior, com a finalidade de se otimizar a obtenção de xilitol. Após avaliação de tais variáveis, empregou-se as melhores condições e levedura em biorreator de bancada. Este trabalho apresenta potencial para a proposta de novas linhagens de leveduras para emprego em processos biotecnológicos de produção de xilitol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomassa lignocelulósica

Os maiores recursos biológicos renováveis do planeta são os subprodutos lignocelulósicos. A população humana produz milhões de toneladas de subprodutos agroindustriais anualmente. Estes recursos são materiais orgânicos, e representam aproximadamente 50% da biomassa vegetal, sendo representados por subprodutos florestais, agrícolas, plantas aquáticas, gramíneas e outros (CHANDEL et al., 2011). A produção anual destes materiais é estimada em 10 a 50 x 10⁹ toneladas (CHANDEL et al., 2010).

Os materiais lignocelulósicos são considerados grandes fontes de compostos orgânicos e apresentam amplo potencial como matéria prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (U.S. DEPARTMENT, 2009; PANESAR et al., 2015). A biomassa lignocelulósica é formada por três frações orgânicas principais a celulose (35-50%), a hemicelulose (20-35%) e a lignina (10-25%), sendo que cada tipo de material lignocelulósico apresenta concentrações diferenciadas desses três componentes em sua estrutura (GÍRIO et al., 2010; OJEDA et al., 2011; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016), como indicado na Tabela 1. Um diagrama representativo da estrutura da biomassa lignocelulósica está apresentado na Figura 1.

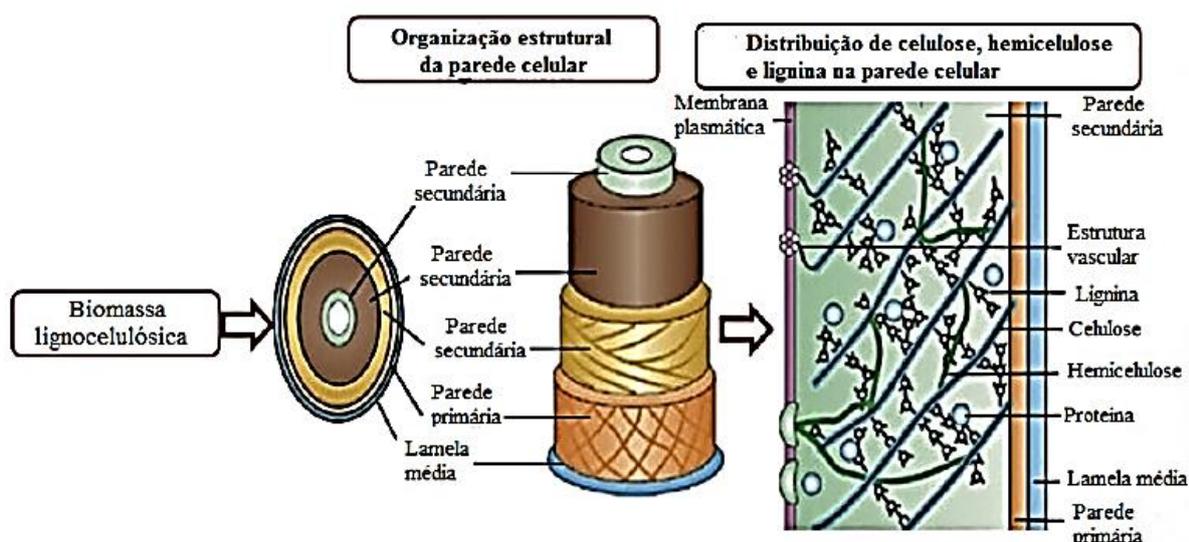


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da biomassa lignocelulósica. (VASCONCELOS, 2012).

Tabela 1: Composição química percentual em termos de celulose, hemicelulose e lignina de alguns materiais lignocelulósicos.

Resíduos Lignocelulósicos	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referências
Algodão	95,00	2,00	0,30	GÓMEZ et al., 2010
Aparas de eucalipto	40,20	15,67	26,90	CANETTIERI; et al., 2002
Bagaço de cana de açúcar	32-48,00	19-24,00	23-32,00	RAJ et al., 2015
Casca de arroz	32,40	13,90	27,80	RAJ et al., 2015
Casca de aveia	29,26	28,35	22,22	TAMANINI; OLIVEIRA, 2004
Casca de nozes	25-30,00	25-30,00	30-40,00	HOWARD et al. 2003
Espiga de milho	45,00	35,00	15,00	GÓMEZ et al., 2010
Farelo de cevada	23,00	32,70	24,40	CRUZ et al., 2000
Fibra de bananeira	60-65,00	6-8,00	5-10,00	GÓMEZ et al., 2010
Fibra de coco	36-43,00	0,15-0,25	41-45,00	GÓMEZ et al., 2010
Folhas de milho	37,60	34,50	12,60	CRUZ et al., 2000
Madeira dura	43-47,00	25-35,00	16-24,00	GÓMEZ et al., 2010
Madeira mole	40-44,00	25-29,00	25-31,00	GÓMEZ et al., 2010
Palha de arroz	43,30	26,40	16,30	GÓMEZ et al., 2010
Palha de cevada	31-45,00	27-38,00	14-19,00	GÓMEZ et al., 2010
Palha de cana de açúcar	31,70	27,00	31,10	HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016
Palha de colza	31,50	17,40	16,20	LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018
Palha de sorgo	34,00	44,00	20,00	HERRERA et al, 2004
Palha de trigo	30,00	50,00	15,00	GÓMEZ et al., 2010
Polpa de café	35,00	46,30	18,80	FREITAS, 2016
Sabugo de milho	35,96	36,32	16,88	LOPES, 2015
Sizal	73,10	14,20	11,00	GÓMEZ et al., 2010
Talo de milho	35,00	25,00	35,00	GÓMEZ et al., 2010

A celulose é o polímero natural de maior ocorrência no mundo e um dos principais constituintes da parede celular dos vegetais (LEHNINGER, 2006). Representa cerca de 23% - 50% da matéria seca da biomassa lignocelulósica, é um polímero linear que contém até 15.000 unidades de β -D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 carbono-carbono e por ligações de hidrogênio intramoleculares, o que ajuda na manutenção da rigidez da cadeia e das ligações intermoleculares (ARANTES; SADDLER, 2010). Duas regiões distintas são visualizadas na molécula: a região cristalina, que apresenta moléculas altamente orientadas e resistência à degradação microbiana, alta resistência à tensão e insolubilidade a um grande número de solventes; e a região amorfa, na qual há menor orientação entre as moléculas, portanto é mais facilmente hidrolisada (FENGEL; WEGENER, 1989; CANILHA et al., 2010). Por sua vez, a fração hemicelulósica consiste

em 15% - 45% do material lignocelulósico seco, sendo o segundo grande componente da biomassa vegetal e também considerado o segundo polissacarídeo mais abundante do mundo (COLLINS et al., 2005). A hemicelulose é composta por cadeias ramificadas de açúcares, cujas unidades incluem hexoses e pentoses com curtas ramificações tais como D-xilose, D-glicose, L-arabinose e D-galactose (KOOTSTRA et al., 2009, GÍRIO et al., 2010). Existem classes de hemiceluloses, nomeadas de acordo com seus constituintes principais, como xilana (homopolímero de D-xilose), xiloglucana (heteropolímero de D-xilose e D-glicose), glucomanana (heteropolímero de D-glicose e D-manose), galactoglucomanana (heteropolímero de D-galactose, D-glicose e D-manose) e arabinogalactana (heteropolímero de D-galactose e L-arabinose) (SHALLOM e SHOHAM, 2003; HAMELINCK et al., 2005). A fração hemicelulósica é facilmente hidrolisada quando comparada à celulose devido à sua composição heterogeneidade e por apresentar estrutura amorfa (JEFFRIES, 1983; SUN; CHENG, 2005), o que permite a liberação relativamente fácil dos seus açúcares constituintes para a produção de diferentes produtos de interesse, como xilitol (SARROUH et al., 2009; HÉRNANDEZ-PÉREZ et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018), etanol, butanol, isopropanol, 2-3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico (SCHUCHARDT et al., 2001, ARRUDA et al., 2011, FERREIRA et al., 2011). Já a lignina é uma macromolécula polifenólica tendo em sua estrutura química 3 metoxi-4-hidroxi-fenilpropano e 4-hidroxi-fenilpropano, representando de 10% - 30% do material lignocelulósico. A lignina é um dos principais componentes dos tecidos de gimnospermas e angiospermas, ocorrendo em tecidos vegetais vasculares. Esta macromolécula apresenta um papel importante no transporte de água, nutrientes e metabólitos, sendo responsável pela resistência mecânica dos vegetais, resistência contra o ataque microbiano e ao estresse oxidativo (FENGEL; WEGENER, 1989; LEMOS, 2001). A degradação deste composto por meio de processos de hidrólise libera compostos fenólicos, álcoois aromáticos e aldeídos, caracterizados como inibidores do metabolismo microbiano (ZALDIVAR et al., 2000; GÍRIO et al., 2010). A lignina é relevante como fonte potencial de tais inibidores, apesar de não contribuir como fonte de carbono fermentável. Além disso, ela pode estar covalentemente ligada às hemiceluloses via ligações éster, conferindo à estrutura da parede celular uma maior solidez e resistência (GRAY et al., 2006). A Figura 2 apresenta as estruturas das principais unidades presentes na parede vegetal da biomassa.

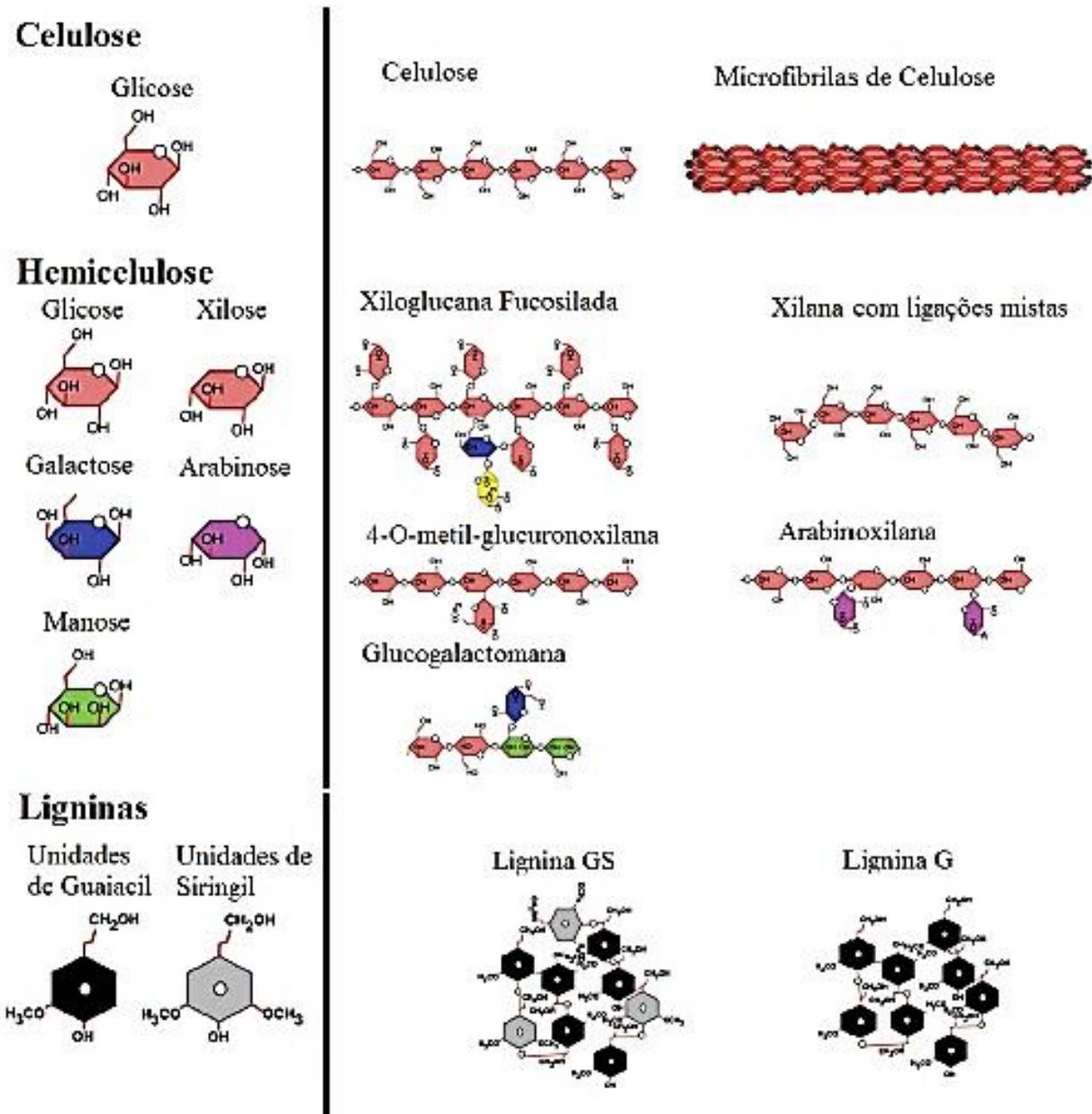


Figura 2: Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal (SAKAR et al., 2009; XAVIER, 2016).

Dentre os subprodutos agrícolas disponíveis, destaca-se no Brasil, o bagaço de cana de açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo e o cavaco de eucalipto, que são abundantes em diversas regiões do país (DAGNINO et al., 2013; MARTINI et al., 2016; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; DUSSÁN et al., 2016; ARRUDA et al., 2017; KUMAR et al., 2018) incluindo também os subprodutos florestais (subprodutos de madeira, serragem), assim como culturas energéticas lenhosas (salgueiro, álamo, gramas), e subprodutos sólidos industriais e municipais (resíduos da indústria de papel, jornal reciclado, papel descartado) (SATHITSUKSANO et al., 2010; TALEBNIA et al., 2010; NUNES et al., 2013).

2.2 Bagaço de cana de açúcar

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção total de cana de açúcar na safra 2017/2018 é estimada em 633,26 mil toneladas, com destaque para a região sudeste (Figura 3), que é uma das maiores produtoras deste insumo (CONAB, 2018). Na safra 2015/16, a produção de cana-de-açúcar foi 658,7 mil toneladas (CONAB, 2016), deste montante foram gerados 166,40 milhões de toneladas de bagaço de cana de açúcar no País. O Estado de São Paulo respondeu por 55,2% dessa produção (INSTITUTO DE ECONOMIA AGRÍCOLA, 2017).

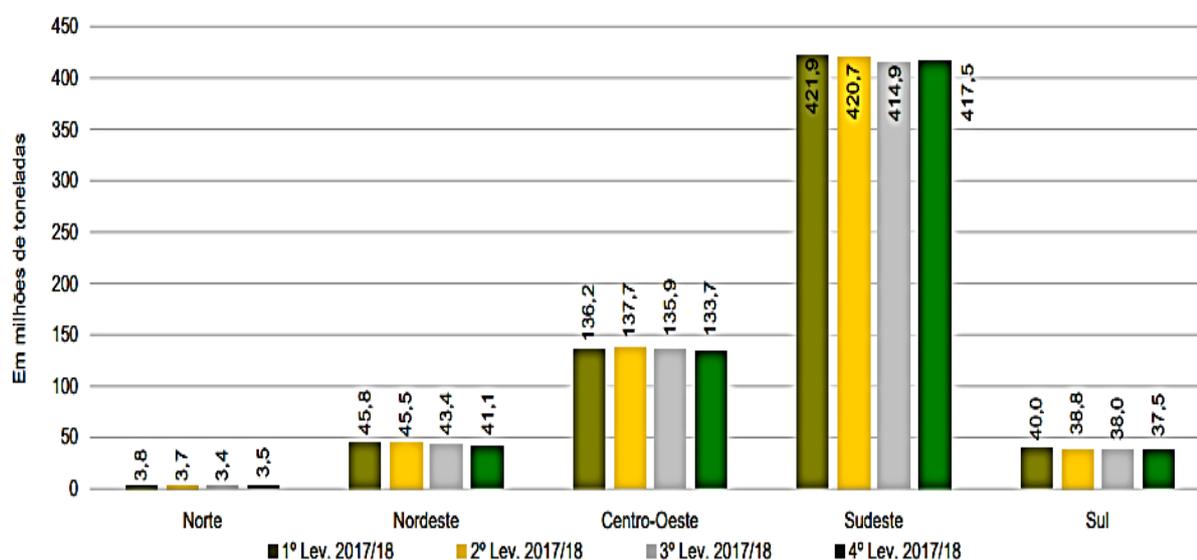


Figura 3: Produção de cana de açúcar em milhões de toneladas por regiões do Brasil na safra 2017/2018. (CONAB, 2018).

O bagaço de cana de açúcar, um importante subproduto da indústria sucroalcooleira, é resultante do processo de extração do caldo da cana de açúcar, sendo constituído de três frações: material fibroso (45%), água (51-49%) e sólidos não solúveis (2-3%); apresenta em sua composição 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000; AREA et al., 2012; VALLEJOS et al., 2012). (Figura 4).

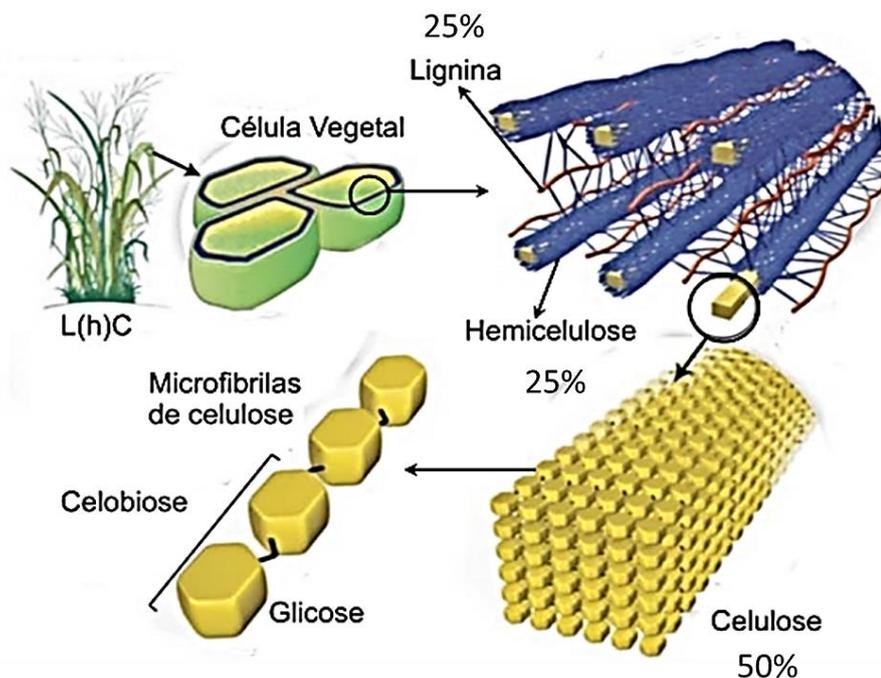


Figura 4: Composição da biomassa lignocelulósica do bagaço de cana de açúcar. (Adaptado SANTOS et al., 2012).

Como é considerado um subproduto, praticamente não tem custo de produção ou transporte, e muitas vezes é utilizado como uma alternativa ao combustível fóssil e à madeira, pois quando queimado gera vapor e energia elétrica permitindo a autossuficiência energética das unidades produtoras, e, em algumas, a comercialização da energia elétrica excedente (MATSUOKA et al., 2012). Além disso, o bagaço de cana de açúcar tem sido empregado como matéria prima para a indústria de papel e papelão, fabricação de aglomerados, ou ainda como material alternativo na construção civil, como ração animal, substrato para a produção de biomassa microbiana, em revestimentos acústicos, forragem para agricultura, produção de álcool, alcalóides, enzimas e xilitol (TORQUATO, 2006; COSTA, BOCCHI, 2012; THANCHAROEN et al., 2016; LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018).

O bagaço de cana de açúcar, por apresentar uma composição rica em açúcares, é amplamente estudado como matéria prima de utilidade para diversos processos de bioconversão, seja em processos de fermentação submersa (SILVA et al., 2003; CARVALHO et al., 2005) ou em fermentação em estado sólido (KUMAR et al., 2003; MAZUTTI et al., 2006). Por meio de um mecanismo de pré-tratamento, a fração hemicelulósica pode ser separada dos demais componentes da biomassa vegetal. Açúcares como xilose, glicose e arabinose são liberados e podem ser utilizados em diversos

processos biotecnológicos (PANDEY et al., 2000; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; JIANG et al., 2016; ARRUDA et al., 2017; BUCKERIDGE et al., 2019).

A elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar, que pode corresponder a 80% do total de açúcares (RODRIGUES et al., 2001) e a capacidade de assimilação desta pentose por várias leveduras são os principais fatores que impulsionam o aproveitamento desta matéria prima em diferentes processos de bioconversão para a obtenção de produtos de valor agregado, como o xilitol (SAHA, 2003; SILVA et al., 2005; SARROUH et al., 2009; PRAKASHAM et al., 2009; THANCHAROEN et al., 2016; LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018). A Tabela 2 apresenta a composição química dos polissacarídeos da parede celular da cana de açúcar e enzimas que atuam nesses polímeros para a liberação de açúcares em processos de hidrólise.

Tabela 2: Frações, polímeros, composição química e enzimas que atuam na hidrólise da parede celular da cana de açúcar.

Fração (%)	Polímeros (%)	Composição química (número de carbonos)	Enzimas
Celulose (28%)	Microfibrilas glucanas (28%).	Glicose (6).	Celulases, β -glicosidases.
Hemicelulose (58%)	Arabinoxilana (40%).	Xilose (5), Arabinose (5), Ácido ferúlico (10), Acetil (2).	Endo-xilanases, Arabinofuranosidases, Feruloil-esterases, β -xilosidase.
	β -glucana (10%). Xiloglucana (8%).	Glicose (6). Glicose (6), Xilose (5), Galactose (6), Ácido ferúlico (10), Acetil (2).	Liquenases, β -glicosidases. Xiloglucana endoglucanases, β -glalactosidases, α -xilosidases, Feruloil-esterases.
Pectina (8%)	Homogalaturonano.	Ácido galactutônico (6), Metil (1).	Endopologalacturonases, Pectina metil esterases.
	Arabinogalactano. Arabinano.	Arabinose (5), Galactose (6). Arabinose (5).	Arabinosidases, galactanases. Arabinosidases, arabinanases.
Lignina (6%)	Polímeros de fenilpropanóides.	Guaiacil (7), Siringil (11), Coniferil (10).	Lacases.

Fonte: adaptado de SOUZA et al., (2014)

2.3 Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de biomassa lignocelulósica

2.3.1 Pré-tratamento

O processo de pré-tratamento ou pré-hidrólise da biomassa vegetal pode ser realizado por métodos físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos, ou ainda uma combinação destes (CHIARAMONTI et al., 2012; KATO et al., 2014; MAURYA et al.,

2015; RABEMANOLONTSO; SAKA, 2016; ANTUNES et al., 2017). Para um pré-tratamento ser considerado efetivo, deve apresentar algumas características: (i) resultar em alta extração de açúcares; (ii) permitir alta digestibilidade da celulose no caso de subsequente hidrólise enzimática; (iii) produzir quantidades insignificantes de produtos de degradação derivados dos açúcares ou da lignina, que serão tóxicos aos microrganismos; (iv) ter uma baixa demanda energética ou ser realizado em uma via que possibilite o reuso da energia em outras etapas do processo como calor secundário; (v) ter um baixo custo de capital e operacional, minimizando os custos com a redução de tamanho da matéria prima, material de construção dos reatores de pré-tratamento; e (vi) produzir menos resíduos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; GÍRIO et al., 2010; KIM et al., 2013). O grande objetivo e desafio do pré-tratamento de materiais lignocelulósicos é o fracionamento adequado da celulose, hemicelulose e lignina (Figura 5), juntamente com uma baixa degradação de açúcares que constituem esses polímeros, a fim de se obter rendimentos e taxas de bioconversão máximas no processo empregado (GÍRIO et al., 2010).

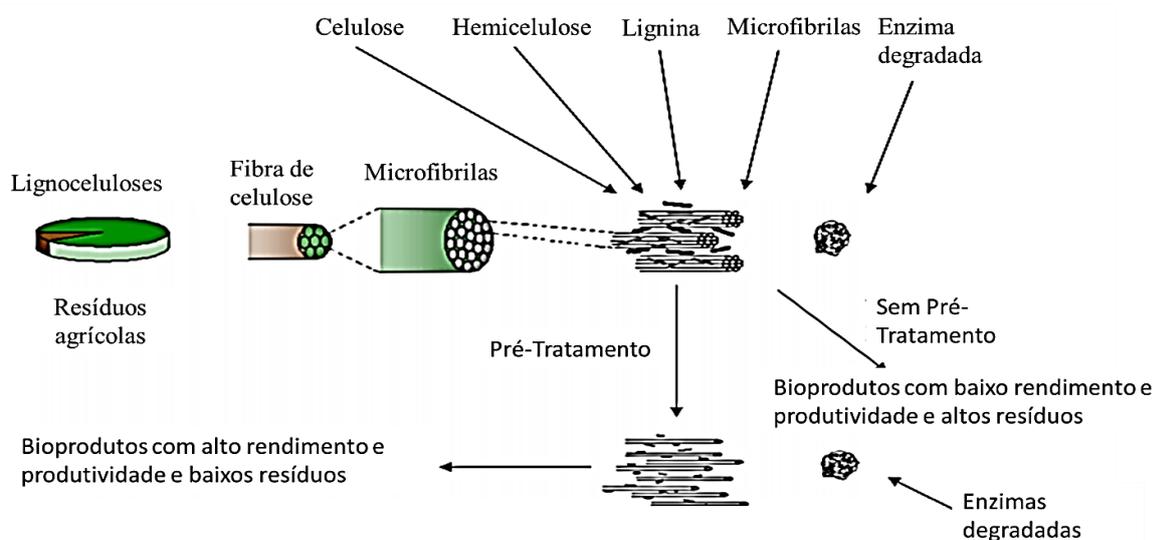


Figura 5: Esquema do fracionamento dos principais componentes da biomassa lignocelulósica no processo de pré-tratamento (Adaptado - TAHERZADEH; KARIMI et al., 2008).

O pré-tratamento físico é usado para aumentar a área de superfície e o tamanho de poros da lignocelulose e para diminuir a cristalinidade e o grau de polimerização da celulose presente na biomassa lignocelulósica (HARMSEN et al., 2010; BEHERA et al., 2014). Para tanto, geralmente são empregados como um primeiro estágio na abertura da

estrutura lignocelulósica para então se aplicar um tratamento hidrolítico químico (ácido ou alcalino) ou biológico (com enzimas purificadas ou células microbianas). Entre os tratamentos físicos destacam-se a moagem, a trituração ou o esfarelamento mecânicos e a explosão com vapor (GALBE; ZACCHI, 2007). Os processos mecânicos, como a moagem, reduzem o tamanho da partícula e a cristalinidade da celulose, além de causar a quebra de ligações de longas cadeias moleculares (ZHU, 2009; ZHU et al., 2011). A explosão com vapor consiste em tratar a matéria prima com vapor saturado sob alta pressão, a temperaturas entre 160 e 240 °C por até 20 minutos. Em seguida, a pressão é retirada e a mudança brusca de pressão causa ruptura das ligações da lignina e da hemicelulose à celulose. A adição de SO₂ pode aumentar o efeito do pré-tratamento, assim como a recuperação da hemicelulose (SARKAR et al., 2012). Um outro processo estudado é a cavitação hidrodinâmica (HC), tecnologia de processo com potencial para aplicação em diferentes áreas, incluindo produção ambiental, processamento de alimentos e biocombustíveis. A aplicação de energia de cavitação para aumentar a eficiência do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma estratégia interessante proposta para a integração em biorrefinarias para a produção de produtos de base biológica. Além disso, é uma alternativa atraente quando comparado a outras tecnologias convencionais de pré-tratamento. Isso se deve não apenas à alta eficiência de pré-tratamento, resultando em alta digestibilidade enzimática da fração de carboidratos, mas também, por sua alta eficiência energética, configuração simples e construção de sistemas, além da possibilidade de utilização em larga escala (HILARES et al., 2018).

No processo biológico, como a biodegradação, são utilizados microrganismos (bactérias e fungos) para degradar determinadas frações do material lignocelulósico. As vantagens deste tipo de pré-tratamento são a baixa energia requerida e condições ambientais brandas, porém são considerados muito lentos e apresentam baixos rendimentos (SUN; CHENG, 2002; BALAT et al., 2008; BINOD et al., 2010).

Um método mais brando e mais específico é a hidrólise enzimática. Visto que xilanases e celulasas mostram diferentes especificidades de substratos, estas enzimas podem ser usadas para a remoção específica de monossacarídeos. O processo de hidrólise enzimática é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores (TALEBNIA et al., 2010; GHAFAR et al., 2017).

Entre todos os métodos de pré-tratamento investigados, o pré-tratamento químico tem se mostrado promissor, pois tem o objetivo de remover a lignina e a hemicelulose, provocando pouca alteração na cadeia celulósica, que será posteriormente hidrolisada

(SILVA, 2011). Na hidrólise alcalina ocorre o rompimento nas ligações éster entre hemiceluloses e lignina e o efeito vai depender do conteúdo de lignina do material lignocelulósico. Ocorre um aumento na porosidade do material quando as ligações éster são rompidas. O uso de NaOH diluído causa uma intumescência no material, aumenta a área de superfície interna, diminui o grau de polimerização e a cristalinidade, ocasionando a ruptura da estrutura da lignina (SUN; CHENG, 2002; SUN et al., 2004). O uso de solventes também é empregado. O processo chamado de organosolv utiliza uma mistura de ácido e solvente orgânico, geralmente etanol, para o rompimento das ligações internas da lignina e da hemicelulose (PAN et al., 2005; HILARES et al., 2017). A hidrólise ácida, à qual se emprega ácidos concentrados ou diluído, tem sido referida como um dos processos mais utilizados para a despolimerização da fração hemicelulósica em materiais lignocelulósicos em escala laboratorial devido ao seu baixo custo e alta eficiência (SUN; CHENG, 2005; GOUVEIA et al., 2009; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; ALVIRA et al., 2010; RAMBO et al., 2013; JIA et al., 2016; GHAFAR et al., 2017).

2.3.2 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida é muito empregada como forma de obtenção de hidrolisados hemicelulósicos para a utilização destes em diferentes bioprocessos em pequena escala. Entretanto, durante este procedimento de hidrólise são liberados, além dos açúcares, compostos tóxicos para os microrganismos como o ácido acético, fenóis, furfural e hidroximetilfurfural (RODRIGUES et al., 2003; CHANDEL et al., 2007; ANTUNES et al., 2017; LÓPEZ-LINARES, et al., 2018).

Neste processo, o uso de ácidos concentrados como H_2SO_4 e HCl pode levar à ocorrência de corrosão no equipamento. Desta forma, o emprego de ácidos diluídos tem mostrado eficiência ao fornecer soluções como uma alta concentração de açúcares e baixas concentrações de compostos inibitórios sem causar os problemas decorrentes da utilização dos ácidos concentrados. Neste método as frações de lignina e celulose permanecem praticamente inalteradas e a fração hemicelulósica é hidrolisada. Alguns ácidos diluídos utilizados para a hidrólise ácida são: ácido sulfúrico, clorídrico, acético e nítrico (LAVARACK et al., 2002; SARROUH et al., 2007; KUMAR et al., 2009; GÍRIO et al., 2010; TALEBNIA et al., 2010). O produto da hidrólise é uma solução contendo principalmente açúcares, como xilose, glicose e arabinose. Outros produtos como oligômeros, furfural, ácido acético, hidroximetilfurfural, metais pesados (cromo, cobre, níquel e ferro) provenientes dos equipamentos de hidrólise, assim como compostos

aromáticos derivados da lignina, são também liberados após o procedimento de hidrólise e são classificados como compostos inibitórios para o metabolismo (TEIXEIRA et al., 1999; BINOD et al., 2010). A Figura 6 apresenta os inibidores microbianos que podem ser formados durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos.

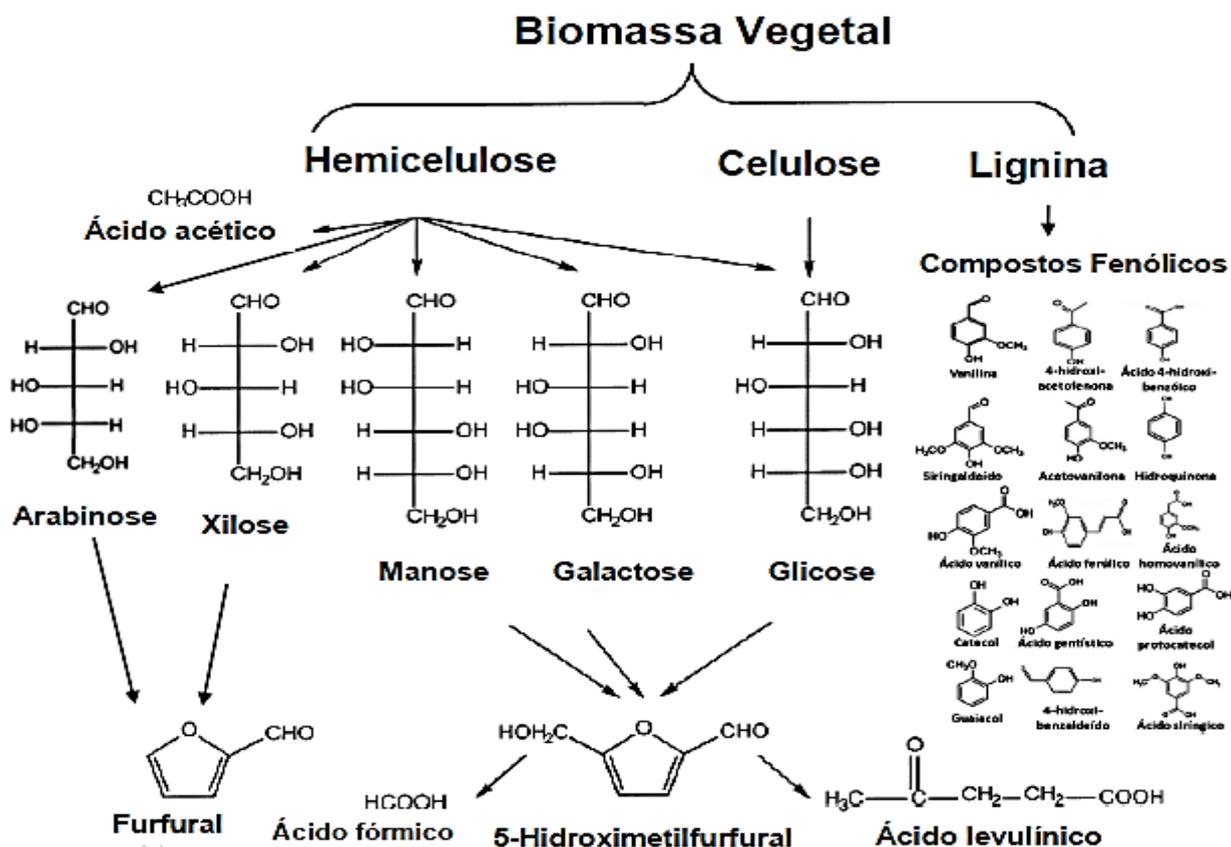


Tabela 3: Composição química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar em reator piloto obtido por hidrólise ácida.

Propriedades físicas	pH	0,97
	°Brix	4,00
	Condutibilidade (mS)	40,20
Açúcares (gL ⁻¹)	D-xilose	19,19
	D-glicose	0,98
	L-arabinose	1,82
Produtos da degradação do açúcar (gL ⁻¹) (compostos furfurais)	Furfural	0,082
	5-hidroxiacetilfurfural	0,0071
Produtos da degradação da lignina (gL ⁻¹) (compostos fenólicos)	Ácido gálico	0,035
	Ácido Vanílico	nd*
	Ácido Siringico	nd*
	P-Ácido Coumarílico	0,15
	Ácido Feurílico	0,12
	Aldeído protocatecoico	0,0067
	Vanilina	0,0079
	ρ-Ácido hidroxibenzóico	nd*
Total de compostos fenólicos (gL ⁻¹)	Compostos fenólicos (gL ⁻¹)	1,95
Ácido acético (gL ⁻¹)	Ácido Acético (gL ⁻¹)	3,49
Compostos inorgânicos (gL ⁻¹)	Cobre	<0,10
	Ferro	554,4
	Cromo	<0,10
	Cálcio	34,10
	Magnésio	51,10
	Sódio	41,00
	Potássio	103,90
	Manganês	8,20
	Zinco	6,50
Níquel	27,80	
	Enxofre	3433,60

*nd = não detectado

Fonte: RODRIGUES et al. (2010).

Para a redução das concentrações dos inibidores microbianos presentes em hidrolisados de biomassa vegetal, diferentes métodos de destoxificação podem ser empregados (métodos biológicos, físicos e químicos) (JÖNSSON et al., 2013; JÖNSSON; MARTÍN, 2016; VALLEJOS et al., 2016). Dentre estas técnicas destacam-se o ajuste do pH pela adição de ácidos e bases (MARTÍNEZ et al., 2001), a adsorção em carvão ativo (MARTON, 2002; VILLARREAL, 2006; LÓPEZ-LINARES, et al., 2018), a adsorção em resinas de troca iônica (CANILHA et al., 2004; MARTON, 2005; VILLARREAL, 2006), floculação por polímero vegetal (SILVA, 2006; CHAUD, 2010), a destoxificação biológica ou biodestoxificação (FONSECA, 2009) e biopolímeros (SILVA-FERNANDES et al., 2017). A concentração máxima tolerada de cada inibidor pelos microrganismos é

difícil de ser estabelecida de uma forma geral, pois dependem de alguns fatores como o microrganismo utilizado e o seu grau de adaptação, a condição de cultivo (temperatura, aeração, nutrientes pH) e também deve se levar em conta a forma de cultivo, se o será contínuo, descontínuo, alimentado ou semicontínuo (CORTEZ, 2005).

Os ácidos orgânicos, como por exemplo, ácido acético, por meio da inibição das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, causam danos ao metabolismo celular, como limitação do consumo da fonte de carbono e interferência na cinética de crescimento celular, que é dependente da concentração de açúcar, oxigênio dissolvido e pH do meio de cultivo (FELIPE et al., 1995; TAMANINI; OLIVEIRA, 2004). Segundo Felipe et al. (1997), fermentações com *C. guilliermondii* comprovaram que valores maiores que 3 g.L⁻¹ de ácido acético inibem o metabolismo da xilose, afetando a produtividade e o rendimento em xilitol. Por outro lado, Carvalho et al. (2005) constataram que o ácido acético em concentrações de 1 g.L⁻¹ favoreceu a produção de xilitol nos meios em que a concentração inicial de D-xilose era de 50 g.L⁻¹. A ação destes ácidos orgânicos em pH ácido interfere em vários pontos do metabolismo da levedura, como o transporte de xilose através da membrana citoplasmática, afetando o pH intracelular, resultando na redução do crescimento celular (FELIPE et al., 1997).

Compostos como furfural e 5-HMF têm efeito inibidor na respiração e na fosforilação oxidativa das leveduras, dificultando a bioconversão dos açúcares nos produtos desejados (CANILHA et al., 2010). Trabalhos da literatura relataram que a taxa máxima de crescimento das leveduras foi reduzida em uma concentração de 0,35 g.L⁻¹ de furfural e que esta é completamente inibida com uma concentração de 1,75 g.L⁻¹ deste composto (SANCHES; BAUTISTA, 1988; FELIPE et al., 1995; PARAJO, et al., 1998c). O efeito prejudicial do furfural afeta na taxa de crescimento, e sua acumulação na célula provoca a inibição das enzimas envolvidas no metabolismo central do carbono, alterando o equilíbrio da energia celular. Além disso, o furfural causa danos nas membranas vacuolares e mitocondriais, e a acumulação de espécies reativas de oxigênio, por sua vez, pode causar a morte celular (SÁRVÁRI et al., 2003; HEER; SAUER, 2008). Entretanto, durante a fermentação, o furfural e o 5-hidroximetilfurfural são reduzidos aos seus álcoois correspondentes, que são compostos menos tóxicos para a célula (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; HEER; SAUER, 2008).

2.4 Xilitol

2.4.1 Características e propriedades do xilitol

O xilitol é um poliálcool de fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano) (Figura 7) e é classificado como adoçante capaz de substituir a sacarose; é tolerado por diabéticos e apresenta várias aplicações clínicas (DASGUPTA et al., 2017). Além disso, outras propriedades de relevância, como anticariogenicidade, metabolismo independente de insulina e outras propriedades terapêuticas, fazem com que exista bastante interesse no uso comercial de xilitol (RAFIQUL; SAKINAH 2012; COCCO et al., 2017). De estrutura aberta, a molécula de xilitol possui cinco grupos hidroxilas (OH), cada uma delas ligada a um átomo de carbono, razão pela qual esse composto é conhecido como poliidroxiálcool acíclico ou pentitol (MÄKINEN, 2000; UR-REHMAN et al., 2015). É um metabólito intermediário no metabolismo de carboidratos em mamíferos, cuja produção, que varia de 5 a 15 g por dia em humanos adultos saudáveis, é seguida de assimilação pelo próprio organismo (CANILHA et al., 2013). De acordo com a literatura, o xilitol é bem tolerado pelo organismo quando ingerido em doses que não ultrapassem, em um adulto, 60 g/ dia, já que a ingestão de doses superiores às indicadas produz efeito laxativo (MUSSATO et al., 2002).

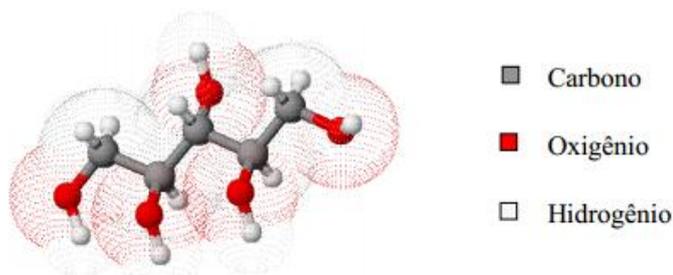


Figura 7: Modelo molecular do xilitol – Software ACD/Chemsketch – vs. 4.55. (MARTON, 2002).

Em vista do crescente número de pessoas que apresenta algum tipo de distúrbio metabólico e necessita, por isso, diminuir ou mesmo cessar o consumo de açúcar, centros de pesquisas nacionais e estrangeiros têm tentado encontrar um substituto da sacarose que seja, ao mesmo tempo, nutritivo e benéfico para a saúde, atuando na cura ou na prevenção de doenças (MOHAMAD et al., 2015). Na Tabela 4 pode-se verificar as características e propriedades físico-químicas do xilitol (BAR, 1991; UR-REHMAN et al., 2015).

Tabela 4: Características e propriedades físico-químicas do xilitol.

Propriedades	Características ou Valores
Formula Empírica	C ₅ H ₁₂ O ₅
Massa Molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de Fusão	92-96 °C
Ponto de Ebulição	216 °C
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade	1,03 g mL ⁻¹ (Solução 10%) 1,23 g mL ⁻¹ (solução 60%)
Solubilidade em água a 20° C	64,20 g(100 g) ⁻¹ de solução
Viscosidade (à 20° C)	1,23 cP (Solução 10%) 20,63 cP (Solução 60%)
Calor de Solução (endotérmico)	34,80 cal g ⁻¹
Valor Calórico	2,40 k cal g ⁻¹
Índice de Refração (25° C)	1,3471 (solução aquosa a 10%)
Higroscopicidade	Em elevada umidade relativa, é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol
Poder adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120° C (não carameliza)

Fonte: (BAR, 1991; UR-REHMAN et al., 2015)

Em relação ao mercado do xilitol, Ravella et al. (2012) reportaram uma estimativa no ano 2012 em 537 milhões de dólares por ano, com produção estimada em mais de 125.000 toneladas por ano, participação de 12% no mercado de polióis, e previsão de continuar com forte demanda e rápido crescimento mundial. Estes autores relataram também que o valor do xilitol era de 4,5 – 5,5 dólares por kg para compra por atacado por meio de companhias alimentícias ou farmacêuticas, e de 20 dólares por kg para compra em supermercados. O custo final do produto varia e depende de custos de material e os custos de transporte, que por sua vez dependem da matéria prima e da localização de sua produção (LANGE, 2007; KAZI et al., 2010). Por sua vez, Rueda et al. (2015) indicaram que o mercado global de xilitol passará de 537 milhões de dólares em 2013, correspondente a aproximadamente 161.500 toneladas, à 1 bilhão de dólares, equivalente a 242.000 toneladas, em 2020. Na Ásia a produção de xilitol a partir de sabugo de milho corresponde mais de 50% do total da produção mundial, enquanto o restante desta produção encontra-se na Europa, Estados Unidos e Austrália (RAVELLA et al., 2012). A empresa Danisco (atualmente parte da DuPont) destaca-se como uma das maiores produtoras mundiais de xilitol, e utiliza madeiras duras, como bétula obtida em associação

com a indústria de papel e polpa, e milho como matérias primas (RAVELLA et al., 2012). A China apresenta o maior mercado para o xilitol e em segundo lugar está a Índia com um elevado crescimento (RAO et al., 2016). A indústria de chicletes tem o maior mercado para o consumo de xilitol em comparação a outras indústrias apresentando um consumo de 80% em 2010 e estima-se consumir cerca de 163 mil toneladas até 2020, com 67% do consumo global de xilitol (XYLITOL, 2014). Marcas de chicletes, como Gross e Wrigley, usam apenas xilitol para a fabricação de gomas de mascar sem açúcar. Em relação a produção de xilitol, além da DuPont, destaca-se Cargill, CSPC Shengxue Glicose, Corn Products International, Mitsubishi Shoji Food Tech que são consideradas as principais indústrias fornecedoras de xilitol no mercado. Dentre outros fornecedores estão as empresas ZuChem, Tecnologia Biológica Shouxin Hangzhou, Novagreen, a Tata Chemicals, Roquette Frres e Thomson (RAO et al., 2016).

O xilitol tem um poder adoçante semelhante à da sacarose, mas com um valor calórico inferior ($2,4 \text{ calg}^{-1}$, enquanto que o da sacarose é $4,0 \text{ calg}^{-1}$) (CHEN et al., 2010). Esse produto pode ser utilizado sozinho ou em combinação com outros adoçantes para realçar o sabor dos alimentos, em gomas de mascar, produtos de confeitaria e chocolates, promovendo um efeito refrescante devido ao seu elevado calor endotérmico de solução ($34,8 \text{ calg}^{-1}$), pode ser empregado como antioxidante, hidratante, estabilizador, e crioprotetor por reduzir o ponto de congelamento de alguns produtos (PRAKASHAM, et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2014; MOHAMAD et al., 2015). A Figura 8 apresenta alguns produtos encontrados no mercado formulados à base de xilitol.



Figura 8: Exemplos de produtos formulados a base de xilitol.

2.4.2 Aplicações do xilitol

Uma das vantagens do xilitol frente à sacarose é que em virtude da elevada estabilidade química e microbiológica, o mesmo atua como conservante de produtos alimentícios, e desta forma oferece resistência ao crescimento de microrganismos e prolonga a vida de prateleira dos produtos (BAR, 1991). Outra vantagem é que devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações com aminoácidos, conhecidas como reações de Maillard. Isto significa que ele não sofre reações de escurecimento não enzimático, que provocam diminuição do valor nutricional das proteínas. Dessa forma, recomenda-se sua utilização na manufatura de produtos nos quais as reações de Maillard são indesejáveis. Entretanto, em produtos de padaria, o uso exclusivo de xilitol oferece problemas, uma vez que as reações de escurecimento são responsáveis pela aparência e pelas características flavorizantes desses produtos (MANZ et al., 1973).

Ao contrário dos açúcares convencionais, o xilitol independe de insulina para ser metabolizado pelo organismo, sendo, por isso, bem tolerado pelas pessoas portadoras de Diabetes mellitus Tipo I ou Tipo II (BAR, 1991; YOUSOFF et al., 2017). De fato, nenhuma das duas principais vias de absorção do xilitol (fígado e microbiota intestinal) é

mediada pela insulina. Este adoçante pode ser empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e na dieta de obesos, uma vez que exerce pequena contribuição para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (PRAKASHAM et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 2014).

O xilitol também é eficiente no tratamento ou na prevenção da osteoporose e em pacientes com fibrose cística, conforme comprovado por Mattila et al. (1998). Em pesquisas utilizando modelo animais, esses autores verificaram que o xilitol promove o aumento da massa óssea, preserva os minerais neles existentes e evita o enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas. A administração simultânea em ratos de 10% de xilitol aliada a 10% de etanol aumentou o volume ósseo e o conteúdo mineral destes animais (MATTILA et al., 1998).

O xilitol não é assimilado pela maioria dos microrganismos da cavidade oral de humanos e, por isso, é capaz de inibir a desmineralização dos dentes e de exercer efeito não-cariogênico. Esse efeito decorre do fato da bactéria *Streptococcus mutans*, principal causadora das cáries, não utilizar o xilitol como fonte de carbono e dessa forma não ocorrer a acidificação do pH, o que contribuiria para o crescimento desse microrganismo (FERREIRA, 2007; CHEN et al., 2010; SALLI et al., 2017). De acordo com Montanuci et al. (2013), o uso de gomas de mascar após a ingestão de bebida ácida provocaram uma elevação no pH salivar dos voluntários e os grupos que utilizaram gomas com fosfopeptídeo de caseína, fosfato de cálcio amorfo e xilitol em sua composição não apresentaram tais efeitos.

A eficiência do xilitol no tratamento de doenças respiratórias foi atribuída por Zabner et al. (2000), à baixa permeabilidade transepitelial desse edulcorante, que dessa forma, não é metabolizado pela maioria das bactérias e pode diminuir a concentração de sais no líquido que reveste a superfície interna dos pulmões. Experimentos realizados por esses autores a partir de 50 µL de uma solução a 3 mM de xilitol mostraram que as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (principais causadoras de doenças pulmonares) não utilizam xilitol para crescimento, o que resulta na diminuição da concentração de sais no líquido e aumenta a atividade antibiótica natural dos pulmões. Pode-se dizer, portanto, que o xilitol fortalece o sistema de defesa natural dos pulmões, atrasando ou prevenindo o estabelecimento de infecções bacterianas, entre as quais se inclui a pneumonia.

Uma composição contendo xilitol pode ser usada no tratamento de vaginose. Este poliol atua seletivamente sobre a bactéria patogênica *Gardnerella vaginalis*, não inibindo o crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, a bactéria predominante da microbiota vaginal (KIMBERLY CLARCK CO., 2006a; KIMBERLY CLARK CO., 2010). O agente terapêutico é geralmente colocado em contato com a vagina em uma quantidade necessária para atingir o efeito desejado. A quantidade ideal é aquela suficiente para inativar, mas não necessariamente matar os microrganismos responsáveis pela infecção (KIMBERLY CLARK CO., 2010).

O xilitol atua na inibição do crescimento da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, principal causadora de sinusites e infecções no ouvido médio (VERNACCHIO et al., 2014; SAKALLIOGLU et al., 2014). Estudos realizados com crianças revelaram que uma dose diária de 8,4 g de xilitol, dada sob a forma de 2 gomas de mascar (mascadas durante 5 minutos cada), mostrou-se efetiva no combate a esta doença, reduzindo em cerca de 40% a ocorrência dessa infecção. Também sob a forma de xarope, o xilitol foi bem tolerado por crianças e mostrou-se eficaz na prevenção de otite, diminuindo a necessidade de antibióticos (UHARI et al., 1998).

2.4.3 Produção de xilitol

O xilitol pode ser encontrado na natureza em muitas frutas e vegetais tais como alface, couve flor, ameixas, framboesas, morangos, uvas, bananas, assim como em leveduras, líquens e cogumelos, porém, em quantidades inferiores a 0,9g/100g (PARAJÓ et al., 1998a). A extração diretamente dessas fontes não é economicamente viável pelas baixas quantidades presentes nestes materiais, o que torna este processo de obtenção economicamente inviável (PEPPER; OLINGER, 1988). Diante disso, o xilitol é produzido por processos químicos.

2.4.3.1 Processo químico

Em escala comercial o xilitol é convencionalmente produzido por processo químico que teve início na Finlândia pela empresa Finnish Sugar Co. Ltda., Helsink, com capacidade para produzir acima de 3000 ton/ano, processo patenteado em 1977 (Patente #4008285) (MELAJA; HÄMÄLÄINEM, 1977). Esse processo consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura obtida por meio da hidrólise de materiais lignocelulósicos (DUSSÁN et al., 2016; RAO et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; YEWALE et al.,

2017). De modo geral, são necessárias quatro etapas básicas para realização do processo químico:

- (1) Desintegração de materiais lignocelulósicos ricos em xilana por meio de hidrólise;
- (2) Separação da xilose do hidrolisado, por cromatografia, para obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza;
- (3) Hidrogenação catalítica da xilose pura em xilitol na presença de níquel como catalisador;
- (4) Purificação e cristalização do xilitol (MELAJA; HÄMÄLÄINEM, 1977; RAFIQUIL; SAKINAH, 2013).

A produção de xilitol por via química depende do rendimento do processo, da pureza da solução inicial de xilose, da purificação para remoção de resíduos do catalisador e de subprodutos gerados durante o processo de hidrogenação o que resulta no aumento de tempo e custo de processamento (PARAJÓ et al., 1998a; RAFIQUIL; SAKINAH, 2013; CHENG et al., 2014). As vantagens do processo químico de produção do xilitol estão relacionadas ao tempo, pois o mesmo é relativamente rápido, à não interferência dos compostos gerados na hidrólise no restante do processo, a obtenção de uma solução de xilose suficientemente pura para produzir xilitol em escala comercial e uma separação eficiente de outros açúcares (CHENG et al., 2014). Por outro lado, o rendimento da produção não é alto, em torno de 50-60%, o custo é elevado, tendo em conta a série de etapas a serem realizadas e os reagentes e máquinas utilizadas além da baixa eficiência. De acordo com Heikkilä et al. (1992), a produção do xilitol à partir de xilose tem um custo cerca de 10 vezes superior, quando comparado à produção de sacarose ou sorbitol. Este processo também gera poluição ambiental pelos produtos químicos utilizados (RAFIQUIL; SAKINAH, 2013; UR-REHMAN et al., 2015). Desse modo, pesquisadores voltaram a atenção para a produção sustentável desse produto, que há anos vem ganhando mercado, sendo a mais estudada a utilização de microrganismos que consigam converter açúcares em xilitol.

2.4.3.2 Microrganismos produtores de xilitol

Um dos processos mais atrativos para a produção de xilitol atualmente é a via biotecnológica, a qual apresenta vantagens como o uso de condições mais brandas de pressão e temperatura (SANTOS et al., 2005; CUNHA, 2006) e a não necessidade de utilizar a xilose purificada, pois as leveduras são capazes de converter diretamente a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico em xilitol (SARROUH; SILVA, 2008; YEWALE

et al., 2017). A Tabela 5 traz um comparativo da produção de xilitol por conversão química e por conversão biotecnológica.

Tabela 5: Características dos processos químicos e biológicos para a produção de xilitol.

Fatores	Processo biológico	Processo químico
Fonte de carbono	Xilose a partir da lignocelulose	Xilose pura ou xilose a partir da lignocelulose
Catalisador	Leveduras/bactérias/fungos que apresentam atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase	Níquel e hidrogenação
Etapas do Processo	1. Hidrólise ácida ou enzimática da lignocelulose 2. Destoxificação do hidrolisado 3. Fermentação do hidrolisado - produção de xilitol	1. Hidrólise ácida da lignocelulose 2. Purificação do hidrolisado para obtenção da xilose pura 3. Hidrogenação de xilose – produção de xilitol.
Purificação	Processo complexo, devido a diferentes subprodutos microbianos	Resinas de troca iônica
Custo	Baixo - pouca energia e temperatura amena	Alto – energia, pressão e temperatura elevadas

Fonte: MOHAMAD et al., 2015.

A alternativa de produção de xilitol por bioconversão de xilose por espécies microbianas, incluindo bactérias, fungos e leveduras é um processo que pode apresentar elevado rendimento e ser ecologicamente correto. Dentre estes microrganismos, as leveduras têm sido relatadas como detentoras de uma elevada capacidade de produzir xilitol (PRAKASH et al, 2011; MOHAMAD et al., 2015). A Tabela 6 apresenta alguns microrganismos capazes de metabolizar xilose e produzir o xilitol.

Tabela 6: Microrganismos fermentadores de xilose e produtores de xilitol.

Microrganismos	Referências
<i>Bacillus subtilis</i>	CHENG et al., 2011
<i>Candida tropicalis</i>	DALLI et al., 2017; UNREAN; KETSUB, 2018
<i>Candida guilliermondii</i>	HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016
<i>Candida (Spathaspora) materiae</i>	MOURA, 2015
<i>Cyberlindnera saturnus</i>	KAMAT et al., 2013
<i>C. xylosilytica</i>	CADETE et al., 2015
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LÓPEZ-LINARES et al., 2018
<i>D. nepalensis</i>	KUMDAM et al., 2012
<i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	MARTINI, et al., 2016
<i>Milleroyzyma farinosa (Pichia miso)</i>	RODRIGUES et al., 2011
<i>Scheffersomyces amazonensis</i>	CADETE et al., 2012; CADETE et al., 2016b
<i>Sc. Stipitis</i>	RODRIGUES et al., 2011
<i>Spathaspora brasiliensis</i>	CADETE et al., 2016 ^a
<i>Sp. Roraimanensis</i>	CADETE et al., 2016 ^a
<i>Spathaspora arborariae</i>	CADETE et al., 2017
<i>Sp. Xylofermentans</i>	CADETE et al., 2016 ^a
<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	CADETE et al., 2017

Fonte: Próprio autor.

Subprodutos agrícolas e agroindustriais têm sido satisfatoriamente utilizados como alternativa para produção de xilitol por meio de diferentes tratamentos, utilizando-se distintos microrganismos. A Tabela 7 apresenta uma relação de microrganismos produtores de xilitol utilizando diferentes substratos como bagaço de cana de açúcar, casca e palha de arroz, palha de colza, resíduos de eucaliptos, sabugo e espiga de milho. A espécie *Meyerozyma (Candida) guilliermondii* é um dos microrganismos mais estudados para esta produção (DOMINGUEZ et al., 2004; MOLARES, 2005; ARRUDA, 2011; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; LÓPEZ-LINAREZ et al., 2018), apresentando elevada conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e produtividade (Q_p).

Tabela 7: Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p) de leveduras comumente estudadas quanto à produção de xilitol a partir de resíduos agroalimentares.

Material	Espécie	$Y_{p/s}$ (gg^{-1})	Q_p ($gL^{-1}h^{-1}$)	Referências
Bagaço de cana de açúcar	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,59	0,19	PRAKASH et al., 2011
	<i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	0,81	0,60	ARRUDA, 2011
	<i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	0,67	0,34	HERNÁNDEZ-PEREZ et al., 2016
	<i>S. cerevisiae/C. tropicalis</i>	0,50	0,25	UNREAN; KETSUB, 2018
	<i>Kluyveromyces maxianus</i>	0,31	0,19	DASGUPTA et al., 2017
Casca de arroz	<i>Candida tropicalis</i>	0,60	ni*	RAMBO et al., 2013
Eucalyptus spp	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0,57	0,40	DIZ et al., 2002
Palha de arroz	<i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	0,90	0,50	DOMINGUEZ et al., 2004
	<i>S. cerevisiae/C. tropicalis</i>	0,55	0,42	ZAHED et al., 2016
	<i>Debaryomyces hansenii</i> ; <i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	0,42 0,42	0,16 0,10	LÓPEZ-LINARES et al., 2018.
Resíduo de eucalipto	<i>Meyerozyma (Candida) guilliermondii</i>	0,64	1,04	MORALES, 2005
Sabugo de milho	<i>Cyberlindnera saturnus</i>	0,54	0,20	KAMAT et al., 2013
	<i>C. tropicalis</i>	0,32	0,24	CHENG et al., 2014
Espiga de milho	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,95	Ni	BAPTISTA et al., 2018

ni* = não informado. $Y_{p/s}$ = fator de conversão de substratos em produto (gramas de xilitol produzido por gramas de xilose consumida); Q_p = Produtividade volumétrica (gramas de xilitol produzida por litro por hora). Fonte: Próprio autor.

A via metabólica de xilose utilizada pelas leveduras é descrita conforme a seguir: a xilose é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase – XR (E.C. 1.1.1.2.1) na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não fosfatada em sua forma reduzida (NADPH/NADH). Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela enzima xilitol desidrogenase – XDH (E.C.1.1.1.9) NAD⁺ dependente ou mais raramente, NADP⁺ dependente. A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose-5-fosfato, molécula que pode ser convertida por meio de reações não oxidativas da via pentose monofosfato a gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato. Estes compostos intermediários podem ser metabolizados por via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que está conectada a outras vias como do ácido cítrico e às reações de fermentação alcoólica (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; PRAKASHAM et al., 2009; RAFIQU; SAKINAH, 2013; VERAS et al., 2017).

As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) podem apresentar diferentes especificidades em relação aos cofatores oxidados e reduzidos, dependendo da espécie de levedura. Em *Scheffersomyces stipitidis* a enzima XR é dependente dos cofatores NADPH ou NADH e a enzima XDH é dependente primariamente do cofator NAD⁺ (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; HAHN-HÄGERDAL et al., 2006). Em *Candida utilis*, a enzima XR requer como cofator o NADPH, enquanto a XDH é dependente da NAD⁺. Yokoyama et al. (1995) sugerem que microrganismos que apresentam a enzima XR dependente de NADH são melhores produtores de etanol, e, em contrapartida, aqueles que apresentam xilose redutase dependente de NADPH acumulam xilitol. Além disso, a disponibilidade de oxigênio influencia o requerimento dos cofatores destas enzimas (ALBUQUERQUE et al., 2014; CADETE et al., 2016). Condições de anaerobiose ou condições limitadas de oxigênio causam um desbalanço redox, o qual interfere na produção de xilitol e dos subprodutos deste metabolismo, como etanol e/ou glicerol (FELIPE, 2004). Assim, leveduras dotadas de XR estritamente dependentes de NADPH produzem xilitol como o produto principal do metabolismo de D-xilose em condições limitadas de oxigênio. As leveduras que apresentam XR com utilização de dois cofatores podem oxidar NADH a NAD⁺ nesta etapa, reduzindo a formação de xilitol e permitindo que o metabolismo de D-xilose prossiga sob condições limitadas de oxigênio. A relação direta entre a dupla dependência de cofatores por XR em relação às atividades ligadas ao NADH e a capacidade de fermentar D-xilose em etanol com alta eficiência por leveduras já foi relatada na literatura (CADETE et al., 2014). As atividades de xilose redutase e xilitol desidrogenase são também influenciadas por outros carboidratos como arabinose e glicose, presentes juntamente à xilose nos hidrolisados hemicelulósicos (SILVA; FELIPE, 2006). A Figura 9 apresenta um esquema do metabolismo de xilose por leveduras.

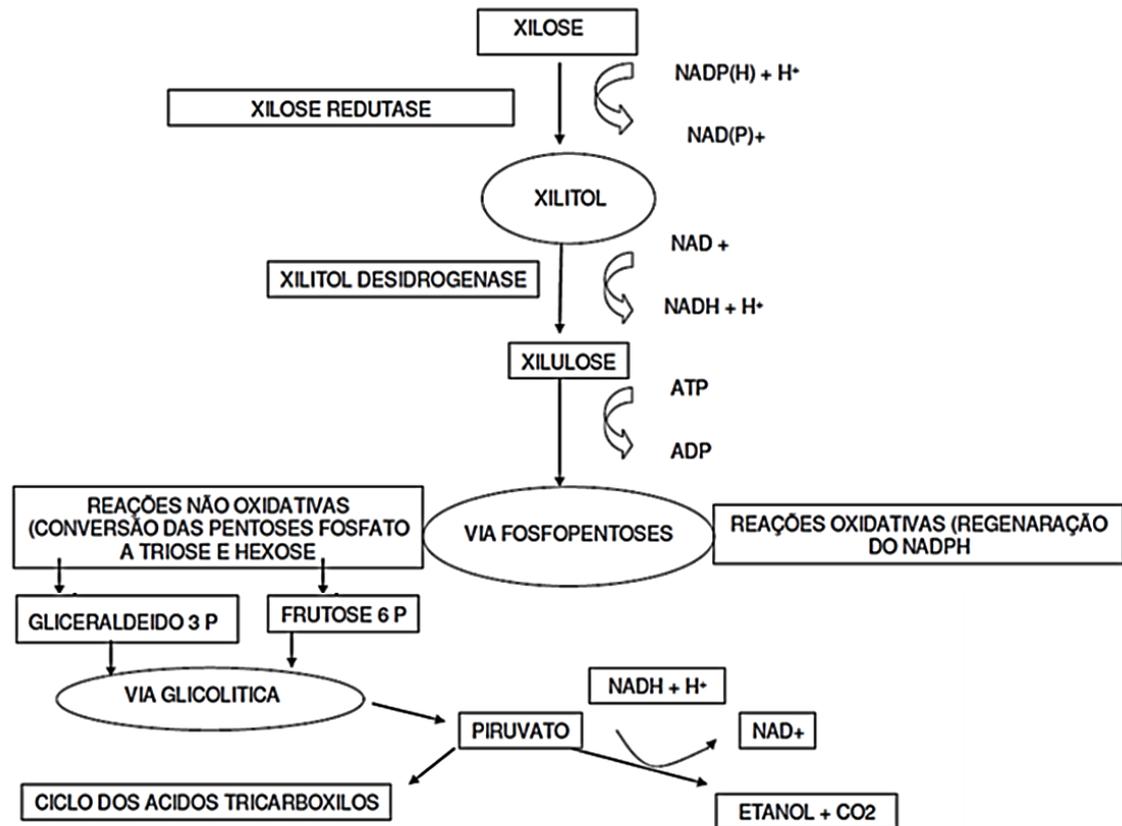


Figura 9: Esquema simplificado do metabolismo de xilose por leveduras. (LOURENÇO, 2009).

O xilitol pode ser produzido por meio da redução biológica da xilose, presente em hidrolisados hemicelulósicos, pelas leveduras. Contudo, a taxa de aeração utilizada no cultivo e os subprodutos originados pela hidrólise da biomassa vegetal podem inibir a produção de xilitol durante o processo. Hernández-Pérez et al. (2016) estudaram a suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar ($50,60 \text{ gL}^{-1}$ de xilose) em função da disponibilidade inicial de oxigênio por *Candida guilliermondii* FTI 20037. As condições nutricionais de suplementação avaliadas foram: sem suplementação, suplementada apenas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e suplementação completa com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, em frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 ou 50 mL de meio de modo a variar a disponibilidade inicial de oxigênio. Quando suplementado observou um aumento no consumo de xilose de até 240%. No caso suplementado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, farelo de arroz e $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, observou-se uma maior produção de xilitol quando utilizou 25 mL de meio ($16,20 \text{ gL}^{-1}$; $Y_{p/s}=0,47 \text{ gg}^{-1}$; $Q_p=0,34 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $\eta=50,91\%$), enquanto que a menor disponibilidade inicial de oxigênio (50 mL de meio) favoreceu a eficiência da bioconversão ($14,24 \text{ gL}^{-1}$; $Y_{p/s} = 0,55 \text{ gg}^{-1}$; $Q_p = 0,30 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; $\eta = 60,07\%$).

Misra et al. (2013), estudaram o potencial do hidrolisado de sabugo de milho para produção de xilitol por uma linhagem de *C. tropicalis*. Esses autores alcançaram extração máxima de xilose de 20,92 gL⁻¹ utilizando-se ácido sulfúrico 1% v/v. Concentrando-se o hidrolisado até 52,71 gL⁻¹ em relação a xilose, obtiveram 15,19 gL⁻¹ de xilitol em 60h de cultivo. Ping et al. (2013) utilizaram hidrolisado concentrado não destoxificado de sabugo de milho, contendo 60 gL⁻¹ de xilose, para produção de xilitol por *C. tropicalis* CCTCC M2012462 alcançando produção máxima de 38,8 gL⁻¹ de xilitol ($Y_{p/s}=0,70$ gg⁻¹ e $Q_p=0,46$ gL⁻¹.h⁻¹), obtida após 84 horas de cultivo.

Pesquisas vêm sendo realizadas para o conhecimento dos fatores reguladores da bioconversão de D-xilose em xilitol por *Meyerozyma guilliermondii*, tanto em meios complexos como em hidrolisados hemicelulósicos. Dentre estes fatores, destacam-se o pH (RODRIGUES et al., 2003; DUSSÁN et al., 2016; MARTINI et al., 2016;), a idade e a concentração do inóculo (0,1 a 10 gL⁻¹) (PFEIFER et al., 1996; FELIPE et al., 1997a; MOURA, 2015), a concentração inicial de xilose no hidrolisado (50-65,0gL⁻¹) (FELIPE et al., 1997a; RODRIGUES, et al., 2003; DUSSÁN et al., 2016; ARRUDA et al., 2017;), a temperatura (30° C) (PARAJÓ et al., 1998b; SENE et al., 2000), a suplementação como extrato de levedura (1-10 gL⁻¹) (MISRA et al., 2013; DUSSÁN et al., 2016; MARTINI et al., 2016;), farelo de arroz (1-20 gL⁻¹), (GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; ARRUDA et al., 2017;) sulfato de amônio (1-12,5 gL⁻¹) (GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; ARRUDA et al., 2017; VERAS et al. 2017) e a concentração de oxigênio considerada um dos parâmetros mais críticos do processo (SU et al., 2015; DUSSÁN et al., 2016; HÉRNANDEZ-PÉREZ, 2016; VERAS et al., 2017). Em pesquisas com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, o emprego de valores de coeficiente de transferência de oxigênio (k_La) de 20h⁻¹ (MARTÍNEZ et al., 2000), 27 h⁻¹ (SILVA et al., 1998) e 30 h⁻¹, (MARTÍNEZ et al., 2007) permitiram a obtenção de elevadas produtividades volumétricas em xilitol (0,7 gL⁻¹.h⁻¹, 0,87 gL⁻¹.h⁻¹ e 0,48 gL⁻¹.h⁻¹ respectivamente), enquanto que o uso de k_La de 10h⁻¹ (MORITA et al., 2000) resultou em uma alta eficiência de bioconversão de xilose em xilitol (86,15%).

No trabalho realizado por KAMAT et al. (2013), fungos isolados das florestas de manguezais da costa ocidental indiana foram selecionados pela capacidade de produzir xilitol. A levedura *Cyberlindnera saturnus*, isolada a partir deste ecossistema, foi identificada como uma boa produtora deste poliál. Este microrganismo apresentou a capacidade de crescer e metabolizar xilose produzindo quantidades significativas de xilitol (29,10 gL⁻¹) a partir de hidrolisado de sabugo de milho destoxificado contendo 65,00 gL⁻¹

de xilose, 13,00 gL⁻¹ de glicose e 6,30 gL⁻¹ de arabinose. A conversão máxima de 0,54 gg⁻¹ foi obtida após 144 h de crescimento em 150,00 gL⁻¹ de xilose, obtendo-se 38,63 gL⁻¹ de xilitol.

KUMDAM et al. (2012) reportaram que a linhagem NCYC 3413 de *Debaryomyces nepalensis* foi capaz de utilizar componentes do hidrolisado hemicelulósico, tais como glicose, galactose, manose, xilose e arabinose, produzindo xilitol a partir de xilose. Neste trabalho, o método Plackett-Burman, que identificam os parâmetros críticos no início da fase de fermentação, foi aplicado para determinar os componentes específicos do meio que afetam a produção de xilitol, e descobriu-se que xilose, K₂HPO₄ e ZnSO₄ foram fundamentais para aumentar sua produção. Estes parâmetros significativos foram otimizados utilizando-se a metodologia de superfície de resposta e as concentrações ótimas de xilose, K₂HPO₄, ZnSO₄ encontradas e utilizadas foram 100 gL⁻¹, 10,60 gL⁻¹ e 8,90 mgL⁻¹, respectivamente. Sob estas condições ótimas a produção de xilitol aumentou de 27 gL⁻¹ para 36 gL⁻¹ com um rendimento de 0,44 gg⁻¹ (57% de aumento de rendimento total). Além disso, a formação de glicerol foi reduzida sob tais condições.

Além das leveduras comumente estudadas quanto à produção de xilitol, como *Candida tropicalis* e *Meyerozyma guilliermondii*, nos últimos anos novas espécies de leveduras produtoras têm sido descritas, como por exemplo, *Scheffersomyces amazonensis* (CADETE et al., 2012; CADETE et al., 2016b), *Candida (Spathaspora) materiae* (MOURA, 2015), *Cyberlindnera xylosilytica* (CADETE, et al., 2015), *Spathaspora brasiliensis*, *Sp. roraimanensis*, *Sp. suhii* e *Sp. xylofermentans* (CADETE et al., 2016a). O estudo de novos microrganismos produtores de xilitol abre perspectivas para a produção biotecnológica deste polioliol como alternativa à via química aplicada na indústria.

2.5. Suplementação no meio de cultivo

Para todos os processos biotecnológicos, os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de carbono e nutrientes que são fatores importantes para a utilização de hidrolisados hemicelulósicos como meio de fermentação para a bioconversão de xilose-xilitol (MARTINI et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016). Como a composição da biomassa vegetal varia de acordo com a matéria-prima, é necessário a utilização de substâncias que têm a finalidade de melhorar o crescimento microbiano e acelerar o metabolismo durante o processo fermentativo. Dentre elas podemos citar: fontes

de nitrogênio, minerais, vitaminas, proteínas, aminoácidos, entre outros (MARTINI et al., 2016; LORLIAM et al., 2017). Podemos destacar o farelo de arroz, sulfato de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de cálcio, extrato de levedura e peptona (GUAMÁN-BURNEO et al., 2015; MARTINI, et al., 2016; THANCHAROEN et al., 2016; LORLIAM et al., 2017; BAPTISTA et al., 2018). Na seleção dos nutrientes necessários ao metabolismo celular as leveduras sofrem a repressão catabólica induzidas pelas fontes de carbono e nitrogênio. A utilização destes nutrientes impõem à levedura uma sequência ordenada de utilização de fontes de carbono e nitrogênio (SANTOS et al., 2013). Além destas vias de regulação existem outras de sinalização e de sensoriamento de nutrientes em leveduras, além ainda, de ocorrer a integração de várias vias de regulação envolvendo aquelas descritas para o carbono e outras para o nitrogênio, criando um quadro complexo de regulação e sinalização (GANCEDO, 1998; SCHNEPER et al., 2004). Os estudos da interação das fontes de carbono e nitrogênio no metabolismo das diferentes linhagens industriais, são importantes na medida em que estes compostos apresentam uma complexidade estrutural e são fontes utilizadas pela levedura para um bom desempenho metabólico. O efeito da interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio na eficiência fermentativa das leveduras industriais, pode ser um fator importante para promover melhorias na eficiência fermentativa das leveduras e melhorar a produção de etanol (SANTOS et al., 2013).

Um dos nutrientes utilizados durante o processo fermentativo são derivados dos íons NH_4^+ , sendo o mais utilizado o sulfato de amônio, porém não deve ser utilizado em concentrações elevadas por ser, neste caso, considerado tóxico para a célula. O ponto crítico de entrada destes íons está ligado a dois aminoácidos, Glutamato e Glutamina, sendo assim o NH_4^+ é assimilado pela célula através de uma reação de biossíntese envolvendo alta afinidade por NH_4^+ . O Glutamato é gerado por reação entre α -cetoglutarato e glutamina na presença de NADPH e H^+ , sendo esta reação catalisada pela enzima glutamato sintase (LEHNINGER, 2006)

O extrato de levedura é uma mistura de aminoácidos, vitaminas e magnésio, e tem sido considerado uma importante fonte nutricional para produção de etanol e xilitol para muitas espécies de levedura. Segundo alguns autores, o extrato de levedura favorece o crescimento e a viabilidade celular (FERREIRA et al., 2011; SILVA et al., 2012).

O farelo de arroz é o subproduto do polimento ou beneficiamento do arroz após a remoção da casca silícica e lignocelulósica, constituído da camada intermediária entre a casca e o endosperma. A operação de beneficiamento do arroz com casca para obtenção do

arroz branco produz em média 8% de farelo de arroz (SCHOULTEN et al., 2003). O farelo é composto por uma mistura de substâncias, como proteínas, gorduras, cinzas, fibras, vitaminas, aminoácidos e minerais (Tabela 8) e suas concentrações são largamente afetadas pelo tipo e/ou fase do beneficiamento. É rico em ácidos graxos insaturados, principalmente em ácido oleico e linoleico. Além disto contém outros componentes como α -orinazol, esteróis e tocoferol (SAUNDERS et al., 1985; BATISTA et al., 2004).

Tabela 8: Composição do Farelo de arroz

Componentes principais (%)		Aminoácidos (%)				Vitaminas (mgKg ⁻¹)		Minerais (gKg ⁻¹)	
Matéria seca	91,0	Arginina	0,5	Lisina	0,5	Colina	1,25	Ca	0,57
Proteínas	13,0	Cisteína	0,1	Metionina	0,2	Niacina	297	Fe	0,19
Carboidratos	45,0	Glicina	0,9	Fenilalanina	0,4	Ác. Pantotênico	23,1	Mg	7,81
Gorduras	13,0	Histadina	0,2	Treonina	0,4	Riboflavina	2,64	P	16,8
Fibras	14,0	Isoleucina	0,4	Triptofano	0,1	Tiamina	22,0	K	14,9
Cinzas	16,0	Leucina	0,6	Valina	0,6	Vitamina E	49,2	Na	0,05
Celulose	24,4	Cistina	0,3	Tirosina	0,4	Vitamina B ₆	41,0	Zn	0,06
Hemicelulose	31,6	Alanina	1,0	Aspartato	1,3	Folatos	0,63	Mn	0,14
Lignina	18,4	Glutamato	1,9	Prolina	0,7	Vitamina K	0,02	Se	0,16

Fonte: SAUNDERS, 1985; CLAYE et al., 1996

O farelo de arroz vem sendo avaliado como aditivo ou substituto de certos componentes de rações animais (LEKULE et al., 2001; SCHOULTEN et al., 2003), como substrato para crescimento de fungos (WANG et al., 2003) e como substituto, ao menos em parte, da farinha de trigo na fabricação de pães e outros alimentos (LIMA et al., 2004). Alguns trabalhos utilizaram o farelo de arroz como suplemento nutricional para os microrganismos durante o cultivo com o objetivo de obter xilitol, na concentração de 10-20 gL⁻¹ (RODRIGUES et al., 2003; SILVA et al., 2007; MARTÍNEZ e SANTOS, 2012; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; VALLEJOS et al., 2016). O farelo de arroz também, vem sendo empregado em substituição do extrato de levedura na suplementação dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana de açúcar (ARRUDA et al., 2017; DASGUPTA et al., 2017), resíduos de eucalipto (CANETTIERI, et al., 2002; MORALES, 2005), palha de arroz (MUSSATO, et al., 2002; ZAHED et al., 2016), casca de aveia (FELIPE, et al., 2003) para a produção de xilitol. A suplementação com uma fonte complexa de nitrogênio, como o extrato de farelo de arroz, considerado um subproduto agroindustrial, também pode fornecer minerais e vitaminas.

Carvalho et al. (2007), avaliaram a suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por *Candida guilliermondii*, utilizando sulfato de amônio e

extrato de farelo de arroz, obtendo os melhores resultados quando suplementado com ambos os nutrientes em todos testes realizados, encontrando valores de 25,90-48,70 gL⁻¹, produtividades de 0,27-0,51 gL⁻¹h⁻¹ e rendimentos de 0,45-0,58 gg⁻¹. Na ausência de nutrientes, a produção de xilitol, a produtividade e o rendimento não ultrapassaram 12,10 gL⁻¹, 0,13 gL⁻¹h⁻¹ e 0,30 gg⁻¹, respectivamente. Hernández-Pérez et al. (2016) também estudaram a suplementação da palha de cana de açúcar na produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, utilizando nenhum suplemento; suplementado com (NH₄)₂SO₄ e suplementação completa com (NH₄)₂SO₄, extrato de farelo de arroz e CaCl₂·2H₂O, observando que a suplementação nutricional aumentou o consumo de xilose e a produção de xilitol em até 200% e 240%, respectivamente. Os resultados demonstraram um efeito combinado da suplementação nutricional e da disponibilidade inicial de oxigênio na produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar.

2.6 Experimentos fatoriais

Segundo MONTGOMERY (2001), um experimento planejado é um teste, ou uma série de testes nos quais são feitas mudanças propositalmente nas variáveis de entrada de um processo, de modo a podermos observar e identificar mudanças correspondentes na resposta de saída.

Os delineamentos em esquema fatorial 2^k ocorrem quando temos k fatores, todos com dois níveis. São do tipo inteiramente casualizados, sempre que cada um dos 2^k tratamentos for atribuído aleatoriamente às unidades experimentais, sem a formação de blocos, de quadrados latinos e assim por diante. Delineamentos desse tipo são muito utilizados em laboratórios e/ou locais onde as fontes externas são geralmente muito bem controladas. Eles apresentam uma vantagem incontestável: fornecem o maior número possível de graus de liberdade para o resíduo. Para tornar possível a execução ao menos apropriada da interferência estatística, é usual que sejam feitos alguns ensaios no ponto central do espaço experimental. Com tal procedimento estaremos viabilizando o cálculo de resíduos e, conseqüentemente, do erro padrão e então, das estimativas por intervalo, dos testes e assim por diante (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Aplicações dos planejamentos experimentais na indústria são fundamentais para desenvolvimento de novos produtos e para o controle de processos, sendo que nesta área é comum aparecer problemas em que se precisam estudar várias propriedades ao mesmo tempo que podem ser afetadas por um grande número de fatores experimentais. É papel de

técnicas de planejamento de experimentos auxiliar na fabricação de produtos com melhores características, diminuir o tempo de desenvolvimento, aumentar a produtividade de processos e minimizar a sensibilidade a fatores externos (NETO et al., 2001).

Para Neto et al., (2010), o experimento fatorial é apropriado quando dois ou mais fatores estão sendo investigados em dois ou mais níveis e a interação entre os fatores pode ser importante. Como exemplo, estudar o efeito do fator temperatura em quatro níveis, 50°C, 60°C, 70°C e 80°C, e o efeito de um catalizador em três níveis, os catalizadores A, B e C. Para fazer um planejamento completo, devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis de fatores.

2.7 Ampliação de Escala

A ampliação de escala pode ser definida como um procedimento em que os resultados experimentais com equipamentos de menor escala são empregados para projetar e construir um sistema de maior escala, sendo considerado importante passo no desenvolvimento de processos, sendo conhecido também como “scale-up” (OKONKOWSKI et al., 2005; ARRUDA et al., 2011). Este processo biotecnológico se baseia numa conversão biológica entre todas as etapas que devem ser ampliadas, sendo executada em três estágios: experimentos de bancada realizados em laboratório; planta piloto e setor industrial (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). De acordo com Okonkowski et al. (2005), existem vários fatores que devem ser considerados relevantes ao analisar a ampliação de escala até chegar ao nível industrial, dentre eles podemos citar, preparo do inóculo, esterilização e parâmetros ambientais, além destes deve se levar em consideração a geometria do fermentador, a frequência de agitação, a potência transmitida ao sistema, a transferência de oxigênio e as propriedades reológicas do fluido (SILVA et al., 1998). O preparo do inóculo tem um importante papel na estabilidade do processo, na produtividade, na qualidade do produto final e no controle todo do processo. Em relação à esterilização, e de extrema importância pois é possível haver microrganismos considerados contaminantes em um biorreator ou em um sistema de menor escala, ocasionando uma diminuição na produtividade e no rendimento do processo (ARRUDA et al., 2011). Muitas vezes é necessário durante o processo de aumento de escala utilizar antimicrobianos para diminuir essas possíveis contaminações. Os parâmetros ambientais devem ser levados em consideração pois o aumento de escala é considerado um ambiente diferente para o microrganismo, sendo que todos os parâmetros envolvidos são afetados pela agitação e

aeração, como por exemplo o controle de pH, disponibilidade de nutrientes, temperatura, formação de espuma, cisalhamento, concentração de dióxido de carbono dissolvido, teor de oxigênio dissolvido no meio, sendo este último, um dos fatores que regulam a bioconversão de xilose em xilitol (DAMIANI et al., 2014).

Os bioreatores que utilizam meio de cultura líquido, permitem a renovação do ar durante o cultivo bem como o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, etc. (TEIXEIRA, 2002), porém estes parâmetros devem ser estabelecidos em escala laboratoriais, pois o fenômeno de transporte gás-líquido é considerado um dos parâmetros mais críticos durante o processo (HUBBARD et al., 1994). O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) deve ser usado como critério para escalonar os processos que requerem oxigênio. Assim, quando o k_{LA} é mantido constante, em ambas as escalas (laboratório e planta piloto), outras variáveis (potência, frequência de agitação e diâmetro do tanque) podem ser determinadas em maior escala, com base em correlações empíricas já desenvolvidas.

De acordo com Schmidell; Facciotti, (2001), os critérios de ampliação de escala para biorreatores à ser considerados varia de processo para processo, pois dependem da especificação de cada um, sendo os mais utilizados: a constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio (P/V); a constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}), determinado por equações; constância da capacidade de bombeamento do impelidor (F_L/V); constância do número de Reynolds (N_{Re}); constância da velocidade na extremidade do impelidor (v_{Tip}) e a constância da pressão parcial ou concentração de O_2 dissolvido no meio (C). Os critérios mais utilizados pelas indústrias de fermentação são k_{LA} e o P/V , sendo o k_{LA} dependente de vários fatores como características geométricas e operacionais do biorreator, composição do meio, viscosidade, densidade, tensão superficial, concentração, morfologia do microrganismo e a área superficial das bolhas de ar (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009; DAMIANI et al., 2014).

Segundo DAMIANI et al. (2014), o método dinâmico clássico é um meio para medir k_{LA} , que requer apenas um eletrodo de oxigênio de resposta rápida, conectado à base do biorreator. O processo pode ser dividido em duas etapas, sendo que a primeira ocorre a interrupção do fornecimento de ar para o sistema, geralmente utilizando nitrogênio, até ajustar uma reta, após esta etapa o ar é retomado e começa o borbulhamento no meio de fermentação, com isso o k_{LA} pode ser determinado através da equação da reta.

Trabalhos relatam a utilização de K_{La} como critério para ampliação de escala industrial. Arruda et al. (2017) avaliaram a produção de xilitol por *Meyerozyma (Candida) guilliermondii* utilizando ampliação de escala em biorreatores com capacidade para 2,4 L, 18 L e 125 L. Rodrigues et al. (2010), avaliaram o pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar utilizando ácido sulfúrico para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, conduzidos em escala laboratorial e reatores semi-piloto, baseando-se no Fator-H, que combina temperatura e tempo de residência, permitindo estimar resultados com diferentes desenhos de reatores e podendo ser utilizado no aumento de escala na produção de hidrolisado hemicelulósico. Hickert et al. (2013), avaliaram a produção de etanol por *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* ou a combinação destas duas leveduras na conversão da composição mista de açúcar do hidrolisado de casca de arroz (RHH) como substrato em experimentos em escala laboratorial e ampliados para escala piloto, avaliando as condições de anaerobiose e limitação de oxigênio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as linhagens das espécies de leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

3.2 Objetivos específicos

- Selecionar linhagens produtoras de xilitol entre as espécies de leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*, em meio complexo contendo xilose (YPX).
- Estudar, para as leveduras selecionadas, o efeito da suplementação na bioconversão de xilose à xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.
- Estudar o efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em cultivos empregando as leveduras e condição de suplementação previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar.
- Avaliar em biorreator de bancada o desempenho da levedura que apresentou maior bioconversão de xilose em xilitol em condições previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos do Departamento de Microbiologia da UFMG e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP.

4.1 Seleção das linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e de *Wickerhamomyces rabaulensis* quanto à produção de xilitol em meio complexo.

4.1.1 Leveduras

Foram utilizadas cinco linhagens da espécie de *Cyberlindnera xylosilytica* e onze linhagens da espécie de *Wickerhamomyces rabaulensis* pertencentes à Coleção de Microrganismos Células da UFMG (Tabela 9), que estavam preservadas em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂PO₄ 0,2%) com 20% de glicerol a – 80 °C.

Tabela 9: Linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e de *Wickerhamomyces rabaulensis* utilizadas no estudo da produção de xilitol em meio complexo contendo xilose (YPX).

Levedura	Código da linhagem	Substrato de isolamento	Referência
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	UFMG-CM-Y408	Casca de árvore - Serra da Prata – Mucajai –RR	Cadete et al. (2015)
	UFMG-CM-Y309	Madeira em decomposição - São João da Balizas –RR	
	UFMG-CM-Y407	Madeira em decomposição - São João da Balizas –RR	
	UFMG-CM-Y409	Torta de filtro de cana de açúcar - Iracemápolis –SP	
	NRRL YB-2097	Excremento de inseto - Waterloo, Carolina do Sul, EUA	
<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	UFMG-CM-Y516	Madeira em decomposição – Floresta Amazônica	Cadete et al. (2017)
	UFMG-CM-Y6303	Água de lagoa – Parque estadual de Cantão –TO	Brandão et al. (2017)
	UFMG-CM-Y3696	Tecido de cactos - Parque Estadual do Sumidouro (MG), no Município de Aurora do Tocantins (TO) e no Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba (RJ)	Freitas (2014)
	UFMG-CM-Y3708		
	UFMG-CM-Y3716		
	UFMG-CM-Y3721		
	UFMG-CM-Y3734		
	UFMG-CM-Y3735		
	UFMG-CM-Y3747		
UFMG-CM-Y3754			
UFMG-CM-Y3759			

Fonte: Próprio autor

4.1.2 Curva de calibração - peso seco x densidade ótica

Para cada linhagem estudada construiu-se uma curva de calibração correlacionando a massa seca de células e densidade ótica (DO_{600nm}) em espectrofotômetro (Biospectro SP-22). Inicialmente, cada linhagem de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* foi cultivada em ágar YM (10 gL^{-1} de glicose, 5 gL^{-1} de Peptona, 3 gL^{-1} de extrato de levedura, 3 gL^{-1} de extrato de malte e 20 gL^{-1} de ágar bacteriológico) por 24 a 48h. Uma alçada dessa cultura foi transferida para frascos Erlenmeyers de 125mL com 50mL de caldo YM. Os frascos foram incubados por 24 h a 30°C em agitador horizontal (New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) a 200 rpm. Os cultivos foram feitos em duplicata. Alíquotas de 5 mL de cada cultivo foram filtradas, em triplicata, em membranas de 0,45mm (Milipore) utilizando-se bomba à vácuo. Após a filtração, as membranas foram incubadas em estufa a 60°C e pesadas diariamente até atingirem peso constante. Paralelamente, a partir do cultivo das leveduras em caldo YM, uma alíquota de 10 mL foi centrifugada a 3500 xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspendidas em 10 mL de uma solução salina (0,85%). A partir dessa suspensão de células, foram realizadas diluições nas concentrações de 1:5, 1:7, 1:10, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50 e 1:60, em que foram determinadas a densidade ótica (DO_{600nm}) em espectrofotômetro (MOURA, 2015).

4.1.3 Preparo do inóculo

As leveduras foram previamente cultivadas em 50 mL de meio YPX (D-xilose 30 gL^{-1} , peptona 20 gL^{-1} , extrato de levedura 10 gL^{-1}) e incubadas em agitador horizontal à 200 rpm e 30 °C por 24 h (ARRUDA et al., 2017; LORLIAM et al., 2017). Para a obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 xg por 15 minutos, lavadas e ressuspendidas em água destilada esterilizada. Volumes adequados destas soluções foram utilizados como inóculo de modo a se obter uma concentração celular inicial de 0,5 gL^{-1} .

4.1.4 Meio e Condições de cultivo

O meio de cultivo foi o YPX contendo 60 gL^{-1} de D-xilose, 20 gL^{-1} de peptona, 10 gL^{-1} de extrato de levedura (CADETE et al., 2015; THANCHAROEN et al., 2016; LORLIAM et al., 2017), a pH 5,5. Na preparação do meio, a D-xilose foi autoclavada separadamente e adicionada posteriormente ao meio YPX. Os cultivos foram realizados, em duplicata, em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio YPX e incubados em agitador horizontal, à $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm por 72 h. Em cada ensaio utilizou-se inóculo na concentração de $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de células preparadas de acordo com o item 4.1.3. Amostras foram retiradas em tempos regulares (0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 hs) para determinação da concentração celular por meio da curva de calibração obtida no item 4.1.2. Após a determinação da concentração celular, as amostras foram centrifugadas a $2600 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

4.2 Estudo do efeito da suplementação na bioconversão de xilose à xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar

4.2.1 Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar foi gentilmente cedido pela professora Dra. Rita de Cássia L. B. Rodrigues, do Departamento de Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP), Lorena, SP, sendo obtido por hidrólise ácida conduzido em reator de aço inox de 100 L a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ por 20 minutos utilizando-se ácido sulfúrico 98% na proporção 1:10 (100 mg de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{g}$ de bagaço). Após esta etapa, foi filtrado e concentrado à vácuo em duas vezes seu volume inicial à $70 \text{ }^\circ\text{C}$. A seguir, o hidrolisado hemicelulósico foi tratado pelo método de elevação e abaixamento de pH. Inicialmente, o pH 0,37 foi elevado para pH 7 com a adição de óxido de cálcio, sem seguida, filtrado em papel de filtro com 80 g/m^2 de gramatura, $205 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura e poros de $14 \text{ }\mu\text{m}$. Posteriormente, corrigiu-se o pH para 5,5 com ácido fosfórico concentrado, e filtrou-se nas mesmas condições já descritas (papel de filtro com 80 g/m^2 de gramatura, $205 \text{ }\mu\text{m}$ de espessura e poros de $14 \text{ }\mu\text{m}$). A seguir adicionou-se 2,5 g de carvão ativado para cada 100 mL de hidrolisado, e o mesmo foi mantido a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ sob agitação de 200 rpm por uma hora,

seguida de uma terceira filtração. O hidrolisado previamente tratado (parcialmente destoxificado) foi autoclavado à 111° C e 0,5 atm, por 15 minutos (ALVES et al., 1998). Uma alíquota foi retirada para análises posteriores de açúcares e ácido acético por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

4.2.2 Metodologia estatística: avaliação da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

A suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar previamente tratado (item 4.2.1) foi de acordo com planejamento fatorial 2^3 com quatro repetições no ponto central. A escolha dos níveis foi baseada em trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. Os nutrientes avaliados foram sulfato de amônio (0-2 gL⁻¹), extrato de farelo de arroz (5,0-10,0 gL⁻¹) (SILVA, 2001; CANETTI, 2002; ARRUDA, 2011; GUAMÁN-BURNEO et al., 2015) e/ou extrato de levedura (1,0-2,0 gL⁻¹) (SANTOS, et al., 2012) (Tabelas 10 e 11).

Os níveis dos fatores foram codificados de acordo com a equação 1 (BARROS-NETO et al., 1995):

$$X = \frac{V_R - \sum V_R/2}{(V_{R_2} - V_{R_1})/2} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: X é o valor codificado da variável;

V_R é o valor real da variável;

$\sum V_R/2$ é a média dos valores reais da variável;

V_{R_1} é o valor real mínimo da variável;

V_{R_2} é o valor real máximo da variável.

Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a ocorrência de erros sistemáticos.

Tabela 10: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo para suplementação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Fatores	Níveis*		
	-1	0	+1
Sulfato de amônio (gL^{-1}) (X_1)	0,00	1,00	2,00
Extrato de farelo de arroz (gL^{-1}) (X_2)	5,00	7,50	10,00
Extrato de levedura (gL^{-1}) (X_3)	1,00	1,50	2,00

*Os níveis correspondem a uma faixa em que -1 corresponde ao nível inferior, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior.

Tabela 11: Planejamento fatorial 2^3 , com quatro repetições no ponto central, para a avaliação do efeito da suplementação do hidrolisado na produção de xilitol pelas leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	X_1	X_2	X_3	X_1 (gL^{-1})	X_2 (gL^{-1})	X_3 (gL^{-1})
1	-1	-1	-1	0,00	5,00	1,00
2	+1	-1	-1	2,00	5,00	1,00
3	-1	+1	-1	0,00	10,00	1,00
4	+1	+1	-1	2,00	10,00	1,00
5	-1	-1	+1	0,00	5,00	2,00
6	+1	-1	+1	2,00	5,00	2,00
7	-1	+1	+1	0,00	10,00	2,00
8	+1	+1	+1	2,00	10,00	2,00
9	0	0	0	1,00	7,50	1,50
10	0	0	0	1,00	7,50	1,50
11	0	0	0	1,00	7,50	1,50
12	0	0	0	1,00	7,50	1,50

4.2.2.1 Preparo do extrato do farelo de arroz

Para o extrato de farelo de arroz (200 gL^{-1}) preparou-se uma suspensão contendo 200 g de farelo com adição de 1 L de água destilada. A seguir, essa suspensão foi autoclavada por 15 min à 0,5 atm, esfriada e centrifugada em condições assépticas a 2000 xg por 15 min. A fração líquida (extrato) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e armazenada a 4°C no máximo por uma semana, antes de sua utilização (ALVES et al., 1998; RODRIGUES, 1999).

4.2.3 Condições de cultivo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar previamente tratado (item 4.2.1) contendo em média 40 gL^{-1} de xilose, $5,0 \text{ gL}^{-1}$ de glicose, $1,05 \text{ gL}^{-1}$ de arabinose, $3,0 \text{ gL}^{-1}$ de ácido acético e pH 5,5. A seguir, os cultivos foram suplementados de acordo com o item 4.2.2 e inoculados com $0,5 \text{ gL}^{-1}$ de células (item 4.1.3) e incubados em agitador horizontal, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 200 rpm por 120 h. Amostras (1,5 mL) foram retiradas em tempos regulares (0, 24, 48, 72, 96 e 120 h) para determinar a concentração celular por meio da curva de calibração obtida no item 4.1.2. Após a determinação da concentração celular, as amostras foram centrifugadas a $2600 \times g$ por 10 min e o sobrenadante foi armazenado a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para posteriores análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.3 Estudo do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar.

Após a seleção das melhores leveduras produtoras de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar e adequação da suplementação nutricional avaliou-se também em hidrolisado o efeito da concentração inicial de células e disponibilidade de oxigênio. Nesta etapa utilizou-se condições de obtenção de inóculo semelhante ao item 4.1.3. O meio e condições de cultivos foram de acordo com o item 4.2. A suplementação foi de acordo com os resultados obtidos no item 4.2 - farelo de arroz (10 gL^{-1}) e extrato de levedura (1 gL^{-1}).

4.3.1 Metodologia estatística: avaliação do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar

Os ensaios foram realizados de acordo com planejamento fatorial 2^2 com quatro repetições no ponto central. Os fatores avaliados foram concentração inicial de células ($1-10 \text{ gL}^{-1}$) e variação do volume de meio de cultivo (25-75 mL) em frascos Erlenmeyers de 125 mL visando alterar a disponibilidade e oxigênio dissolvido no meio de fermentação (Tabelas 12 e 13). A escolha dos níveis foi baseada em trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de

Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Os níveis dos fatores foram codificados de acordo com a equação geral (BARROS-NETO et al., 1995) (Equação 1) apresentada no item 4.2.2.

Tabela 12: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo para avaliação do efeito da concentração inicial de células em associação com a disponibilidade de oxigênio em hidrolisado hemicelulósico de bagaço cana de açúcar.

Fatores	Níveis*		
	-1	0	+1
Volume de Meio (mL) (X_1)	25,00	50,00	75,00
Concentração celular (gL^{-1}) (X_2)	1,00	5,00	10,00

*Os níveis correspondem a uma faixa em que -1 corresponde ao nível inferior, 0 corresponde ao nível intermediário e +1 ao nível superior.

Tabela 13: Planejamento fatorial 2^2 , com quatro repetições no ponto central, para a avaliação do efeito do volume de meio e da concentração celular do hidrolisado na produção de xilitol pelas leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais	
	X_1	X_2	X_1 (mL)	X_2 (gL^{-1})
1	-1	-1	25,00	1,00
2	+1	-1	75,00	1,00
3	-1	+1	25,00	10,00
4	+1	+1	75,00	10,00
5	0	0	50,00	5,00
6	0	0	50,00	5,00
7	0	0	50,00	5,00
8	0	0	50,00	5,00

Os ensaios foram executados em ordem aleatória para minimizar a ocorrência de erros sistemáticos.

4.4 – Avaliação em biorreator de bancada do desempenho da levedura que apresentou maior bioconversão de xilose em xilitol em condições previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

4.4.1 Características gerais do biorreator

O biorreator possui volume útil de 2,0 L (Biostat A – Sartorius, Figura 10) equipado com sensores de temperatura, pH e oxigênio dissolvido (Endress Hauser). Também possui acoplados medidores e reguladores da frequência de agitação e da vazão de aeração, que são controlados por um sistema computacional (Sartorius Stedim – Biotech).



Figura 10: Ilustração do biorreator – Biostat A - Sartorius.

Foram utilizadas duas turbinas tipo “flat blade”, com seis pás planas cada, sendo que a primeira turbina se situou logo acima do dispersor de ar. O ar esterilizado foi introduzido para o meio fermentativo através de um dispersor de ar do tipo anel. Existem filtros absolutos para a esterilização do ar (0,20 μm - Politetrafluoretileno) à entrada e saída do reator, a fim de evitar que a umidade fosse arrastada pela corrente gasosa.

4.4.2 Preparo do Inóculo e meio de cultivo

Foram realizados testes preliminares em meio complexo contendo 60 gL^{-1} de xilose como fonte de carbono e suplementado com extrato de levedura (1 gL^{-1}) e farelo de arroz (10 gL^{-1}), para acertar condições de cultivo com menor formação de espuma, para isso foi utilizado o antiespumante Tween 80. O meio de cultivo foi preparado com o hidrolisado hemicelulósico concentrado e tratado de acordo com os itens 4.2. Em seguida foi adicionado os nutrientes, extrato de levedura (1 gL^{-1}) e extrato de farelo de arroz (10 gL^{-1}) nas concentrações otimizadas no item 4.2, 0,01% de cloranfenicol e 0,5% de Tween 80. A concentração inicial de inóculo foi a otimizada no item 4.3 (1 gL^{-1}).

4.4.2.1 Condições de Cultivo

As fermentações foram realizadas em reator de bancada modelo Biostat A (Figura 11) utilizando 1,0 L de meio de cultivo (hidrolisado ou meio complexo). Foram mantidas constantes os valores de temperatura ($30 \text{ }^{\circ}\text{C}$) com monitoramento do pH e oxigênio dissolvido. Para avaliação do efeito da k_{La} inicial (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio dissolvido) na bioconversão de xilose em xilitol em processo descontínuo foram utilizadas diferentes valores de frequência de agitação e vazão de ar (Tabela 14). Amostras (3 mL) foram retiradas em tempos regulares (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 e 144 h) para acompanhamento do crescimento celular, açúcares e contaminantes por meio de microscopia.

Tabela 14: Variações da vazão de ar e frequência de agitação e seus respectivos valores de k_{La} .

Ensaio	Condições		
	Aeração (vvm)	Agitação (rpm)	k_{La} (h^{-1})
Meio complexo – D-xilose	0,65	200	13,68
Meio complexo – D-xilose	0,80	350	22,32
Meio complexo – D-xilose	0,85	450	29,88
F1 – Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	0,75	350	21,60
F2 - Hidrolisado Hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar	0,85	450	35,64

4.5 Métodos analíticos

4.5.1 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, etanol e xilitol

As concentrações de xilose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol em meio YPX e glicose, xilose, arabinose, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol presentes no hidrolisado de bagaço de cana de açúcar foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu (Shimadzu, Japão). As amostras provenientes dos cultivos em meio YPX foram filtradas em membrana de acetato de celulose (Sartorius), com 0,22 μm e D13mm e as amostras contendo hidrolisado foram previamente diluídas e filtradas em filtro Sep-Pak C18 (Millipore) e analisadas utilizando-se as seguintes condições: coluna Supelco Analytica C-610 H, mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 μL ; detector de índice de refração RID 10-A; fase móvel H_2SO_4 5mM como eluente e fluxo de 0,6 mL/min. (MOURA 2015).

4.5.2 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}).

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{LA}) foi determinado através da metodologia de gassing-out, segundo Pirt (1975). Inicialmente o meio de cultivo, nas condições de trabalho pré-estabelecidas, isento de células foi aerado com nitrogênio, com o objetivo zerar a % de oxigênio dissolvido no meio. Logo após o meio foi agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração da % de oxigênio dissolvido em função do tempo. Por integração da equação de oxigênio no meio líquido (Equação 2) foi possível obter a relação apresentada na equação 3.

$$\frac{dC}{dt} = k_{\text{L}}a (C^* - C) \quad (\text{Equação 2})$$

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_{\text{L}}a * t \quad (\text{Equação 3})$$

$\frac{C}{C^*}$: corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação)

O gráfico do logaritmo de $\left(1 - \frac{C}{C^*}\right)$ em função do tempo permite a determinação do valor de k_{LA} em h^{-1} .

4.5.3 Cálculo dos parâmetros de conversão

4.5.3.1 Fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$)

O fator de conversão de substrato em produto ou fator de rendimento, que expressa a massa de xilitol produzida pela massa de xilose consumida, foi calculado conforme a equação 4

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (\text{Equação 4})$$

Na qual:

ΔP = Concentração inicial e final de xilitol (gL^{-1})

ΔS = Concentração inicial e final de xilose (gL^{-1})

4.5.3.2 Produtividade volumétrica (Q_p)

A produtividade volumétrica em xilitol, que expressa a quantidade de xilitol produzida (gL^{-1}) por tempo (h), foi calculada pela equação 5:

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (\text{Equação 5})$$

Na qual:

ΔP = Concentração inicial e final de xilitol (gL^{-1})

Δt = Tempo inicial e final de produção do xilitol (h).

4.5.3.3 Eficiência ($\eta\%$)

Este parâmetro, expresso em %, representa a razão entre o fator de rendimento ($Y_{p/s}$) obtido experimentalmente e o fator de rendimento máximo teórico, de 0,917 g de xilitol por g de xilose consumida (Equação 6) (BARBOSA et al., 1988).

$$\eta = \left(\frac{Y_{p/s} \text{ obtido}}{Y_{p/s} \text{ teórico}} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Na qual:

η = Eficiência de conversão (%)

$Y_{p/s}$ teórico = 0,917 g xilitol/g xilose consumida.

4.5.4 Cálculo dos parâmetros cinéticos.

A velocidade específica de crescimento tem seu valor máximo na fase exponencial da curva de crescimento, onde a ação do metabolismo do microrganismo se dá de forma mais acentuada e efetiva. Para o estudo cinético do processo fermentativo, as velocidades instantâneas de crescimento celular (dx/dt), consumo de substrato ($-ds/dt$) e formação de xilitol (dp/dt) foram calculadas pelo método de Le Duy e Zajic (1973). Para se obter as velocidades específicas de crescimento (μ_x), de consumo de D-Xilose (μ_s) e de produção de etanol (μ_p), dividiu-se as velocidades instantâneas pela concentração celular nos pontos em que se calcularam as derivadas.

4.6 Análises estatísticas

Para análise e compreensão dos resultados, utilizando meio complexo (item 4.1), foram utilizados o método ANOVA (teste F) seguido de análise do intervalo de confiança para as médias dos tratamentos, utilizando-se probabilidade de erro de 5% ($\alpha=0,05$). As pressuposições da ANOVA (normalidade, independência e homogeneidade de variâncias do resíduo) foram testadas para todos os resultados apresentados. Os efeitos cujo p-valor foi menor que α foram considerados significativos em causar variação nas respostas estudadas. O p-valor é a probabilidade real de erro associada à rejeição da hipótese de nulidade em um teste estatístico. A análise estatística dos resultados para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar foi realizada através do programa STATISCA versão 6.0 e o modelo de segunda ordem foi ajustado usando o software Design-Expert, e as superfícies de resposta foram plotadas a partir do programa STATISCA versão 6.0. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de Student e tabelas de análise de variância com colunas de causa de variância (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ) quadrado médio (QM), teste F e nível de significância (ρ).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Conversão de Xilose em Xilitol em meio complexo.

Para avaliar a conversão de xilose foram realizados experimentos em meio YPX contendo 60 gL^{-1} de xilose inicial (DUSSÁN et al., 2016). Esta concentração de xilose foi aplicada por já ter sido relatada na literatura como uma das mais favoráveis condições para obtenção de bons resultados na produção de xilitol. Valores superiores a este, como acima de 100 gL^{-1} , prejudicam a viabilidade celular de muitas espécies de leveduras devido ao estresse osmótico causado pelo excesso de açúcar no meio (EL-BRAZ et al., 2011). Os parâmetros de conversão selecionados para análise estatística foram referentes aos resultados encontrados a 48 e 72 horas de cultivo para todas as linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* (Tabelas 15 e 16). As Tabelas com todos os dados encontrados em todos os tempos amostrados para cada linhagem estão no APÊNDICE 1 e as análises estatísticas estão no APÊNDICE 2.

Os melhores parâmetros fermentativos foram obtidos em tempos que variam de 48 a 72 horas. Para 48 horas de cultivo, as leveduras que se destacaram estatisticamente em relação à conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica são: *Cyberlindnera xylosilytica* UFMG-CM-Y407 ($0,90 \text{ gg}^{-1}$ e $0,59 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$, respectivamente), UFMG-CM-Y409 ($0,83 \text{ gg}^{-1}$ e $0,58 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), UFMG-CM-Y309 ($0,78 \text{ gg}^{-1}$, $0,60\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$); e *Wickerhamomyces rabaulensis* UFMG-CM-Y6303 ($0,74\text{gg}^{-1}$, $0,73 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), UFMG-CM-Y3716 ($0,70 \text{ gg}^{-1}$, $0,71\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e UFMG-CM-Y3747 ($0,72 \text{ gg}^{-1}$, $0,82 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$). Para 72 horas de cultivo podemos destacar as leveduras: *Cyberlindnera xylosilytica* UFMG-CM-Y309 ($0,87 \text{ gg}^{-1}$, $0,65 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$), UFMG-CM-Y409 ($0,84 \text{ gg}^{-1}$, $0,59 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$); e *Wickerhamomyces rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 ($0,71 \text{ gg}^{-1}$, $0,55\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e UFMG-CM-Y3747 ($0,66 \text{ gg}^{-1}$, $0,52\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1}$). Diante de tais resultados, foram selecionadas duas leveduras de cada espécie para os testes subsequentes, as linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de *Cyberlindnera xylosilytica* e UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747 de *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Tabela 15: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL⁻¹ de xilose, inóculo de 0,5 gL⁻¹, em 48 hs de cultivo das linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Espécie	Linhagem	Biomassa (gL ⁻¹)	Xilitol (gL ⁻¹)	Etanol (gL ⁻¹)	Consumo de xilose %	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	Q _p (gL ⁻¹ ·h ⁻¹)	η (%)
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	UFMG-CM-Y408	2,79	21,36±0,210	0,75	54,60	0,65±0,0018 ^{e,f,g,h}	0,45±0,0044 ⁱ	70,91
	UFMG-CM-Y309	3,92	29,03±0,212	0,00	60,88	0,78±0,0260 ^{b,c}	0,60±0,0044 ^{e,f,g}	84,87
	UFMG-CM-Y409	3,88	28,01±0,495	0,00	54,47	0,83±0,0200 ^b	0,58±0,0100 ^g	90,85
	UFMG-CM-Y407	2,81	28,52±0,198	0,00	52,37	0,90±0,0340 ^a	0,59±0,0041 ^{f,g}	97,80
	NRRL YB 2097	3,56	25,05±0,240	0,00	60,39	0,68±0,0016 ^{d,e,f}	0,52±0,0050 ^h	74,12
<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	UFMG-CM-Y516	3,97	30,17±0,200	0,00	75,13	0,66±0,0194 ^{e,f,g}	0,63±0,0040 ^{d,e,f}	71,99
	UFMG-CM-Y6303	4,07	35,22±0,792	0,00	77,69	0,74±0,0230 ^{c,d}	0,73±0,0165 ^b	80,45
	UFMG-CM-Y3696	8,30	30,63±0,495	1,22	88,14	0,58±0,0041 ⁱ	0,64±0,0100 ^{d,e}	63,59
	UFMG-CM-Y3708	6,40	31,96±0,820	1,00	87,04	0,61±0,0140 ^{f,g,h,i}	0,67±0,0171 ^d	67,23
	UFMG-CM-Y3716	8,56	34,07±0,240	0,00	82,72	0,70±0,0039 ^{d,e}	0,71±0,0050 ^c	75,79
	UFMG-CM-Y3721	6,89	30,74±0,728	1,15	86,32	0,60±0,0110 ^{g,h,i}	0,60±0,0150 ^{d,e}	65,27
	UFMG-CM-Y3734	8,39	27,43±0,438	0,00	68,95	0,64±0,0103 ^{e,f,g,h,i}	0,57±0,0091 ^g	69,91
	UFMG-CM-Y3735	9,67	32,04±0,283	0,98	87,88	0,61±0,0066 ^{g,h,i}	0,67±0,0059 ^{c,d}	66,58
	UFMG-CM-Y3747	8,65	39,29±0,806	0,00	90,09	0,72±0,0041 ^{d,e}	0,82±0,0170 ^a	73,52
	UFMG-CM-Y3754	8,77	31,39±0,516	2,48	90,36	0,59±0,0100 ^{h,i}	0,65±0,0110 ^d	63,95
UFMG-CM-Y3759	8,74	35,19±0,632	0,0	86,01	0,66±0,0180 ^{e,f,g}	0,73±0,0132 ^b	71,44	

Y_{p/s}; Q_p, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol. Como F calc > F5% pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade (p≤0,05). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Tabela 16: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL⁻¹ de xilose, inóculo de 0,5 gL⁻¹, em 72 hs de cultivo, das linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Espécie	Linhagem	Biomassa (gL ⁻¹)	Xilitol (gL ⁻¹)	Etanol (gL ⁻¹)	Consumo de xilose %	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	η (%)
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	UFMG-CM-Y408	4,67	36,95±0,521	0,76	77,14	0,80±0,030 ^{b,c}	0,51±0,0072 ^d	86,82
	UFMG-CM-Y309	7,85	46,87±0,4667	0,00	87,92	0,87±0,0149 ^a	0,65±0,0065 ^a	94,88
	UFMG-CM-Y409	7,05	42,36±0,792	0,00	81,87	0,84±0,020 ^{a, b}	0,59±0,0110 ^b	91,42
	UFMG-CM-Y407	4,15	36,90±0,226	0,00	80,88	0,75±0,0061 ^{c,d}	0,51±0,0031 ^{d,e}	81,94
	NRRL YB 2097	5,12	37,19±0,579	0,00	82,74	0,74±0,0138 ^{c,d}	0,52±0,0081 ^d	80,32
<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	UFMG-CM-Y516	5,70	33,32±0,775	0,00	89,69	0,61±0,0190 ^{f,g,h}	0,46±0,0110 ^{f,g}	66,60
	UFMG-CM-Y6303	6,16	34,95±0,7885	0,00	91,51	0,62±0,0160 ^{f,g}	0,48±0,0110 ^{e,f}	67,68
	UFMG-CM-Y3696	11,21	30,69±0,325	1,80	91,57	0,55±0,0110 ⁱ	0,43±0,0045 ⁱ	59,77
	UFMG-CM-Y3708	9,55	33,84±0,088	1,53	93,87	0,60±0,0010 ^{f,g,h,i}	0,47±0,0012 ^{f,g}	65,93
	UFMG-CM-Y3716	11,31	39,66±0,085	0,00	94,58	0,71±0,0014 ^{d,e}	0,55±0,0012 ^c	77,16
	UFMG-CM-Y3721	10,26	34,59±0,127	2,50	96,10	0,60±0,0078 ^{f,g,h}	0,48±0,0018 ^f	65,97
	UFMG-CM-Y3734	14,88	31,29±0,778	1,14	86,60	0,58±0,0210 ^{g,h,i}	0,43±0,0110 ^{h,i}	63,22
	UFMG-CM-Y3735	16,72	30,87±0,608	1,43	93,57	0,55±0,0139 ^{h,i}	0,43±0,0084 ⁱ	60,24
	UFMG-CM-Y3747	14,82	37,67±0,042	0,59	93,31	0,66±0,0044 ^{e,f}	0,52±0,0010 ^{c,d}	72,32
	UFMG-CM-Y3754	11,93	31,95±0,078	3,43	96,76	0,56±0,0034 ^{h,i}	0,44±0,0011 ^{g,h,i}	60,78
UFMG-CM-Y3759	10,22	33,03±0,332	0,00	93,39	0,57±0,0070 ^{g,h,i}	0,46±0,0046 ^{f,g,h}	61,75	

Y_{p/s}; Q_p, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol. Como F calc > F5% pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade (p≤0,05). As médias indicadas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo Teste de Tukey (p≤0,05).

Na presença apenas de xilose como fonte de carbono, todas as leveduras avaliadas produziram preferencialmente xilitol, algumas delas conseguiram produzir uma pequena quantidade de etanol. Leveduras que possuem a enzima XR estritamente dependente de NADPH, ou com baixa atividade na presença de NADH, produzem xilitol como produto principal do metabolismo da D-xilose. As leveduras que apresentam XR com utilização de dois cofatores podem oxidar NADH a NAD⁺ nesta etapa, reduzindo a formação de xilitol e permitindo que a via metabólica de D-xilose prossiga até a formação do etanol (CADETE et al., 2014; CADETE et al., 2016). A partir dos resultados apresentados, pode-se inferir que as leveduras avaliadas podem possuir o primeiro tipo de XR citado, produzindo xilitol como principal produto do metabolismo da D-xilose.

Linhagens de *C. xylosilytica* produziram de 37 a 47 gL⁻¹ de xilitol, tendo destaque a linhagem UFMG-CM-Y309 com uma produção de 46,87 gL⁻¹, consumo de 87,92% de xilose, $Y_{p/s} = 0,87 \text{ gg}^{-1}$, $Q_p = 0,65 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e eficiência de 94,88%, (Tabela 16). Linhagens de *Cyberlindera xylosilytica* também foram testadas por CADETE et al., (2015), utilizando-se 50 gL⁻¹ de xilose, 10 gL⁻¹ de extrato de levedura e 20 gL⁻¹ de peptona. Em 72 horas de cultivo observou-se um consumo de xilose de 86 a 94 % e produção de xilitol em torno de 33,02 gL⁻¹, $Y_{p/s} = 0,726 \text{ gg}^{-1}$ e $Q_p = 0,459 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Guamán-Burneo et al. (2015), cultivaram uma linhagem de *Cyberlindnera galapagoensis* em um meio contendo 50 gL⁻¹ de xilose, 20 gL⁻¹ de extrato de farelo de arroz, 2 gL⁻¹ de sulfato de amônio e 0,1 gL⁻¹ de cloreto de cálcio e uma concentração celular de 1 gL⁻¹ em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio a 200 rpm e 30° C por 72 h, obtendo 17,01 gL⁻¹ de xilitol, $Y_{p/s}, 0,50 \text{ gg}^{-1}$ e $Q_p, 0,23 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Linhagens de *W. rabaulensis* produziram em torno de 30-39,66 gL⁻¹ de xilitol e $Y_{p/s} 0,55-0,71 \text{ gg}^{-1}$, destacando-se a linhagem UFMG-CM-Y3716 para uma produção de xilitol de 39,66 gL⁻¹ e $Y_{p/s} 0,71 \text{ gg}^{-1}$. (Tabela 16). Junyapate et al. (2014) ao utilizar 10 gL⁻¹ de xilose, 3,4 gL⁻¹ de KH₂PO₄, 6,5 gL⁻¹ de K₂HPO₄, 1gL⁻¹ de sulfato de amônio, 1,1 gL⁻¹ de sulfato de magnésio e 5 gL⁻¹ de extrato de levedura, pH 6,0, sob agitação a 100 rpm por 72 h encontraram valores de produção de xilitol de 1,78-2,0 gL⁻¹ e $Y_{p/s} 0,17-0,19 \text{ gg}^{-1}$ para *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Entre as 16 linhagens testadas, duas de cada espécie foram selecionadas com base na análise estatística realizada com ANOVA ($p \leq 0,05$) utilizando parâmetros como rendimento de xilitol ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p). As leveduras que

foram estatisticamente significativas e consideradas como as melhores produtoras de xilitol foram *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747. Estas leveduras foram utilizadas para os testes subsequentes na presença de hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar.

5.2 Planejamento fatorial 2³ para selecionar fontes de nitrogênio adequadas para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana

Uma vez que a bioconversão de xilose por leveduras é um processo influenciado pela espécie/linhagem do microrganismo utilizado, pH, temperatura, agitação, oxigenação, concentração e tipo de açúcar, concentração inicial de células e suplementação do meio com nutrientes (SILVA et al., 2012; DUSSÁN et al., 2016; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; MARTINI et al., 2016; VERAS et al., 2017). Devido a composição da biomassa vegetal variar de acordo com a matéria-prima, é necessário a utilização de substâncias que têm a finalidade de melhorar o crescimento microbiano e acelerar o metabolismo durante o processo fermentativo. Diante disso esta etapa tem a finalidade de avaliar a influência da suplementação na produção de xilitol em hidrolisado por linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. O estudo de diferentes fontes de nitrogênio como sulfato de amônio (X_1 - 0-2 gL⁻¹), extrato de farelo de arroz (X_2 - 5,0-10,0 gL⁻¹), e extrato de levedura (X_3 - 1,0-2,0 gL⁻¹) foi realizado por meio de um planejamento fatorial completo 2³. Os resultados dos ensaios para cada linhagem e suplementação nos tempos de 72, 96 e 120 horas de cultivo encontram-se detalhados no APÊNDICE 3.

A utilização do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar foi estudada como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol. A composição deste material, previamente verificada por análise de cromatografia, foi de aproximadamente 40 gL⁻¹ de xilose, 5gL⁻¹ de glicose, 2,65 gL⁻¹ de ácido acético, 0,06 gL⁻¹ de furfural e 0,05 gL⁻¹ de hidroximetilfurfural mesmo após o tratamento com carvão ativado. Apesar da presença destes compostos tóxicos foi possível a utilização deste hidrolisado como matéria-prima para a produção biotecnológica de xilitol. Os valores de açúcares e compostos inibitórios foram próximos aos valores encontrados em outros trabalhos utilizando os mesmos processos de hidrólise e destoxificação (SILVA; FELIPE 2006; THANCHAROEN et al., 2016; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016). A xilose foi o monossacarídeo de maior concentração, favorecendo o processo de bioconversão de xilose em xilitol.

A Tabela 17 apresenta os valores reais e codificados das variáveis independentes, concentração de sulfato de amônio (S, X_1), concentração de extrato de farelo de arroz (F, X_2) e concentração de extrato de levedura (E, X_3) e os valores de produção de xilitol em cada um dos ensaios do planejamento fatorial. Para cada levedura foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2^3 (ensaios 01 a 08) e 4 repetições no ponto central (PC1, PC2, PC3 e PC4). Nesta etapa, visando à melhoria da produção de xilitol por estas leveduras, foi possível selecionar fatores e interações que foram significativos ao nível de 95% de confiança. Os melhores valores para a produção de xilitol por estas leveduras foram obtidos no tempo de 72 horas de cultivo (Tabela 17).

Tabela 17: Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2^3 com 4 repetições no ponto central para os três fatores (X_1 , X_2 e X_3) e respostas para cada levedura (Y_1 , Y_2 , Y_3 e Y_4) no tempo de 72h.

Ensaio	S (gL^{-1}) X_1	F* (gL^{-1}) X_2	E* (gL^{-1}) X_3	X_1	X_2	X_3	<i>Cyberlindnera xylosylitica</i>		<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i> .		
							UFMG-CM- Y309 Xilitol (gL^{-1}) Y_1	UFMG-CM- Y409 Xilitol (gL^{-1}) Y_2	UFMG-CM- Y3716 Xilitol (gL^{-1}) Y_3	UFMG-CM- Y3747 Xilitol (gL^{-1}) Y_4	
Planejamento Fatorial 2^3	1	0,0	5,0	1,0	-1	-1	-1	9,89±0,133	14,01±0,611	1,94±0,101	2,38±0,041
	2	2,0	5,0	1,0	+1	-1	-1	9,37±0,222	12,01±0,082	1,96±0,093	2,48±0,042
	3	0,0	10,0	1,0	-1	+1	-1	11,97±0,813	14,06±0,083	2,09±0,162	2,56±0,012
	4	2,0	10,0	1,0	+1	+1	-1	10,12±0,574	12,34±0,231	2,54±0,302	3,96±0,095
	5	0,0	5,0	2,0	-1	-1	+1	11,11±0,765	12,38±0,185	2,63±0,893	3,35±0,281
	6	2,0	5,0	2,0	+1	-1	+1	9,75±0,143	12,64±0,392	3,10±0,714	3,92±0,093
	7	0,0	10,0	2,0	-1	+1	+1	9,55±0,921	13,05±0,784	3,66±0,952	3,82±0,012
	8	2,0	10,0	2,0	+1	+1	+1	9,30±0,712	13,41±0,593	3,41±0,413	4,10±0,073
Ponto central	PC1	1,0	7,50	1,50	0	0	0	10,23±0,043	12,51±0,082	3,38±0,671	4,30±0,074
	PC2	1,0	7,50	1,50	0	0	0	9,64±0,421	12,95±0,784	2,22±0,402	3,45±0,281
	PC3	1,0	7,50	1,50	0	0	0	9,76±0,062	13,16±0,781	3,54±0,333	3,45±0,144
	PC4	1,0	7,50	1,50	0	0	0	9,70±0,083	13,73±0,393	2,54±0,301	3,45±0,351

Concentração de sulfato de amônio (S, X_1), concentração de extrato de farelo de arroz (F*, X_2) e concentração de extrato de levedura (E*, X_3). Linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 pertencem à espécie *Cyberlindnera xylosylitica* e UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747 pertencem à espécie *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Em geral, a produção de xilitol por *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 foi maior do que a produção pelas linhagens de *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Em todos os casos, os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, em média, $9,83\pm 0,269$, $13,09\pm 0,507$, $2,92\pm 0,640$ e $3,66\pm 0,425$ gL^{-1} de xilitol para as leveduras UFMG-CM-Y309, UFMG-CM-Y409 (*Cyberlindnera xylosilytica*), UFMG-CM-Y3716, UFMG-CM-Y3747 (*Wickerhamomyces rabaulensis*), respectivamente, indicando uma boa repetibilidade do processo (Tabela 17). A Tabela 18 apresenta as estimativas dos efeitos dos fatores e interações para a produção de xilitol (gL^{-1}) por essas leveduras.

Tabela 18: Estimativas dos efeitos dos fatores e interações para a produção de xilitol (gL^{-1}) pelas leveduras UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747 (*Wickerhamomyces rabaulensis*), UFMG-CM-Y309, UFMG-CM-Y409 (*Cyberlindnera xylosilytica*).

Leveduras	Fatores	Efeitos e erro padrão	p – valor
UFMG-CM-Y3716 <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	Média	$2,75\pm 0,16$	-
	X ₁ (L)	$0,173\pm 0,39$	0,681
	X ₂ (L)	$0,518\pm 0,39$	0,248
	X ₃ (L)	$1,068\pm 0,39$	0,043
	X ₁ X ₂	$-0,073\pm 0,39$	0,862
	X ₁ X ₃	$-0,063\pm 0,39$	0,881
	X ₂ X ₃	$0,153\pm 0,39$	0,716
UFMG-CM-Y3747 <i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>	Média	$3,43\pm 0,14$	-
	X ₁ (L)	$0,588\pm 0,34$	0,146
	X ₂ (L)	$0,578\pm 0,34$	0,152
	X ₃ (L)	$0,953\pm 0,34$	0,039
	X ₁ X ₂	$0,253\pm 0,34$	0,493
	X ₁ X ₃	$-0,163\pm 0,34$	0,655
	X ₂ X ₃	$-0,253\pm 0,34$	0,493
UFMG-CM-Y309- <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	$10,03\pm 0,14$	-
	X ₁ (L)	$-0,995\pm 0,35$	0,035
	X ₂ (L)	$0,205\pm 0,35$	0,580
	X ₃ (L)	$-0,41\pm 0,35$	0,290
	X ₁ X ₂	$-0,055\pm 0,35$	0,880
	X ₁ X ₃	$0,19\pm 0,35$	0,607
	X ₂ X ₃	$-1,21\pm 0,35$	0,018
UFMG-CM-Y409- <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	$13,02\pm 0,12$	-
	X ₁ (L)	$-0,775\pm 0,28$	0,041
	X ₂ (L)	$0,455\pm 0,28$	0,169
	X ₃ (L)	$-0,235\pm 0,28$	0,444
	X ₁ X ₂	$0,095\pm 0,28$	0,751
	X ₁ X ₃	$1,085\pm 0,28$	0,012
	X ₂ X ₃	$0,265\pm 0,28$	0,392

Na triagem inicial dos fatores e interações que foram significativos ao nível de 95 % de confiança (Tabela 18) observou-se que para as leveduras UFMG-CM-Y3716 e UFMG-CM-Y3747, ambas da espécie *Wickerhamomyces rabaulensis*, somente a adição de extrato de levedura (X_3) foi significativa ao nível de 95 % de confiança ($p < 0,05$). Em ambos os casos esse nutriente favoreceu a produção de xilitol quando sua concentração no meio de cultivo foi aumentada de seu nível -1 ($1,0 \text{ gL}^{-1}$) para o seu nível +1 ($2,0 \text{ gL}^{-1}$). No entanto, estas leveduras produziram baixas concentrações de xilitol ($< 4,5 \text{ gL}^{-1}$) após 72 horas de cultivo (Tabela 17), mesmo apresentando a maior produção de xilitol ($39,66 \text{ gL}^{-1}$) durante a triagem com meio complexo. Estes resultados indicam que para estas leveduras a produção de xilitol poderá ser melhorada com o aumento da concentração desta fonte de nitrogênio no meio de cultivo, bem como diminuindo a concentração de inibidores microbianos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. No entanto, devido à baixa produção de xilitol por tais linhagens sugere-se um estudo envolvendo outras variáveis, como outra fonte de carbono com menor concentração de compostos inibitórios, outros suplementos, níveis de oxigenação, temperatura e pH. Alguns inibidores, como ácido acético, furfural e 5-hidroxiacetilfurfural podem afetar a fisiologia, viabilidade celular e a produção de xilitol, interferindo na atividade das enzimas glicolíticas e na síntese de macromoléculas (da CUNHA et al., 2011). Ainda, alguns inibidores apresentam reação cruzada, ou seja, a presença de outros potencializa sua toxicidade (HUANG et al., 2011). O ácido acético acidifica o citoplasma, que em condições normais, apresenta um pH próximo da neutralidade; interfere na organização da membrana plasmática; inibe a absorção de nutrientes essenciais para o metabolismo da levedura, como leucina, lisina, glicose e fosfato, além de induzir a célula à apoptose (DING et al., 2013).

As linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica*, UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, tiveram destaque quanto a produção de xilitol no ensaio contendo nível mínimo de sulfato de amônio (0 gL^{-1}), nível máximo de farelo de arroz (10 gL^{-1}) e o nível mínimo de extrato de levedura (1 gL^{-1}), apresentando uma produção de $11,97 \text{ gL}^{-1}$ de xilitol ($Y_{p/s} = 0,55 \text{ gg}^{-1}$, $Q_p = 0,17 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $\eta = 60,20\%$) e $14,06 \text{ gL}^{-1}$ ($Y_{p/s} = 0,63 \text{ gg}^{-1}$, $Q_p = 0,20 \text{ gL}^{-1} \cdot \text{h}$, $\eta = 68,22\%$), respectivamente (Tabela 17). Uma vez que os resultados obtidos para essa espécie foram melhores que aqueles obtidos para *W. rabaulensis*, na sequência dessa análise estatística será dado ênfase às leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de *Cyberlindnera xylosilytica*.

Para *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, os modelos lineares e de segunda ordem foram testados para variável de resposta de produção de xilitol, e o modelo de segunda ordem foi ajustado usando o software Design-Expert. Para *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309, o termo linear da variável X_1 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e as interações entre as duas fontes de nitrogênio orgânico extrato de farelo de arroz e extrato de levedura (X_2X_3) foram estatisticamente significantes ao nível de confiança de 5% ($p < 0,05$). De acordo com a Tabela 18 o efeito da adição de sulfato de amônio para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 foi negativo, indicando que a produção de xilitol por estas leveduras foi favorecida empregando-se o sulfato de amônio no seu nível mais baixo (-1) o que corresponde à sua ausência no meio de cultivo. Também para estas linhagens constatou-se a existência de efeitos de interação significativos, X_2X_3 (extrato de farelo de arroz e extrato de levedura) e X_1X_3 (sulfato de amônio e extrato de levedura), respectivamente. Bera; Mukherjee (1989) mencionaram que o concentrado de proteína de farelo de arroz tinha solubilidade máxima ($> 75\%$) a pH 9,0-10,5 e solubilidade mínima ($\sim 13\%$) a pH 4,5-5,5. Neste trabalho, a proteína de arroz foi extraída com água a pH 6,0, o que provavelmente contribuiu para a suplementação do meio com baixa quantidade de proteínas solúveis podendo ser enriquecida com baixa quantidade de extrato de levedura para a melhoria no rendimento de xilitol.

A Tabela 19 mostra os coeficientes de regressão para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 depois de retirados os fatores e interações que não foram estatisticamente significativos no nível de 95%.

Tabela 19: Coeficientes de regressão para a resposta produção de xilitol pelas linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de *Cyberlindnera xylosilytica*.

Leveduras	Fatores	Coeficientes
UFMG-CM-Y309 - <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	10,03
	$X_1(L)$	-0,498
	$X_2(L)$	0,103
	$X_3(L)$	-0,205
	X_2X_3	-0,605
UFMG-CM-Y409 - <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	13,02
	$X_1(L)$	-0,388
	$X_3(L)$	-0,118
	X_1X_3	0,543

Nos casos supracitados, constatou-se que os resultados relativos à produção de xilitol (gL^{-1}) apresentaram curvatura significativa e não apresentavam falta de ajuste significativo no nível de 95% de confiança. A análise dos resíduos do modelo proposto mostrou uma disposição dos valores preditos pela curva com relação à média e seus respectivos resíduos dispostos de maneira aleatória (dados não apresentados). Este fato não sugere um padrão geométrico que possa indicar uma anormalidade na distribuição dos resíduos. Com isso, considerou-se que a curva está representando os pontos de maneira satisfatória, pois os erros seguem uma distribuição normal.

As Tabela 20 e Tabela 21 apresentam a análise de variância (ANOVA) para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409; respectivamente, pode-se observar que os níveis de significância para os fatores e interações encontram-se em 95% de confiança, indicando que o F_{estimado} foi maior que o F_{tabelado} . Assim, tem-se a evidência da existência de uma relação quadrática dos fatores e interações (variáveis independentes) com a variável resposta que é a produção de xilitol (gL^{-1}) para ambas as linhagens, indicando que todos os fatores foram estatisticamente significativos, com bom intervalo de confiança.

Tabela 20: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-Y309-*Cyberlindnera xylosilytica* seguindo um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
	X ₁ (L)	1,980	1	1,980	10,83	0,0133
	X ₂ (L)	0,084	1	0,084	0,46	0,5196
	X ₃ (L)	0,336	1	0,336	1,84	0,2173
	X ₂ X ₃	2,928	1	2,928	16,01	0,0052
Resíduo		1,280	7	0,183	-	-
	Falta de ajuste	1,063	4	0,266	3,66	
	Erro puro	0,218	3	0,073	-	-
Total (Corr)		6,609	11	-	-	-

$$R^2 = 0,8063$$

$$R^2 (\text{ajustado}) = 0,6956$$

Tabela 21: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-Y409 de *Cyberlindnera xylosilytica* seguindo um planejamento fatorial 2^3 com 4 repetições no ponto central.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
Resíduo	X ₁ (L)	1,201	1	1,201	7,00	0,0295
	X ₃ (L)	0,110	1	0,111	0,64	0,4457
	X ₁ X ₃	2,352	1	2,354	13,71	0,0060
		1,374	8	0,1712	-	-
	Falta de ajuste	0,027	1	0,0267	0,14	0,7207
	Erro puro	1,347	7	0,192	-	-
Total (Corr)		5,040	11	-	-	-

$$R^2 = 0,7274$$

$$R^2 \text{ (ajustado)} = 0,6252$$

As Tabelas 20 e 21 também mostram que os resíduos totais foram desmembrados em falta de ajuste e erro puro. Este procedimento é válido uma vez que foram realizadas as repetições no ponto central para poder se obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro). Assim, pode-se julgar de maneira quantitativa se o modelo representa satisfatoriamente as observações. A partir da análise de tais tabelas para a resposta produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, verifica-se a porcentagem de variação explicada (R^2), de 80,63 e 72,74%, respectivamente.

As Equações 7 e 8 descrevem a produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, respectivamente, prevista pelos modelos em função das variáveis codificadas nos modelos reparametrizados que contém apenas os termos estatisticamente significativos (Tabela 19).

$$Y_1 = +10,03 - 0,498X_1 + 0,103X_2 - 0,205X_3 - 0,605X_2X_3 \quad \text{(Equação 7)}$$

$$Y_2 = +13,02 - 0,388X_1 - 0,118X_3 + 0,543X_1X_3 \quad \text{(Equação 8)}$$

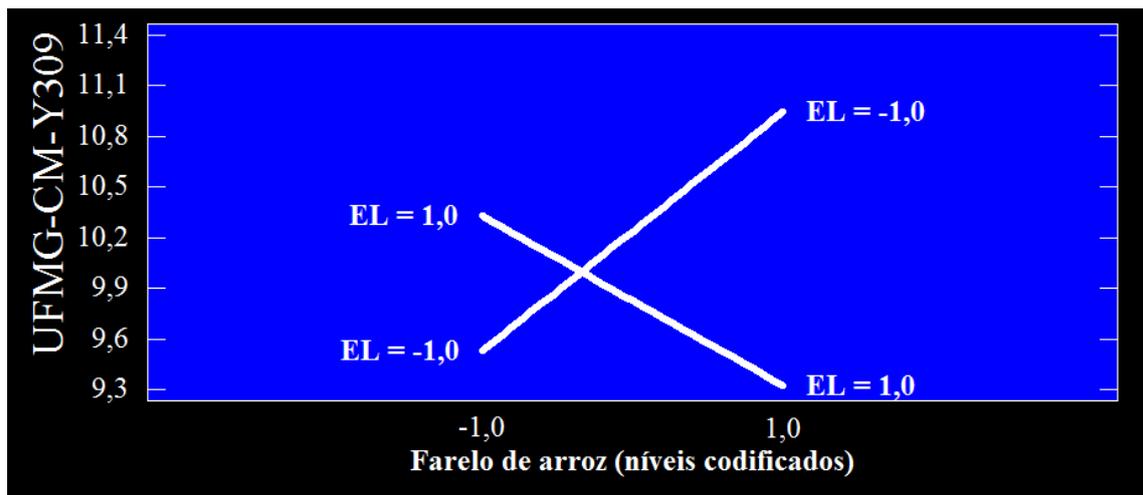
Em que: Y_1 e Y_2 correspondem à produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, respectivamente, e X_1 , X_2 e X_3 correspondem aos valores codificados para as variáveis: concentração de sulfato de amônio (S, X_1), concentração de extrato de farelo de arroz (F, X_2) e concentração de extrato de levedura (E, X_3), respectivamente.

Como observado anteriormente, para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 constatou-se a existência de efeitos de interação significativos, X_2X_3 (extrato de farelo de arroz e extrato de levedura) e X_1X_3 (sulfato de amônio e extrato de levedura), respectivamente (Tabelas 20 e 21). Nestes casos, os efeitos principais devem ser interpretados conjuntamente. A Figura 11 apresenta a produção de xilitol estimada em função destes pares de fatores para estas leveduras. Nestes pares o primeiro fator varia de seu nível inferior (-1) para o seu nível superior (+1), enquanto que o segundo fator principal que compõe a interação é mantido em seu nível inferior (linha negativa) e em seu nível superior (+1) (linha positiva).

Assim, os efeitos de interação de primeira ordem, X_2X_3 e X_1X_3 para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, respectivamente, podem ser entendidos como a variação causada na resposta, quando se faz variar os níveis de um dos fatores “dentro” de cada nível do outro. Assim para a UFMG-CM-Y309 (Figura 11a) observa-se que a maior produção de xilitol foi favorecida quando o extrato de farelo de arroz foi adicionado ao meio de cultivo no sentido de seu nível inferior ($5,0 \text{ gL}^{-1}$) para o seu nível superior ($10,0 \text{ gL}^{-1}$) quando associado ao extrato de levedura em seu nível inferior ($1,0 \text{ gL}^{-1}$).

No entanto, em menor proporção também se observou melhorias na produção de xilitol com a diminuição do extrato de farelo de arroz ($5,0 \text{ gL}^{-1}$), porém, neste caso deve-se aumentar a concentração de extrato de levedura ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) no meio de cultivo (Figura 11a). Para esta levedura, UFMG-CM-Y309, será possível empregar fontes mais baratas de nitrogênio (isto é, o extrato de levedura, obtido a partir da levedura utilizada na própria biorrefinaria) para a produção de xilitol.

a)



b)

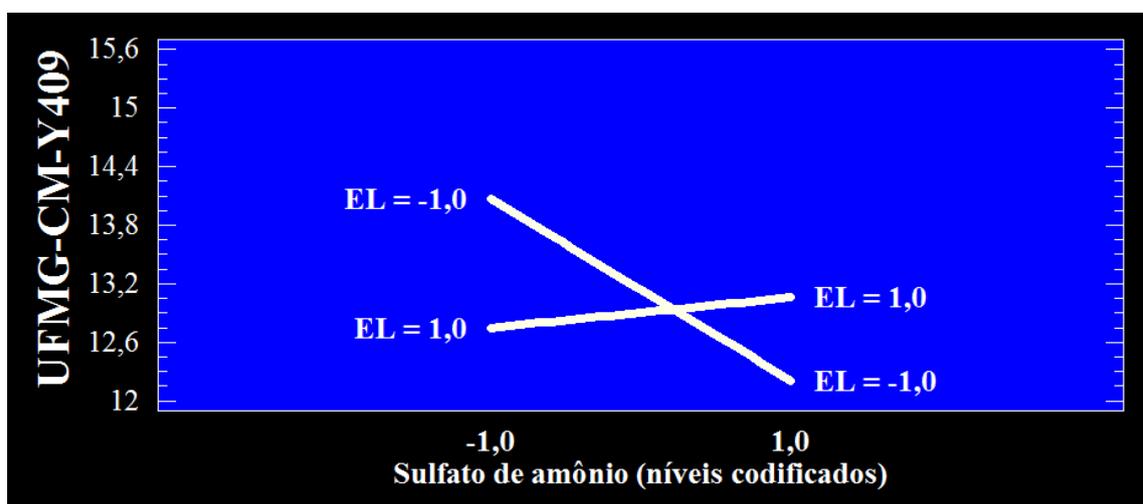
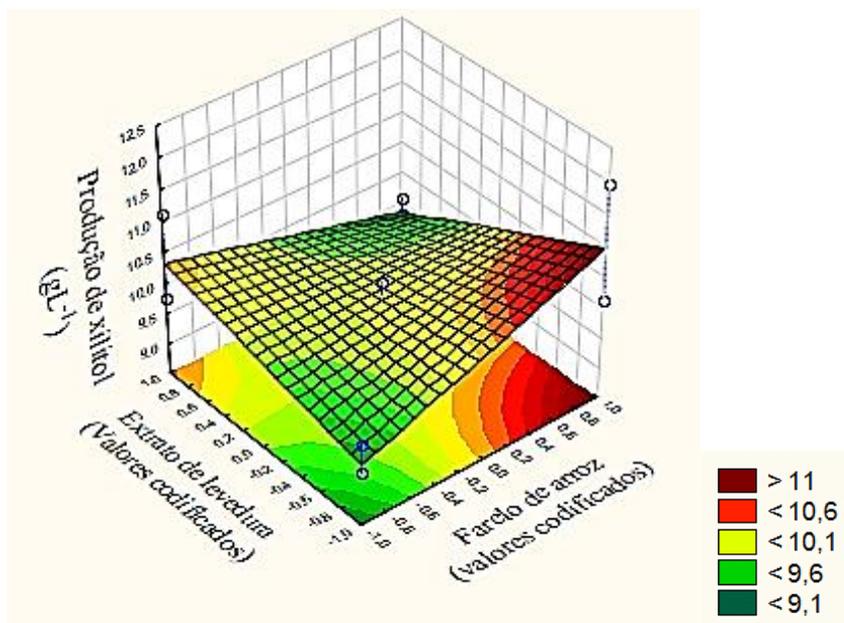


Figura 11: Interações dos fatores significativos na resposta produção de xilitol para as linhagens leveduras UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de *Cyberlindnera xylophilica*.

Para a linhagem UFMG-CM-Y409 (Figura 11b) como a interação X_1X_3 foi significativa ao nível de 95 % de confiança pode-se constatar que a produção de xilitol foi favorecida quando o sulfato de amônio estava ausente do meio de cultivo (nível inferior) com associação da menor concentração de extrato de levedura ($1,0 \text{ gL}^{-1}$). No entanto, ao direcionar o sulfato de amônio do seu nível inferior para o seu nível superior ($2,0 \text{ gL}^{-1}$), deve-se manter o extrato de levedura em seu nível superior ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) para favorecer a produção de xilitol por esta levedura (Figura 11b). Estes resultados podem

ser melhores visualizados na Figura 12. Analisando-se as superfícies de respostas (Figuras 12a e 12b), pode-se verificar a existência de uma região que favoreceu a produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409.

a)



b)

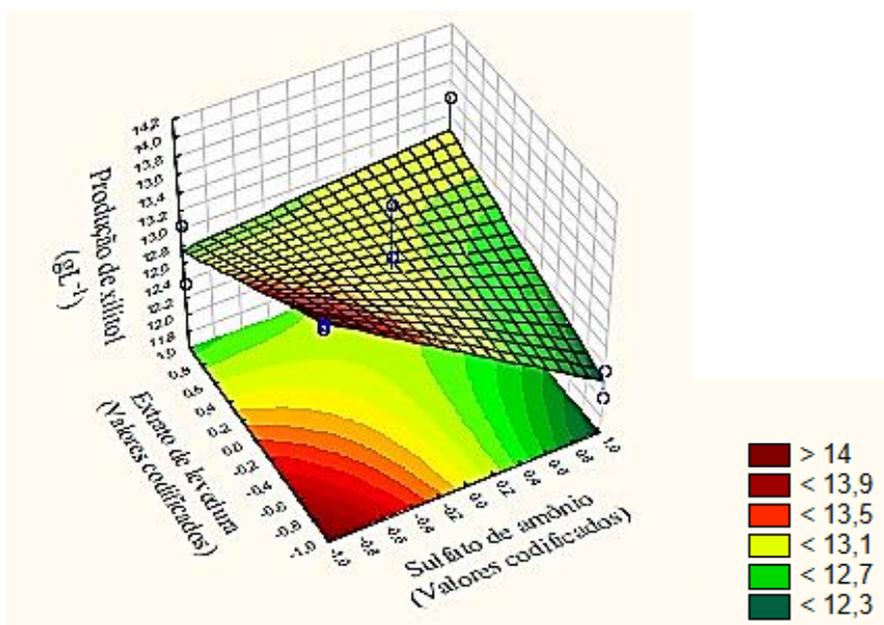


Figura 12: Superfície de resposta para a produção de xilitol (gL^{-1}) pelas linhagens UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de *Cyberlindnera xylosilytica*.

A melhoria na produção de xilitol pelas linhagens de *C. xylosilytica* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foi possível através da utilização de uma fonte alternativa de nitrogênio, extrato de farelo de arroz (10 gL^{-1}) e pela redução da fonte de nitrogênio mais cara, extrato de levedura (1 gL^{-1}). Estas linhagens de levedura (UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409) foram utilizadas para testes subsequentes em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar, suplementado com os nutrientes selecionados (extrato de farelo de arroz e extrato de levedura), para avaliar os efeitos de diferentes concentrações celulares e volumes de meio.

5.3 Planejamento fatorial 2^2 para selecionar a concentração celular e o volume de meio adequadas para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Nesta etapa, estudou-se a produção de xilitol, consumo de xilose e crescimento celular de linhagens de *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar suplementado com farelo de arroz (10 gL^{-1}) e extrato de levedura (1 gL^{-1}) selecionados na etapa anterior, utilizando um planejamento fatorial 2^2 completo com quatro pontos centrais, para avaliar o volume de meio e a concentração celular durante o processo de cultivo.

As avaliações das diferentes concentrações celulares e volumes de meio e os parâmetros fermentativos para todas os experimentos estão resumidos na Tabela 22. Em geral, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o crescimento celular, o consumo de xilose e a produção de xilitol aumentaram com baixas concentrações celulares ($1,0 \text{ gL}^{-1}$) e aumento da disponibilidade inicial de oxigênio (25 mL) em frascos de Erlenmeyer (125 mL), utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Tabela 22: Valores utilizados e codificados no planejamento fatorial completo 2^2 com 4 repetições no ponto central para a avaliação do efeito do volume de meio (V^*) e concentração celular (C^*) para a produção de xilitol pelas leveduras *Cyberlindnera xylosilytica*

Ensaio	V^* (X_1)	C^* (X_2)	Linhagens	Tempo (h)	Biomassa (gL^{-1})	Consumo de xilose %	Xilitol (gL^{-1})	$Y_{p/s}$ (gg^{-1})	Q_p ($gL^{-1}h^{-1}$)	η (%)
01	25.0	1.0	UFMG- CM-Y309	96	3,30	63,24	$18,57 \pm 0,571$	0,71	0,19	77,16
				120	3,83	70,72	$22,13 \pm 0,882$	0,75	0,18	82,27
			UFMG- CM-Y409	96	4,23	64,23	$19,20 \pm 0,288$	0,74	0,20	80,73
				120	5,10	78,34	$21,01 \pm 0,773$	0,66	0,18	72,43
02	75.0	1.0	UFMG- CM-Y309	96	1,84	27,73	$6,70 \pm 0,021$	0,58	0,07	63,23
				120	1,85	24,46	$7,85 \pm 0,213$	0,77	0,07	84,44
			UFMG- CM-Y409	96	1,55	40,35	$11,88 \pm 0,076$	0,73	0,12	79,37
				120	1,60	44,36	$12,47 \pm 0,764$	0,70	0,10	76,18
03	25.0	10.0	UFMG- CM-Y309	96	10,35	48,30	$13,40 \pm 0,740$	0,69	0,14	75,74
				120	11,38	63,33	$16,31 \pm 0,706$	0,64	0,14	70,27
			UFMG- CM-Y409	96	10,58	66,50	$11,19 \pm 0,371$	0,43	0,12	47,41
				120	11,12	71,52	$11,40 \pm 0,449$	0,41	0,10	44,91
04	75.0	10.0	UFMG- CM-Y309	96	9,08	52,10	$11,01 \pm 0,063$	0,55	0,12	60,49
				120	9,23	61,29	$11,53 \pm 0,212$	0,49	0,10	53,74
			UFMG- CM-Y409	96	9,21	71,21	$15,45 \pm 0,237$	0,57	0,16	62,01
				120	8,37	83,25	$16,42 \pm 0,130$	0,52	0,14	56,55
05	50	5	UFMG- CM-Y309	96	4,62	28,12	$7,79 \pm 0,050$	0,75	0,07	81,59
				120	4,70	29,76	$7,79 \pm 0,064$	0,71	0,06	77,13
			UFMG- CM-Y409	96	4,30	38,4	$9,16 \pm 0,037$	0,60	0,10	65,32
				120	4,29	40,83	$4,75 \pm 0,025$	0,29	0,04	32,06
06	50	5	UFMG- CM-Y309	96	4,71	27,34	$7,11 \pm 0,126$	0,71	0,07	77,81
				120	4,72	33,23	$7,79 \pm 0,262$	0,65	0,07	70,35
			UFMG- CM-Y409	96	4,35	37,47	$9,09 \pm 0,024$	0,64	0,09	69,72
				120	4,29	38,30	$4,36 \pm 0,039$	0,30	0,04	32,69
07	50	5	UFMG- CM-Y309	96	4,65	32,14	$7,73 \pm 0,036$	0,66	0,08	71,97
				120	4,92	33,23	$8,05 \pm 0,096$	0,66	0,07	72,48
			UFMG- CM-Y409	96	4,43	34,43	$9,21 \pm 0,030$	0,71	0,10	77,25
				120	4,36	45,11	$5,85 \pm 0,022$	0,34	0,05	37,58
08	50	5	UFMG- CM-Y309	96	4,78	38,31	$7,98 \pm 0,497$	0,53	0,08	58,19
				120	4,83	39,56	$7,85 \pm 0,452$	0,55	0,07	59,70
			UFMG- CM-Y409	96	4,11	44,43	$9,10 \pm 0,141$	0,66	0,12	71,44
				120	4,45	44,23	$5,15 \pm 0,212$	0,28	0,04	30,24

$Y_{p/s}$; Q_p , η , são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol.

O uso de xilose para o crescimento celular ou produção de xilitol foi dependente da disponibilidade inicial de oxigênio, pois estes experimentos foram realizados sob condições de aumento e diminuição dos níveis de oxigênio estabelecidos utilizando diferentes volumes de meio (25, 50 e 75 mL) em Erlenmeyer de 125 mL (Tabela 22). Observou-se que a capacidade da levedura em assimilar a xilose foi afetada com a redução da condição inicial de oxigênio (volume médio de 75 mL), o que poderia estar associado à limitação do suprimento de NADPH necessário para a atividade da XR (SILVA e FELIPE, 2006), mesmo com o uso de farelo de arroz e extrato de levedura como suplementos nutricionais. Segundo a literatura, o oxigênio tem um papel relevante comoceptor final de elétrons na manutenção do equilíbrio redox em duas etapas iniciais do metabolismo da xilose. A redução nas taxas de consumo de oxigênio ou condições anaeróbicas pode resultar na inibição da oxidação de NADH a NAD⁺ (SU et al., 2015; CADETE et al., 2016). Nesse caso, outroceptor de elétrons se torna necessário para oxidar o NADH. Na ausência de qualquerceptor de elétrons, a célula pode não manter o balanço redox e seria incapaz de fermentar D-xilose em etanol, resultando no acúmulo de xilitol. O oxigênio também é necessário para gerar energia durante o transporte da xilose na célula (SILVA et al., 2012; BELLIDO et al., 2013; MOURA, 2015).

Em relação a variação da disponibilidade inicial de oxigênio, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL de meio o consumo de xilose foi maior do que o comparado com menor disponibilidade inicial de oxigênio (75 mL de meio) (Figuras 13a, 13c, 14a e 14c), demonstrando que o crescimento de *C. xylosilytica* foi suscetível aos níveis de oxigenação. O ensaio 01, em que a condição de oxigenação foi maior (com 25 mL de meio), promoveu aumento de 283% e 410% na massa celular de *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y-409, em 120 h de cultivo, como pode ser visualizado pelas Figuras 13a e 14a, respectivamente. Em relação aos experimentos em que ocorreu o aumento da concentração celular para 10 gL⁻¹ (Ensaio 3 e 4), não foi observada variação sobre o crescimento celular durante o cultivo, esses valores iniciais foram mantidos constantes para todas as amostras coletadas durante 120 hs, como pode ser observado nas Figuras 13c-d e 14c-d.

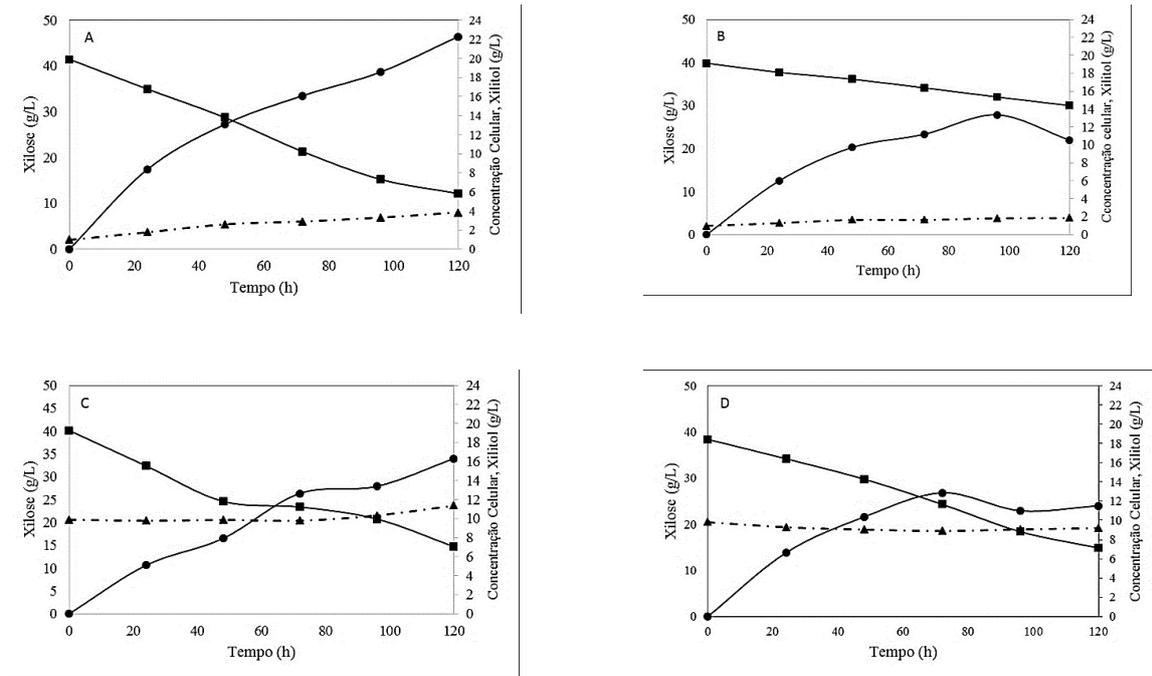


Figura 13: Perfis de xilose (-■-), xilitol (-●-) e biomassa celular (-▲-) em cultivo com *C. xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar com diferentes concentrações celulares e disponibilidade inicial de oxigênio: (A) 1gL^{-1} e 25 mL; (B) 1gL^{-1} e 75 mL; (C) 10gL^{-1} e 25 mL; (D) 10gL^{-1} e 75 mL.

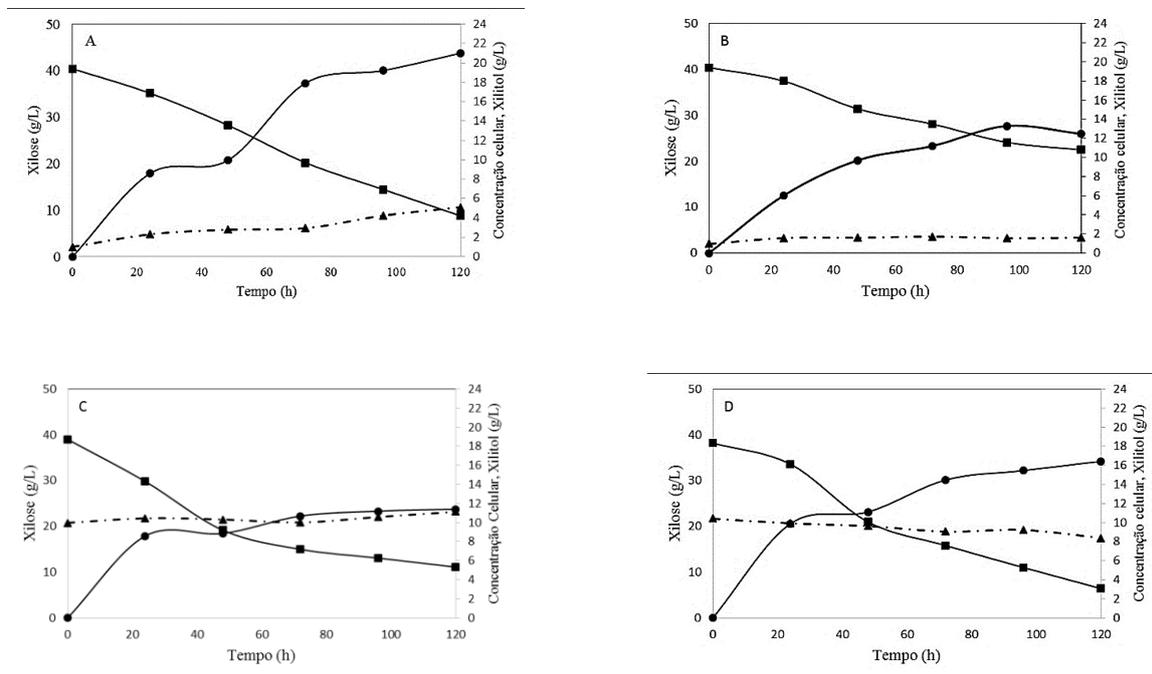


Figura 14: Perfis de xilose (-■-), xilitol (-●-) e biomassa celular (-▲-) em cultivo com *C. xylosilytica* (UFMG-CM-Y409) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar com diferentes concentrações celulares e disponibilidade inicial de oxigênio: (A) 1gL^{-1} e 25 mL; (B) 1gL^{-1} e 75 mL; (C) 10gL^{-1} e 25 mL; (D) 10gL^{-1} e 75 mL.

Um aumento na produção de xilitol também foi observado no Ensaio 01. Os melhores valores dos parâmetros de fermentação para a produção de xilitol foram observados em 96 h para ambas as linhagens, sendo que *C. xylosilytica*, UFMG-CM-Y309, exibiu maior produção de xilitol ($22,13 \text{ gL}^{-1}$; $Y_{p/s} 0,75 \text{ gg}^{-1}$) (Figuras 13 e 14). Embora a disponibilidade de oxigênio seja um fator crítico para a bioconversão de xilose-xilitol, pode ser possível melhorar este bioprocesso aumentando o consumo de xilose sob condições de limitação de oxigênio e diminuição da concentração celular. O maior rendimento de xilitol obtido com *C. tropicalis* em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar destoxificado com carvão ativado foi menor que o encontrado no presente estudo ($Y_{p/s} 0,66 \text{ gg}^{-1}$) (Marton et al., 2006). Segundo Guamán-Burneo et al. (2015), *C. galapagoensis* foi avaliada em uma concentração celular inicial de $1,0 \text{ gL}^{-1}$ na presença de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana contendo $49,7 \text{ gL}^{-1}$ de xilose e apresentou a segunda maior produção de xilitol ($17,01 \text{ gL}^{-1}$ e $Y_{p/s} 0,50 \text{ gg}^{-1}$). Nas mesmas condições, esses autores testaram uma linhagem de *C. tropicalis* que apresentou maiores valores de xilitol ($27,12 \text{ gL}^{-1}$ e $Y_{p/s} 0,67 \text{ gg}^{-1}$). Hernández-Pérez et al. (2016) cultivaram *C. (Meyerozyma) guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar contendo 50 gL^{-1} de xilose suplementado com farelo de arroz (20 gL^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($2,0 \text{ gL}^{-1}$) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ gL}^{-1}$) em uma concentração inicial de células de $1,0 \text{ gL}^{-1}$ para a produção de xilitol em diferentes volumes de meio (25 ou 50 mL) em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Os melhores resultados foram observados com 25 mL de meio, apresentando uma produção e bioconversão de xilose em xilitol de $16,20 \text{ gL}^{-1}$ e $Y_{p/s} 0,47 \text{ gg}^{-1}$, respectivamente.

Os ensaios relacionados aos pontos centrais, com 5 gL^{-1} de concentração celular e 50 mL de meio, (Tabela 22) apresentaram pequenas variações. *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 produziu $7,65 \pm 0,377 \text{ gL}^{-1}$ de xilitol em 96 hs, consumindo aproximadamente 40% de xilose, enquanto a outra linhagem, UFMG-CM-Y409, produziu $9,14 \pm 0,056 \text{ gL}^{-1}$ de xilitol em um consumo médio de xilose de 42%, indicando boa reprodutibilidade do processo.

A Tabela 23 e 24 apresentam a análise de variância (ANOVA) para as leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, no tempo de cultivo de 96 e 120 h, respectivamente. A partir da análise das tabelas para a resposta produção de xilitol pelas leveduras analisadas verifica-se a porcentagem de variação explicada (R^2) de 99,64 e 99,55 %.

Tabela 23: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-309 *Cyberlindnera xylosilytica* seguindo um planejamento fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central, no tempo de 96 hs.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
	Curvatura	45,4581	1	45,45811	319,7710	0,000381
	X ₁ (L)	50,8369	1	50,8369	357,6076	0,000323
	X ₂ (L)	0,1849	1	0,1849	1,3007	0,336895
	X ₁ X ₂	22,4676	1	22,4676	158,0463	0,001085
Resíduo				0,1421583	-	-
	Erro puro	0,4265	3	0,14216	-	-
Total (Corr)		119,3740	7	-	-	-

$$R^2 = 0,99643$$

$$R^2 \text{ (ajustado)} = 0,99166$$

Tabela 24: Análise de variância (ANOVA) para a produção de xilitol, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela linhagem UFMG-CM-409 *Cyberlindnera xylosilytica* seguindo um planejamento fatorial 2^2 com 4 repetições no ponto central, no tempo de 120 h.

Fonte de variação	Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
	Curvatura	212,077	1	212,077	524,0459	0,000183
	X ₁ (L)	3,0976	1	3,0976	7,6542	0,069765
	X ₂ (L)	8,0089	1	8,0089	19,7901	0,021132
	X ₁ X ₂	45,9684	1	45,9684	113,5887	0,001766
Resíduo				0,4046917	-	-
	Erro puro	1,2141	3	0,4047	-	-
Total (Corr)		270,3660	7	-	-	-

$$R^2 = 0,99551$$

$$R^2 \text{ (ajustado)} = 0,98952$$

As equações 9 e 10 descrevem a produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, respectivamente, prevista pelos modelos em função das variáveis codificadas nos modelos reparametrizados que contém apenas os termos estatisticamente significativos. (Tabela 25).

Tabela 25: Coeficientes de regressão para a resposta produção de xilitol pelas linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409 de *Cyberlindnera xylosilytica*.

Leveduras	Fatores	Coefficientes
UFMG-CM-Y309 - <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	12,4200
	X ₁ (L)	-3,5650
	X ₂ (L)	-0,2150
	X ₁ X ₂	2,3700
UFMG-CM-Y409 - <i>Cyberlindnera xylosilytica</i>	Média	15,3250
	X ₁ (L)	-0,8800
	X ₂ (L)	-1,4150
	X ₁ X ₂	3,3900

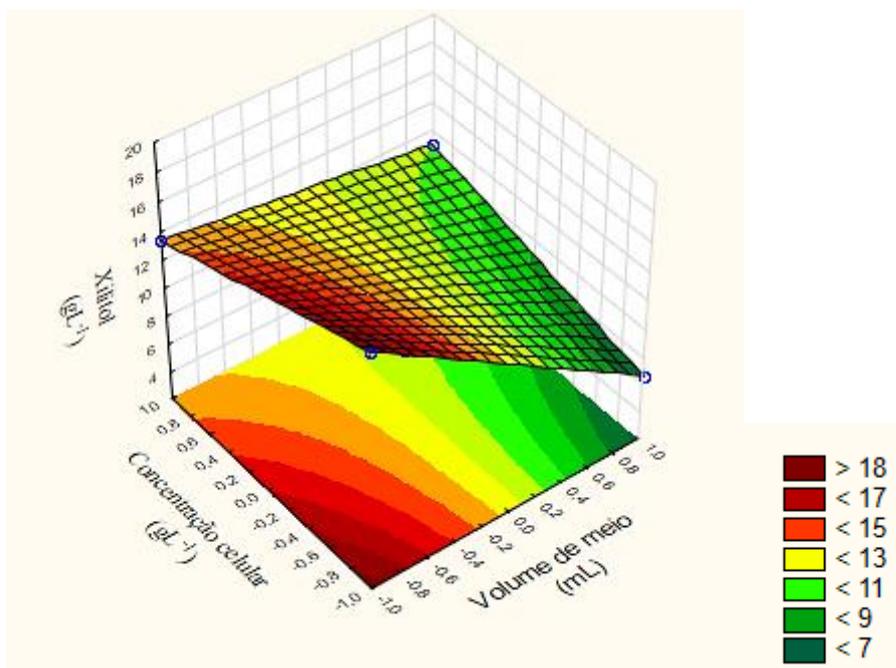
$$Y_1 = 12,42 - 3,5650X_1 - 0,2150X_2 + 2,3700X_1X_2 \quad (\text{Equação 9})$$

$$Y_2 = 15,3250 - 0,8800X_1 - 1,4150X_2 + 3,3900X_1X_2 \quad (\text{Equação 10})$$

Em que Y_1 e Y_2 correspondem à produção de xilitol pelas leveduras UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, respectivamente e X_1 e X_2 corresponde aos valores codificados pelas variáveis: Volume de meio (X_1) e concentração celular (X_2).

Como observado para as linhagens UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409, constatou-se a existência de efeitos de interação significativos ($p \leq 0,05$) X_1X_2 para ambas leveduras (Tabelas 23 e 24). Pode-se visualizar pela Figura 15 a existência de uma região que favoreceu a produção de xilitol quando o volume de meio estava no sentido do seu nível inferior (25mL) quando associado a concentração celular também no seu nível inferior (1 gL⁻¹).

a



b

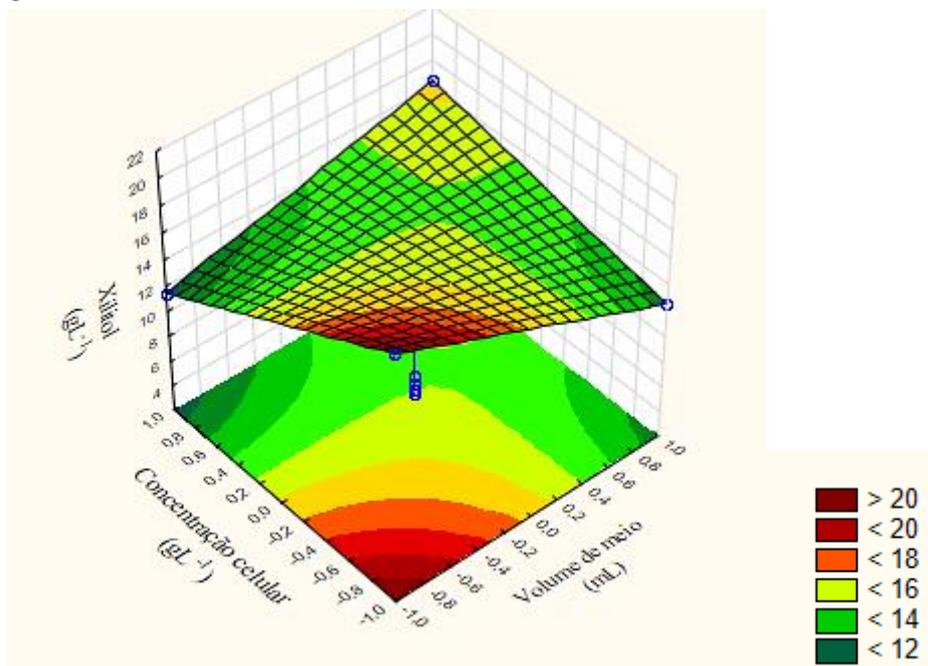


Figura 15: Superfície de resposta para a produção de xilitol (gL^{-1}) pelas linhagens UFMG-CM-Y309 (a) e UFMG-CM-Y409 (b) de *Cyberlindnera xylosilytica*.

Diante destes resultados, a melhoria na produção de xilitol pelas linhagens de *C. xylosilytica* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foi considerando um nível maior de oxigenação e nível menor de concentração celular.

Estas condições prévias foram utilizadas para testes subsequentes em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar, suplementado com extrato de farelo de arroz e extrato de levedura para avaliar a produção de xilitol em biorreator de bancada.

5.4 Avaliação em biorreator de bancada do desempenho da *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar

A linhagem *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) foi selecionada como promissora para a bioconversão de xilose em xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar após adequação da suplementação, concentração inicial de inóculo e relação volume de frasco e volume de meio (aeração) em frascos Erlenmeyers. Segundo Rao et al. (2016), a produção de xilitol em aumento de escala pode ter influência de diversos fatores como: tipo de microrganismo, composição do meio e condições ambientais (pH, temperatura, agitação e aeração).

Diante disso, a primeira etapa desta fase, foi realizar testes prévios para verificar o comportamento da levedura em biorreator de bancada utilizando meio complexo. Como a disponibilidade de oxigênio é um dos fatores principais para o cultivo, foi determinado o coeficiente de transferência de oxigênio (k_{LA}) de acordo com a variação de agitação e aeração, pois é um parâmetro relevante do processo desempenhando um papel importante na regulação do crescimento celular e formação de xilitol por afetar a atividade de xilose redutase e xilitol desidrogenase (BRANCO et al., 2009). O Apêndice 4 apresenta os resultados de crescimento celular, consumo de xilose e produção de xilitol, encontrados em meio contendo apenas xilose como fonte de carbono, suplementada com farelo de arroz (10 gL^{-1}) e extrato de levedura (1 gL^{-1}) em Erlenmeyer e em três valores diferentes de k_{LA} , para avaliar a influência da oxigenação no meio de cultivo. Nestes testes prévios constatou-se dificuldade no processo com a formação de espuma, provavelmente devido a alta agitação e aeração, havendo necessidade da utilização de um antiespumante no início do processo fermentativo. Após verificar as condições de cultivo foram realizados testes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Nesta etapa do trabalho, em biorreator de bancada, foi avaliado o desempenho desta linhagem de levedura em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, utilizando duas condições específicas de coeficiente de transferência volumétrico de

oxigênio dissolvido (k_{La}) correspondendo a $21,60 \text{ h}^{-1}$ (350 rpm e 0,75vvm) e $35,64 \text{ h}^{-1}$ (450 rpm e 0,85 vvm). Os resultados destes ensaios, que estão descritos na Tabela 26, foram comparados aos obtidos em frascos Erlenmeyers estudados nas etapas anteriores deste trabalho.

Os ensaios em biorreator de bancada foram continuamente monitorados sendo possível constatar por meio de microscopia a ausência de contaminantes em todos os tempos coletados. A concentração celular ($14,60 \text{ gL}^{-1}$) foi favorecida no k_{La} de $35,60 \text{ h}^{-1}$, porém foram encontrados valores muito próximos ($13,25 \text{ gL}^{-1}$) para o k_{La} de $21,64 \text{ h}^{-1}$. No entanto, menor crescimento celular ($4,92 \text{ gL}^{-1}$) foi observado nos ensaios conduzidos em Erlenmeyers (Tabela 26). Em pesquisas realizadas por Sampaio et al. (2008), constataram também que o aumento da taxa de agitação leva ao aumento da formação de biomassa.

Nos ensaios conduzidos em reator de bancada observou-se elevação nos valores de pH de aproximadamente 5,5 para 7,5 independentemente da condição de k_{La} utilizado nos ensaios (Tabela 26 e Figura 16). Este fato pode ter favorecido o crescimento celular em ambos os casos com relação aos ensaios conduzidos em frascos Erlenmeyers. Em trabalho realizado por Prakasham et al. (2009), observaram que o pH ótimo para a produção de xilitol está dentro da faixa de 5,0-7,0.

Com o uso do k_{La} mais elevado ($35,64 \text{ h}^{-1}$) observou-se favorecimento (100 %) no consumo de ácido acético entre 24 e 48 h enquanto no k_{La} de $21,60 \text{ h}^{-1}$ esse consumo ocorreu entre 72 e 96 h de cultivo (Tabela 26). Martínez e Santos (2012), também observaram o consumo total de ácido acético, presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, após 48 h de cultivo em biorreator de bancada para a levedura *Candida guilliermondii*. Resultados semelhantes foram encontrados por Canilha et al. (2003), utilizando *Candida guilliermondii*, porém em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. Segundo Arruda (2011), a alta disponibilidade de oxigênio nos biorreatores levou à conversão de ácido acético a acetil-CoA, o qual participa do ciclo do ácido cítrico, usado para a formação de coenzimas não redutoras que são oxidadas na cadeia respiratória.

Arruda (2011) constatou que na ampliação de escala de bancada para semi-piloto para a produção de xilitol observou que a *Candida guilliermondii* foi capaz de assimilar o ácido acético em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar favorecendo o aumento de pH no meio. Esta autora também mencionou que o maior consumo deste ácido (93,4%) foi em reator de escala de bancada (16 L).

Tabela 26: Parâmetros fermentativos para o cultivo de *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Condições	Variáveis	Tempo (h)							
		0	24	48	72	96	120	144	168
Erlenmeyer (25 mL de meio e 1gL ⁻¹ de células)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	0,99	1,78	2,60	2,9	3,3	3,83	*na	*na
	Consumo de Glicose (%)	0,00	67,10	100,00	100,00	100,00	100,00	*na	*na
	Consumo de Xilose (%)	0,00	15,66	30,69	48,63	63,24	70,72	*na	*na
	Conc. de ácido acético (gL ⁻¹)	2,79	3,10	3,12	3,31	3,23	2,90	*na	*na
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00	8,35	13,10	16,10	18,57	22,13	*na	*na
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	1,29	1,03	0,80	0,71	0,75	*na	*na
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,00	0,35	0,27	0,22	0,19	0,18	*na	*na
	η (%)	0,00	140,23	11,16	87,04	77,16	82,27	*na	*na
Biorreator F1 - (350 rpm e 0,75 vvm-k _{La} 21,60h ⁻¹)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	0,99	3,71	5,63	9,93	11,36	12,2	12,26	13,25
	pH	5,54	5,49	6,53	7,55	7,63	7,52	7,45	7,37
	Consumo de Glicose (%)	0,00	76,05	100	100	100	100	100	100
	Consumo de Xilose (%)	0,00	9,64	34,36	39,47	51,77	64,71	77,81	89,72
	Conc. de ácido acético (gL ⁻¹)	2,87	2,94	2,36	1,29	0,00	0,00	0,00	0,00
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00±0,000	5,31±0,678	6,36±0,060	9,80±0,348	11,06±0,322	13,94±0,544	16,69±0,420	19,56±0,178
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	0,63	0,35	0,49	0,45	0,47	0,48	0,50
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,00	0,22	0,13	0,14	0,12	0,12	0,12	0,12
η (%)	0,00	69,02	38,62	53,6	48,83	51,17	52,33	54,15	
Biorreator F2 - (450 rpm e 0,85 vvm-k _{La} 35,64 h ⁻¹)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	0,95	4,98	9,50	11,46	12,14	13,33	13,60	14,60
	pH	5,38	7,34	7,96	7,57	7,48	7,37	7,53	7,62
	Consumo de Glicose (%)	0,00	89,52	100	100	100	100	100	100
	Consumo de Xilose (%)	0,00	19,71	29,70	41,69	61,47	85,93	96,15	100
	Conc. de ácido acético (gL ⁻¹)	3,07	1,86	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00±0,000	0,85±0,036	1,55±0,129	4,56±0,147	8,98±0,667	10,06±0,031	15,66±0,573	14,56±0,640
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	0,10	0,12	0,25	0,34	0,27	0,38	0,34
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,00	0,04	0,03	0,06	0,09	0,08	0,11	0,09
η (%)	0,00	10,84	13,12	27,50	36,73	29,44	40,95	36,61	

*na - Não analisado - Y_{p/s}; Q_p, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol.

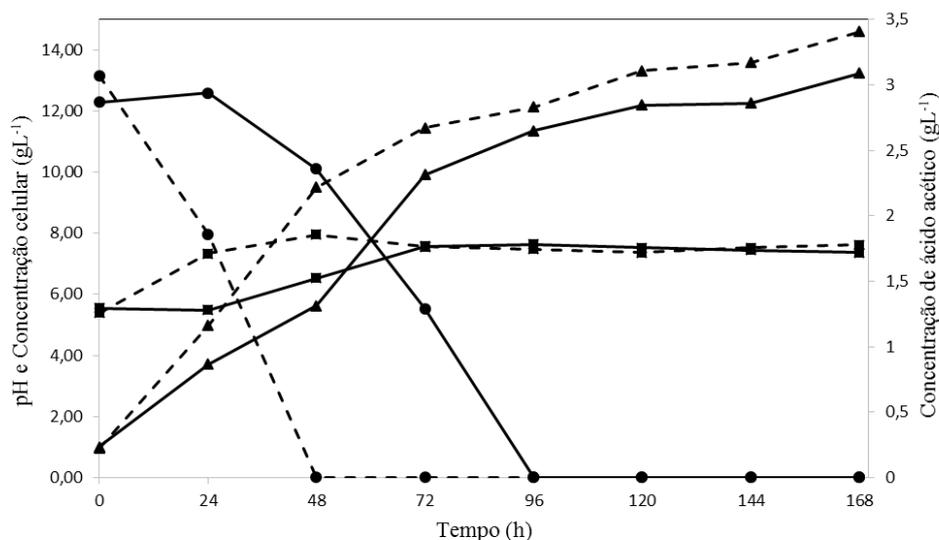


Figura 16: Consumo de ácido acético no biorreator (-●- kLa 21,60h⁻¹, --●-- kLa 35,64h⁻¹), pH (-■-kLa 21,60h⁻¹, --■-- kLa 35,64h⁻¹) e concentração celular (-▲-kLa 21,60h⁻¹, --▲-- 35,64h⁻¹) por *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar em biorreator.

O consumo de xilose (100 %) por *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar foi favorecido em k_{LA} de 35,60 h⁻¹ em 168h de cultivo. Neste mesmo tempo de cultivo, na condição com menor transferência de oxigênio (k_{LA} de 21,60 h⁻¹) o maior consumo de xilose foi de 89,72 %. Nestes casos, a produção de xilitol foi de 14,56 gL⁻¹ e 19,56 gL⁻¹, respectivamente (Tabela 23).

A condição que utilizou menor transferência de oxigênio (k_{LA} de 21,60 h⁻¹) apresentou produção em xilitol similar aos ensaios em frascos Erlenmeyers que foi de 22,13 gL⁻¹ em 120 h. No entanto, os fatores de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) e produtividades volumétricas em xilitol (Q_p) em biorreatores de bancada foram inferiores aos encontrados nos ensaios conduzidos em frascos Erlenmeyers (Tabela 26). Nestes casos, para o k_{LA} de 21,60 h⁻¹ obteve-se maiores valores de fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s} = 0,50 \text{ gg}^{-1}$), produtividade volumétrica em xilitol ($Q_p = 0,12 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$) e rendimento ($\eta = 54,15\%$) quando em comparação com o k_{LA} de 35,64 h⁻¹ ($Y_{p/s} = 0,38\text{gg}^{-1}$, $Q_p = 0,11 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$ e $\eta = 40,95\%$ em tempo de 144 h) (Tabela 26). De acordo com Branco (2010), o excesso de oxigênio leva a oxidação de NADH à NAD⁺ e alta relação NAD⁺/NADH resulta na oxidação de xilitol à xilulose, resultando em mais célula formada e menos xilitol.

Na Tabela 27 tem-se os parâmetros cinéticos para a produção de xilitol por *Cyberlindnera xylosilytica* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. O maior valor de velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_x = 0,165 \text{ h}^{-1}$) foi encontrado na condição de maior k_{LA} ($35,68 \text{ h}^{-1}$) correspondendo a condição em que também se obteve maior crescimento celular ($14,60 \text{ gL}^{-1}$) de *Cyberlindnera xylosilytica*. Neste caso, teve-se o menor valor para a velocidade específica máxima de produção de xilitol ($0,021 \text{ g}_{\text{xilitol}}/\text{g}_{\text{cel}}\text{h}$). Pode-se concluir que houve uma preferência do metabolismo da levedura para a formação de células ao invés da produção de xilitol, por conta da quantidade de oxigênio ser considerada maior nos fermentadores do que o limite ideal para a produção de xilitol, uma vez que este é responsável pela ativação do sistema de transporte de xilose e determinação do fluxo de carbono entre crescimento celular e formação de produto. Segundo, Arruda (2011), o maior valor de velocidade específica de crescimento celular encontrado para biorreator de 2,4L foi de $0,130 \text{ h}^{-1}$ e para biorreator de 16L foi de $0,176 \text{ h}^{-1}$, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar por *Candida guilliermondii*.

Tabela 27: Parâmetros fermentativos do cultivo de *Cyberlindnera xylosilytica* para a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

Parâmetros	Erlenmeyer		k_{LA} de $21,60\text{h}^{-1}$		k_{LA} de $35,68\text{h}^{-1}$	
	Valores encontrados	Tempo (h)	Valores encontrados	Tempo (h)	Valores encontrados	Tempo (h)
Conc. Celular (gL^{-1})	3,83	120	13,65	168	14,60	168
P_{xilitol} (gL^{-1})	22,13	120	19,56	168	14,56	120
$Y_{p/s}$ (gg^{-1})	0,75	120	0,48	168	0,38	168
Q_p ($\text{gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,18	120	0,12	168	0,09	168
η (%)	82,27	120	54,15	168	36,61	168
Cons. de Xilose (%)	70,72	120	89,72	168	100	168
μ_x (h^{-1})	0,03258	2	0,05027	10	0,16547	2
μ_s ($\text{g}_{\text{xilose}} \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,31998	2	0,12255	12	0,31481	2
$\mu_{p\text{máx}}$ ($\text{g}_{\text{xilitol}} \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	0,39744	2	0,19986	2	0,02092	2

Para o ensaio em frascos Erlenmeyers encontrou-se o valor mais elevado para a velocidade máxima de produção de xilitol ($0,397 \text{ g}_{\text{xilitol}} \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em contrapartida obteve-se o menor valor para a velocidade específica máxima de crescimento celular ($0,033 \text{ h}^{-1}$). Neste caso, a velocidade específica máxima de consumo de xilose ($\mu_s = 0,319 \text{ g}_{\text{xilose}} \text{g}_{\text{cel}}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi similar a obtida na condição de maior transferência de oxigênio (k_{LA} de $35,60 \text{ h}^{-1}$) em biorreator de bancada (Tabela 27). Segundo trabalhos da literatura, isso pode estar associado a algum fenômeno de transporte, pois o aumento de escala altera o tempo de mistura, alterando a concentração de oxigênio dissolvido, proporcionando diferenças nos

valores de velocidades específicas máximas (MAVITUNA, 1996; VAN'T RIET e TRAMPER, 1991; ARRUDA, 2011)

A condução do processo em biorreator de bancada no k_{La} de $21,60 \text{ h}^{-1}$ favoreceu a manutenção de valor baixo na velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_x = 0,050 \text{ h}^{-1}$) quando comparado com a condição de maior transferência de oxigênio dissolvido (k_{La} de $35,60 \text{ h}^{-1}$) (Tabela 27) e com isso favoreceu-se a produção de xilitol ($19,56 \text{ gL}^{-1}$) por *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em reator de bancada.

6. CONCLUSÕES

O estudo do aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol por linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* permitiu as seguintes conclusões:

- Com relação à seleção de linhagens produtoras de xilitol em meio complexo contendo xilose (YPX) foi possível constatar que na presença apenas de xilose como fonte de carbono, todas as leveduras avaliadas produziram preferencialmente xilitol, algumas delas conseguiram produzir uma pequena quantidade de etanol. Entre as 16 linhagens testadas, duas de cada espécie foram selecionadas utilizando parâmetros como rendimento de xilitol ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica (Q_p). As leveduras que foram estatisticamente diferentes e consideradas como as melhores produtoras de xilitol foram *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 (P 46,87 gL⁻¹; $Y_{p/s}$ 0,87 gg⁻¹) e UFMG-CM-Y409 (P 42,36 gL⁻¹; $Y_{p/s}$ 0,84 gg⁻¹), *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 (P 39,66 gL⁻¹; $Y_{p/s}$ 0,71 gg⁻¹) e UFMG-CM-Y3747 (P 39,26 gL⁻¹; $Y_{p/s}$ 0,72 gg⁻¹). As leveduras selecionadas foram testadas na presença de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar.

- A melhoria na produção de xilitol (P 14,06 gL⁻¹; $Y_{p/s}$ 0,63 gg⁻¹) pelas linhagens de *C. xylosilytica* em meio contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar (40 gL⁻¹ de xilose) foi possível através da utilização de uma fonte alternativa de nitrogênio (extrato de farelo de arroz) e pela redução da fonte de nitrogênio mais cara (extrato de levedura). Estas linhagens de levedura (UFMG-CM-Y309 e UFMG-CM-Y409) foram utilizadas para testes subsequentes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para avaliar os efeitos de diferentes concentrações de inóculo e relação volume de frasco com volume de meio.

- A linhagem *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) foi selecionada como promissora para a bioconversão de xilose em xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar após adequação da suplementação, concentração inicial de inóculo e relação volume de frasco e volume de meio (aeração) em frascos Erlenmeyers. A menor concentração de células (1 gL⁻¹) e a maior disponibilidade de

oxigênio (25mL de meio) favoreceu a produção de xilitol (P 22,13 gL^{-1} ; $Y_{p/s}$ 0,75 gg^{-1}).

- Com relação a avaliação em biorreator de bancada do desempenho da *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em condições previamente selecionadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar constatou-se que em condição de menor transferência de oxigênio (k_{La} de 21,60 h^{-1}) a produção em xilitol (P 19,56 gL^{-1} ; $Y_{p/s}$ 0,50 gg^{-1}), foi similar aos ensaios em frascos Erlenmeyers (P 22,13 gL^{-1} ; $Y_{p/s}$ 0,75 gg^{-1}), , apesar dos fatores de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) e produtividades volumétricas em xilitol (Q_p) terem sido inferiores aos obtidos em frascos Erlenmeyers. A condução do processo em menor transferência de oxigênio favoreceu a manutenção da velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_x = 0,050 \text{ h}^{-1}$) em níveis mais baixos do que na condição de maior transferência de oxigênio dissolvido no meio (k_{La} de 35,60 h^{-1}) e com isso favoreceu-se a produção de xilitol (19,56 gL^{-1}) por *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) em reator de bancada.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com relação aos resultados de produção de xilitol obtidos neste presente trabalho, sugere-se:

Estudar detalhadamente novas condições de transferência de oxigênio dissolvido em associação com controle de pH e variação da concentração inicial de D-xilose no meio hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar em biorreator de bancada utilizando a promissora levedura *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309) na produção de xilitol.

Avaliação do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar em associação com a presença de compostos inibitórios ao metabolismo microbiano, provenientes do pré-tratamento ácido do bagaço de cana na produção de xilitol.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, T. L.; SILVA, I. J.; MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. *Process Biochemistry*, v. 49: p. 1779–1789, 2014.

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

ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4851–4861, 2010.

ANTUNES, F.A.F.; SANTOS, J.C.; CUNHA, M.A.A.; BRUMANO, L.P.; MILESSI, T.S.S.; TERÁN-HILARES, R.; PERES, G.F.P.; MEDINA, K.J.D.; SILVA, D.D.V.; DALLI, S.S.; GAIKWAD, S.; SILVA, S.S. Biotechnological production of xylitol from biomass. Production of platform chemicals from sustainable resource. *Biofuels and Biorefineries*, p. 311-342, 2017.

ARANTES, V.; SADDLER, J.N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, v. 3, n. 4, 2010.

AREA, M.C.; FELISSIA, F.E.; VALLEJOS, M.E. Products from the delignification of sugarcane bagasse. In: Goncalves, J.F.; Correia, K.D. (Eds.), *Sugarcane: Production, Cultivation and Uses*. Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, 2012.

ARRUDA, P.V. Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. 163f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, D.D.V.; FELEPE, M.G.A. Evaluation of hexose, and pentose inpre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation*, 22, p. 815-822, 2011.

ARRUDA, P.V.; SANTOS, J.C.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, D.D.V.; YAMAKAWA, C.K.; ROCHA, G.J.M.; NOLASCO JR., J.; PRADELLA, J.G.C.; ROSSEL, C.E.V.; FELIPE, M.A. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 47, 297–302, 2017.

BALAT, M; BALAT, H; CAHIDE, O. Progress in bioethanol processing. *Prog. Energ. Combust. Sci. Oct*, 34 (5): 551-73, 2008.

BAPTISTA, S.L.; CUNHA, J.T.; ROMANÍ, A.; DOMINGUES, L. Xylitol production from lignocellulosic whole slurry corn cob by engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. *Bioresource Technology*. v 267, p. 481-491, 2018.

BATISTA, A.; CALGAROTO, C.; KLUG, T.; ZAMBIAZI Ação antioxidante de extratos de farelo de arroz com diferentes níveis de polaridades I Congresso de Ciências Farmacêuticas de Cascavel, I Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do MERCOSUL, UNIOESTE (Universidade Estadual do Oeste do Paraná) anais, p. 59, 2004.

BAR, A. Xylitol. In: O'BREIN NABORS, L.; GELARDI, R.C., eds. Alternative Sweeteners. 2. ed., New York: Marcel Dekkor Inc., p.349-379, 1991.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Planejamento e otimização de experimentos. 2 ed. Campinas: Ed. UNICAMP, 299 p, 1995.

BEHERA, S.; ARORA, R.; NANDHAGOPAL, N.; KUMAR, S. Importance of chemical pretreatment for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 36: 91-106, 2014.

BERA, M.B.; MUKHERJEE, R.K. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci.*, 54: 142–145, 1989.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHIMIS.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: Na overview. *Bioresource Technology*, v.101, 13, p. 4767-4774, 2010.

BRANCO, R.F.; SANTOS, J.C.; SARROUH, B.F.; RIVALDI, J.D.; PESSOA JR, A.; SILVA, S.S. profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under diferente oxygen transfer volumetric coeficiente values. *Journal of Chemical Technology Biotechnology*, v. 84, p. 326-330, 2009.

BRANCO, R.F. Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção. 133f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

BRANDÃO, R.L.; VAZ, A.B.M.; ESPIRITO SANTO, L.C.; PIMENTA, R.S.; MORAIS, P.B.; LIBKIND, D.; ROSA, L.H.; ROSA, C.A. Diversity and biogeographical patterns of yeast communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. *Fungal Ecology*, 28, 33-43, 2017.

BUCKERIDGE, M.S; GRANDIS, A.; TAVARES, E.Q.P. Disassembling the Glycomic Code of Sugarcane Cell Walls to Improve Second-Generation Bioethanol Production. *Bioethanol Production From Food Crops*, 2019.

CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; MOURO, A.; PROMPT, A. H.; GOMES, F. C. O.; STAMBUK, B. U.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel D-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. *Springer Science*, v. 103: p.421–431, 2012a.

CADETE, R.M.; MELO, M.A.; DUSSA, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. PLOS ONE v.7 (8) e0043135, 2012b.

CADETE, R. M.; FONSECA, C.; ROSA, C. A. Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. Biofuels in Brazil, Chapter 12, p.255-279, 2014.

CADETE, R. M.; CHEAB, M. A.M.; SANTOS, R. O.; SAFAR, S. V. B.; ZILLI, J. E.; VITAL, M. J. S.; BASSO, L. C.; LEE, C.; KURTZMAN, C. P.; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol producing yeast species isolated from lignocellulosic materials. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 00, p. 1–7, 2015.

CADETE, R.M.; HERAS, A.M.; SANDSTROM, A.G.; FERREIRA, C.; GÍRIO, F. GRAUSLUND, M.F.G.; ROSA, C.A.; FONSECA, C. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology for Biofuels. 9:167, 2016a.

CADETE, R.M.; CHEAB, A.M.; VIANA, A.L.; OLIVEIRA, E.S.; FONSECA, C. ROSA, C.A. The yeast *Scheffersomyces amazonensis* is an efficient xylitol producer. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 32:207, 2016b.

CADETE, R.M.; MELO-CHEAB, M.A.; DUSSÁN, K.J.; RODRIGUES, R.C.L.B.; SILVA, S.S.; GOMES, F.C.O.; ROSA, C.A. Production of bioethanol in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces illinoisensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. Journal Applied Microbiology. 123, 1203–1213, 2017.

CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A., CANETTIERI, E. V, SOLENZAL, A. I. N. Use of Response Methodology to Evaluate the Optimum environmental Conditions for the Bioconversion of xylose into xylitol in Eucalyptus Hemicellulosic Hydrolysate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 78, p. 945- 948, 2003.

CANILHA L.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption and ion-exchange resins for xylitol production. Process Biochemistry, v. 39, p.1909-1912, 2004.

CANILHA, L.; MILAGRES, A.M. F.; SILVA, S.S.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A.; ROCHA, G.J.M.; FERRAZ, A.; CARVALHO, W. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrolise ácida seguida por hidrolise enzimática: uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. Revista Analítica, n. 44, p. 48-54, 2010.

CANILHA, L.; RODRIGUES, R.C.L.B.; ANTUNES, F.A.F.; CHANDEL, A.K.; MILESSI, T.S.S.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Bioconversion of Hemicellulose from

Sugarcane Biomass Into Sustainable Products. Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization, 2013.

CANETTIERI, E.V.; SILVA, J.B.A.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 38, n. 3, jul/set., 2002.

CARVALHO, R. J.; MARTON, J.M.; SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Evaluation of the *Candida guilliermondii* cell growth in cane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with active charcoal and this combination with ion exchange resins. In: Simpósio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras, 5. Mar, 2005.

CARVALHO W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutrition supplementation. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.43, n.1, 2007.

CHANDEL A.K; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.K.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. Bioresource Technology v. 98, p. 1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V.; RAO, L.V. Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: State-of-the-art. In: O.V. Singh and S.P. Harvey (eds). Sustainable Biotechnology: Renewable Resource and New Perspectives. Netherland: Springer Verlag, p. 63-81, 2010.

CHANDEL, A.K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P. Bioconversion of pentose sugar into ethanol: A review and future directions. Biotechnology and Molecular Biology Review, v.6, n.1, p.8-20, 2011.

CHAUD, L.C.S. Avaliação do carvão vegetal e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a produção biotecnológica de xilitol. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

CHEN, X.; JIANG, ZH, CHEN S, QIN W. Microbial and Bioconversion production of D-Xylitol and its detection and application. International Journal of Biological Sciences, v. 6, n. 7, p. 834-844, 2010.

CHENG, H. WANG, B.; LV, J.; JIANG, M.; LIN, S.; DENG, Z. Xylitol production from xylose mother liquor: a novel strategy that combines the use of recombinant *Bacillus subtilis* and *Candida maltose*. Microbial Cell Factories, v. 10, p. 1-12, 2011.

CHENG K.K., WU, J. LIN, Z.; ZHANG, J. Aerobic and sequential anaerobic fermentation to produce xylitol and ethanol using non-detoxified acid pretreated corncob. Biotechnology for Biofuels, 7:166, 2014.

CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol

production, and development of an innovative method. *Biomass Bioenergy*; 46:25–35, 2012.

CLAYE, S. S.; IDOURAINE, A. E.; WEBER, C. W. Extraction and fractionation of insoluble fiber from five fiber sources. *Food Chemistry*, v.57, n.2, p.305-310, 1996.

COCCO, F.; CARTA, G.; CAGETTI, M.G.; STROHMENGER, L.; LINGSTRÖM, P.; CAMPUS, G. The caries preventive effect of 1-year use of low-dose xylitol chewing gum. A randomized placebo-controlled clinical trial in high-caries-risk adults. *Clin Oral Invest*, 21:2733–2740, 2017.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiological Review*, v. 29, p. 3-23, 2005.

CONAB – Acompanhamento da Safra Brasileira – Disponível em: <file:///C:/Users/User/Downloads/BoletimZCanaZ4ZLevantamentoZ17-18.pdf> Acessado em setembro de 2018.

CONAB – Acompanhamento da Safra Brasileira – Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/Boletim_Cana_3_Levantamento_15-16.pdf Acessado em: setembro de 2018.

CORTEZ, D.V. Influência dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. Dissertação (Mestrado), 128p. Lorena-SP, Brasil, 2005.

COSTA, W.L.S.; BOCCHI, M.L.M. Aplicações do bagaço de cana de açúcar utilizadas na atualidade. *Ciência; Tecnologia, Jaboticabal*, v.2, n.1, 2012.

CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. *Food Biotechnology*, New York, v. 14, p. 79-97, 2000.

CUNHA, M.A.A. Bioprodução de xilitol a partir de bagaço de cana de açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena (EEL), Lorena, 2006.

DA CUNHA-PEREIRA, F., HICKERT, L., SENHEM, N., ROSA, C.A., SOUZA-CRUZ, P., 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*, 102, 4218–4225, 2011.

DAGNINO E.P.; CHAMORRO E.R.; ROMANO S.D.; FELISSIA F.E.; AREA M.C. Optimization of the acid pretreatment of rice hulls to obtain fermentable sugars for bioethanol production. *Ind. Crops Prod.* 42: 363-8, 2013.

DAMIANI, A.L.; KIM, M.H.; WANG, J.. An Improved Dynamic Method to Measure k_{La} in Bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 9999, 2014.

DASGUPTA, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, D.K.; GHOSH, D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. *Microbiological Research* 197, 9–21, 2017.

DING, J.; BIERMA, J.; SMITH, M. R.; POLINER, E.; WOLFE, C.; HADDUCK, A. N.; ZARA, S.; JIRIKOVIC, M.; ZEE, K.; PENNER, M. H.; PATTON-VOGT, J.; BAKALINSKY, A. T. Acetic acid inhibits nutrient uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: auxotrophy confounds the use of yeast deletion libraries for strain improvement. *Applied Microbiol Biotechnol*, v. 97: p. 7405–7416, 2013.

DIZ, J.; CRUZ, J.M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J.C. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates in low-cost fermentation media. *Food Technology Biotechnology*. 40, 191–197, 2002.

DUSSÁN, K.J., SILVA, D.D.V., PEREZ, V.H., SILVA, S.S. Evaluation of oxygen availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. Energy*, 87, 703-710, 2016.

EL-BRAZ, A.F.; SHETAIA, Y.M.; ELKHOULI, R.R. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimizes growth conditions. *African Journal of Biotechnology*, v. 10(68): p. 15353-15363, 2011.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V; CÂNDIDO, E. J; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SINAFERM – Simpósio Nacional de Fermentação, 14. Anais, CD-ROM, v. 1, p 1-7, 2003.

FELIPE, M. G. A. Xilitol: Uma abordagem enzimática no metabolismo de xilose durante fermentações do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. 6 Anais, p. 143, 2004.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D. C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. *Journal of Basic Microbiology*, v, 35, p. 171-177, 1995.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Amsterdam, v.18, n.4, p.251-254, 1997a.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. *Biomass and Bioenergy*, v.13, n. 1/2, p. 11-14, 1997b.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. C. O.; CANETTIERI, E. V; CÂNDIDO, E. J; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, Florianópolis. Anais... Florianópolis, 2003.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: Lignocellulose Biodegradation. New York: American, Chemical Society, p.300-315, 2004.

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

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

FERREIRA, A.S. Estudo de propriedades microbiológicas e toxicológicas do xilitol visando a sua aplicação no controle da dermatite atópica. 2007. 117f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

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

FREITAS, L.F.D. Comunidades de leveduras associadas a cactáceas de exossistemas de cerrado e restinga. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, 2014.

FREITAS, J.W.L.C. Estudo da casca de café como matéria-prima em processos fermentativos. Dissertação (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP. Departamento de Biotecnologia, 2016.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen rate in microbial process: An overview. *Biotechnology Advances*, v. 27, p. 153-176, 2009.

GHAFFAR, A; YAMEEN, M.; ASLAM, N.; JALAL, F.; NOREEN, R.; MUNIR, B; MAHMOOD, Z.; SALEEM, S.; RAFIQ, N.; FALAK, S.; TAHIR, I.M., NOMAN, M.; FAROOQ, M.U.; QASIM, S.; LATIF, F. Acidic and enzymatic saccharification of waste agricultural biomass for biotechnological production of xylitol. *Chemistry Central Journal*, 11:97, 2017.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: OLSSON, L (Ed.). *Biofuels*. Berlin: Springer-Verlag, 2007.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Madrid, v. 62, n. 2, p. 334-361, 1998.

GÍRIO, F.M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GÓMEZ, E.O.; SOUZA, R.T.G.; ROCHA, G.J.M.; ALMEIDA, E.; CORTEZ, L.A.B. A palha de cana de açúcar como matéria prima para processos de segunda geração. In: Cortez (Ed.). Bioetanol de cana de açúcar: P;D para produtividade sustentabilidade – São Paulo: Blucher, p. 637-659, 2010.

GOUVEIA, E.R.; NASCIMENTO, R.T.; SOUTO-MAIOR, A.M; ROCHA, G.J.M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana de açúcar. Química Nova, vol. 32, no 6, 1500-1503, 2009.

GRAY, K.A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. Current opinion in Chemical Biology, v.10, p.141-146, 2006.

GUAMÁN-BURNEO, M.C.; DUSSÁN, K.J.; CADETE, R.M.; CHEAB, M.A.M.; PORTERO, P.; CARVAJAL-BARRIGA, E.J.; SILVA, S.S.; ROSA, C.A. Xylitol production by yeasts isolated from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of *Cyberlindnera galapagoensis* f.a., sp. nov. Antonie van Leeuwenhoek, 108:919–931, 2015.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M.F.; LIDÉN, G.; ZACCGI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology, v. 24, n. 12, p. 549-556, 2006.

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

HARMSSEN, P.; HUIJGEN, W.; BERMUDEZ-LOPEZ L.; BAKKER R. Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass, 1st ed. Wageningen: Food; Biobased Research; 2010.

HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. Microbial Biotechnology, v. 1, p. 497-506, 2008.

HEIKKILÄ, H., NURMI, J., RAKKILA, L., TÖYRYLA, M., KIKKONUMMI. Method for the production of xylitol. Patente US n.5.081.026. 1992.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresource Technology, v. 100, p.10-18, 2009.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F. Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana de açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP, 2015.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A.F.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. Brazilian Journal of Microbiology. 47, p. 489-496, 2016.

HERRERA, S.; SIMÓN, J.T.L.; CABRIALES, J.J.G.; RAMÍREZ, J.A.; VÁZQUEZ, M. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering*. Essex, v. 63, n. 1, p. 103-109, 2004.

HICKERT, L.R.; CUNHA-PEREIRA, F.; SOUZA-CRUZ, P.B.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Ethanogenic fermentation of co-cultures of *Candida shehatae* HM 52.2 and *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 in synthetic medium and rice hull hydrolysate. *Bioresource Technology*, v. 131, 508–514, 2013.

HILARES, R.T.; SWERTS, M.P.; AHMED, M.A.; RAMOS, L.; SILVA, S.S.; SANTOS, J.C. Organosolv pretreatment of sugarcane bagasse for bioethanol production. *Industrial Engineering Chemistry Research*. 56 (14), pp 3833–3838, 2017.

HILARES, R.T.; RAMOS, L.; SILVA, S.S.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; SANTOS, J.C. Hydrodynamic cavitation as a strategy to enhance the efficiency of lignocellulosic biomass pretreatment. *Critical Reviews in Biotechnology*. v. 38:4, 483-493, 2018.

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

HUANG, H.; GUO, X.; LI, D.; LIU, M.; WU, J.; REN, H. Identification of crucial yeast inhibitors in bio-ethanol and improvement of fermentation at high pH and high total solids. *Bioresource Technology*, v.102: p. 7486–7493, 2011.

HUBBARD, D.W.; LEDGER, S.E.; HOFFMAN, J.A. Scaling-up aerobic fermentation with produce non-newtonian, viscoelastic broths. I: *Advances in Bioprocess Engineering*. GALINDO, E. & RAMIREZ O. T. (eds), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp. 95-101, 1994.

JEFFRIES, T.W.; Effects of Nitrate on Fermentation of Xylose and Glucose by *Pachysolen tannophilus*, *Nature Biotechnology*. 1, p 503-506, 1983.

JIA, H.; SHAO, T.; ZHONG, C.; LI, H.; JIANG, M.; ZHOU, H.; WEI, P. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide Extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 151 676–683, 2016.

JÖNSSON, L.J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology Biofuels*, 1–10, 2013.

JÖNSSON, L.J.; MARTÍN, C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology* 199, 103–112, 2016.

JIANG, X.; HE, P.; QI, X.; LIN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, Q. High-efficient xylitol production by evolved *Candida maltosa* adapted to corncob hemicellulosic hydrolysate. *Journal Chemical Technology Biotechnology*; 91: 2994–2999, 2016.

KAMAT, S.; GAIKWAD, S.; KUMAR, A.R.; and GADE, W.N. Xylitol production by *Cyberlindnera (williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, 115, p. 1357-1367, 2013.

KATO, D. M.; ELÍA, N.; FLYTHE, M.; LYNN, B.C. Pretreatment of lignocellulosic biomass using Fenton chemistry. *Bioresource Technology*, v. 162, p. 273-278, 2014.

KAZI, F.; FORTMAN, J.; ANEX, R.; HSU, D.; ADEN, A.; DUTTA, A.; KOTHANDARAMAN, G. Technoeconomic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel* 89, S20–S28. 9, 2010.

KIM, D. S.; MYINT, A. A.; LEE, H. W.; YOON, J.; LEE, Y. W. Evaluation of hot compressed water pretreatment and enzymatic saccharification of tulip tree sawdust using severity factors. *Bioresource Technology*, 144, 460–466, 2013.

KIMBERLY CLARK CO (USA). YANG SHU-PING; HUANG LEI; Compound and method for prevention and/or treatment of vaginal infections. US 2006106117, 2006.

KIMBERLY CLARK CO (USA).Stephanie M. Martin, Lei Huang, Shu-Ping Yang, Yanbin Huang, Julie Villanueva, Sharon Linda Greene, Kelly Arehart, Curtis Sayre, Robert B. Johnson. Vaginal treatment compositions containing xylitol.US7786176B2, 31 ago. 2010.

KOOTSTRA, A.M.J.; BEEFTINK, H.H.; SCOTT. E.L.; SANDERS, J.P.M. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, v. 2, n. 31, 2009.

KUMAR, D.; JAIN, V.K.; SHANKER, G.; SRIVASTAVA, A. Citric acid production by solid state fermentation using sugarcane bagasse. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1731-1738, 2003.

KUMAR, P.; BARRETT, D.M.; DELWICHE, M.J.; STROEVE, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial ; Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, V.; KRISHANIA, M.; PREET SANDHU, P.; AHLUWALIA, V.; GNANSOUNOU, E.; SANGWAN, R.S. Efficient detoxification of corn cob hydrolysate with ion-exchange resins for enhanced xylitol production by *Candida tropicalis* MTCC 6192. *Bioresource Technology*. 251, 416–419, 2018.

KUMDAM, H.B.; MURTHY, S.N.; GUMMADI, S.N. A statistical approach to optimize xylitol production by *Debaromyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. *Food and Nutrition Sciences*, v.3, p. 1027-1036, 2012.

LANGE, J. Lignocellulose conversion: An introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels Bioproducts Biorefining*, 1, 39–48, 2007.

LAVARACK, B.P.; GRIFFIN, G.J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, v. 23, n. 5, p. 367-380, 2002.

LEHNINGER, A.L. Lehninger princípios de bioquímica/coordenação de tradução Arnaldo Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. 4 ed., São Paulo: SARVIER, 2006.

LEKULE, F. P.; SARWATT, S. V.; MUNISI, W. G. Effect of Supplementation of Rice Bran on Growth Performance and Carcass Quality of Growing Finishing Pigs. Tsap Proceedings, v.28. 2001.

LE MOS, J.L.S. Estudo da produção de xilanases por *Aspergillus awamori* em bagaço de cana. Dissertação. (Doutorado em tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química – UFRJ, 2001.

LÓPEZ-LINARES, J.C.; ROMERO, I.; CARA, C.; CASTRO, E.; MUSSATO, S.I. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. Bioresource Technology 247, 736–743, 2018.

LOPES, M.M. Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioetanol. Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial – Escola de Engenharia de Lorena- SP- USP, 2015.

LORLIAM, W.; AKARACHARANYA, A.; KRAJANGSANG, S.; TOLIENG, V.; TANASUPAWAT, S. Optimization of Xylitol Production by *Candida tropicalis* A26. Chiang Mai J. Sci. 44(1) : 50-58, 2017.

LOURENÇO, M. V. M. Seleção de Leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, 2009.

MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xylitol? Medical hypotheses, v. 54, n 4, p. 603-613, 2000.

MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F.; Xylitol – Its properties and use as a sugar substitute in foods. In: Food R. A. Symp. Sugar and Sugar Replacements, London, 1973.

MARTÍNEZ, A.C.; SILVA, S.S. FELIPE, M.G.A. Effect of the Oxygen Transfer Coefficient on Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Continuous Stirred-Tank Reactor Fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology Vol. 84–86, 2000.

MARTÍNEZ, E.A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YOK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxificação of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. Biotechnology Progress, v.17, p. 289-293, 2001.

MARTÍNEZ, E.A.; SILVA, J.B.A.; GIULIETTI, M.; SOLENZAL, A.I.N. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology 40 1193–1198, 2007.

MARTÍNEZ, E.A.; SANTOS, J.A.F. Influence of the use of rice bran extract as a source of nutrients on xylitol production. *Ciência Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 32(2): 308-313, abr.-jun. 2012.

MARTINI, C.; TAU-K-TORNISIELO, S.M.; BASTOS, R.G.; CECCATO-ANTONINI, S.R. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World J Microbial Biotechnology*, 32:80, 2016.

MARTON, J.M. Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol, 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena (EEL), 2002.

MARTON, J.M. Avaliação de um sistema contínuo composto por colunas de carvão ativo e resinas de troca iônica para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. 131f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP. Departamento de Biotecnologia, 2005.

MATSUOKA, S.; BRESSIANI, J.; MACCHERONI, W.; FOUTO, I. Bioenergia da cana. In: SANTOS, F.A.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (eds). *Cana de açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol – Tecnologias e perspectivas*. 2. Ed. Revisada e ampliada – Viçosa, MG, p. 547-577, 2012.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism Clinical and Experimental*, v. 47, p 578-583, 1998.

MAURYA, D.P.; SINGLA, A.; NEGI, S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *Biotech*. 5: 597-609, 2015.

MAVITUNA, F. Strategies for bioreactor scale-up. In: MOREIRA, A.R.; WALLACE, K.K. editors. *Computer and information Science Application in bioprocesso Engineering*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996.

MAZUTTI, M.; BENDER, J.P.; TREICHEL, H.; LUCCIO, M. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, p. 56-59, 2006.

MELAJA, J.; HÄMÄLÄINEN, L. Process for Making xylitol. US n. 4008285. 15 fev. 1977.

MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R. K. Evaluation of corn cob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. *Carbohydrate polymers*, v. 92, n. 2, p. 1596–601, 2013.

MOHAMAD, N. L.; KAMAL, S. M. M.; MOKHTAR, M. N. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, v. 31: p. 74–89, 2015.

MONTANUCI, L.M.G.M.; VOLPATO, L.E.R.; FRANÇA, D.C.C.; AGUIAR, S.M.H.C.A.; MACHADO, M.A.A.M. Efeito de Diferentes Gomas de Mascar sobre o pH Salivar de Crianças. Pesquisa Brasileira Odontoped Clinica Integrada, João Pessoa, 13(1):23-29, jan./mar., 2013.

MONTGOMERY, D.C. Design and analysis of experiments, 5th edition. New York, Willey, 2001.

MORALES, M.L.V. Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol. 141f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena – USP. 2005.

MOURA, M. Produção de etanol e xilitol a partir de D-xilose por linhagens *Candida (Spathaspora) materiae*. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais- UFMG, 2015.

MORITA, T.A.; SILVA, S.S. Inhibition of Microbial Xylitol Production by Acetic Acid and Its Relation with Fermentative Parameters. Applied Biochemistry and Biotechnology, Vol. 84–86, 2000.

MUSSATO, I. S.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n.28, p.34-39, set/out 2002.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Unicamp, 2001.

NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos. 4. ed. Porto Alegre, Brasil, 2010.

NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V. MARTINS, Á. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

OJEDA, K.; ÁVILA, O.; J.SUÁREZ, J.; KAFAROV, V. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. Chemical Engineering Research and Design, v. 89, p. 270–279, 2011.

OKONKOWSKI, J.; KIZER-BENTLEY, L., LISTNER, K.; ROBINSON. D; CHARTRAIN, M. Development of a robust, versatile and scalable inoculums trains for the production of a DNA vaccine. Biotechnology Progress, v.21, n.4, p. 1038-1047, 2005.

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

- PAN, X.; ARATO, C.; GILKES, N.; GREGG, D. MABEE, W.; PYE, K.; XIAO, Z.; ZHANG, X. SADDLER, J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 90, p. 473-481, 2005.
- PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v.74, p.69-80, 2000.
- PANESAR, R.; KAUR, S. and PANESAR P.S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review. *Current Opinion in Food Science*. Volume 1, p. 70-76, 2015.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 191-201, 1998a.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresource Technology*, v. 65, p. 203-212, 1998b.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 66: p. 25-40, 1998c.
- PEPPER, T.; OLINGER, P.M. xylitol in sugar-free confections. *Food Technology*, v. 42, n. 10, 1988.
- PFEIFER, M.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; TOBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of culture condition on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 57-58, p. 423-430, 1996.
- PING, Y.; LING, H.-Z.; SONG, G.; GE, J.-P. Xylitol production from nondetoxified corncob hemicellulose acid hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 75, p. 86-91, 2013.
- PIRT, S.J. principles of microbe and cell cultivation. New York: Blackell Scientific, p. 260-268, 1975.
- PRAKASHAM, R.S.; SREENIVAS RAO, R.; HOBBS, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, v.3, n.1, p.8-36, 2009.
- PRAKASH, G.; VARMA, A.J. PRABHUNE, A.; YOGESH, S.; RAO, M. Microbial production of xylitol from D-xylose and sugarcane bagasse hemicelluloses using newly isolated thermotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, 3304-3308, 2011.
- RABEMANOLONTSO, H.; SAKA, S. Various pretreatments of lignocellulosics. *Bioresource Technology*, v.199, p. 83-91, 2016.

RAFIQUL, I.S.M.; SAKINAH, A.M.M. Perspective bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects *International Food Research Journal*, 19 (2), 405–408, 2012.

RAFIQUL, I.S.M., SAKINAH, A.M.M. Processes for the production of xylitol—review. *Food Rev. Int.* 29, 127–156, 2013.

RAJ, T; KAPOOR, M.; GAUR, R.; CHRISTOPHER, J.; LAMBA, B.; TULI, D.K.; KUMAR, R. Physical and chemical characterization of various Indian agriculture residues for biofuels production. *Energy and Fuels*, v. 29, p. 3111-3118, 2015.

RAMBO, K.D.; BEVILAQUA, D.B.; BRENNER, C.G.B.; MARTINS, A.F. Xylitol from husks by acid hydrolysis and *Candida* yeast fermentation. *Química Nova*, v. 36, No 5, 634-639, 2013.

RAO, L.V.; GOLI, J.K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, 213, p. 299–310, 2016.

RAVELLA, S.R.; GALLAGHER, J.; FISH, S.; PRAKASHAM, R.S. Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends. In *d-Xylitol*; SILVA S.S., CHANDEL, A.K. *D-Xylitol*. Eds.; Springer, Berlin and Heidelberg, p. 291–306, 2012.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.18, p.299-311, 2001.

RODRIGUES, D.C.G.A. Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar em sistema descontínuo alimentado. 104p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 1999.

RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A.; VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables. *Process Biochemistry*, v. 38, p. 1231-1237, 2003.

RODRIGUES, R.C.L.B. Influência da disponibilidade de O₂ no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana. 246f. Tese (Doutorado) Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª Ed. Campinas-SP, Casa do Espírito amigo Fraternidade fé e amor, 2009.

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

RODRIGUES, R.C.L.B.; LU, B.; LIN, B.; JEFFRIES, T.W. Fermentation kinetics for xylitol production by a *Pichia stipitis* D-xylulokinase mutant previously grown in spent sulfite liquor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 148, n. 1-3, p. 199-209, 2011.

RODRIGUES, R.C.L.B.; KENEALY, W.R.; JEFFRIES, T. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia Stipitis* YS-30. *Journal Industrial Biotechnology*, v. 38, p. 1649-2655, 2011.

RUEDA, C.; CALVO, P.A.; MONCALIÁN, G.; RUIZ, G.; COZ, A. Biorefinery options to valorize the spent liquor from sulfite pulping. *Chemical Technology and Biotechnology*. v.90, Issue12, p. 2218-2226, 2015.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology*, v.30, p. 279-291, 2003.

SAKALLIOGLU, Ö.; GÜVENÇ, I. A.; CINGI, C. Xylitol and its usage in ENT practice. *The Journal of Laryngology ; Otology*, 128(07), 580-585, 2014.

SALLI, K.M.; GURSOY, U.K.; SODERLING, E.M.; OUWEHAND, A.C. Effects of Xylitol and Sucrose Mint Products on *Streptococcus mutans* Colonization in a Dental Simulator Model. *Springer*, 17, 2017.

SAMPAIO, F.C.; CHAVES-ALVES, V.M.; CONVERTI, A.; LOPES PASSOS, F.M.; CAVALCANTE COELHO, J.L. Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*. 99:502–8, 2008.

SANCHES, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. *Enzyme Microbial Technology*, v. 10, p. 315-318, 1988.

SANTOS, F.A.; QUEIRÓZ, J.H; COLODETTE, J.L.; FERNANDES, S.A.; GUIMARÃES, V.M.; REZENDE, S.T. Potencial da palha de cana de açúcar para produção de etanol. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 1004-1010, 2012.

SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATO, S.I SILVA, S.S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 113-118, 2005.

SANTOS, J.C.; MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Biochemical Engineering Journal*, v. 23, n. 1, p. 1-9, 2005.

SANTOS, E.F.S.; SCHAUTZ, L.C.A.; CARDOSO, C.A.L.; ERNANDES, J.R.; BATISTOTES, M. O efeito da complexidade estrutural da fonte de carbono e

nitrogênio no desempenho fermentativo de leveduras industriais. *Ciência e Natura*, v. 35 n. 2, p. 009-014, 2013.

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their principles. *Journal of Experimental Botany*, v.60, n. 13, p.3615-3635, 2009.

SARKAR, N.; GHOSH, S.K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, v. 37, p. 19-27, 2012.

SARROUH, B. F.; SILVA, S.S.; SANTOS, D.T.; CONVERTI, A. Technical/economical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. *Chemical Engineering ; Technology*, v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SARROUH, B. F.; SILVA, S.S. Evaluation of the performance of a three-phase fluidized bed reactor with immobilized yeast cells for the biotechnological production of Xylitol. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, v. 6, p. 1-15, 2008.

SARROUH, B.F.; BRANCO, R.F.; SILVA, S.S. Biotechnological production of xylitol: Enhancement of monosaccharide production by post-hydrolysis of dilute acid sugarcane hydrolysate. *Applied Biochemistry Biotechnology*, v. 153, o. 163-170, 2009.

SÁRVÁRI, I.; FRANZÉN, C.J.; TAHERZADEH, M.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Effects of furfural on the respiratory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in glucose-limited chemostats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 4076-4086, 2003.

SATHITSUKSANOH, N.; ZHU, Z.; ROLLIN, J. Solvent fractionation of lignocellulosic biomass. *Bioalcohol Production: Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass*, vol. 1. Woodhead Publishing Limited, 2010.

SAUNDERS, R.M. Rice bran: Composition and potential food uses. *Food Reviews International*, 1(3), 465-495, 1985.

SCHNEPER, L.; DUVEL, K.; BROACH, R. J. Sense and sensibility: nutritional response and signal integration in yeast. *Current Opinion in Microbiology*, New Jersey, v.7, p. 624-630, 2004.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M.L.; GONÇALVES, A.R. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? *Química Nova*. v. 24, n. 2, p. 247-251, 2001.

SCHOULTEN, N. A.; TEIXEIRA, A. S.; RODRIGUES, P. B.; FREITAS, R. T. F.; CONTE, A. J.; SILVA, H. O. Desempenho de frangos de corte alimentados com ração contendo farelo de arroz e enzimas. *Ciências Agrotécnicas*, v. 27, n. 6, p. 1380-1387, nov./dez., 2003.

SCHMIDELL, W. FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial*. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v.2, p;179-192, 2001.

SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SHALLOM, D.; SHOHAM, Y. Microbial hemicellulases. Current Opinion in Microbiology, v. 6, n. 3, p. 219-228, 2003.

SILVA, D.D.V. Bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana: estudo do efeito do ácido acético. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Escola de Engenharia de Lorena – EEL – USP, 2001.

SILVA, D.D.V.; BANHE, A.A.; FELIPE, M.G.A. Efeito da fonte de carbono no cultivo do inoculo de *Candida guilliermondii* para a obtenção de xilitol. In: III Encontro de Pós Graduação da Universidade do Vale do Paraíba, 3, 2003, São José dos Campos/SP. Anais.1 CD-Rom, 2003.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose: xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 81, p. 1294-1300, 2006.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Evaluation of inoculum of *Candida guilliermondii* grow in presence of glucose on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity and xylitol production during batch fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.121, n.12, p.427-437, 2005.

SILVA-FERNANDES, T.; SANTOS, J.C.; HASMANN, F.; RODRIGUES, R.C.L.B; IZARIO FILHO, H.J.; FELIPE, M.G.A.. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. Bioresource Technology, 2017.

SILVA, V.F.N. Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol celulósico. Dissertação (Mestre em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena – EEL, 2009.

SILVA, D.D.V.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol.50, n. 2: pp.207-215, 2007.

SILVA, G.M. Pré-tratamento do bagaço de cana de açúcar com amônia aquosa para a produção de etanol. 125f. (Dissertação). São Carlos – SP (Brasil): Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Factors that Affect the Biosynthesis of Xylitol by Xylose-Fermenting Yeasts. A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology. Vol. 70-72, 1998.

SOUZA A.P.; GRANDIS, A.; LEITE, D.C.C.; BUCKERIDGE, M.S. Sugarcane as a bioenergy source: history, performance, and perspectives for second-generation bioethanol. *BioEnergy Research*, v. 7, p. 24-35, 2014.

SU, Y.K.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Effects of Aeration on Growth, Ethanol and Polyol Accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 112, No. 3, March, 2015.

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

SUN, J.X.; SUN; X.F.; ZHAO, H.; SUN, R.C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. *Polymer Degradation and Stability*, v. 84, p. 331-339, 2004.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 9, p. 1621-1651, 2008.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Producton of biotheanol from wheat straw: Am overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

TAMANINI, C.; HAULY, M.C.O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina Ci. Agr. Londrina*, v.25, n.4, p.315-330, 2004.

THANCHAROEN, K.; DEESEENTHUM, S.; VICHITPHAN, K. Potential of xylose-fermented yeast isolated from sugarcane bagasse waste for xylitol production using hydrolysate as carbon source. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 38 (5), 473-483, 2016.

TEIXEIRA, L.C.; LINDEN, J.C.; SCHROEDER, H.A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugar cane bagasse to ethanol fuel. *Renewable Energy*, v. 16, n. 1-4, p. 1070-1073, 1999.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. *Revista Biotecnologica & Desenvolvimento*, v. 24, janeiro/fevereiro, p. 36-41, 2002.

TORQUATO, S.A. Cana de açúcar par a industria: O quanto vai precisar Crescer. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, v. 1, n. 10, 2006. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=7448>> . Acessado em: 28 agosto. 2018.

U.S. DEPARTMENT. From Biomass to Cellulosic Ethanol for Alternative Fuels. Disponível em:< http://genomicscience.energy.gov/biofuels/Biofuels_Placemat2.pdf>. Acesso em: 20 de julho de 2018.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELA, M. A Novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. *Pediatrics*, v.102, p.879-884, 1998.

UNREAN, P.; KETSUB, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops ; Products*. 123, 238–246, 2018.

UR-REHMAN, S.; MUSHTAQ, Z; ZAHOOR, T.; JAMIL, A.; MURTAZA, MA. Xylitol: a review on bioproduction, application, health benefits, and related safety issues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55:1514–1528, 2015.

VALLEJOS, M.E.; ZAMBON, M.D.; AREA, M.C.; DA SILVA CURVELO; A.A. Low liquid-solid ratio (LSR) hot water pretreatment of sugarcane bagasse. *Green Chem*. 14, 1982–1989, 2012.

VALLEJOS, M.E.; CHADE, M.; MERELES, E.B.; BENGOCHEA, D.I.; BRIZUELA, J.G.; FELISSIA, F.E.; AREA, M.C. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products* 91, 161–169, 2016.

VAN T RIET, K.; TRAMPER, J. *Basic bioreactor design*. New York, USA: Marcel Dekker, Inc., 1991.

VASCONCELOS, S.M. Pré-tratamento de bagaço de cana de açúcar com ácido fosfórico diluído para aplicação em biorrefinarias. Tese de doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 184f., 2012.

VERAS, G.C.T.; PARACHIN, N.S.; ALMEIDA, J.R.M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories*, 16:153, 2017.

VERNACCHIO, L.; CORWIN, M. J.; VEZINA, R. M.; PELTON, S. I.; FELDMAN, H. A.; COYNE-BEASLEY, T.; MITCHELL, A. A. Xylitol syrup for the prevention of acute otitis media. *Pediatrics*, 133(2), 289-295, 2014.

VILLARREAL, M.L.M.; PRATA, A.M.R.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, J.B.A. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 17–24, 2006.

XAVIER, F.D. Produção biotecnológica de xilitol à partir da fração hemicelulósica da fibra de sisal. Tese de Mestrado – Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

Xylitol-Polyol/SugarAlcoholSweetener, p. 293, 2014. Disponível em: <http://www.marketresearch.com/product/sample-8164119.pdf>. Acessado em: out/2018.

WANG, S. L.; YEN, Y. H.; SHIH, I. L.; CHANG, A. C.; CHANG, W. T.; WU, W. C.; CHAI, Y. D. Production of xylanases from rice bran by *Streptomyces actuosus* A-151. *Enzyme and Microbial Technology*, v 33, p. 917-925, 2003.

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

YEWALE, T.; PANCHWAGH, S.; SAWALE, S.; JAIN, R.; DHAMOLE, P.B. Xylitol production from non-detoxified and non-sterile lignocellulosic hydrolysate using low-cost industrial media components. *Biotech.*, 7(1):68, 2017.

YOKOYAMA, S.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 79, p. 217-223, 1995.

YOUSOFF, S.N.M., BAHARIN, A., ABDULLAH, A. Deep Neural Network Method for the Prediction of Xylitol Production. *Indonesian Journal of Electrical Engineering and Computer Science*. v. 5, n. 3, p. 691-696, 2017.

ZABNER, J.; SEILER, M. P.; LAUNSPACH, J. L.; KARP, P. H.; KEARNEY, W.R.; LOOK, D. C.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 97, n. 21, p. 11614-11619, 2000.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

ZAHED, O.; JOUZANI, G.S.; ABBASALIZADEH, S.; KHODAIYAN, F.; TABATABAEI, M. Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor. *Folia Microbiol*, 61:179–189, 2016.

ZHU, J.Y.; WANG, G.S.; PAN, X.J.; GLEISNER, R. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*, 64:474–85, 2009.

ZHU, J.Y. Physical pretreatment-woody biomass size reduction-for forest biorefinery. Sustainable production of fuels, chemicals and fibers from forest biomass. ACS symposium series. In: ZHU JY, ZHANG X, PAN X, editors; Cap. 4, p. 89–107, 2011.

APÊNDICE 1

Seleção das linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e de *Wickerhamomyces rabaulensis* quanto à produção de xilitol

Os números de 1 a 16 representam as linhagens de acordo com a tabela abaixo. Os dados descritos abaixo são referentes as amostras coletadas em 72 hs de fermentação utilizando 60 gL⁻¹ de xilose, 20 gL⁻¹ de petona e 10 gL⁻¹ de extrato de levedura, com o intuito de selecionar as melhores linhagens produtoras de xilitol.

1) Seleção das linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis* em meio definido.

As Tabelas 28 e 29 representam os valores encontrados durante o processo fermentativo das linhagens selecionadas na produção de xilitol contendo 60 gL⁻¹ de xilose pura.

Tabela 28: Média dos Parâmetros fermentativos utilizando 0,5 gL⁻¹ de biomassa inicial e 60gL⁻¹ de xilose – *Cyberlindnera xylosilytica*.

Linhagem	Tempo (h)	Biomassa final (gL ⁻¹)	Xilose (gL ⁻¹)	Xilitol (gL ⁻¹)	Etanol (gL ⁻¹)	Consumo de xilose (%)	Yp (gg ⁻¹)	Qp (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Eficiência (%)
UFMG-CM-Y408	0,000	0,590	60,159±0,564	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,110	54,519±0,083	3,521 ± 0,015	0,000	9,380	0,620	0,290	67,670
	24,000	1,760	44,378±0,592	7,460 ± 0,395	0,000	26,250	0,470	0,310	51,520
	36,000	2,015	35,385±0,371	16,333 ± 0,420	0,000	41,190	0,660	0,450	71,860
	48,000	2,790	27,317±0,795	21,366 ± 0,210	0,753	54,600	0,650	0,450	70,910
	60,000	4,580	20,595 ± 0,304	28,439 ± 0,017	0,794	65,770	0,720	0,470	78,380
	72,000	4,670	13,759 ± 0,537	36,951 ± 0,521	0,755	77,140	0,800	0,510	86,820
UFMG-CM-Y309	0,000	0,740	61,280 ± 0,176	0,00 ± 0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,830	53,010 ± 0,636	3,110 ± 0,155	0,000	13,480	0,376	0,259	41,060
	24,000	2,400	42,23 ± 0,3253	8,320 ± 0,113	0,000	31,080	0,436	0,346	47,650
	36,000	2,840	31,92 ± 0,3111	20,52 ± 0,4243	0,000	47,900	0,699	0,570	76,240
	48,000	3,920	23,97 ± 0,8061	29,03 ± 0,2121	0,000	60,880	0,778	0,605	84,870
	60,000	5,310	16,41 ± 0,6930	35,02 ± 0,1414	0,000	73,220	0,780	0,584	85,130
	72,000	7,850	7,40 ± 0,5657	46,87 ± 0,4667	0,000	87,920	0,870	0,651	94,880
UFMG-CM-Y407	0,000	0,660	60,725 ± 0,570	0,0000 ± 0,0000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,420	53,683 ± 0,881	7,4500 ± 0,4667	0,000	11,590	1,060	0,620	115,400
	24,000	1,780	46,100 ± 0,396	11,070 ± 0,551	0,000	24,080	0,760	0,460	82,570

	36,000	2,120	33,820 ± 0,028	19,350 ± 0,155	0,000	44,300	0,720	0,540	78,440
	48,000	2,810	28,920 ± 0,848	28,520 ± 0,198	0,000	52,370	0,900	0,590	97,800
	60,000	4,580	17,310 ± 0,297	31,920 ± 0,198	0,000	71,490	0,740	0,530	80,190
	72,000	4,150	11,610 ± 0,665	36,900 ± 0,226	0,000	80,880	0,750	0,510	81,940
UFMG- CM-Y409	0,000	0,600	61,725 ± 0,247	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,710	54,510 ± 0,523	3,620 ± 0,255	0,000	11,680	0,500	0,300	54,750
	24,000	2,170	42,290 ± 0,467	10,756 ± 0,418	0,000	31,480	0,550	0,450	60,330
	36,000	2,750	36,570 ± 0,184	22,300 ± 0,566	0,000	40,750	0,890	0,620	96,690
	48,000	3,880	28,100 ± 0,481	28,010 ± 0,495	0,000	54,470	0,830	0,580	90,850
	60,000	5,030	17,214 ± 0,133	35,018 ± 0,0,17	0,000	72,120	0,790	0,580	85,800
	72,000	7,051	11,190 ± 0,721	42,360 ± 0,792	0,000	81,870	0,840	0,590	91,420
NRRL- YB-2097	0,000	0,680	61,025 ± 0,177	0,0000 ± 0,0000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,478	53,150 ± 0,919	7,3500 ± 0,2121	0,000	12,900	0,930	0,610	101,780
	24,000	2,260	41,160 ± 0,226	11,8700 ± 0,014	0,000	32,550	0,600	0,490	65,160
	36,000	2,620	32,310 ± 0,551	19,950 ± 0,891	0,000	47,050	0,690	0,550	75,760
	48,000	3,560	24,170 ± 0,438	25,050 ± 0,240	0,000	60,390	0,680	0,520	74,120
	60,000	4,890	16,830 ± 0,014	36,020 ± 0,650	0,000	72,420	0,820	0,600	88,880
	72,000	5,120	10,530 ± 0,156	37,190 ± 0,579	0,000	82,740	0,740	0,520	80,320

Yp/s, Q, η são respectivamente os fatores de conversão, a produtividade e a eficiência de xilose em xilitol.

UFMG- CM-Y3721	0,000	0,510	59,500 ± 0,283	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	3,990	36,277 ± 0,194	9,150 ± 0,438	0,000	39,040	0,390	0,760	42,770
	24,000	4,400	24,880 ± 0,339	17,540 ± 0,254	0,000	58,180	0,510	0,730	55,090
	36,000	5,830	14,320 ± 0,141	28,270 ± 0,608	0,610	75,930	0,620	0,790	68,080
	48,000	6,890	8,145 ± 0,007	30,745 ± 0,728	1,150	86,320	0,600	0,640	65,140
	60,000	8,610	3,510 ± 0,000	30,475 ± 0,544	1,960	94,100	0,540	0,510	59,240
	72,000	10,260	2,325 ± 0,247	34,590 ± 0,127	2,500	96,100	0,600	0,480	65,850
UFMG- CM-Y3734	0,000	0,750	62,325 ± 0,672	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	3,630	49,200 ± 0,000	2,650 ± 0,240	0,000	21,050	0,250	0,220	27,790
	24,000	4,390	34,308 ± 0,277	11,570 ± 0,297	0,000	44,960	0,460	0,480	49,870
	36,000	5,900	27,970 ± 0,636	20,190 ± 0,721	0,000	55,440	0,630	0,560	69,170
	48,000	8,390	19,350 ± 0,665	27,430 ± 0,438	0,000	68,950	0,680	0,570	74,320
	60,000	10,610	13,060 ± 0,141	27,009 ± 0,044	0,000	79,040	0,580	0,450	63,270
	72,000	14,440	8,350 ± 0,0707	31,290 ± 0,778	1,140	86,600	0,610	0,430	66,580
UFMG- CM-Y3735	0,000	0,630	59,725 ± 0,389	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	3,510	37,540 ± 0,367	10,310 ± 0,099	0,000	37,140	0,470	0,860	50,970
	24,000	4,900	23,040 ± 0,339	18,150 ± 0,353	0,000	61,420	0,500	0,760	54,140
	36,000	6,750	11,020 ± 0,877	25,180 ± 0,396	0,000	81,550	0,520	0,700	56,520
	48,000	9,670	7,240 ± 0,283	32,040 ± 0,283	0,980	97,880	0,610	0,670	66,730
	60,000	13,090	3,970 ± 0,071	30,730 ± 0,523	1,380	93,350	0,550	0,510	60,240
	72,000	16,720	3,840 ± 0,085	30,870 ± 0,608	1,430	93,570	0,550	0,430	60,370
UFMG- CM-Y3747	0,000	0,680	61,125 ± 0,742	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	3,620	47,120 ± 0,255	8,830 ± 0,240	0,000	22,590	0,710	0,740	77,160
	24,000	5,450	32,686 ± 0,319	16,010 ± 0,325	0,000	46,310	0,590	0,670	64,860

	36,000	6,130	14,480 ± 0,198	33,880 ± 0,877	0,000	76,210	0,750	0,940	81,890
	48,000	8,650	6,030 ± 0,071	39,290 ± 0,806	0,000	90,090	0,730	0,820	79,980
	60,000	11,390	5,010 ± 0,155	37,660 ± 0,424	0,000	91,770	0,690	0,630	75,230
	72,000	14,820	4,070 ± 0,297	37,670 ± 0,042	0,590	93,310	0,680	0,520	73,980
UFMG- CM-Y3754	0,000	0,580	59,247 ± 0,174	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	3,920	36,040 ± 0,467	10,280 ± 0,834	0,000	40,010	0,430	0,860	46,590
	24,000	4,620	25,820 ± 0,000	19,910 ± 0,467	0,360	56,410	0,590	0,830	64,280
	36,000	6,640	11,760 ± 0,028	32,690 ± 0,014	1,480	80,150	0,680	0,910	74,520
	48,000	8,770	5,710 ± 0,169	31,395 ± 0,516	2,480	90,360	0,580	0,650	63,520
	60,000	10,360	2,740 ± 0,014	31,975 ± 0,106	3,180	95,370	0,560	0,530	61,310
	72,000	11,930	1,923 ± 0,040	31,955 ± 0,078	3,430	96,760	0,550	0,440	60,410
UFMG- CM-Y3759	0,000	0,550	62,463 ± 0,077	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	2,480	48,356 ± 0,164	9,510 ± 0,297	0,000	22,590	0,850	0,790	92,180
	24,000	4,590	31,160 ± 0,424	20,840 ± 0,764	0,000	50,110	0,730	0,870	79,910
	36,000	5,320	13,760 ± 0,594	28,820 ± 0,792	0,000	77,970	0,630	0,800	68,560
	48,000	6,540	8,743 ± 0,590	35,193 ± 0,632	0,000	86,010	0,690	0,730	75,450
	60,000	9,897	4,785 ± 0,157	33,594 ± 0,141	0,000	92,350	0,610	0,560	66,820
	72,000	10,220	4,130 ± 0,062	33,038 ± 0,332	0,000	93,390	0,600	0,460	64,940
UFMG- CM-Y6303	0,000	0,620	61,547 ± 0,138	0,000 ± 0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,370	47,402 ± 0,438	9,218 ± 0,116	0,000	22,860	0,760	0,770	82,400
	24,000	2,740	32,076 ± 0,159	15,307 ± 0,128	0,000	47,810	0,560	0,640	60,610
	36,000	3,270	19,740 ± 0,197	27,800 ± 0,085	0,000	67,880	0,700	0,770	76,060
	48,000	4,070	13,710 ± 0,325	35,220 ± 0,792	0,000	77,690	0,770	0,730	83,700
	60,000	5,900	6,881 ± 0,072	34,881 ± 0,604	0,000	88,800	0,660	0,580	72,150

	72,000	6,160	$5,221 \pm 0,075$	$34,958 \pm 0,788$	0,000	91,51	0,621	0,485	67,68
UFMG- CM-Y516	0,000	0,650	$60,84 \pm 0,344$	$0,000 \pm 0,000$	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	12,000	1,590	$46,945 \pm 0,047$	$9,201 \pm 0,219$	0,000	22,830	0,730	0,770	79,250
	24,000	2,980	$32,804 \pm 0,386$	$15,558 \pm 0,144$	0,000	46,080	0,580	0,650	63,270
	36,000	3,230	$22,621 \pm 0,497$	$27,475 \pm 0,025$	0,000	62,810	0,740	0,760	81,010
	48,000	3,970	$15,138 \pm 0,697$	$30,173 \pm 0,200$	0,000	75,130	0,680	0,630	73,980
	60,000	6,340	$8,356 \pm 0,249$	$31,964 \pm 0,189$	0,000	86,270	0,620	0,530	68,010
	72,000	5,700	$6,270 \pm 0,148$	$33,322 \pm 0,775$	0,000	89,690	0,620	0,460	68,130

Y_p/s , Q , η são respectivamente os fatores de conversão, a produtividade e a eficiência de xilose em xilitol.

APÊNDICE 2

Análise estatística

Tabela da análise de variância.

A variabilidade presente em um ensaio é analisada com o auxílio de um quadro padrão denominado Tabela de Análise de Variância, onde as colunas referem-se:

FV – Fontes de Variação – Nesta coluna são descritas as causas de variabilidade dos dados do experimento. O interesse do pesquisador está em conhecer a variabilidade entre os Tratamentos, as outras fontes de variabilidade são agrupadas em resíduos (correspondente à variabilidade existente Dentro do Tratamentos).

GL – Graus de Liberdade – A cada fonte de variação está associado um número de graus de liberdade.

SQ – Somas de Quadrados - São as somas dos quadrados de desvios calculadas para cada fonte de variação.

QM – Quadrados Médios - São obtidos pela razão entre as Somas de Quadrados e os seus respectivos graus de liberdade. Pode-se demonstrar que são estimativas de variâncias.

F_{calc} – valor da estatística F - É o valor obtido para a estatística do teste de F, dado pela razão entre os QM de Tratamentos e o QM do Resíduo.

Os números de 1 a 16 representam as linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. As letras minúsculas indicam se os valores são iguais ou distintos estatisticamente em cada item avaliado; se o $F_{calc} > F_{5\%}$, então pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferentes entre si a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$). Se $F_{calc} < F_{tab}$; não há diferença significativa a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$) entre as médias dos tratamentos.

Tabela 30: Teste de Tukey para Produtividade em 48 hs

	UFMG -CM- Y3696	UFMG -CM- Y3708	UFMG -CM- Y3716	UFMG -CM- Y3721	UFMG -CM- Y3734	UFMG -CM- Y3735	UFMG -CM- Y3747	UFMG -CM- Y3754	UFMG -CM- Y3759	UFMG -CM- Y6303	UFMG -CM- Y516	UFMG -CM- Y408	UFMG -CM- Y309	UFMG -CM- Y407	UFMG -CM- Y409	NRRL- YB- 2097
Leveduras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,6454	0,6779	0,7133	0,6513	0,5779	0,6633	0,8067	0,6617	0,7239	0,7221	0,6316	0,4420	0,6079	0,5913	0,5763	0,5254
2	0,6308	0,6538	0,7062	0,6298	0,5650	0,6717	0,8304	0,6465	0,7425	0,7454	0,6257	0,4482	0,6017	0,5971	0,5908	0,5183
SOMA	1,2762	1,3317	1,4195	1,2811	1,1429	1,3350	1,6371	1,3082	1,4664	1,4675	1,2573	0,8902	1,2096	1,1884	1,1671	1,0437
MÉDIA	0,6381	0,6659	0,7098	0,6406	0,5715	0,6675	0,8186	0,6541	0,7332	0,7338	0,6287	0,4451	0,6048	0,5942	0,5836	0,5219

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	15	0,23818	0,01588	139,934	2,35222
Resíduo	16	0,00182	0,00011		
Total	31	0,24			

			7	10	9	3	6	2	8	4	1	11	13	14	15	5	16	
UFMG-CM-Y3747	7	0,8186																a
UFMG-CM-Y-6303	10	0,7338	0,0848															b
UFMG-CM-Y-3759	9	0,7332	0,0853	0,0005														b
UFMG-CM-Y3716	3	0,7098	0,1088	0,0240	0,0657													c
UFMG-CM-Y-3735	6	0,6675	0,1511	0,0662	0,0674	0,0423												c,d
UFMG-CM-Y-3708	2	0,6659	0,1527	0,0679	0,0791	0,0439	0,0016											d
UFMG-CM-Y-3754	8	0,6541	0,1645	0,0797	0,0927	0,0557	0,0134	0,0118										d
UFMG-CM-Y-3721	4	0,6406	0,1780	0,0932	0,0951	0,0692	0,0270	0,0253	0,0136									d,e
UFMG-CM-Y-3696	1	0,6381	0,1805	0,0956	0,1046	0,0717	0,0294	0,0278	0,0160	0,0024								d,e
UFMG-CM-Y516	11	0,6287	0,1899	0,1051	0,1284	0,0811	0,0388	0,0372	0,0254	0,0119	0,0094							d,e,f
UFMG-CM-Y-309	13	0,6048	0,2138	0,1290	0,1390	0,1050	0,0627	0,0611	0,0493	0,0357	0,0333	0,0239						e,f,g
UFMG-CM-Y-407	14	0,5942	0,2244	0,1396	0,1497	0,1156	0,0733	0,0717	0,0599	0,0463	0,0439	0,0345	0,0106					f,g
UFMG-CM-Y-409	15	0,5836	0,2350	0,1502	0,1618	0,1262	0,0840	0,0823	0,0705	0,0570	0,0546	0,0451	0,0213	0,0107				g
UFMG-CM-Y-3734	5	0,5715	0,2471	0,1623	0,2114	0,1383	0,0961	0,0944	0,0826	0,0691	0,0667	0,0572	0,0334	0,0228	0,0121			g
NRRL-YB-2097	16	0,5219	0,2967	0,2119	0,2881	0,1879	0,1457	0,1440	0,1323	0,1187	0,1163	0,1068	0,0830	0,0724	0,0617	0,0496		h
UFMG-CM-Y-408	12	0,4451	0,3735	0,2887	0,7332	0,2647	0,2224	0,2208	0,2090	0,1955	0,1930	0,1836	0,1597	0,1491	0,1385	0,1264	0,0767	i

Como $F_{calc} > F_{5\%}$ pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5,66 dms tukey 0,042

Tabela 31: Teste de Tukey de conversão de Xilose em Xilitol em 48 hs.

	Tratamentos															
	UFMG- CM- Y3696	UFMG- CM- Y3708	UFMG- CM- Y3716	UFMG- CM- Y3721	UFMG- CM- Y3734	UFMG- CM- Y3735	UFMG- CM- Y3747	UFMG- CM- Y3754	UFMG- CM- Y3759	UFMG- CM- Y6303	UFMG- CM- Y516	UFMG- CM- Y408	UFMG- CM- Y309	UFMG- CM- Y407	UFMG- CM- Y409	NRRL- YB- 2097
Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,5860	0,6233	0,6922	0,6064	0,6456	0,6058	0,7102	0,5932	0,6425	0,7196	0,6742	0,6493	0,7970	0,9214	0,8186	0,6809
2	0,5802	0,6030	0,6978	0,5909	0,6310	0,6151	0,7160	0,5796	0,6679	0,7531	0,6467	0,6519	0,7600	0,8736	0,8476	0,6831
SOMA	1,1662	1,2263	1,3900	1,1973	1,2766	1,2209	1,4262	1,1728	1,3104	1,4727	1,3209	1,3012	1,5570	1,7950	1,6662	1,3640
MÉDIA	0,5831	0,6132	0,6950	0,5987	0,6383	0,6105	0,7131	0,5864	0,6552	0,7364	0,6605	0,6506	0,7785	0,8975	0,8331	0,6820

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	15	0,24491	0,01633	63,2101	2,35222
Resíduo	16	0,00413	0,00026		
Total	31	0,24904			

			14	15	13	10	7	3	16	11	9	12	5	2	6	4	8	
UFMG-CM-Y407	14	0,8975																a
UFMG-CM-Y409	15	0,8331	0,0644															b
UFMG-CM-Y309	13	0,7785	0,1190	0,0546														b,c
UFMG-CM-Y-6303	10	0,7364	0,1612	0,0967	0,0421													c,d
UFMG-CM-Y3747	7	0,7131	0,1844	0,1200	0,0654	0,0233												d,e
UFMG-CM-Y3716	3	0,6950	0,2025	0,1381	0,0835	0,0414	0,0181											d,e
NRRL-YB-2097	16	0,6820	0,2155	0,1511	0,0965	0,0544	0,0311	0,0130										d,e,f
UFMG-CM-Y516	11	0,6605	0,2371	0,1727	0,1181	0,0759	0,0527	0,0346	0,0216									e,f,g
UFMG-CM-Y-3759	9	0,6552	0,2423	0,1779	0,1233	0,0812	0,0579	0,0398	0,0268	0,0052								e,f,g
UFMG-CM-Y408	12	0,6506	0,2469	0,1825	0,1279	0,0858	0,0625	0,0444	0,0314	0,0098	0,0046							e,f,g,h
UFMG-CM-Y-3734	5	0,6383	0,2592	0,1948	0,1402	0,0981	0,0748	0,0567	0,0689	0,0222	0,0169	0,0123						e,f,g,h,i
UFMG-CM-Y-3708	2	0,6132	0,2844	0,2200	0,1654	0,1232	0,1000	0,0819	0,6132	0,0473	0,0421	0,0375	0,0252					f,g,h,i
UFMG-CM-Y-3735	6	0,6105	0,2871	0,2227	0,1681	0,1259	0,1027	0,0846	0,0716	0,0500	0,0448	0,0402	0,0279	0,0027				g,h,i
UFMG-CM-Y-3721	4	0,5987	0,2989	0,2345	0,1799	0,1377	0,1145	0,0964	0,0833	0,0618	0,0566	0,0520	0,0397	0,0145	0,0118			g,h,i
UFMG-CM-Y-3754	8	0,5864	0,3111	0,2467	0,1921	0,1500	0,1267	0,1086	0,0956	0,0740	0,0688	0,0642	0,0519	0,0267	0,0240	0,0123		h,i
UFMG-CM-Y-3796	1	0,5831	0,3144	0,2500	0,1954	0,1533	0,1300	0,1119	0,0989	0,0774	0,0721	0,0675	0,0552	0,0301	0,0274	0,0156	0,0033	i

Como $F_{calc} > F_{5\%}$ pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5,66 dms tukey 0,064

Tabela 32: Teste de Tukey de Produtividade em 72 hs.

	Tratamentos															
	UFMG- CM- Y3696	UFMG- CM- Y3708	UFMG- CM- Y3716	UFMG- CM- Y3721	UFMG- CM- Y3734	UFMG- CM- Y3735	UFMG- CM- Y3747	UFMG- CM- Y3754	UFMG- CM- Y3759	UFMG- CM- Y6303	UFMG- CM- Y516	UFMG- CM- Y408	UFMG- CM- Y309	UFMG- CM- Y407	UFMG- CM- Y409	NRRL- YB- 2097
Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,4231	0,4692	0,5500	0,4792	0,4422	0,4228	0,5228	0,4431	0,4621	0,4778	0,4704	0,5081	0,6464	0,5103	0,5806	0,5222
2	0,4294	0,4709	0,5510	0,4817	0,4269	0,4347	0,5236	0,4446	0,4556	0,4933	0,4552	0,5183	0,6556	0,5147	0,5961	0,5108
SOMA	0,8525	0,9401	1,1010	0,9609	0,8691	0,8575	1,0464	0,8877	0,9177	0,9711	0,9256	1,0264	1,3020	1,0250	1,1767	1,0330
MÉDIA	0,4263	0,4701	0,5505	0,4805	0,4346	0,4288	0,5232	0,4439	0,4589	0,4856	0,4628	0,5132	0,6510	0,5125	0,5884	0,5165

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	15	0,11327	0,00755	158,955	2,35222
Resíduo	16	0,00076	4,8E-05		
Total	31	0,11403			

			13	15	3	7	16	12	14	10	4	2	11	9	8	5	6	
UFMG-CM-Y309	13	0,6510																a
UFMG-CM-Y409	15	0,5884	0,0627															b
UFMG-CM-Y3716	3	0,5505	0,1005	0,0378														c
UFMG-CM-Y3747	7	0,5232	0,1278	0,0651	0,0273													c,d
NRRL-YB2097	16	0,5165	0,1345	0,0719	0,0340	0,0067												d
UFMG-CM-Y408	12	0,5132	0,1378	0,0751	0,0373	0,0100	0,0033											d
UFMG-CM-Y407	14	0,5125	0,1385	0,0759	0,0380	0,0107	0,0040	0,0007										d,e
UFMG-CM-Y-6303	10	0,4856	0,1655	0,1028	0,0650	0,0377	0,0309	0,0277	0,0269									e,f
UFMG-CM-Y-3721	4	0,4805	0,1706	0,1079	0,0700	0,0428	0,0360	0,0327	0,0320	0,0051								f
UFMG-CM-Y-3708	2	0,4701	0,1810	0,1183	0,0805	0,0532	0,0465	0,0432	0,0425	0,0155	0,0104							f,g
UFMG-CM-Y516	11	0,4628	0,1882	0,1256	0,0877	0,0604	0,0537	0,0504	0,0497	0,0228	0,0177	0,0072						f,g
UFMG-CM-Y-3759	9	0,4589	0,1922	0,1295	0,0917	0,0644	0,0577	0,0544	0,0537	0,0267	0,0216	0,0112	0,0040					f,g,h
UFMG-CM-Y-3754	8	0,4439	0,2072	0,1445	0,1067	0,0794	0,0727	0,0694	0,0687	0,0417	0,0366	0,0262	0,0190	0,0150				g,h,i
UFMG-CM-Y-3734	5	0,4346	0,2165	0,1538	0,1160	0,0887	0,0820	0,0787	0,0780	0,0510	0,0459	0,0355	0,0283	0,0243	0,0093			h,i
UFMG-CM-Y-3735	6	0,4288	0,2223	0,1596	0,1218	0,0945	0,0878	0,0845	0,0838	0,0568	0,0517	0,0413	0,0341	0,0301	0,0151	0,0058		i
UFMG-CM-Y-3696	1	0,4263	0,2248	0,1621	0,1243	0,0970	0,0902	0,0870	0,0862	0,0593	0,0542	0,0438	0,0366	0,0326	0,0176	0,0083	0,0025	i

Como $F_{calc} > F_{5\%}$ pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5,66 dms tukey 0,0276

Tabela 33: Teste de Tuckey de conversão de Xilose em Xilitol em 72 hs.

	Tratamentos															
	UFMG- CM- Y3696	UFMG- CM- Y3708	UFMG- CM- Y3716	UFMG- CM- Y3721	UFMG- CM- Y3734	UFMG- CM- Y3735	UFMG- CM- Y3747	UFMG- CM- Y3754	UFMG- CM- Y3759	UFMG- CM- Y6303	UFMG- CM- Y516	UFMG- CM- Y408	UFMG- CM- Y309	UFMG- CM- Y407	UFMG- CM- Y409	NRRL- YB- 2097
Repetições	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1	0,5406	0,6015	0,7066	0,5995	0,5946	0,5426	0,6634	0,5550	0,5714	0,6091	0,6247	0,7754	0,8595	0,7470	0,8217	0,7481
2	0,5558	0,6025	0,7086	0,6106	0,5651	0,5622	0,6571	0,5599	0,5614	0,6322	0,5968	0,8181	0,8806	0,7556	0,8550	0,7286
SOMA	1,0964	1,2040	1,4152	1,2101	1,1597	1,1048	1,3205	1,1149	1,1328	1,2413	1,2215	1,5935	1,7401	1,5026	1,6767	1,4767
MÉDIA	0,5482	0,6020	0,7076	0,6051	0,5799	0,5524	0,6603	0,5575	0,5664	0,6207	0,6108	0,7968	0,8701	0,7513	0,8384	0,7384

FV	GL	SQ	QM	Fcalc	Ftab
Tratamentos	15	0,34276	0,02285	105,651	2,35222
Resíduo	16	0,00346	0,00022		
Total	31	0,34622			

			13	15	12	14	16	3	7	10	11	4	2	5	9	8	6	
UFMG-CM-Y-309	13	0,8701																a
UFMG-CM-Y-409	15	0,8384	0,0317															a,b
UFMG-CM-Y-408	12	0,7968	0,0733	0,0416														b,c
UFMG-CM-Y-407	14	0,7513	0,1188	0,0870	0,0455													c,d
NRRL-YB-2097	16	0,7384	0,1317	0,1000	0,0584	0,0130												c,d
UFMG-CM-Y3716	3	0,7076	0,1625	0,1308	0,0892	0,0437	0,0308											d,e
UFMG-CM-Y3747	7	0,6603	0,2098	0,1781	0,1365	0,0911	0,0781	0,0474										e,f
UFMG-CM-Y-6303	10	0,6207	0,2494	0,2177	0,1761	0,1307	0,1177	0,0870	0,0396									f,g
UFMG-CM-Y-516	11	0,6108	0,2593	0,2276	0,1860	0,1406	0,1276	0,0969	0,0495	0,0099								f,g,h
UFMG-CM-Y-3721	4	0,6051	0,2650	0,2333	0,1917	0,1463	0,1333	0,1026	0,0552	0,0156	0,0057							f,g,h
UFMG-CM-Y-3708	2	0,6020	0,2681	0,2364	0,1948	0,1493	0,1364	0,1056	0,0582	0,0186	0,0087	0,0031						f,g,h,i
UFMG-CM-Y-3734	5	0,5799	0,2902	0,2585	0,2169	0,1715	0,1585	0,1278	0,0804	0,0408	0,0309	0,0252	0,0222					g,h, i
UFMG-CM-Y-3759	9	0,5664	0,3037	0,2720	0,2304	0,1849	0,1720	0,1412	0,0939	0,0542	0,0444	0,0387	0,0356	0,0135				g,h, i
UFMG-CM-Y-3754	8	0,5575	0,3126	0,2809	0,2393	0,1939	0,1809	0,1502	0,1028	0,0632	0,0533	0,0476	0,0446	0,0224	0,0090			h,i
UFMG-CM-Y-3735	6	0,5524	0,3177	0,2860	0,2444	0,1989	0,1860	0,1552	0,1079	0,0682	0,0584	0,0527	0,0496	0,0275	0,0140	0,0051		h,i
UFMG-CM-Y-3696	1	0,5482	0,3219	0,2902	0,2486	0,2031	0,1902	0,1594	0,1121	0,0724	0,0626	0,0569	0,0538	0,0317	0,0182	0,0092	0,0042	i

Como $F_{calc} > F_{5\%}$ pode-se concluir que as médias dos tratamentos diferem entre si a 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$).

5,66 dms tukey 0,058

APÊNDICE 3

Tabela 34: Dados de cultivo para o tempo de 72 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico

								UFMG-CM-Y309 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y409 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y3716 – <i>W. rabaulensis</i>				UFMG-CM-Y3747 – <i>W. rabaulensis</i>			
	Ensaio	X1	X2	X3	Sulfato de Amônio	Farelo de arroz	Extrato de levedura	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiência	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiência	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiência	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiência
					(g/L) X1	(g/L) X2	(g/L) X3	g/L	(g/g)	(g/L.h)	(%)												
Planejamento fatorial	1	-1	-1	-1	0	5	1	9,89	0,41	0,14	45,07	14,01	0,63	0,19	68,95	1,94	0,41	0,03	44,27	2,38	0,88	0,03	96,40
	2	1	-1	-1	2	5	1	9,37	0,52	0,13	56,27	12,01	0,49	0,17	53,60	1,96	0,61	0,03	66,66	2,48	0,99	0,03	108,38
	3	-1	1	-1	0	10	1	11,97	0,55	0,17	60,29	14,06	0,63	0,20	68,22	2,09	0,59	0,03	63,89	2,56	0,82	0,04	89,76
	4	1	1	-1	2	10	1	10,12	0,53	0,14	58,26	12,34	0,51	0,17	55,15	2,54	0,54	0,04	59,02	3,96	1,22	0,05	132,79
	5	-1	-1	1	0	5	2	11,11	0,52	0,15	56,60	12,38	0,47	0,17	51,76	2,63	0,56	0,04	60,72	3,35	0,70	0,05	76,26
	6	1	-1	1	2	5	2	9,75	0,47	0,14	51,13	12,64	0,54	0,18	58,68	3,10	0,48	0,04	51,98	3,92	1,14	0,05	124,72
	7	-1	1	1	0	10	2	9,55	0,35	0,13	38,42	13,05	0,52	0,18	56,30	3,66	0,38	0,05	41,31	3,82	0,75	0,05	81,87
	8	1	1	1	2	10	2	9,30	0,47	0,13	51,03	13,41	0,49	0,19	53,50	3,41	0,33	0,05	35,60	4,10	0,69	0,06	75,01
Face Centrada	9	0	0	0	1	7,5	1,5	10,23	0,56	0,14	61,08	12,51	0,53	0,17	57,95	3,38	0,57	0,05	62,07	4,30	0,56	0,06	61,06
	10	0	0	0	1	7,5	1,5	9,64	0,50	0,13	54,97	12,95	0,53	0,18	57,45	2,22	0,69	0,03	75,13	3,45	0,50	0,05	54,90
	11	0	0	0	1	7,5	1,5	9,76	0,53	0,14	57,73	13,16	0,55	0,18	59,63	3,54	0,33	0,05	36,20	3,45	1,12	0,05	122,55
	12	0	0	0	1	7,5	1,5	9,70	0,52	0,13	56,30	13,73	0,58	0,19	62,88	2,54	0,50	0,04	54,10	3,40	0,70	0,05	76,50

Tabela 35: Dados fermentativos para o tempo de 96 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico

								UFMG-CM-Y309 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y409 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y3716 – <i>W. rabaulensis</i>				UFMG-CM-Y3747 – <i>W. rabaulensis</i>			
	Ensaio	X1	X2	X3	Sulfato de Amônio	Farelo de arroz	Extrato de levedura	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia
					(g/L) X1	(g/L) X2	(g/L) X3	g/L	(g/g)	(g/L.h)	(%)												
Planejamento fatorial	1	-1	-1	-1	0	5	1	10,15	0,39	0,11	42,00	12,16	0,48	0,13	52,43	4,10	0,48	0,04	52,45	3,11	0,69	0,03	75,12
	2	1	-1	-1	2	5	1	9,42	0,46	0,10	50,04	12,25	0,48	0,13	52,10	2,71	0,43	0,03	47,17	2,99	0,60	0,03	65,87
	3	-1	1	-1	0	10	1	11,87	0,48	0,12	52,38	12,45	0,48	0,13	52,87	5,85	0,52	0,06	56,74	3,34	0,44	0,03	47,51
	4	1	1	-1	2	10	1	10,61	0,50	0,11	55,00	11,27	0,43	0,12	46,84	5,11	0,36	0,05	39,23	5,29	0,69	0,06	75,39
	5	-1	-1	1	0	5	2	11,85	0,49	0,12	53,14	13,30	0,47	0,14	51,56	5,50	0,65	0,06	71,38	4,92	0,53	0,05	57,90
	6	1	-1	1	2	5	2	10,19	0,44	0,11	47,55	11,33	0,45	0,12	48,76	3,20	0,31	0,03	33,81	5,69	0,71	0,06	77,97
	7	-1	1	1	0	10	2	10,88	0,37	0,11	40,28	13,47	0,50	0,14	55,00	6,64	0,43	0,07	46,86	5,45	0,49	0,06	52,90
	8	1	1	1	2	10	2	10,12	0,46	0,11	49,64	12,24	0,43	0,13	46,46	7,70	0,44	0,08	48,52	5,15	0,53	0,05	57,64
Face Centrada	9	0	0	0	1	7,5	1,5	10,71	0,52	0,11	56,52	12,43	0,50	0,13	54,00	5,65	0,49	0,06	53,48	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	0	0	0	1	7,5	1,5	10,42	0,50	0,11	54,19	13,56	0,53	0,14	57,39	5,55	0,63	0,06	68,38	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	0	0	0	1	7,5	1,5	10,12	0,49	0,11	53,81	11,56	0,44	0,12	48,12	5,61	0,63	0,06	68,52	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	0	0	0	1	7,5	1,5	10,27	0,49	0,11	53,98	11,75	0,47	0,12	50,98	4,52	0,45	0,05	49,26	4,33	0,55	0,05	59,81

Tabela 36: Dados fermentativos para o tempo de 120 horas utilizando hidrolisado hemicelulósico

								UFMG-CM-Y309 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y409 – <i>C. xylosilytica</i>				UFMG-CM-Y3716 – <i>W. rabaulensis</i>				UFMG-CM-Y3747 – <i>W. rabaulensis</i>			
	Ensaio	X1	X2	X3	Sulfato de Amônio	Farelo de arroz	Extrato de levedura	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia	Produção de Xilitol	Yp/s	Qp	Eficiencia
					(g/L) X1	(g/L) X2	(g/L) X3	g/L	(g/g)	(g/L.h)	(%)												
Planejamento fatorial	1	-1	-1	-1	0	5	1	11,19	0,41	0,09	44,50	13,36	0,52	0,11	56,47	6,17	0,47	0,05	51,21	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	1	-1	-1	2	5	1	10,25	0,47	0,09	51,26	12,72	0,49	0,11	53,19	3,18	0,30	0,03	32,28	5,47	0,42	0,05	46,07
	3	-1	1	-1	0	10	1	12,03	0,46	0,10	50,28	12,75	0,49	0,11	53,38	7,28	0,46	0,06	56,74	0,00	0,00	0,00	0,00
	4	1	1	-1	2	10	1	10,65	0,48	0,09	52,14	13,20	0,52	0,11	56,19	6,60	0,33	0,06	35,94	0,00	0,00	0,00	0,00
	5	-1	-1	1	0	5	2	11,31	0,44	0,09	48,42	14,00	0,49	0,12	53,91	7,10	0,51	0,06	55,16	0,00	0,00	0,00	0,00
	6	1	-1	1	2	5	2	12,22	0,51	0,10	55,83	12,10	0,48	0,10	52,73	5,99	0,35	0,05	38,12	2,00	0,14	0,02	15,27
	7	-1	1	1	0	10	2	10,75	0,35	0,09	38,30	13,80	0,51	0,12	55,97	6,88	0,44	0,06	48,38	0,00	0,00	0,00	0,00
	8	1	1	1	2	10	2	10,61	0,45	0,09	49,44	12,87	0,45	0,11	48,75	9,41	0,44	0,08	47,67	0,00	0,00	0,00	0,00
Face Centrada	9	0	0	0	1	7,5	1,5	10,84	0,49	0,09	53,97	13,48	0,54	0,11	58,48	5,90	0,33	0,05	35,53	0,00	0,00	0,00	0,00
	10	0	0	0	1	7,5	1,5	10,40	0,47	0,09	50,76	13,44	0,52	0,11	56,88	5,22	0,32	0,04	35,09	0,00	0,00	0,00	0,00
	11	0	0	0	1	7,5	1,5	9,84	0,45	0,08	48,65	13,09	0,52	0,11	56,50	5,63	0,30	0,05	32,20	0,00	0,00	0,00	0,00
	12	0	0	0	1	7,5	1,5	10,12	0,46	0,08	49,70	13,36	0,54	0,11	58,37	5,55	0,37	0,05	40,13	0,00	0,00	0,00	0,00

APÊNDICE 4

Tabela 37: Parâmetros de conversão do ensaio em meio YPX com 60 gL⁻¹ de xilose, inóculo de 1,0 gL⁻¹, em cultivo da linhagem de *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309).

Condições	Variáveis	Tempo (h)										
		0	12	24	36	48	60	72	84	96	120	144
Erlenmeyer (25 mL de meio e 1gL ⁻¹ de células)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	1,12	3,58	3,95	5,17	7,78	8,27	8,51	8,46	8,55	8,99	9,02
	Consumo de Xilose (%)	0,00	18,44	19,74	34,07	48,27	51,08	64,77	73,12	79,99	99,71	99,90
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00	5,10	6,78	9,60	12,87	17,98	18,45	21,82	22,27	23,66	23,95
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	0,42	0,52	0,43	0,40	0,53	0,43	0,45	0,41	0,36	0,36
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,43	0,28	0,27	0,27	0,27	0,30	0,22	0,26	0,22	0,20	0,17
	η (%)	45,74	45,74	56,79	46,59	44,08	58,20	47,10	49,24	44,40	39,23	39,59
Biorreator F1 - (200 rpm e 0,65 vvm-k _{La} 13,68 h ⁻¹)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	1,28	3,13	2,07	1,39	1,48	1,42	1,401	*na	*na	*na	*na
	pH	5,70	5,56	5,10	5,10	4,90	4,80	4,75	*na	*na	*na	*na
	Consumo de Xilose (%)	0,00	11,23	10,30	13,15	13,09	16,19	20,20	*na	*na	*na	*na
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00	1,64	2,28	2,97	3,17	3,52	4,10	*na	*na	*na	*na
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	0,27	0,41	0,42	0,45	0,40	0,37	*na	*na	*na	*na
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0,00	0,14	0,10	0,08	0,07	0,06	0,06	*na	*na	*na	*na
Biorreator F2 - (350 rpm e 0,80 vvm- k _{La} 22,32 h ⁻¹)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	0,79	1,02	1,14	0,94	1,82	1,25	1,10	0,96	0,65	1,07	*na
	pH	5,72	5,54	4,99	4,70	4,50	4,54	4,50	4,46	4,41	4,33	*na
	Consumo de Xilose (%)	0,00	1,55	2,64	7,10	9,90	11,62	13,00	15,26	15,09	14,86	*na
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0,00	0,63	1,04	1,48	2,98	3,72	3,80	3,85	4,39	5,45	*na
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0,00	0,62	0,60	0,32	0,46	0,49	0,45	0,39	0,45	0,56	*na
	Q _p (gL ⁻¹ h)	0,00	0,05	0,04	0,04	0,06	0,06	0,05	0,05	0,04	0,06	*na
Biorreator F3 - (450 rpm e 0,85 vvm com Tween 80-k _{La} 29,88 h ⁻¹)	Conc. Celular (gL ⁻¹)	0,97	1,32	1,06	2,33	3,55	3,63	3,86	5,1	5,05	5,02	5,07
	pH	5,71	5,40	5,10	5,05	4,95	4,70	4,32	4,09	3,95	3,88	3,73
	Consumo de Xilose (%)	0	2,25	4,74	7,66	8,98	13,04	18,55	32,54	66,15	97,47	97,43
	Produção de Xilitol (gL ⁻¹)	0	1,06	1,35	1,64	1,89	3,53	5,16	9,74	11,8	14,46	17,65
	Y _{p/s} (gg ⁻¹)	0	0,9	0,41	0,32	0,32	0,41	0,43	0,47	0,28	0,23	0,28
	Q _p (gL ⁻¹ h ⁻¹)	0	0,08	0,05	0,04	0,04	0,06	0,07	0,12	0,12	0,12	0,12
Biorreator F3 - (450 rpm e 0,85 vvm com Tween 80-k _{La} 29,88 h ⁻¹)	η (%)	0	98	45,13	34,46	34,65	44,82	46,63	50,78	30,22	25,15	30,75

*na – não analisada - Y_{p/s}; Q_p, η, são respectivamente os fatores de conversão, produtividade e eficiência de xilitol.

APÊNDICE 5

Abaixo segue a relação de Participação de Simpósios e Artigo submetido:

Participação de Simpósios:

PALLADINO, F., BARROS, K., RODRIGUES, R.C.L.B., ROSA, C.A. Evaluation of xylitol production by strains of *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis* in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. International Specialized Symposium on Yeasts. Bariloche, 2018.

PALLADINO, F., CADETE, R.M., RODRIGUES, R.C.L.B., ROSA, C.A. Avaliação da produção de xilitol por linhagens de *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. IV Simpósio de Microbiologia da UFMG – Metabolismo Microbiano, 2017.

Artigo submetido:

PALLADINO, F., CADETE, R.M.; BARROS, K., RODRIGUES, R.C.L.B., ROSA, C.A. Xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using novel yeast strains of *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis*.

EVALUATION OF XYLITOL PRODUCTION BY strains of *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis* FROM SUGARCANE BAGASSE HEMICELLULOSIC HYDROLYSATE

Palladino, F.¹, Barros, K.O.¹, Rodrigues, R.C.L.B.², Rosa, C.A.¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG

²Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP. E-mail: ferpalladino12@gmail.com

In Brazil, the sugarcane processing generates tons of sugarcane bagasse every year. It may be hydrolyzed to release the sugars from cellulosic and hemicellulosic fractions, mainly glucose and xylose, respectively. These carbohydrates can be converted into products of biotechnological interest by yeasts, such as xylitol (a natural sweetener). On the other hand, xylitol accumulation in yeasts depends on factors, which includes nutritional supplements, temperature, pH, inoculum size, substrate, and aeration. In this context, the present work aimed to evaluate some of these variables (nutrients, initial cell concentration and aeration) to obtain xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH) by new xylitol producers strains of the species *Cyberlindnera xylosilytica* (05 strains) and *Wickerhamomyces rabaulensis* (11 strains) isolated from Brazilian ecosystems. Therefore, a screening for xylitol production was performed with these yeasts in YPX medium (60 g L⁻¹ D-xylose, 20 g L⁻¹ peptone, 10 g L⁻¹ yeast extract). *C. xylosilytica* (UFMG-CM-Y409 and UFMG-CM-Y309) and *W. rabaulensis* (UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747) showed the higher amounts of xylitol. Then, the preselected strains were cultivated in SBHH, obtained by dilute acid treatment and supplemented with ammonium sulfate, rice bran extract, and yeast extract based on 2³ full factorial design. *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-409 achieved the highest xylitol titers (14.06 g L⁻¹), xylitol yield ($Y_{\text{xylp/s}} = 0.63\text{g g}^{-1}$), and xylitol productivity ($Q_{\text{xylp}} = 0.20\text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$) utilizing the maximum level (10 g L⁻¹) of rice bran, and the minimum level (1.0 g L⁻¹) of yeast extract. In the other case, the xylitol production (22.13 g L⁻¹) was improved by the use of a lower initial cell concentration (1.0 g L⁻¹) and oxygen availability according to a 2² full factorial design analysis. These results suggest that *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-409 has a potential to be used in further biotechnological applications for xylitol production.

Keywords: *Cyberlindnera xylosilytica*, *Wickerhamomyces rabaulensis*, hemicellulosic hydrolysate; sugarcane bagasse, fermentation, xylitol, Brazilian ecosystems.

Financial Support: CNPq, FAPESP.

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR LINHAGENS DE *Cyberlindnera xylosilytica* E *Wickerhamomyces rabaulensis*

Palladino, F¹., Cadete, R.M¹., Rodrigues, R.C.L.B²., Rosa, C.A¹

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG ²Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP.

Subprodutos agroindustriais, como o bagaço de cana de açúcar, são ricos em açúcares, como xilose, e podem ser utilizados como matérias primas para a obtenção de produtos de interesse econômico. Dentre estes, destaca-se o xilitol, adoçante natural utilizado nas indústrias farmacêuticas e de alimentos. Leveduras que utilizam xilose como fonte de carbono apresentam potencial para produzir xilitol. Este trabalho propõe a investigação da produção de xilitol por linhagens das leveduras *Cyberlindnera xylosilytica* e *Wickerhamomyces rabaulensis*. A partir do cultivo em meio contendo xilose como única fonte de carbono, foram calculados os parâmetros fator de conversão de substrato em produto, Yp/s (g/g), e produtividade volumétrica, Qp (g/L/h). Os melhores resultados, comprovados estatisticamente, foram alcançados pelas linhagens de *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409 (0,83g/g e 0,58g/L/h, em 48h) e UFMG-CM-Y309 (0,87g/g e 0,65g/L/h, em 72h), e pelas linhagens de *W. rabaulensis* TO 56.1 (0,70g/g e 0,71g/L/h) e TO 68.1.1 (0,72g/g, 0,82g/L/h), ambas em 48h. Na sequência, a partir do cultivo em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar e utilizando-se as linhagens mencionadas, foi executado um estudo para avaliação da influência da suplementação na produção de xilitol, empregando-se os nutrientes sulfato de amônio (0-2 g/L), extrato de farelo de arroz (5-10 g/L), e extrato de levedura (1-2 g/L), por meio de um planejamento fatorial 2³. As linhagens de *C. xylosilytica* tiveram destaque quanto à produção de xilitol no ensaio contendo nível máximo de farelo de arroz e nível mínimo de sulfato de amônio e de extrato de levedura, apresentando uma produção de xilitol que variou de 0,55-0,63g/g e 0,17-0,20g/L/h. Para as linhagens de *W. rabaulensis* somente a adição de extrato de levedura foi significativa (p<0,05) no favorecimento da produção de xilitol. Este trabalho evidencia a importância de estudos na aplicação biotecnológica de leveduras para a obtenção industrial de produtos de valor agregado.

Palavras-chave: *Cyberlindnera xylosilytica*; *Wickerhamomyces rabaulensis*; hidrolisado de bagaço de cana de açúcar; xilitol

Apoio Financeiro: CNPq, FAPESP.

1 **Xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using novel**
2 **yeast strains of *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis***

3 **Fernanda Palladino^a, Rita C.L.B. Rodrigues^b, Raquel M. Cadete^a, Katharina O.**
4 **Barros^a, Carlos A. Rosa^{a*}**

5 **Fernanda Palladino**

6 ^aDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of
7 Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

8 **E-mail:** ferpalladino12@gmail.com

9

10 **Rita C. L. B. Rodrigues**

11 ^bDepartment of Biotechnology, Lorena Engineering School, University of São Paulo,
12 12602-810, Lorena-SP, Brazil

13 **Phone Number:** 55-12-31595027

14 **E-mail:** rita@debiq.eel.usp.br

15

16 **Raquel M. Cadete**

17 ^aDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of
18 Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

19 **E-mail:** raquelcadete@gmail.com

20

21 **Katharina O. Barros**

22 ^aDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of
23 Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

24 **E-mail:** katharinabarrosn@gmail.com

25

26 **Carlos A. Rosa***

27 ^aDepartment of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of
28 Minas Gerais, 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brazil

29 **Phone Number:** 55-31-34092739

30 **E-mail:** carlosa@icb.ufmg.br

31

32 **Abstract**

33 This study aimed to screen xylitol-producing strains of *Cyberlindnera xylosilytica* and

34 *Wickerhamomyces rabaulensis* for sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate

35 (SCHH) bioconversion. Four yeast strains (*C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and

36 UFMG-CM-Y409 and, *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747)

37 were regarded as the best xylitol producers from a complex medium. These strains were

38 cultivated in SCHH supplemented with ammonium sulfate, rice bran extract, and yeast
39 extract. *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y-409 showed the highest values for xylitol
40 production (production, 14.06 g·L⁻¹; xylitol yield, 0.63 g·g⁻¹; xylitol volumetric
41 productivity, 0.20 g·L⁻¹·h⁻¹) following SCHH supplementation with both rice bran and
42 yeast extract. In addition, a detailed study was performed with *C. xylosilytica* UFMG-
43 CM-Y309 and UFMG-CM-Y409 at different cell concentrations and volumes of
44 medium. Maximum xylitol production was achieved with 1.0 g·L⁻¹ cell concentration
45 and 25 mL of culture medium. This work demonstrates the biotechnological potential of
46 these yeasts for xylitol production.

47 **Keywords:** Xylitol production; *Cyberlindnera xylosilytica*; *Wickerhamomyces*
48 *raubaulensis*; sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.

49

50 **1. Introduction**

51 Xylitol is a polyalcohol (C₅H₁₂O₅) classified as a sweetener capable of replacing
52 sucrose (Mohamad et al., 2015; Dasgupta et al., 2017; Unrean and Ketsub, 2018).
53 Xylitol is well tolerated by diabetic patients, exerts non-cariogenic effect (Duangthip et
54 al., 2015; Jia et al., 2016; Cocco et al., 2017), and demonstrates clinical usefulness in
55 osteoporosis and vaginosis treatment (Mattila et al., 1998; Kimberly Clark CO, 2010).
56 At present, commercial xylitol production is achieved through the catalytic
57 hydrogenation of purified xylose from biomass hemicellulosic hydrolysates. This
58 process is inefficient and expensive, owing to the high complexity of the xylose
59 purification procedure and the need to separate catalyst residues and byproducts
60 generated during the process of xylitol hydrogenation (Pal et al., 2016; Rao et al., 2016).
61 An alternative strategy for the production of xylitol involves biotechnological pathway

62 using hemicellulosic hydrolysate; this method does not require xylose purification or
63 high temperatures and pressures (Dussán et al., 2016; Thancharoen et al., 2016; [López-](#)
64 [Linares](#) et al., 2018).

65 Sugarcane bagasse is a lignocellulosic waste rich in sugars. According to the
66 Brazilian National Supply Company (CONAB), around 94.1 tons of bagasse was
67 obtained from 625.96 thousand tons of sugarcane produced in the 2018/19 harvest
68 (Conab, 2018). Brazil is one of the world's largest sugarcane producers. Sugarcane
69 bagasse has a complex structure formed roughly of 20-30% lignin, 40-45% cellulose,
70 and 30-35% hemicelluloses, with limited amounts of extractives and ash (Rodrigues et
71 al., 2001, Hernández-Pérez et al., 2016). The high concentration of D-xylose in the
72 hemicellulosic fraction of the sugarcane bagasse and the high capacity of D-xylose
73 assimilation by several yeasts are the main reasons that drive the use of this raw
74 material for the production of xylitol (Guamán-Burneo et al., 2015; Hernández-Pérez et
75 al., 2016; Jiang et al., 2016; Arruda et al., 2017). However, the pretreatment process
76 generates several by-products such as furans (furfural and 5-hydroxymethylfurfural),
77 carboxylic acids (i.e., levulinic, formic, and acetic acids), and phenolics (e.g., phenol,
78 vanillin, vanillic acid, coumaric acid) (Rodrigues et al., 2003, Li et al., 2016). These
79 compounds may inhibit the bioconversion of xylose to xylitol by yeasts; their removal
80 or reduction from the medium may be achieved through activated charcoal, resin,
81 solvent extraction, and vacuum evaporation (Rodrigues et al., 2001; [López-Linares](#), et
82 al., 2018).

83 For biotechnological production of xylitol, factors other than the carbon source and
84 microbial strains, such as temperature, pH, nitrogen source, cell concentration, and
85 oxygen concentration, are important. Oxygen concentration is considered as one of the

86 most limiting parameters (Su et al., 2015). The use of nitrogen sources in fermentation
87 media could enhance cell biomass generation or metabolite formation. While the low
88 ratio of carbon to nitrogen favors the generation of cell biomass, high ratio facilitates
89 the formation of metabolites. Yeasts are able to assimilate different sources of inorganic
90 nitrogen, such as peptone, yeast extracts, ammonium sulfate ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$), and urea,
91 which are extensively studied for the production of xylitol (Hongzhi et al., 2011).
92 Another source of nutrients studied for xylitol production is rice bran, which is
93 considered as a rich source of proteins, Fe, Zn, and Mn and vitamins B and E (Saunders,
94 1985; Vallejos et al., 2016; Favaro et al., 2017). Supplementation of the sugarcane
95 bagasse hemicellulosic hydrolysate with nutrients such as rice bran has been widely
96 used in several studies such as for the formulation of culture media to produce xylitol by
97 *Candida (Meyerozyma) guilliermondii* (Rodrigues et al., 2001; Pereira et al., 2011;
98 Arruda et al., 2017).

99 *Candida tropicalis* and *Meyerozyma guilliermondii* are yeasts commonly studied for
100 the production of xylitol (Dalli et al., 2017; Arruda et al., 2017; [López-Linares](#) et al.,
101 2018). New yeasts species have been identified as xylitol producers and include
102 *Scheffersomyces amazonensis* (Cadete et al., 2017, 2012), *Spathaspora brasiliensis*, *Sp.*
103 *roraimanensis*, *Sp. suhii*, *Sp. xylofermentans* (Cadete et al., 2016), and *Sugiyamaella*
104 *xylolytica* (Sena et al., 2017). Yeasts of the genus *Cyberlindnera* and *Wickerhamomyces*
105 have been studied as potential producers of xylitol. *Cyberlindnera xylosilytica* was able
106 to produce high yield ($0.726 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) of xylitol in the presence of xylose ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as a
107 carbon source (Cadete et al., 2015). Junyapate et al. (2014) reported that
108 *Wickerhamomyces rabaulensis* is a xylitol-producing yeast ($0.36 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) that utilizes
109 xylose ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as the carbon source. During studies on yeasts associated with rotting

110 wood in forest ecosystems in Brazil, we have isolated several novel strains of *C.*
111 *xylosilytica* and *W. rabaulensis* (Freitas, 2014; Cadete et al., 2015; Cadete et al., 2017;
112 Brandão et al., 2017). These strains were not characterized based on their potentials for
113 xylitol production.

114 In this work, different strains of *C. xylosilytica* and *W. rabaulensis* were screened in the
115 semi-defined medium for the selection of yeast strains with maximum xylitol
116 production capacity. The growth profiles of these strains were evaluated using
117 sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate supplemented with different
118 concentrations of rice bran, yeast extract, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. We examined the influence of
119 cell concentration and oxygen conditions on the fermentation of sugarcane bagasse
120 hemicellulosic hydrolysate medium supplemented with rice bran and yeast extract using
121 two of the best xylitol-producing strains of *C. xylosilytica*.

122 **2. Material and methods**

123 *2.1 Screening for xylitol-producing strains in semi-defined medium containing xylose*

124 *2.1.1 Yeasts strains and inoculum medium*

125 Table 1 shows the origin of *C. xylosilytica* and *W. rabaulensis* strains used in this
126 study. Methods of isolation of these yeast strains are described in Cadete et al., (2012).
127 The yeasts were isolated from bark tree, decaying wood, sugarcane filter cake, insects
128 frass, water, cactus samples (Freitas, 2014; Cadete et al., 2015; Cadete et al., 2017;
129 Brandão et al., 2017). These isolates were stored in the Collection of Microorganisms
130 and Cells of Federal University of Minas Gerais at $-80\text{ }^\circ\text{C}$. For pre-inoculum
131 preparation, yeast strains were grown on yeast extract-malt extract agar (YMA)
132 (glucose, $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; peptone, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; yeast extract, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; malt extract, $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; and

133 agar $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24-48 h at $30 \text{ }^\circ\text{C}$. Each tested strain was grown in 125-mL
134 Erlenmeyer flasks containing 50 mL of YPX broth (yeast extract, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; peptone, 20
135 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; and D-xylose, $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in an orbital shaker at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and 200 rpm for 24 h
136 (Arruda et al., 2017; Lorliam et al., 2017). Cells were recovered by centrifugation
137 ($3,000 \times g$ for 15 min), washed twice with sterile distilled water, and an aliquot from the
138 final solution was transferred to fresh fermentation medium to obtain an initial cell
139 concentration of $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cadete et al., 2015).

140 *2.1.2 Screening for xylitol-producing strains*

141 Screening for xylitol-producing yeasts in YPX broth (yeast extract, $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; peptone,
142 $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; and D-xylose, $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) was carried out in 125-mL Erlenmeyer flasks
143 containing 50 mL of medium in an orbital shaker at $30 \text{ }^\circ\text{C}$ and 200 rpm for 72 h (Cadete
144 et al., 2015; Thancharoen et al., 2016; Lorliam et al., 2017). The experiments were
145 performed in duplicate. Samples were taken at regular intervals of 12 h. Cell
146 concentration was determined and the culture broth was centrifuged ($3,000 \times g$ for 15
147 min). The supernatants were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ for subsequent analysis of the sugars and
148 toxic compounds by high-pressure liquid chromatography (HPLC) (Cadete et al., 2015).
149 The results were expressed as xylitol concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sugar consumption (%),
150 xylitol yield ($Y_{p/s}$; $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), and xylitol volumetric productivity (Q_p ; $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

151 *2.2 Screening for xylitol-producing strains using sugarcane bagasse hemicellulosic* 152 *hydrolysate*

153 *2.2.1 Preparation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate*

154 Sugarcane bagasse was dried to 10% moisture in sunlight and stored at room
155 temperature (25°C) before pretreatment. Sugarcane bagasse was pretreated with diluted
156 sulfuric acid (100 mg H₂SO₄/g dry matter) at a solid:liquid ratio of 1:10. The reaction
157 was conducted in a 50 L stainless steel reactor at 121 °C for 20 min. After this step, the
158 residual solid material was separated by centrifugation and the liquid phase
159 (hemicellulosic hydrolysate) was vacuum concentrated in a 30 L stainless steel
160 evaporator at 70 °C to increase the xylose concentration to 60 g·L⁻¹ (Rodrigues et al.,
161 2010; Dussán et al., 2016; Arruda et al., 2017).

162 The vacuum evaporated hemicellulosic hydrolysate was treated with the overliming
163 detoxification method, wherein calcium oxide was added to raise the initial pH (0.87) to
164 7.0, followed by the addition of phosphoric acid to decrease the pH to 5.5. At each step,
165 the precipitate was removed by centrifugation (2,000 ×g for 20 min). Activated charcoal
166 powder (2.5% m/v) was added to Erlenmeyer flask (2,000 mL) containing 1,100 mL of
167 hemicellulosic hydrolysate (pH 5.5). The mixture was maintained at 200 rpm and 30 °C
168 for 1 h. The solids were removed by centrifugation (2,000 ×g for 20 min). Before
169 fermentation, the vacuum-evaporated and detoxified hemicellulosic hydrolysate was
170 autoclaved at 111 °C (0.5 atm) for 15 min (Hernández-Pérez et al., 2016; Arruda et al.,
171 2017). The sugar composition of the hemicellulosic hydrolysate was determined by high
172 performance liquid chromatography (HPLC).

173 *2.2.2 Supplementation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate*

174 The supplementation of sugarcane hemicellulosic hydrolysate was performed using
175 Design of Experiments (DoE). The experiments were conducted based on 2³ full
176 factorial design with four replicates in the central point. The effects of the independent

177 variables, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (X_1 , S), rice bran extract (X_2 , F), and yeast extract (X_3 , E),
178 were evaluated on xylitol production ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Y_1) by the yeast strains. The levels and
179 coded levels (-1, 0, 1) of the independent variables evaluated are listed in Table 2.

180 The experimental data were analyzed by multiple regression analysis through least
181 square method. All the terms of the model were statistically tested and verified using F -
182 test (analysis of variance [ANOVA] at probability levels ($p < 0.05$)). Adequacy of the
183 developed models was tested by performing R^2 , adjusted coefficient of R^2 -adj, normal
184 probability plot, and residuals versus the fit values (Rodrigues et al., 2012). All
185 numerical analyses were estimated using Design-Expert Version 6.0.6 software (Stat-
186 Ease Inc., USA). The response and contour plots were developed using Statistica for
187 WindowsTM release 5.1 software (StatSoft Inc., USA).

188 2.2.3 Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate

189 The screening for xylitol-producing yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic
190 hydrolysate (32 to 37 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylose) was carried out in 125-mL Erlenmeyer flasks
191 containing 50 mL of medium in an orbital shaker at 30 °C and 200 rpm for 120 h.
192 Sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate was supplemented with rice bran extract
193 (5.0-10.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Guamán-Burneo et al., 2015; Arruda et al., 2017), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0-2
194 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Guamán-Burneo et al., 2015; Hernández-Perez et al., 2016; Arruda et al., 2017),
195 and yeast extract (1.0-2.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (Lorliam et al., 2017) according to 2^3 full factorial
196 design with four central points (Table 2). The experiments were performed in duplicate.
197 Samples were taken at regular intervals of 24 h and cell concentration was determined
198 for spectrophotometry. The culture broths were centrifuged (3,000 $\times g$ for 15 min) and
199 the supernatants were stored at -20 °C for the subsequent analysis of sugars and toxic

200 compounds by HPLC (Cadete et al., 2015). The results were expressed as xylitol
201 concentration ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sugar consumption (%), xylitol yield ($Y_{p/s}$, $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), and xylitol
202 productivities (Q_p , $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$).

203 *2.3 Influence of cell concentration and volume of medium on sugarcane bagasse* 204 *hemicellulosic hydrolysate bioconversion*

205 An experimental factorial design 2^2 was performed with four central points by
206 varying cell concentration (1.0, 5.0, and 10.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and medium volume (25, 50, and 75
207 mL) (Table 3). The hydrolysate culture assays were carried out in 125-mL flasks
208 containing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of xylose)
209 supplemented with 1.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of yeast extract and 10.0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of rice bran extract
210 (Guamán-Burneo et al., 2015; Arruda et al., 2017) at 30 °C and 200 rpm. The assays
211 were monitored by taking samples at time intervals of 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h.
212 Samples were stored at 20 °C for further analysis. All experiments were performed in
213 duplicates.

214 *2.4 Determination of cell concentration*

215 Cell concentrations were determined using a Beckman DU 640B spectrophotometer
216 (Beckman Coulter, Pasadena, California, USA) by reading the optical density at 600 nm
217 wavelength and from the previously determined calibration curve (dry weight \times
218 Abs600) (Cadete et al., 2016; Dussán et al., 2016).

219 *2.5 Analytical methods*

220 All samples were centrifuged at 2,600 $\times g$ for 15 min, and the resulting supernatants
221 were diluted (1:10) and filtered using a Sep-Pak C18 (Millipore) filter. The

222 concentrations of D-xylose, ethanol, and xylitol in YPX medium and glucose, xylose, l-
223 arabinose, ethanol, xylitol, and acetic acid in sugarcane bagasse hemicellulosic
224 hydrolysate were determined by HPLC (Waters, Milford, Massachusetts, USA) using a
225 Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) column at 45 °C and Waters 410 refraction
226 index detector at an injection volume of 20 µL using a mobile phase of 5 mM H₂SO₄ at
227 a flow rate of 0.6 mL/min.

228 2.6 Fermentation parameters

229 Xylitol yield ($Y_{p/s}$, g·g⁻¹) were calculated as the ratio between xylitol concentration
230 and xylose consumption. Xylitol productivities (Q_p , g·L⁻¹·h⁻¹) were calculated as the
231 ratio between xylitol concentration and time of maximum xylitol production. The
232 efficiency (η , %) of xylose-to-xylitol bioconversion was calculated as the ratio between
233 the experimental $Y_{p/s}$ value (g·g⁻¹) and the maximum theoretical yield value (0.917
234 g·g⁻¹), as proposed by Cadete et al. (2012) and Dussán et al. (2016).

235 3. Results and discussion

236 3.1 Screening for xylitol-producing strains

237 Table 1 summarizes the results of xylose consumption (%), xylitol production (g·L⁻¹),
238 yeast biomass (g·L⁻¹), ethanol yield (g·L⁻¹), xylitol yield ($Y_{p/s}$, g·g⁻¹), xylitol volumetric
239 productivity (Q_p , g·L⁻¹·h⁻¹), and theoretical xylitol yield (η , %) of different strains of *C.*
240 *xylosilytica* and *W. rabaulensis*.

241 The results were analyzed at 48 and 72 h (Table 1) of cultivation. All strains
242 produced xylitol using xylose as a sole carbon source in the culture medium. Ethanol
243 was also produced at low concentrations. The best xylitol-producing strains were *C.*

244 *xylosilytica* UFMG-CM-Y407 and UFMG-CM-Y309 and *W. rabaulensis* UFMG- CM-
245 Y6303 and UFMG-CM-Y3716 (Table 1). These results suggest that these yeasts
246 express xylose reductase (XR) enzymes and are strictly dependent on NADPH or may
247 have preference for NADPH or exhibit low activity in the presence of NADH. Yeasts
248 showing this behavior produce xylitol as the main product of the metabolism of D-
249 xylose (Cadete et al., 2016).

250 Strains of *C. xylosilytica* tested in the present study produced 37 to 46.87 g·L⁻¹ of
251 xylitol, especially UFMG-CM-Y309 strain that showed xylitol production of 46.87
252 g·L⁻¹ and xylose consumption of 87.92% (Table 1). Strains of *C. xylosilytica* tested by
253 Cadete et al. (2015) using culture medium containing 50 g·L⁻¹ xylose, 10 g·L⁻¹ yeast
254 extract, and 20 g·L⁻¹ peptone showed a xylose consumption of 86% to 94% and a
255 maximum xylitol production of 33 g·L⁻¹ ($Y_{p/s}$ 0.726 g·g⁻¹ and Q_p 0.459 g·L⁻¹·h⁻¹) after
256 72 h of incubation. Guamán-Burneo et al. (2015) used a medium with 50 g·L⁻¹ xylose,
257 20 g·L⁻¹ rice bran extract, 2 g·L⁻¹ (NH₄)₂SO₄, and 0.1 g·L⁻¹ calcium chloride
258 (CaCl₂·2H₂O; pH 5.5) and a cell concentration of 1 g·L⁻¹ in 250-mL flasks with 100 mL
259 of medium at 200 rpm and 30 °C for 72 h. Xylitol production value for *C.*
260 *galapagoensis* was found to be 17.01 g·L⁻¹ ($Y_{p/s}$, 0.50 g·g⁻¹ and Q_p , 0.23 g·L⁻¹·h⁻¹).

261 In the present work, 60 g·L⁻¹ xylose led to xylitol production of 30-39.66 g·L⁻¹ and
262 $Y_{p/s}$ of 0.55 to 0.71 g·g⁻¹ with *W. rabaulensis* strain UFMG-CM-Y3716 (Table 1).
263 Junyapate et al. (2014) used culture medium with 10 g·L⁻¹ xylose and reported xylitol
264 production values of 1.78 to 3.30 g·L⁻¹ and $Y_{p/s}$ of 0.17 to 0.32 g·g⁻¹ for *W. rabaulensis*.

265 Among the 16 strains tested, two strains of each species were selected based on the
266 statistical analysis performed with ANOVA ($p \leq 0.05$) using parameters xylitol yield
267 ($Y_{p/s}$) and volumetric productivity (Q_p). The yeasts that were statistically significant and
268 deemed as the best xylitol producers were *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and
269 UFMG-CM-Y409 and, *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747.
270 These yeasts were used for the subsequent tests in the presence of sugarcane
271 hemicellulosic hydrolysate.

272 *3.2 Xylitol production by the yeast strains from sugarcane bagasse hemicellulosic* 273 *hydrolysate medium*

274 The xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409
275 and *W. rabaulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747 strains from sugarcane
276 bagasse hemicellulosic hydrolysate medium was studied using a 2^3 full factorial design
277 augmented with quadruplicates at the central point. The levels and coded levels ($-1, 0,$
278 1) of the independent variables evaluated are shown in Table 2. For each yeast strain,
279 the optimum supplementation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (S, X_1), rice bran extract (F, X_2), and yeast
280 extract (E, X_3) was established to improve xylitol production ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ($Y_1, Y_2, Y_3,$ and
281 Y_4).

282 Xylitol production ranged from $1.94 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Assay 01, *W. rabaulensis* UFMG-CM-
283 Y3716) to $14.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Assay 03, *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409) (Table 2). Assay 03
284 used rice bran extract ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}, X_2, F$) at high level. In all cases, the addition of rice
285 bran extract was associated with the addition of yeast extract and lack of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ to
286 enhance xylitol production ($Y_1, Y_2, Y_3,$ and Y_4). Bera and Mukherjee (1989) mentioned
287 that the rice bran protein concentrate had maximum solubility ($> 75\%$) at pH 9.0-10.5

288 and minimum (~13%) solubility at pH 4.5-5.5. In this work, the rice protein was
289 extracted with water at pH around 6.0, which probably contributed to the
290 supplementation of the medium with low amount of soluble proteins needed to be
291 enriched with low amount of yeast extract for the improvement in xylitol yield.

292 **[Table 2 about here.]**

293 At this stage of the experiment that corresponded to the factorial design 2^3 (Assays 01
294 to 08) with four central points (PC1, PC2, PC3, and PC4), were selected from second-
295 order factors and interactions that were significant at 95% confidence level (Table 4). In
296 addition, the xylitol production values (Y_1 , Y_2 , Y_3 , and Y_4) (Table 2) obtained under the
297 same experimental conditions (PC1, PC2, PC3, and PC4) for all yeasts showed small
298 variations, indicative of the excellent repeatability of the process.

299 In general, xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-
300 Y409 was higher than that by *W. ramboulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-
301 Y3747 strains with sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (Table 2). For *W.*
302 *ramboulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747, only the addition of yeast
303 extract (X_3) significantly improved xylitol production at 95% confidence level ($p <$
304 0.05) (Table 4). These strains showed the highest production of xylitol ($39.66 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)
305 during screening with xylitol-producing yeast medium containing xylose ($60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) but
306 produced low amount of xylitol ($< 4.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) after 72 h of cultivation in sugarcane
307 hemicellulosic hydrolysate medium.

308 For *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409, the linear and second-
309 order models were tested for xylitol production response variable, and the second-order
310 model was fitted using Design-Expert software. For both yeasts, multiple regression

311 analysis coefficients were calculated using xylitol production values from Table 2. For
312 *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309, the linear term of the variable X_1 ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) and
313 the interactions between the two organic nitrogen sources rice bran extract and yeast
314 extract (X_2X_3) were statistically significant at 5% significance level ($p < 0.05$) (Table
315 4). However, for *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409, the linear term of the variable X_1
316 and its interaction with yeast extract concentration (X_1X_3) were statistically significant
317 at 5% significance level ($p < 0.05$) (Table 4). Factors and interactions that were not
318 statistically significant at 95% confidence level were obtained from the model
319 composition.

320 **[Table 4 about here.]**

321 Table 5 displays the ANOVA for xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-
322 Y309 and UFMG-CM-Y409. The significance levels for the factors and interactions
323 showed a confidence level of 95%. This observation indicates that the F -value was
324 higher than the tabulated F -value (Table 5). This model shows that the lack-of-fit error
325 is insignificant, indicative of the accuracy of the fitted model for the prediction of the
326 response. We evaluated the normal probability plots and histograms of residuals (data
327 not shown) and found that the residuals showed no unusual structure, suggesting that
328 the models proposed for both yeast strains are adequate and there are no reasons to
329 suspect any violation of the independence or constant variance assumption.

330 **[Table 5 about here.]**

331 Mathematical models (Eq. 1 and Eq. 2) were developed to determine the optimal
332 values of the fermentation conditions that maximized the value of xylitol production for
333 *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409, respectively. Eq. 1 and Eq. 2

334 describe the xylitol production predicted by the models as a function of the coded
 335 variables in reparameterized models that contain only the statistically significant terms
 336 (Table 5). Here, Y_1 and Y_2 correspond to the xylitol production ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) by *C.*
 337 *xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409, respectively, while X_1 , X_2 , and
 338 X_3 correspond to the values coded for the variables $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, rice bran extract, and
 339 yeast extract, respectively.

$$340 \quad Y_1 = +10,03 - 0,498X_1 + 0,103X_2 - 0,205X_3 - 0,605X_2X_3$$

$$341 \quad (1)$$

$$342 \quad Y_2 = +13,02 - 0,388X_1 - 0,118X_3 + 0,543X_1X_3$$

$$343 \quad (2)$$

344 Eq. 1 displayed a positive value only for the rice bran extract mean effect (X_2), which
 345 means that xylitol production was favored with the highest coded levels (+1). The
 346 opposite situation was observed for the mean effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration (X_1)
 347 and yeast extract concentration (X_3) (Eq. 1), which showed negative values. This
 348 observation indicates that xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 was
 349 favored in lower coded levels (-1). The main effects must be interpreted together,
 350 owing to the existence of significant interaction effect (X_2X_3). These results may be
 351 better visualized in Fig. 1a.

352 **[Figure 1 about here.]**

353 The response surface and contour curves (Fig. 1a) present the existence of an optimal
 354 area for xylitol production by the interaction effects of rice bran extract and yeast
 355 extract in the absence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (lower level, -1) in fermentation medium. Here, the
 356 strength of rice bran extract ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) in sugarcane hemicellulosic hydrolysate favored
 357 xylitol production when the concentration of yeast extract was maintained at its lower

358 level ($1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). These results indicate that it was possible to reduce a nitrogen source
359 as expensive as yeast extract with the use of an alternative source (rice bran) and still
360 maintain the highest production of xylitol.

361 Highest xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409 (Fig. 1b) was favored
362 by the interaction between $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract (X_1X_3) that was significant at
363 95% confidence level. In this case, xylitol production was favored in the fermentation
364 medium with the lowest concentration of yeast extract ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and was associated with
365 the absence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Fig. 1b). For xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-
366 CM-Y409, the rice brain extract had no significant effect at 95% confidence level and
367 was kept at the lowest level ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). However, yeast extract should be maintained at its
368 upper level ($2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) while $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ should be kept at its lower level to improve
369 xylitol production by *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y409 (Fig. 1b).

370 The strains *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409 and *W.*
371 *raibaulensis* UFMG-CM-Y3716 and UFMG-CM-Y3747 produced high amounts of
372 xylitol in the medium supplemented with $60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylose. However, the strains *C.*
373 *xylosilytica* UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409 showed better xylitol yields
374 ($11.97 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $Y_{p/s}$ 0.55 and $14.06 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $Y_{p/s}$ 0.63, respectively) in the presence of
375 sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate medium supplemented with maximum
376 rice bran ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and minimum yeast extract ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) as sources of nutrients. The
377 improvement in xylitol production by these new yeast strains in the presence of
378 sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate medium was possible through the use of
379 an alternative nitrogen source (rice bran extract) and by reducing the amount of the
380 more expensive nitrogen source (yeast extract). These yeast strains were used for

381 subsequent tests in sugarcane hemicellulosic hydrolysate to evaluate the effects of
382 different cell concentrations and volumes of medium.

383 We studied xylitol production, xylose consumption, and cell growth of *C. xylosilytica*
384 UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409 strains in sugarcane bagasse hemicellulosic
385 hydrolysate medium supplemented with rice bran and yeast extract using a 2² full
386 factorial design augmented with quadruplicates at the central point. Evaluations of the
387 different cell concentrations and volumes of medium (Fig. 2a-d) and the fermentative
388 parameters for all experiments are summarized in Table 3. In general, the results
389 obtained in the present work showed that cell growth, xylose consumption, and xylitol
390 production improved with low cellular concentrations (1.0 g·L⁻¹) and reduced initial
391 oxygen availability (25 mL) in Erlenmeyer flasks (125 mL).

392 Oxygen has a relevant role as a final electron acceptor in the maintenance of the
393 redox equilibrium in two initial steps of xylose metabolism. Reduction in oxygen
394 consumption rates or anaerobic conditions may result in the inhibition of the oxidation
395 of NADH to NAD⁺ (Su et al., 2015; Cadete et al., 2016). In this case, another electron
396 acceptor becomes necessary to oxidize NADH. In the absence of any electron acceptor,
397 the cell may not maintain the redox balance and would be unable to ferment D-xylose
398 into ethanol, resulting in the accumulation of xylitol. Oxygen is also necessary to
399 generate energy during xylose transport in the cell (Bellido et al., 2013). The use of
400 xylose for cell growth or xylitol production was dependent on the initial availability of
401 oxygen, as these experiments were performed under conditions of increasing and
402 decreasing oxygen levels established using different volumes of medium (25, 50, and 75
403 mL) (Table 3). It was observed that the ability of the yeast to assimilate xylose was
404 affected with the reduction in the initial oxygen condition (medium volume of 75 mL),

405 which could be associated with the limitation of NADPH supply required for XR
406 activity (Silva and Felipe, 2006). As a consequence, the production of xylitol was
407 affected even with the use of rice bran and yeast extract as nutritional supplements.

408 **[Table 3 about here.]**

409 In response to the reduction in the initial oxygen availability (25 mL of medium),
410 xylose consumption was faster than that observed with lower initial availability of
411 oxygen (75 mL of medium) (Fig. 2a and 2c). The growth of *C. xylosilytica* was
412 susceptible to the levels of oxygenation. Assay 01, wherein the oxygenation condition
413 was higher (with 25 mL of medium), promoted an increase of 283% and 410% in the
414 cell mass of *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 (Fig. 2) and *C. xylosilytica* UFMG-CM-
415 Y-409 (Fig. 2), respectively, in 120 h of culture. As the increase in the cell
416 concentration from 5 to 10 g·L⁻¹ had no effect on cell growth, these values were
417 maintained for all samples collected in 120 h (Table 3).

418 **[Figures 2 about here.]**

419 A significant increase in xylitol production was observed in Assay 01. The best
420 values of the fermentation parameters for xylitol production were observed at 96 h for
421 both strains; *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 exhibited higher production of xylitol
422 (22.13 g·L⁻¹; 0.75 g·g⁻¹) (Fig. 2). Thus, although oxygen availability is a critical factor
423 for xylose-to-xylitol bioconversion, it may be possible to improve this bioprocess by
424 increasing xylose consumption under conditions of oxygen limitation and decreased cell
425 concentration. The highest yield of xylitol obtained using *C. tropicalis* in sugarcane
426 bagasse hydrolysate detoxified with activated carbon was lower than that found in the
427 present study ($Y_{p/s}$ 0.66 g·g⁻¹) (Marton et al., 2006). According to Guamán-Burneo et al.

428 (2015), *C. galapagoensis* was evaluated at an initial cell concentration of $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in
429 the presence of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate ($49.7 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of xylose) and
430 showed the second largest production of xylitol ($17.01 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $Y_{p/s} 0.50 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$). Under
431 same conditions, these authors tested a *C. tropicalis* strain that showed higher values of
432 xylitol ($27.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $Y_{p/s} 0.67 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$). Hernández-Pérez et al. (2016) cultivated *C.*
433 (*Meyerozyma*) *guilliermondii* in sugarcane straw hemicellulosic hydrolysate ($50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
434 xylose) supplemented with rice bran ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($2.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), and $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$
435 ($0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) at an initial cell concentration of $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the production of xylitol at
436 different volumes (25 or 50 mL) of medium in 125-mL Erlenmeyer flasks. The best
437 results were observed with 25 mL of medium, with xylitol production of $16.20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
438 and xylitol yield of $Y_{p/s} 0.47$.

439 In all assays, the central points ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of cell concentration and 50 mL of medium)
440 showed minor variations. *C. xylosilytica* UFMG-CM-Y309 produced $7.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of
441 xylitol in 96 h and consumed approximately 40% of xylose, while *C. xylosilytica*
442 UFMG-CM-Y409 produced $9.10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylitol on an average consumption of 42%
443 xylose, indicating the great reproducibility of the process.

444 Based on these results, the improvement in xylitol production by the *C. xylosilytica*
445 strains in medium containing hydrolysate hemicellulosic sugarcane bagasse was
446 considered to be higher availability of oxygen and lower cell concentration.

447 **4. Conclusion**

448 *C. xylosilytica* strains showed higher production of xylitol, followed by *W. rabaulensis*
449 strains. The combination of rice bran ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) and yeast extract ($1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), favored the

450 production of xylitol by *C. xylosilytica* in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.
451 This study also confirmed the high xylitol yield obtained from *C. xylosilytica* in the
452 presence of high oxygen availability and low cell concentration. These results suggest
453 that nutritional supplementation, cell concentration, and oxygen availability are
454 important variables for the biotechnological production of xylitol from lignocellulosic
455 materials by these yeast strains.

456 **Acknowledgments**

457 This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
458 Tecnológico (CNPq – Brazil, process numbers 407415/2013-1 and 0457499/2014-1)
459 and Fundação do Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG, process
460 number APQ-01525-14).

461 **References**

- 462 Arruda, P., Santos, J.C., Rodrigues, R.C.L.B., Silva, D.D.V. Yamakawa, C.K., Rocha,
463 G.J.M., Júnior, J.N., Pradella, J.G.C, Rossell, C.E.V., Felipe, M.G.A., 2017. Scale
464 up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by
465 *Candida guilliermondii* FTI 20037. J. Ind. Eng. Chem. 47, 297-302.
466 <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.046>.
- 467 Bellido, C., González-Benito, G., Coca, M., Lucas, S., & García-Cubero, M. T., 2013.
468 Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw
469 hydrolysates using *Pichia stipitis*. Bioresour. Technol. 133, 51-58.
470 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.104>.
- 471 Bera, M.B. and Mukherjee, R.K., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties
472 of rice bran protein concentrates. J. Food Sci., 54: 142–145.
473 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1989.tb08587>.
- 474 [Brandão, R.L.; Vaz, A.B.M.; Espírito Santo, L.C.; Pimenta, R.S.; Morais, P.B.; Libkind,](#)
475 [D.; Rosa, L.H.; Rosa, C.A., 2017. Diversity and biogeographical patterns of yeast](#)
476 [communities in Antarctic, Patagonian and tropical lakes. Fungal Ecology, 28, 33-](#)

- 477 43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2017.04.003>.
- 478 Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussa, K.J., Gomes, C.O., Rosa, C.A., Zilli, J.E., Vital,
479 M.J.S., 2012. Diversity and Physiological Characterization of D-xylose-
480 Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. Plos one, v. 7
481 (8), e43135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043135>.
- 482 Cadete, R.M., Cheab, M.A.M., Santos, R.O., Safar, S.V.B., Zilli, J.E., Vital, M.J.S.,
483 Basso, L.C., Lee, C.F., Kurtzman, C.P., Lachance, M.A., Rosa, C.A., 2015.
484 *Cyberlindnera xylosilytica* sp. nov., a xylitol-producing yeast species isolated from
485 lignocellulosic materials. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 2968–2974.
486 <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000363>.
- 487 Cadete, R.M., de las Heras, A.M., Sandström, A.G., Ferreira, C., Gírio, F., Gorwa-
488 Grauslund, M.-F., Rosa, C.A., Fonseca, C., 2016. Exploring xylose metabolism in
489 *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for
490 efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces*
491 *cerevisiae*. Biotechnol. Biofuels, 9, 167. [https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-6)
492 [6](https://doi.org/10.1186/s13068-016-0570-6).
- 493 Cadete, R.M., Melo-Cheab, M.A., Dussán, K.J., Rodrigues, R.C.L.B., da Silva, S.S.,
494 Gomes, F.C.O., Rosa, C.A., 2017. Production of bioethanol in sugarcane bagasse
495 hemicellulosic hydrolysate by *Scheffersomyces parashehatae*, *Scheffersomyces*
496 *illinoisensis* and *Spathaspora arborariae* isolated from Brazilian ecosystems. J.
497 Appl. Microbiol. 123, 1203–1213. <https://doi.org/10.1111/jam.13559>.
- 498 Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M.G., Strohmenger, L., Lingström, P., Campus, G., 2017.
499 The caries preventive effect of 1-year use of low-dose xylitol chewing gum. A
500 randomized placebo-controlled clinical trial in high-caries-risk adults. Clin. Oral
501 Investig. 21, 2733–2740. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2075-5>.
- 502 Conab, 2018. Monitoramento agrícola – Cana-de-açúcar [WWW Document]. URL
503 <http://C:/Users/User/Downloads/BoletimZCanaZ1ZLevantamentoZ18-19.pdf>
504 (accessed 3.9.18).
- 505 Dalli, S.S., Silva, S.S., Uprety, B.K., Rakshit, S.K., 2017. Enhanced production of xylitol
506 from poplar wood hydrolysates through a sustainable process using immobilized
507 new strain *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a. App. Biochem. Biotechnol.
508 182, 1053–1064. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2381-4>.

- 509 Dasgupta, D., Bandhu, S., Adhikari, D.K., Ghosh, D., 2017. Challenges and porpsects
510 of xylitol production with whole cell bio-catalysis: a review. *Microbiol. Res.* 197,
511 9-21. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.micres.2016.12.012>.
- 512 Duangthip, D., Jiang, M., Chu, C.H., Lo, E.CM., 2015. Non-surgical tretament of dentin
513 caries in preschool children-systematic review. *BMC Oral Health*, 15:44.
514 <https://doi/10.1186/s12903-015-0033-7>.
- 515 Dussán, K.J., Silva, D.D.V., Perez, V.H., da Silva, S.S., 2016. Evaluation of oxygen
516 availability on ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate in a batch
517 bioreactor using two strains of xylose-fermenting yeast. *Renew. Energy*, 87, 703-
518 710. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.065>.
- 519 Favaro L, Cagnin L, Basaglia M, Pizzocchero V, van Zyl WH, Casella S., 2017.
520 Production of bioethanol from multiple waste streams of rice milling. *Bioresour.*
521 *Technol.* 244: 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.07.108>.
- 522 Freitas , L.F.D. Yeast communities associated with cactaceae of Sand Dune and Cerrado
523 ecosystems. Master Dissertation. Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG,
524 2014.
- 525 Guamán-Burneo, M.C., Dussán, K.J., Cadete, R.M., Cheab, M.A.M., Portero, P.,
526 Barriga, E.J.C., Silva, S.S., Rosa, C.A., 2015. Xylitol production by yeast isolated
527 from rotting wood in the Galápagos Islands, Ecuador, and description of
528 *Cyberlindnera Galapagoensis* f.a., sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108:919-
529 931. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0546-8>.
- 530 Hernández-Pérez, A.F., de Arruda, P.V., Felipe, M. das G. de A., 2016. Sugarcane straw
531 as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037.
532 *Brazilian J. Microbiol.* 47, 489–496. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.019>.
- 533 Hongzhi, L., Keke, C., Jingping, G., Wenxiang, P., 2011. Statistical optimization of
534 xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis*
535 HDY-02. *New. Biotechnol.*, 28, 673-678.
536 <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2010.05.004>.
- 537 Jia, H. Shao, T., Zhong, C. Li, H. Jiang, M., Zhou, H., Wei, P., 2016. Evaluation of
538 xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining
539 tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydr.*
540 *Polym.* 151, 676-683. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.06.013>.

- 541 Jiang, X., He, P., Qi, X., Lin, Y., Zhang, Y., Wang, Q., 2016. High-efficient xylitol
542 production by evolved *Candida maltosa* adapted to corncob hemicellulosic
543 hydrolysate. J. Chem. Technol. Biotechnol. 91, 2994–2999. [DOI 10.1002/jctb.4924](https://doi.org/10.1002/jctb.4924).
- 544 Junyapate, K., Jindamorakot, S., Limtong, S., 2014. *Yamadazyma ubonensis* f.a., sp.
545 nov., a novel xylitol-producing yeast species isolated in Thailand. Antonie van
546 Leeuwenhoek, 105, 471–480. [DOI 10.1007/s10482-013-0098-8](https://doi.org/10.1007/s10482-013-0098-8).
- 547 Kimberly Clark CO (USA).Stephanie M. Martin, Lei Huang, Shu-Ping Yang, Yanbin
548 Huang, Julie Villanueva, Sharon Linda Greene, Kelly Arehart, Curtis Sayre,
549 Robert B. Johnson., 2010. Vaginal treatment compositions containing xylitol.
550 US7786176B2.
- 551 Li, S., Zhang, J., Xu, H., Feng, X., 2016. Improved xylitol production from D-Arabitol
552 by enhancing the coenzyme regeneration efficiency of the pentose phosphate
553 pathway in *Luconobacter oxydans*. J. Chem. Technol. Biotechnol. 64, 1144-1150.
554 [https://doi.org/ 10.1021/acs.jafc.5b05509](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05509).
- 555 López-Linares, J.C., Romero, I., Cara, C. Castro, E., Mussatto, S.I., 2018. Xylitol
556 production by *Debaromyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed
557 straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 247, 736–743
558 <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.139>.
- 559 Lorliam, W.; Akaracharanya, A.; Krajangsang, S.; Tolieng, V.; Tanasupawat, S., 2017.
560 Optimization of Xylitol Production by *Candida tropicalis* A26. *Chiang Mai J. Sci.*
561 44(1): 50-58.
- 562 Marton, J. M., Felipe, M. G. A., Almeida e Silva, J. B., & Pessoa Junior, A. (2006).
563 Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the
564 treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. *Braz. J. Chem.*
565 *Eng.*, 23(1), 9-21. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-66322006000100002>.
- 566 Mattila, P.T., Knuutila, M.L.E., Svanberg, M.J., 1998. Dietary xylitol supplementation
567 prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism*, 47,
568 578–583. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(98\)90243-8](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(98)90243-8).
- 569 Mohamad, N.L.; Kamal, S.M.M.; Mokhtar, M.N., 2015. Xylitol Biological Production:
570 A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, 31:74-89. [DOI:
571 10.1080/87559129.2014.961077](https://doi.org/10.1080/87559129.2014.961077).
- 572 Pal, S., Mondal, D.K., Sahoo, D.K., 2016. Molecular strategies for enhancing microbial

- 573 production of xylitol. *Process Biochem.* 51, 809-819.
574 <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.017>.
- 575 Pereira, R.S., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2011. Inhibitory action of toxic compounds
576 present in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by
577 *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38:71-78.
578 <https://doi/10.1007/s10295-010-0830-6>.
- 579 Rao, L.V., Goli, J.K., Gentela, J., Koti, S., 2016. Bioconversion of lignocellulosic
580 biomass to xylitol: an overview. *Bioresour. Technol.* 213, 299-310.
581 <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.04.092>
- 582 Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., Silva, J.B.A. e, Vitolo, M., Gómez, P.V., 2001.
583 The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of
584 volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic
585 hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation.
586 *Braz. J. Chem. Eng.* 18, 299–311. [https://doi.org/10.1590/S0104-](https://doi.org/10.1590/S0104-66322001000300009)
587 [66322001000300009](https://doi.org/10.1590/S0104-66322001000300009).
- 588 Rodrigues, R.C.L.B., Felipe, M.G.A., 2003. Response surface methodology for xylitol
589 production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled
590 vacuum evaporation process variables. *Process Biochemistry*, 38, 1231–1237.
591 [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(02\)00290-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00290-X).
- 592 Rodrigues, R.C.L.B., Rocha, G.J.M., Rodrigues Jr, D., Filho, H.J.I., Felipe, M., Pessoa
593 Jr, A., 2010. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane
594 bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). *Bioresour. Technol.*, 101, 1247–
595 1253. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.034>.
- 596 Rodrigues, R.C.L.B., Kenealy, W.R., Dietrich, D., Jeffries, T.W., 2012. Response
597 surface methodology (RSM) to evaluate moisture effects on corn stover in
598 recovering xylose by DEO hydrolysis. *Bioresour. Technol*, 108 (2012) 134–139.
599 [DOI:10.1016/j.biortech.2011.09.026](https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.09.026).
- 600 Saunders, R., 1985. Rice bran: composition and potential food uses. *Food Rev. Int.* 1,
601 465-495 <https://doi.org/10.1080/87559128509540780>.
- 602 Sena, L.M.F., Morais, G.M., Lopes M.R., Santos, R.O., Uetanabaro, A.P.T., Morais,
603 P.B., Vital, M.J.S., Morais, M.A., Lachance, M.A., Rosa, C.A. 2017. D-Xylose

- 604 fermentation, xylitol production and xylanase activities by seven new species of
605 Sugiyamaella. Antonie van Leeuwenhoek, 110:53-67. DOI [10.1007/s10482-016-](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0775-5)
606 [0775-5](https://doi.org/10.1007/s10482-016-0775-5).
- 607 Silva, D. D. V., Felipe, M. G. A., 2006. Effect of glucose: xylose ratio on xylose
608 reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in
609 sugarcane bagasse hydrolysate. J. Chem. Technol. Biotechnol, 81(7), 1294-1300.
610 DOI: [10.1002/jctb.1570](https://doi.org/10.1002/jctb.1570).
- 611 Su, Y. K., Willis, L. B., & Jeffries, T. W. (2015). Effects of aeration on growth, ethanol
612 and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and
613 *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. Biotechnol. Bioeng. 112(3), 457-469.
614 [https://DOI 10.1002/bit.25445](https://doi.org/10.1002/bit.25445).
- 615 Thancharoen, K., Deeseenthum, S., Vichitphan, K., 2016. Potential of xylose-fermented
616 yeast isolated from sugarcane bagasse waste for xylitol production using
617 hydrolysate as carbon source. Songklanakarin J. Sci. Technol. 38, 473–483.
618 DOI: [10.14456/sjst-psu.2016.63](https://doi.org/10.14456/sjst-psu.2016.63).
- 619 Unrean, P., Ketsub, N., 2018. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of
620 ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. Ind. Crops Prod., 123, 238–246.
621 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.071>.
- 622 Vallejos, M.E., Chade, M., Mereles, E.B., Bengoechea, D.I., Brizuela, J.G., Felissia,
623 F.E., Area, M.C., 2016. Strategies of detoxification and fermentation for
624 biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. Industrial Crops
625 and Products 91, 161–169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.07.007>.

626

List of Figures

627 Figure 1: Response surface for xylitol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) production by *Cyberlindnera xylosilytica*
628 strains UFMG-CM-Y309 (a) and UFMG-CM-Y409 (b).

629

630 Figure 2: Profiles of xylose consumption (●), xylitol (■), and cell biomass (▲) for *C.*
631 *xylosilytica* (UFMG-CM-Y309- solid line and UFMG-CM-Y409 – dashed line) in
632 SCHH with different cell concentrations and initial availability of oxygen. (A) $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
633 and 25 mL; (B) $1.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 75 mL; (C) $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 25 mL; (D) $10.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 75
634 mL.

List of Tables

Table 1 Screening for xylitol-producing strains in semi-defined medium containing xylose (60 g·L⁻¹).

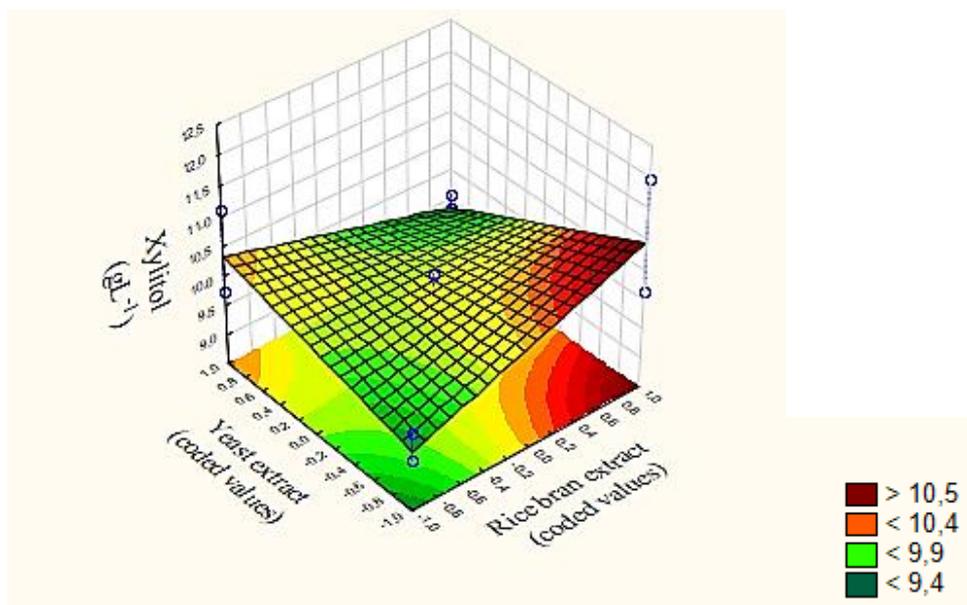
Table 2 Levels and coded levels for the independent variables used in a 2³ full factorial design augmented with quadruplicates at the central point for the evaluation of the effects of hydrolysate supplementation on xylitol production by yeasts *Cyberlindnera xylosilytica* and *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Table 3 Levels and coded levels for the independent variables used in a 2² full factorial design augmented for the evaluation of the effect of volume of medium and cell concentration on xylitol production by yeasts *Cyberlindnera xylosilytica* at 96 and 120 h of cultivation.

Table 4 Estimates of the effects of factors and interactions for the production of xylitol (g·L⁻¹) by yeasts UFMG-CM-Y309, UFMG-CM-Y409 (*Cyberlindnera xylosilytica*), UFMG-CM-Y3716, and UFMG-CM-Y3747 (*Wickerhamomyces rabaulensis*).

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for xylitol production by *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409) from sugarcane hemicellulosic hydrolysate.

a



b

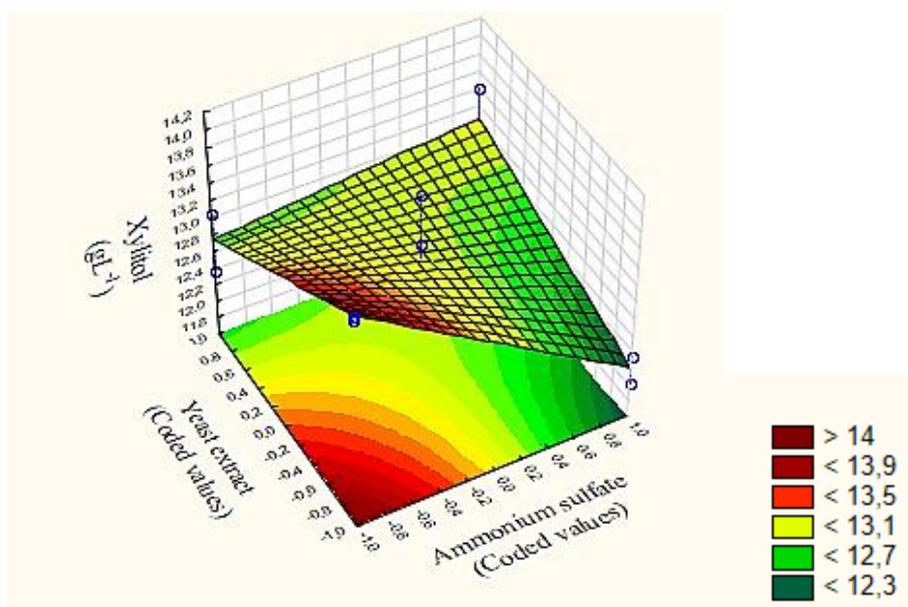


Figure 1: Response surface for xylitol (g·L⁻¹) production by *Cyberlindnera xylosilytica* strains UFMG-CM-Y309 (a) and UFMG-CM-Y409 (b).

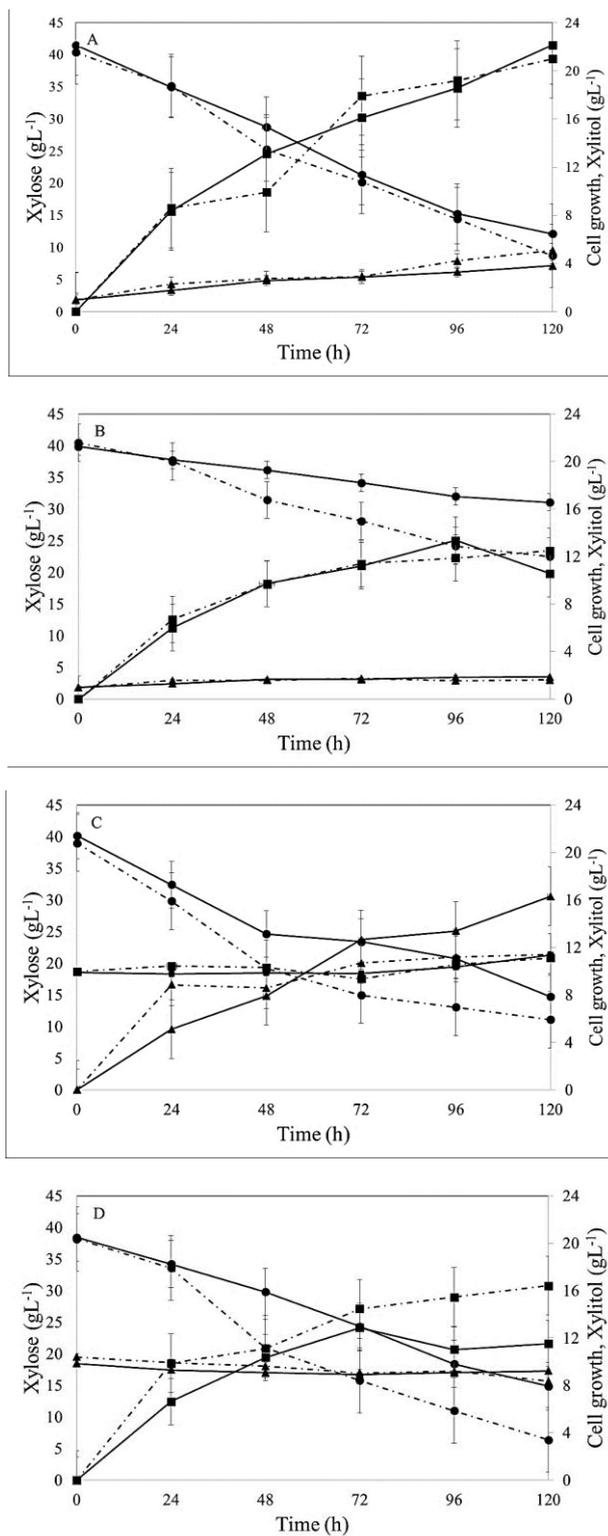


Figure 2: Profiles of xylose consumption (●), xylitol production (■) and cell biomass production (▲) for *C. xylosilytica* (UFMG-CM-Y309, solid line and UFMG-CM-Y409, dashed line) in SCHH with different cell concentrations and initial availability of oxygen. (A) 1.0 g·L⁻¹ and 25 mL; (B) 1.0 g·L⁻¹ and 75 mL; (C) 10.0 g·L⁻¹ and 25 mL; (D) 10.0 g·L⁻¹ and 75 mL.

Table 1

Screening for xylitol-producing strains in semi-defined medium containing D-xylose (60 g·L⁻¹).

Yeast strain	Lineage code	Biomass (g·L ⁻¹)		Xylitol (g·L ⁻¹)		Ethanol (g·L ⁻¹)		Xylose consumption %		Y _{p/s} (g·g ⁻¹)		Qp (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)		η	(%)
		48	72	48	72	48	72	48	72	48	72	48	72		
<i>C. xylosilytica</i>	UFMG-CM-Y408	2.79	4.67	21.36±0.210	36.95±0.521	0.75	0.76	54.60	77.14	0.65 ^{e.f.g.h}	0.80 ^{b.c}	0.45 ⁱ	0.51 ^d	70.91	86.82
	UFMG-CM-Y309	3.92	7.85	29.03±0.212	46.87±0.467	0.00	0.0	60.88	87.92	0.78 ^{b.c}	0.87 ^a	0.60 ^{e.f.g}	0.65 ^a	84.87	94.88
	UFMG-CM-Y409	3.88	7.05	28.01±0.495	42.36±0.792	0.00	0.0	54.47	81.87	0.83 ^b	0.84 ^{a.b}	0.58 ^g	0.59 ^b	90.85	91.42
	UFMG-CM-Y407	2.81	4.15	28.52±0.198	36.90±0.226	0.00	0.0	52.37	80.88	0.90 ^a	0.75 ^{c.d}	0.59 ^{f.g}	0.51 ^{d.e}	97.80	81.94
	NRRL YB 2097	3.56	5.12	25.05±0.240	37.19±0.579	0.00	0.0	60.39	82.74	0.68 ^{d.e.f}	0.74 ^{c.d}	0.52 ^h	0.52 ^d	74.12	80.32
<i>W. rabaulensis</i>	UFMG-CM-Y516	3.97	5.70	30.17±0.200	33.32±0.775	0.00	0.0	75.13	89.69	0.66 ^{e.f.g}	0.61 ^{f.g.h}	0.63 ^{d.e.f}	0.46 ^{f.g}	71.99	66.60
	UFMG-CM-Y6303	4.07	6.16	35.22±0.792	35.15±0.788	0.00	0.0	77.69	91.47	0.74 ^{c.d}	0.63 ^{f.g}	0.73 ^b	0.49 ^{e.f}	80.45	68.19
	UFMG-CM-Y3696	8.30	11.21	30.63±0.495	30.69±0.325	1.22	1.80	88.14	93.94	0.58 ⁱ	0.55 ⁱ	0.64 ^{d.e}	0.43 ⁱ	63.59	59.77
	UFMG-CM-Y3708	6.4	9.55	31.96±0.820	33.84±0.088	1.00	1.53	87.04	93.87	0.61 ^{f.g.h.i}	0.60 ^{f.g.h.i}	0.67 ^d	0.47 ^{f.g}	67.23	95.65
	UFMG-CM-Y3716	8.56	11.31	34.07±0.240	39.66±0.085	0.00	0.0	82.72	94.58	0.70 ^{d.e}	0.71 ^{d.e}	0.71 ^c	0.55 ^c	75.79	77.16
	UFMG-CM-Y3721	6.89	10.26	30.74±0.728	34.59±0.127	1.15	2.5	86.32	96.10	0.60 ^{g.h.i}	0.60 ^{f.g.h}	0.60 ^{d.e}	0.48 ^f	65.27	65.97
	UFMG-CM-Y3734	8.39	14.88	27.43±0.438	31.29±0.778	0.00	1.14	68.95	86.60	0.64 ^{e.f.g.h.i}	0.58 ^{g.h.i}	0.57 ^g	0.43 ^{h.i}	69.91	63.22
	UFMG-CM-Y3735	9.67	16.72	32.04±0.283	30.87±0.608	0.98	1.43	87.88	93.57	0.61 ^{g.h.i}	0.55 ^{h.i}	0.67 ^{c.d}	0.43 ⁱ	66.58	60.24
	UFMG-CM-Y3747	8.65	14.82	39.29±0.806	37.67±0.042	0.00	0.59	90.09	93.31	0.72 ^{d.e}	0.66 ^{e.f}	0.82 ^a	0.52 ^{c.d}	73.52	72.32
	UFMG-CM-Y3754	8.77	11.93	31.39±0.516	31.95±0.078	2.48	3.43	90.36	96.76	0.59 ^{h.i}	0.56 ^{h.i}	0.65 ^d	0.44 ^{g.h.i}	63.95	60.78
UFMG-CM-Y3759	8.74	10.22	35.19±0.632	33.03±0.332	0.00	0.00	86.01	93.39	0.66 ^{e.f.g}	0.57 ^{g.h.i}	0.73 ^b	0.46 ^{f.g.h}	71.44	61.75	

Yps, Qp, η are respectively the conversion, productivity and efficiency factors of xylitol. As F calc > F5%, it can be concluded that the means of the treatments differ among themselves at 5% probability (p≤0.05). The means indicated by the same letter did not differ statistically by the Tukey test (p≤0.05).

Table 2

Levels and coded levels for the independent variables used in a 2^3 full factorial design augmented with quadruplicates at the central point for the evaluation of the effects of hydrolysate supplementation on xylitol production by yeasts *Cyberlindnera xylophilica* and *Wickerhamomyces rabaulensis*.

Essay	S (g.L ⁻¹) X ₁	F* (g.L ⁻¹) X ₂	E* (g.L ⁻¹) X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	<i>Cyberlindnera xylophilica</i>		<i>Wickerhamomyces rabaulensis</i>		
							UFMG-CM- Y309 Xylitol (g.L ⁻¹) Y ₁	UFMG-CM- Y409 Xylitol (g.L ⁻¹) Y ₂	UFMG- CM-Y3716 Xylitol (g.L ⁻¹) Y ₃	UFMG- CM-Y3747 Xylitol (g.L ⁻¹) Y ₄	
Factorial planning 2^3	1	0.00	5.00	1.00	-1	-1	-1	9.89±0.133	14.01±0.611	1.94±0.101	2.38±0.041
	2	2.00	5.00	1.00	+1	-1	-1	9.37±0.222	12.01±0.082	1.96±0.093	2.48±0.042
	3	0.00	10.00	1.00	-1	+1	-1	11.97±0.813	14.06±0.083	2.09±0.162	2.56±0.012
	4	2.00	10.00	1.00	+1	+1	-1	10.12±0.574	12.34±0.231	2.54±0.302	3.96±0.095
	5	0.00	5.00	2.00	-1	-1	+1	11.11±0.765	12.38±0.185	2.63±0.893	3.35±0.281
	6	2.00	5.00	2.00	+1	-1	+1	9.75±0.143	12.64±0.392	3.10±0.714	3.92±0.093
	7	0.00	10.00	2.00	-1	+1	+1	9.55±0.921	13.05±0.784	3.66±0.952	3.82±0.012
	8	2.00	10.00	2.00	+1	+1	+1	9.30±0.712	13.41±0.593	3.41±0.413	4.10±0.073
Central point	PC1	1.00	7.50	1.50	0	0	0	10.23±0.043	12.51±0.082	3.38±0.671	4.30±0.074
	PC2	1.00	7.50	1.50	0	0	0	9.64±0.421	12.95±0.784	2.22±0.402	3.45±0.281
	PC3	1.00	7.50	1.50	0	0	0	9.76±0.062	13.16±0.781	3.54±0.333	3.45±0.144
	PC4	1.00	7.50	1.50	0	0	0	9.70±0.083	13.73±0.393	2.54±0.301	3.45±0.351

Concentration of ammonium sulfate (S, X₁), concentration of rice bran extract (F *, X₂) and concentration of yeast extract (E *, X₃).

Table 3 Levels and coded levels for the independent variables used in a 2² full factorial design augmented for the evaluation of the effect of volume of medium and cell concentration on xylitol production by yeasts *Cyberlindnera xylosilytica* at 96 and 120 h of cultivation.

Assay	V* (X ₄)	C* (X ₅)	V* (X ₄)	C* (X ₅)	Lineage code	Time (h)	Biomass (g.L ⁻¹)	Xylose consumption (%)	Xylitol (g.L ⁻¹)	Y _{p/s} (g.g ⁻¹)	Q _p (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	η (%)
01	-1	-1	25.0	1.0	UFMG-CM-Y309	96	3.30	63.24	18.57±0.571	0.71	0.19	77.16
						120	3.83	70.72	22.13±0.882	0.75	0.18	82.27
					UFMG-CM-Y409	96	4.23	64.23	19.20±0.288	0.74	0.20	80.73
						120	5.10	78.34	21.01±0.773	0.66	0.18	72.43
02	+1	-1	75.0	10.0	UFMG-CM-Y309	96	1.84	27.73	6.70±0.021	0.58	0.07	63.23
						120	1.85	24.46	7.85±0.213	0.77	0.07	84.44
					UFMG-CM-Y409	96	1.55	40.35	11.88±0.076	0.73	0.12	79.37
						120	1.60	44.36	12.47±0.764	0.70	0.10	76.18
03	-1	+1	25.0	1.0	UFMG-CM-Y309	96	10.35	48.30	13.40±0.740	0.69	0.14	75.74
						120	11.38	63.33	16.31±0.706	0.64	0.14	70.27
					UFMG-CM-Y409	96	10.58	66.50	11.19±0.371	0.43	0.12	47.41
						120	11.12	71.52	11.40±0.449	0.41	0.10	44.91
04	+1	+1	75.0	10.0	UFMG-CM-Y309	96	9.08	52.10	11.01±0.063	0.55	0.12	60.49
						120	9.23	61.29	11,53±0.212	0.49	0.10	53.74
					UFMG-CM-Y409	96	9.21	71.21	15.45±0.237	0.57	0.16	62.01
						120	8.37	83.25	16.42±0.130	0.52	0.14	56.55

Volume of medium (V, X₄) and the Cell concentration (C*, X₅). Y_{p/s}, Q_p, η are respectively the conversion, productivity and efficiency factors of xylitol.

Table 4

Estimates of the effects of factors and interactions for the production of xylitol ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) by yeasts UFMG-CM-Y309, UFMG-CM-Y409 (*Cyberlindnera xylosilytica*), UFMG-CM-Y3716, and UFMG-CM-Y3747 (*Wickerhamomyces rabaulensis*).

Yeast strain	Factors	Standard error and effects	p-Value
UFMG-CM-Y309- <i>Cyberlindnera</i> <i>xylosilytica</i>	Average	10.030±0.14	-
	X ₁ (L)	-0.995±0.35	0.035
	X ₂ (L)	0.205±0.35	0.580
	X ₃ (L)	-0.410±0.35	0.290
	X ₁ X ₂	-0.055±0.35	0.880
	X ₁ X ₃	0.190±0.35	0.607
	X ₂ X ₃	-1.210±0.35	0.018
UFMG-CM-Y409- <i>Cyberlindnera</i> <i>xylosilytica</i>	Average	13.02±0.12	-
	X ₁ (L)	-0.775±0.28	0.041
	X ₂ (L)	0.455±0.28	0.169
	X ₃ (L)	-0.235±0.28	0.444
	X ₁ X ₂	0.095±0.28	0.751
	X ₁ X ₃	1.085±0.28	0.012
	X ₂ X ₃	0.265±0.28	0.392
UFMG-CM-Y3716- <i>Wickerhamomyces</i> <i>rabaulensis</i>	Average	2.750±0.16	-
	X ₁ (L)	0.173±0.39	0.681
	X ₂ (L)	0.518±0.39	0.248
	X ₃ (L)	1.068±0.39	0.043
	X ₁ X ₂	-0.073±0.39	0.862
	X ₁ X ₃	-0.063±0.39	0.881
	X ₂ X ₃	0.153±0.39	0.716
UFMG-CM-Y3747 <i>Wickerhamomyces</i> <i>rabaulensis</i>	Average	3.430±0.14	-
	X ₁ (L)	0.588±0.34	0.146
	X ₂ (L)	0.578±0.34	0.152
	X ₃ (L)	0.953±0.34	0.039
	X ₁ X ₂	0.253±0.34	0.493
	X ₁ X ₃	-0.163±0.34	0.655
	X ₂ X ₃	-0.253±0.34	0.493

Concentration of ammonium sulfate (X₁), concentration of rice bran extract (X₂) and concentration of yeast extract (X₃).

Table 5

Analysis of variance (ANOVA) for xylitol production by *Cyberlindnera xylosilytica* (UFMG-CM-Y309 and UFMG-CM-Y409) from sugarcane hemicellulosic hydrolysate.

		Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F-Value	p-value
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i> UFMG-CM-Y309	X ₁ (L)		1.980	1	1.980	10.830	0.0133
	X ₂ (L)		0.084	1	0.084	0.460	0.5196
	X ₃ (L)		0.336	1	0.336	1.840	0.2173
	X ₂ X ₃		2.928	1	2.928	16.010	0.0052
	Residual		1,280	7	0.183	-	-
	Lack of Fit		1.063	4	0.266	3.660	-
	Pure Error		0.218	3	0.073	-	-
	Cor. Total		6.609	11	-	-	-
R ² =0.8063 (ajustado)=0.6956						R ²	
<i>Cyberlindnera xylosilytica</i> UFMG-CM-Y409	X ₁ (L)		1.201	1	1.201	7.000	0.0295
	X ₃ (L)		0.110	1	0.111	0.640	0.4457
	X ₁ X ₃		2.352	1	2.354	13.710	0.0060
	Residual		1.374	8	0.171	-	-
	Lack of Fit		0.027	1	0.0267	0.1400	0.7207
	Pure Error		1.347	7	0.192	-	-
	Cor. Total		5.040	11	-	-	-
	R ² =0.7274 (ajustado)=0.6252						R ²

Significant at 95% confidence level for all feedstock mixture. Concentration of ammonium sulfate (X₁), concentration of rice bran extract (X₂) and concentration of yeast extract (X₃).

