

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

TESE DE DOUTORADO

**PRODUÇÃO DE XILITOL E DIVERSIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS
DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E TORTA DE FILTROS DE USINAS
SULCROALCOOLEIRAS NO BRASIL**

Renata de Oliveira Santos

**Belo Horizonte
2013**

**Produção de xilitol e diversidade de leveduras isoladas de
bagaço de cana-de-açúcar e torta de filtros de usinas
sulcroalcooleiras no Brasil**

Renata de Oliveira Santos

Renata de Oliveira Santos

**Produção de xilitol e diversidade de leveduras isoladas de
bagaço de cana-de-açúcar e torta de filtros de usinas
sulcroalcooleiras no Brasil**

Tese de Doutorado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais,
como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Rosa – ICB/UFMG
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Sivério da Silva – DEBIQ – EEL/USP

Belo Horizonte
2013

COLABORADORES

Prof. Dr. Luiz Carlos Basso – Departamento de Ciências Biológicas - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ / USP – Piracicaba / SP.

Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes Junior – Departamento de Genética / UFPE – Recife / PE.

Dra. Kelly Johana Dussán Medina – Departamento de Biotecnologia DEBIQ – Escola de Engenharia de Lorena (EEL) - Universidade de São Paulo / SP.

“...Ao transferir bens materiais, o doador perde a sua posse. Há, porém, alguns atributos intrínsecos que não podem ser transferidos de um indivíduo para o outro, como a beleza e a coragem. O conhecimento, por outro lado, é algo tão importante que os deuses decidiram que o doador pode retê-lo mesmo que o tenham transmitido...”

Pitágoras de Samos, cerca de 2.500 anos atrás.

Sempre, a meus pais, João e Nelcy, e familiares

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela inteligência que nos foi concedida e pela natureza, sempre tão surpreendente!

Ao meu orientador, Carlos Rosa, pela orientação nos trabalhos, pelos conselhos, exemplos, ensinamentos e pelos anos de convivência tão enriquecedores profissional e pessoalmente.

Ao Prof. Silvio Silvério da Silva, pela disponibilidade e atenção na co-orientação deste trabalho. Meu muito obrigada pela ótima recepção no DEBIQ, na EEL/USP, e disponibilização do espaço e equipamentos para a realização dos experimentos.

Aos colaboradores deste trabalho: Prof. Basso e Prof. Marcos Morais, que me auxiliaram nas coletas, e contribuíram de fato para a realização deste.

À Kelly Dussán pela ajuda primordial na realização dos experimentos no DEBIQ (EEL/USP) e à Adriana, por toda disponibilidade e atenção, durante a estadia em Lorena.

Ao pessoal do DEBIQ: Débora, Bruna, Samira, Wagner, Felipe, Larissa, Otávio e em especial ao Paulo, pela acolhida.

Aos meus queridos do Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos pelos anos de convivência, cooperação, alegria diária e bons exemplos profissionais e pessoais: Ana Raquel, Alice, Débora, Fran, Adriana M., Bárbara, Silvana, Cris Guaman, Larissa, Carla Lara, Carla Pataro, Laura, Valéria, Monalisa, César, Mari Zé, Mari Vieira, Camila Gontijo, Cris Bigatti, Camila Rodrigues, Vivi, Larissa, Lilia, Bia Borelli, Jordana, Maroca, Suzana, Luiz e às “mais novas”, que vieram completar esse time que é bacana demais: Belbel, Marina Lima, Marina Moura, Jandora, Camila Silva, Gabriela, Grazi e Letícia. A ótima convivência com vocês tornou o trabalho ainda mais prazeroso!

Agradeço em especial às grandes companheiras e amigas do lab: Lu, Quel, Iara e às queridas Nati e Piló.

Ao Prof. Cláudio Bonjardim, coordenador do programa de Pós-graduação em Microbiologia.

A todo pessoal da secretaria do programa de Pós-Graduação em Microbiologia ICB/UFMG: Iracema, Gina, Patrícia, Tiago e Gabriel, e em especial ao Douglas, sempre tão atencioso.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

Aos componentes da banca examinadora, por terem gentilmente aceito o nosso convite.

Aos suplentes e relatores convidados.

Às amigas da vida: Carla, Dani, Carol, Niriana, Lílian, Leia, Vi e Nane pela torcida constante e pela confiança a que sempre me dedicam.

Por fim, agradeço aos meus pais, “meus queridos, meus velhos, meus amigos”! Pelo amor e dedicação de vocês pude ingressar em uma Universidade e em um mundo de ensinamentos que a educação e a ciência nos proporcionam. A vocês, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
ANEXOS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 – BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA E O CONCEITO DE BIORREFINARIAS.....	3
2.1.1 – <i>Composição da biomassa lignocelulósica</i>	4
2.1.2 – <i>Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica</i>	6
2.2 - UTILIZAÇÃO DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA	8
2.2.1 - <i>Indústria do etanol combustível</i>	8
2.2.2 - <i>Xilitol</i>	13
2.2.3 – <i>Fermentação de D-xilose para produção de etanol e xilitol</i>	17
2.3 – RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR	21
2.3.1 – <i>Bagaço de cana-de-açúcar</i>	21
2.3.2 – <i>Torta de filtros</i>	24
3- OBJETIVOS	26
3.1- OBJETIVO GERAL	26
3.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4- MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1- REALIZAÇÃO DAS COLETAS	27
4.2- ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS.....	27
4.3- PURIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DAS LEVEDURAS	27
4.4. IDENTIFICAÇÃO DAS LEVEDURAS	28
4.4.1 <i>Extração do DNA</i>	28
4.4.2 - <i>PCR com o iniciador EI-1</i>	29
4.4.3 - <i>Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4</i>	29
4.4.4. - <i>Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4</i>	30
4.4.5 - <i>Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento</i>	31
4.4.6 - <i>Análise das sequências</i>	31
4.5 - CÁLCULO DOS ÍNDICES DE DIVERSIDADE, SIMILARIDADE E CURVAS DE RAREFAÇÃO	32
4.6 - SELEÇÃO DAS LEVEDURAS FERMENTADORAS DE D-XILOSE	32
4.6.1- <i>Triagem quanto a produção de etanol e/ou xilitol</i>	33
4.6.2 - <i>Ensaio de fermentação</i>	33
4.6.3 - <i>Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar</i>	36
4.7 – MÉTODOS ANALÍTICOS	40
4.7.1 - <i>Determinação da concentração de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol</i>	40
4.7.2 <i>Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio</i>	40

4.7.3 - Determinação dos parâmetros fermentativos.....	41
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1 – COLETA DOS SUBSTRATOS E OBTENÇÃO DAS LEVEDURAS.....	42
5.2 – DIVERSIDADE DE LEVEDURAS.....	44
5.3- TRIAGEM DE LEVEDURAS FERMENTADORAS DE D-XILOSE	55
5.4- ENSAIO FERMENTATIVO COM MEIOS COMPLEXOS A BASE DE D-XILOSE	60
5.5- ENSAIO FERMENTATIVO DE D-XILOSE EM ESCALA DE BANCADA.....	63
5.6 - ENSAIO FERMENTATIVO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EM ESCALA DE BANCADA.....	69
5.7 - ENSAIO FERMENTATIVO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA EM BIORREATOR	75
6 - CONCLUSÕES	81
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de açúcares encontrados em diferentes matérias-primas.....	7
Tabela 2 – Locais de coleta e número de amostras de bagaço de cana e torta de filtros obtidas no presente trabalho.....	42
Tabela 3 - Identificação, ocorrência nas regiões de coleta, substratos de isolamento e meios de cultivo das leveduras isoladas nas usinas de álcool e açúcar no Brasil.....	46
Tabela 4 – Identificação das espécies novas com base nas sequências do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.....	48
Tabela 5 – Índices de diversidade de leveduras isoladas de bagaço de cana e torta de filtros a partir do meio YNB-Xilana, nas regiões amostradas.....	50
Tabela 6- Índices de diversidade de leveduras isoladas de bagaço de cana e torta de filtros a partir do meio YNB-Xilose, nas regiões amostradas.....	50
Tabela 7 – Índice de diversidade de leveduras obtidas a partir dos meios YNB-Xilose e YNB-Xilana e a partir do bagaço de cana e torta de filtros.....	51
Tabela 8- Consumo de xilose, produção de xilitol e etanol pelas espécies de leveduras avaliadas no teste triagem.....	59
Tabela 9 – Consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e ácido acético a partir do meio 1.....	62
Tabela 10 – Consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e ácido acético a partir do meio 2.....	62
Tabela 11 – Parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação de meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz em escala de bancada.....	67
Tabela 12 – Parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada.....	73
Tabela 13 – Parâmetros fermentativos obtidos para <i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BX21-a durante experimentos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator.....	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vias metabólicas da fermentação de glicose e xilose em leveduras.....	21
Figura 2 – Localização das principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil.....	22
Figura 3 - Biorreator de tanque agitado empregado no processo de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	39
Figura 4 - Distribuição em porcentagem de todos os isolados de leveduras obtidos nas diferentes usinas de álcool amostradas no Brasil.....	43
Figura 5 – Dendograma para o coeficiente de Sorensen para avaliação da similaridade entre as leveduras obtidas.....	52
Figura 6 – Amostragem e acumulação de espécies.....	54
Figura 7 – Valores de consumo de D-xilose, produção de células e produção de xilitol exibidos pelas leveduras testadas em meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz.....	68
Figura 8 – Valores de consumo de D-xilose, produção de células e produção de xilitol exibidos pelas leveduras testadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em escala de bancada.....	74
Figura 9 - Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator para a linhagem <i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BX21-a.....	80

ANEXO

Anexo 1 – Análises estatísticas entre os resultados obtidos para os parâmetros fermentativos determinadas por meio do teste de análise de variância (ANOVA).....	109
---	------------

RESUMO

A utilização de resíduos lignocelulósicos tem sido vista como uma alternativa potencial para a geração de energia e químicos devido à grande disponibilidade desses materiais. No contexto de biorrefinaria, a biomassa lignocelulósica pode ser utilizada como matéria-prima para a geração de diferentes produtos com valor comercial, como o etanol de segunda geração e o xilitol. Os objetivos desse trabalho foram isolar, identificar e selecionar leveduras capazes de fermentar D-xilose para o possível uso desses micro-organismos em processos de obtenção do xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico oriundo de biomassa vegetal. Quatrocentos e cinquenta leveduras foram obtidas de 100 amostras de bagaço de cana-de-açúcar e 60 amostras de torta de filtros coletadas em usinas de álcool nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraíba. Foram obtidas 24 espécies de leveduras conhecidas e três possíveis novas espécies. *Candida tropicalis* foi a espécie isolada com maior frequência, seguida de *Trichosporon mycotoxinivorans* e *Candida tartarivorans*. Outros nove gêneros foram obtidos, representados por espécies geralmente encontradas em materiais vegetais. Dos isolados obtidos, linhagens das espécies *C. tropicalis*, *Lindnera bimundalis*, *Sugiyamaella smithiae* e *Zygoascus meyeriae* apresentaram produção de xilitol em fermentações de D-xilose conduzidas em tubos de ensaio. Em ensaios em escala de bancada em frascos contendo 100 ml de meio de D-xilose, estas linhagens produziram xilitol como principal produto de fermentação. Nos ensaios em escala de bancada em tubos contendo hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, *L. bimundalis* UFMG BX21-a, produziu elevadas concentrações de xilitol. Já no ensaio fermentativo de hidrolisado de bagaço de cana em biorreator contendo 1,5 litros de meio, essa linhagem não apresentou estes resultados, embora a produção de xilitol tenha sido verificada nas duas condições de ensaio empregadas, mas com maior produção onde a taxa de transferência de oxigênio foi maior. Os resultados desse trabalho mostram o potencial biotecnológico para produção de xilitol de micro-organismos isolados a partir de resíduos como bagaço de cana. A utilização destes micro-organismos na bioconversão de D-xilose a xilitol a partir da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos derivados da biomassa vegetal pode ser viabilizada pela otimização das condições de fermentação em estudos futuros.

Palavras-chave: resíduos lignocelulósicos; fermentação de D-xilose; xilitol.

ABSTRACT

The use of lignocellulosic residues has been viewed as a reasonable alternative for energy and chemicals generation because of the wide availability of these materials. In the biorefinery, lignocellulosic biomass can be used as feedstock for the generation of different commercial value – added products such as xylitol and second generation ethanol. The aims of this study were to isolate, identify and select yeast capable to ferment D -xylose for the possible use of these microorganisms in processes for the production of xylitol from hemicellulosic hydrolysate. Four hundred and fifty yeasts were obtained from 100 samples of sugarcane bagasse and 60 pie filters samples collected in the alcohol plants in Minas Gerais, São Paulo and Paraíba states. Twenty-four known yeast species were isolated, and three possible new species. *Candida tropicalis* was the most frequently isolated species. *Candida tropicalis* was the most frequently isolated species, followed by *Trichosporon mycotoxinivorans* and *Candida tartarivorans*. Nine other genera were obtained, represented by species usually found in plant materials. Of the isolates, strains of *C. tropicalis*, *Lindnera bimundalis*, *Sugiyamaella smithiae* and *Zygoascus meyeræ* showed production of xylitol from D-xylose fermentation in test tubes with 2 ml of medium. In xylose fermentation assays on bench scale, these isolates produced xylitol the main product of fermentation. In tests of hemicellulosic hydrolyzate fermentation of sugarcane bagasse into flasks containing 100 ml of medium in a bench scale, *L. bimundalis* UFMG it BX21 produced high concentrations of xylitol. However, in the assay hydrolyzate fermentation in a bioreactor containing 1.5 liters of medium, this strain did not reproduce these resultados although the production of xylitol has been checked in one of two test conditions employed where oxygen transfer rate was higher. The results of this work show the biotechnological potential of microorganisms isolated from waste like bagasse. The use of these microorganisms in the conversion of xylose to xylitol by the fermentation of hemicellulose hydrolysates derived from plant biomass can be possible by optimization of fermentation conditions in future studies.

Keywords: lignocellulosic wastes; fermentation of D-xylose; xylitol.

1 – RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O interesse pela implantação de biorrefinarias para viabilizar a geração de diferentes produtos tem aumentado significativamente nos últimos anos. No conceito de biorrefinarias, as indústrias poderiam utilizar resíduos gerados em uma escala de produção como matérias-primas para outros fins, dentro da mesma indústria. Isto poderá resultar na utilização otimizada da biomassa para geração de produtos múltiplos em um sistema integrado, com interessantes perspectivas econômicas e ambientais. A biomassa lignocelulósica é vista como matéria-prima principal para a implantação de biorrefinarias e vários materiais lignocelulósicos podem ser utilizados, como os resíduos da indústria sulcralcooleira, que são produzidos abundante e continuamente.

A indústria da cana-de-açúcar no Brasil vem recebendo investimentos maciços, desde sua implantação, no sentido de sustentar o aumento crescente da demanda pelo etanol combustível. O etanol destaca-se atualmente como a principal fonte de energia alternativa à utilização do petróleo. Diferentemente da utilização de reservas fósseis, que além de esgotáveis contribuem para a geração de impactos ambientais conhecidos, a produção do etanol baseia-se na utilização de fontes naturais renováveis e não contribuem diretamente com a instauração de efeitos ambientais indesejáveis. O etanol produzido pela fermentação de açúcares presentes em matérias-primas oriundas de culturas alimentares, como a cana-de-açúcar no Brasil e o milho nos EUA, é denominado, etanol de primeira geração. Estratégias para a produção do etanol têm sido amplamente pesquisadas, para evitar aumento no preço do produto e/ou perda de áreas plantadas em detrimento da cultura da cana, a fim de sustentar a crescente demanda pelo produto. Assim, a produção do etanol conhecido como de segunda geração, tem ganhado espaço, no Brasil e no mundo. Essa produção baseia-se na utilização da biomassa lignocelulósica como matéria-prima e na fermentação dos açúcares presentes no hidrolisado lignocelulósico. Neste contexto, o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo lignocelulósico amplamente produzido no Brasil, poderia ser reempregado em bioprocessos para a geração do etanol de segunda geração.

Tendo em vista o conceito de biorrefinaria, além da produção de etanol de segunda geração, hidrolisados lignocelulósicos podem ser empregados para a geração de outros produtos, como o xilitol. Este poliálcool apresenta alto valor econômico

e tem sido utilizado como substituto da sacarose, em alimentos destinados ao consumo de pacientes diabéticos, já que seu metabolismo é independente de insulina. Além disso, o xilitol tem sido aplicado em composições de substâncias utilizadas na higiene oral, em função de sua propriedade anticariogênica. A produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado de biomassa lignocelulósica pode tornar o processo de obtenção deste menos oneroso, em comparação com as técnicas atualmente empregadas.

Para que a biomassa vegetal seja eficientemente utilizada em bioprocessos, é necessário que diferentes etapas sejam consolidadas. A biomassa é composta por lignina e açúcares fermentescíveis presentes na celulose e na hemicelulose. Pré-tratamentos precisam ser empregados a fim de liberar os açúcares. A degradação da hemicelulose disponibiliza predominantemente moléculas de D-xilose, entretanto esses açúcares não são fermentados pelas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* industriais utilizadas atualmente. Embora alguns gêneros e espécies de leveduras sejam descritos como naturais fermentadores de pentoses, tais linhagens não apresentam ainda todas as características necessárias para serem utilizadas em escala industrial. Desse modo, torna-se relevante o isolamento e a caracterização de leveduras que sejam capazes de fermentar D-xilose visando a produção do etanol de segunda geração. A produção biotecnológica do xilitol também passa necessariamente pela bioconversão da xilose por algumas espécies de leveduras. Linhagens de *Candida tropicalis* têm sido mais frequentemente estudadas, embora muitos parâmetros para uma melhor eficiência destes processos ainda precisem ser estabelecidos. A seleção de linhagens eficientemente fermentadoras de xilose e a otimização das condições de produção fazem-se necessários.

Resíduos orgânicos provenientes da atividade da indústria sulcoralcooleira, como o bagaço de cana-de-açúcar e a torta de filtros podem representar substratos interessantes para o isolamento de diferentes espécies de leveduras. Porém, dados sobre a comunidade de leveduras associadas a estes materiais não foram ainda relatados. Os micro-organismos podem estar melhor adaptados a estas fontes nutricionais, bem como às condições industriais observadas nas usinas de álcool de onde estes procedem. Portanto, torna-se relevante a identificação das populações de leveduras assimiladoras de D-xilose que colonizam estes substratos, o que pode levar ao isolamento de linhagens com interessantes propriedades biotecnológicas e potencialmente utilizáveis na geração do xilitol ou etanol de segunda geração.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Biomassa lignocelulósica e o conceito de biorrefinarias

A lignocelulose é o substrato vegetal mais abundante na biosfera e representa cerca de 50% de toda biomassa na natureza. Dentre os materiais lignocelulósicos podem ser citados resíduos florestais, agrícolas, plantas aquáticas, gramíneas, dentre outros (CHANDEL et al., 2011). A natureza e a disponibilidade desses materiais, em diferentes regiões do planeta, dependem do clima e de outros fatores ambientais, de práticas agrícolas e de desenvolvimentos tecnológicos (CLAASSEN et al., 1999). De modo geral, os materiais lignocelulósicos podem ser divididos em cinco grupos principais: resíduos de culturas (bagaço de cana e sorgo, palha de milho, trigo, arroz e cevada, casca de arroz, polpas, caules e folhas em geral), resíduos florestais (madeiras), culturas herbáceas (gramíneas), subprodutos industriais e resíduos sólidos municipais (SAHA, 2003; CARDONA et al., 2010). No Brasil, a agroindústria da cana-de-açúcar, milho, arroz, mandioca, trigo, cítricos, côco e capim coletivamente ocupam uma área de 28.840.726 hectares e geram 597 milhões de toneladas de resíduos por ano. Évidentemente, toda essa escala de produção agroindustrial necessita do desenvolvimento de estratégias que visem a utilização adequada desses recursos vegetais (FERREIRA-LEITÃO et al., 2010).

Em função da composição, uma ampla gama de materiais lignocelulósicos pode ser utilizado em bioprocessos, e a biomassa vegetal tem sido vista como uma interessante fonte de energia, podendo contribuir para o desenvolvimento sustentável (MONIQUE et al., 2003). Os resíduos agroindustriais, ricos em materiais lignocelulósicos, apresentam vantagens como baixo custo, abundância, e capacidade de serem produzidos nas mais diferentes condições de solo e clima. Entretanto, devido ao elevado custo da reutilização destes materiais, um grande volume é continuamente acumulado. Sendo assim, a aplicação de resíduos agroindustriais em bioprocessos não somente oferece substratos alternativos, mas também ajudaria a solucionar problemas, no que diz respeito a gestão de resíduos, uma grande preocupação ambiental atual (LIN e TANAKA, 2006).

Atualmente, muitas pesquisas têm direcionado objetivos no sentido de desenvolver estratégias para melhorar o processamento da biomassa lignocelulósica, priorizando baixo impacto ambiental e o desenvolvimento de métodos

economicamente viáveis. Esses métodos utilizariam basicamente procedimentos fermentativos ou enzimáticos. As substâncias de interesse industrial produzidas por essas tecnologias incluem combustíveis e solventes (etanol, butanol, 2,3-butanodiol, acetona e 2-propanol), alditóis (xilitol e glicerol), ácidos orgânicos (ácido láctico, acético e butírico), bioplásticos, dentre outros químicos (LEE et al., 1995; OOI et al., 2002; LIMA, 2006; JUCOSKI et al., 2007). Nesse sentido, o termo *Biorrefinaria* se faz presente, no que diz respeito às principais perspectivas para o futuro. As biorrefinarias são indústrias que geram uma grande variedade de produtos a partir de matérias-primas renováveis, sendo a biomassa lignocelulósica vista como principal material a ser empregado (CHERUBINI e STROMMAN, 2011; KAMAT et al., 2013). Conceitualmente, “biorrefinarias são instalações industriais que integram diversos processos e equipamentos de conversão de biomassa para se obter combustíveis, eletricidade e produtos químicos”. Essas instalações industriais ainda precisam ser desenvolvidas e, certamente terão papel de destaque no processamento da biomassa lignocelulósica para a geração de produtos com valor econômico, na tentativa de privilegiar o uso dos insumos e a eficiência energética. O conceito de biorrefinarias é análogo à refinaria de petróleo, onde são produzidos diferentes combustíveis e produtos numa mesma instalação industrial. A indústria sulcralcooleira no Brasil é um exemplo de biorrefinaria, pois nela são produzidos etanol, açúcar, bagaço de cana utilizado na co-geração de energia, leveduras comercializadas como ração animal, vinhaça e torta de filtros, que voltam ao campo para fertirrigação, tudo a partir de matéria-prima renovável (EMBRAPA AGROENERGIA, 2013). Dentro dessa perspectiva, processos efetivos para a utilização de resíduos lignocelulósicos como fonte de carbono utilizável vêm sendo pesquisados e desenvolvidos no Brasil e no mundo (LI et al., 2009). Tendo em vista a implantação de biorrefinarias, vislumbra-se a máxima utilização das instalações industriais e da biomassa lignocelulósica como matéria-prima renovável e a geração de diferentes produtos de interesse comercial.

2.1.1 – Composição da biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos consistem em um complexo de três principais polímeros quimicamente interligados via ligações covalentes e não covalentes: celulose (40-55%), hemicelulose (10-40%) e lignina (20-30%). A pectina (2-20%) é um polímero que pode ou não estar presente, de acordo com o espécime vegetal (INGRAM et al., 1999; ZALDIVAR et al., 2001; PEREZ et al., 2002; SUN e CHENG, 2002; HAHN-HAGERDAL et al., 2006; DERMIBAS, 2009; SANDERSON et al., 2011).

A viabilidade econômica dos processos de conversão da biomassa lignocelulósica passa necessariamente pela utilização eficaz dos três componentes (MENON e RAO, 2012).

A celulose, principal componente do material vegetal e o carboidrato mais abundante na natureza, é um homopolissacarídeo de cadeia longa e linear, formada por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (KLINKE et al., 2004; RIANO et al., 2010). A degradação da celulose é um passo essencial no processo de mineralização do carbono e produz celobiose (dímero de glicose) ou glicose livre por meio da ação de diferentes enzimas. A celulose estabelece uma estreita relação com os outros constituintes estruturais da biomassa vegetal, além da conformação característica que faz com que tal polímero seja altamente resistente à hidrólise (PEREZ et al., 2002; KLINKE et al., 2004; NIGA et al., 2011).

A hemicelulose é o segundo maior constituinte da lignocelulose, e o segundo maior polissacarídeo encontrado na natureza. É um complexo heteropolímero constituído por unidades monossacarídicas como hexoses (D-glicose e D-manose) e pentoses (D-xilose e L-arabinose) (VAN MARIS et al. 2006; RIANO et al., 2010). A xilana, principal componente da hemicelulose, é composta primariamente por unidades de D-xilose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas, e acredita-se que seja importante para a coesão das fibras e para a integridade da parede celular (BEG et al., 2001). Outros componentes da hemicelulose podem ser relatados, como xiloglucana, heteropolímero de D-xilose e D-glicose, e arabinogalactana, heteropolímero de D-galactose e L-arabinose (HAMELINCK et al., 2005). A composição da hemicelulose é dependente do tipo vegetal, podendo a quantidade de cada componente variar de espécie para espécie de planta, e até mesmo entre espécimes. Portanto, a hemicelulose não é um composto quimicamente bem definido, mas uma classe de polímeros que apresenta propriedades particulares. Devido à natureza amorfa e ramificada desse polímero, ao contrário da celulose, a hemicelulose é facilmente hidrolisada aos seus monossacarídeos constituintes (ARISTIDOU e PENTTILA, 2000; ZALDIVAR et al., 2001; PEREZ et al., 2002; HAMELINCK, 2005). Vários resíduos agrícolas, como palha de milho, trigo, arroz e bagaço de cana-de-açúcar contêm cerca de 20 a 40 % de hemicelulose em sua composição.

A biomassa vegetal é ainda composta por lignina, importante composto encontrado em associação com celulose e hemicelulose. A lignina constitui cerca de 20-30% do peso seco da biomassa e representa uma complexa classe de polímeros ricos em anéis aromáticos que contêm resíduos fenólicos. A lignina se comporta como

uma rede tridimensional insolúvel, onde desempenha um papel importante na resistência e desenvolvimento da célula, afetando o transporte de água, nutrientes e metabólitos na célula vegetal. Este composto está presente em diferentes proporções e regiões das plantas, sendo o componente que interfere diretamente na eficiência do processo de hidrólise (MENON e RAO, 2012). A molécula atua como ligante entre as células, criando um material que tem uma notável resistência ao impacto, compressão e flexão (HARMSEN et al., 2009). Além disso, é degradada muito lentamente, em decorrência da estrutura, rica em ligações éter e C-C dispostas irregularmente, o que a torna extremamente resistente ao ataque enzimático. O polímero confere maior solidez e resistência à parede celular vegetal e apesar da lignina não contribuir como fonte de carbono fermentável, ela é relevante como fonte de inibidores do metabolismo microbiano que podem estar presentes durante o processo de fermentação (GRAY et al., 2006).

2.1.2 – Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

A utilização eficaz dos três componentes da biomassa tem um papel importante para viabilidade econômica do processamento da lignocelulose e geração de subprodutos (MENNON e RAO, 2012). Para a realização dos bioprocessos, os materiais lignocelulósicos precisam ser inicialmente submetidos a tratamentos específicos para que então, o hidrolisado obtido possa ser utilizado como fonte de açúcares fermentáveis (SILVA et al., 2007). A proposta dos pré-tratamentos é remover a lignina e a hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade destes materiais (NIGA et al., 2011).

Cada variedade de material lignocelulósico requer um tipo particular de pré-tratamento, no sentido de maximizar a produção dos açúcares (GALBE e ZACCHI, 2002). Se os dois principais polímeros de carboidratos forem eficientemente tratados, a hemicelulose pode ser completamente hidrolisada a xilose (cerca de 50-70% p/p) e arabinose (5-15% p/p) e a celulose a glicose (CAO et al., 1995). Hidrolisados de diferentes materiais vegetais têm sido produzidos, apresentando composição de açúcares também diferenciada, como mostrado na tabela 1.

Dentre as técnicas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos, destacam-se como métodos mais estudados no processo de obtenção de etanol e químicos a partir da biomassa vegetal a utilização de ácidos, explosão a vapor e o tratamento hidrotérmico (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). O tratamento termoquímico de explosão de fibras com ácido oxálico (OAFEX) também

tem sido empregado e é considerado promissor (CHANDEL et al., 2013). Particularmente, para o bagaço de cana-de-açúcar, os métodos já investigados incluem tratamentos com ácidos, álcalis, explosão a vapor, solventes orgânicos, explosão de fibras com amônia ou ácido oxálico e o tratamento biológico (CARDONA et al., 2010; CHANDEL et al., 2013). Os processos de hidrólise ácida que utilizam ácidos fortes como H_2SO_4 e HCL são realizados para separar as frações hemicelulósicas dos materiais lignocelulósicos. A catálise ácida pode utilizar ácidos concentrados e baixas temperaturas ou ácidos diluídos e altas temperaturas (GÍRIO et al., 2010).

Tabela 1: Composição de açúcares encontradas em diferentes matérias-primas.

Matéria-prima	Açúcares (g l ⁻¹)			Referências
	Xilose	Glicose	Arabinose	
<i>Bagaço de cana</i>	46	1,8	2,5	Silva et al. (2007)
<i>Palha de trigo</i>	10,65	2,79	1,78	Canilha et al. (2003)
<i>Palha de arroz</i>	18,33	3,29	3,40	Mussato e Roberto, (2003)
<i>Aveia</i>	32,33	1,61	3,03	Felipe et al. (2003)
<i>Madeira de eucalipto</i>	19,17	2,54	0,41	Canettieri et al. (2002)

Embora tais ácidos sejam tóxicos e corrosivos, estes são eficientemente empregados, mas precisam ser recuperados ou neutralizados no fim do processo (SUN e CHENG, 2002). Em combinação com pH, temperatura e tempo de reação, a hidrólise ácida da hemicelulose pode resultar em alta produtividade de açúcares, primariamente xilose (ELANDER e HSU, 2008). De fato, a utilização do ácido sulfúrico como catalisador em reações de produção de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana tem sido empregada em muitos trabalhos (ROBERTO et al., 1991; PESSOA JR et al., 1997; RAO et al., 2006; SILVA et al., 2007; YU e STAHL, 2008; CHENG et al., 2008, CARDONA et al., 2010). Entretanto, esse tipo de pré-tratamento apresenta

desvantagens: exige custos ainda elevados, favorece a formação de derivados de furano e outros produtos tóxicos e ainda necessita de uma etapa adicional para a concentração do hidrolisado (CARDONA et al., 2010).

O processo hidrotérmico tem sido considerado como um dos métodos mais promissores de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos. Essa metodologia consiste na utilização da água sob alta temperatura e pressão (geralmente entre 180 °C a 240 °C). A água sob elevada pressão pode penetrar na estrutura celular da biomassa, hidratar a celulose e remover a hemicelulose. Assim como no pré-tratamento hidrotérmico, a explosão a vapor se dá sob altas condições de temperatura e pressão, com o objetivo de hidrolisar a hemicelulose (ALLEN et al., 2001). Petersen et al. (2009) relataram a recuperação de aproximadamente 70% de hemicelulose, realizando o pré-tratamento hidrotérmico de palha de trigo.

De acordo com o método de pré-tratamento empregado, a fase líquida da hidrólise será constituída por açúcares e produtos da decomposição da hemicelulose e da lignina. Assim, em hidrolisados hemicelulósicos alguns produtos gerados pelo tratamento da lignocelulose podem estar presentes como ácidos orgânicos de baixo peso molecular, derivados de furano e compostos inorgânicos e fenólicos. Estes são potenciais inibidores da ação microbológica e podem interferir diretamente com a fermentação do hidrolisado (DOMINGUEZ et al., 1996). Dessa forma, após o pré-tratamento da hemicelulose, é necessária uma etapa de detoxificação, onde diferentes processos físico-químicos e também biológicos podem ser utilizados (PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL, 2000). A técnica de *overliming* é o tratamento de detoxificação mais amplamente utilizado (OLSSON e HAHN-HAGERDAL, 1996). A técnica consiste na remoção do ácido sulfúrico pela adição de hidróxido de cálcio (ou outro hidróxido), resultando em um ajuste do pH. Essa condição permite a formação do sulfato de cálcio, capaz de precipitar compostos ácidos e fenólicos, íons de metais pesados, bem como converter furfural em ácido furfúrico (ROBERTO et al., 1994).

2.2 - Utilização da biomassa lignocelulósica

2.2.1 - Indústria do etanol combustível

O panorama energético mundial atual é predominantemente dependente da indústria petroquímica. A crescente taxa de prospecção e exploração das reservas de

petróleo garantiu, por um longo tempo, uma matéria-prima abundante e barata para a geração de produtos químicos, bem como de combustíveis para transporte. Ainda hoje o petróleo apresenta-se como principal fonte de energia mantenedora do desenvolvimento industrial, no entanto, vários fatores têm contribuído para a necessidade urgente do desenvolvimento de fontes de energia que sejam alternativas a esta economia dependente de recursos fósseis (VAN MARIS et al., 2006). A dependência cada vez maior de energia, a possibilidade do esgotamento das reservas fósseis e um sentimento ecológico cada vez mais forte, fundamentado nos impactos ambientais observados atualmente, compreendem fatores que instigam a procura e o desenvolvimento de fontes de energia alternativas (CLARK et al., 2012). Diferentemente da utilização de combustíveis fósseis, a energia renovável é vista como solução em longo prazo para tais problemas. Alguns levantamentos demonstram que apenas 2,2% da energia consumida no mundo são provenientes de fontes renováveis, o que evidencia um extraordinário potencial para a exploração de outras fontes (PESSUTI, 2003). Neste contexto, a produção dos biocombustíveis surge como alternativa promissora, pois se baseia na utilização de fontes naturais renováveis e não contribui diretamente para efeitos ambientais indesejáveis (HAHN HAGERDAL et al., 2006).

O etanol é o biocombustível atualmente mais empregado e difundido no mundo, representando cerca de 80% do mercado de biocombustíveis (CLARK et al., 2012). Este biocombustível tem sido apontado como a melhor opção energética para a substituição ou diminuição do uso de combustíveis fósseis. No início da década de 1920, o etanol foi introduzido no Brasil, Estados Unidos e em alguns países da Europa, que utilizam como matéria-prima diferentes produtos agrícolas (HAHN HAGERDAL et al., 2006). Os Estados Unidos destacam-se como principal produtor mundial de etanol, utilizando o amido de milho como matéria-prima. O Brasil figura como o segundo maior produtor de etanol do mundo, utilizando a sacarose da cana-de-açúcar como matéria-prima, e é o principal exportador deste produto atualmente (BALAT e BALAT, 2009). Estima-se que esta produção possa aumentar em 90% na próxima década, em função da necessidade de atender a crescente demanda interna por combustíveis com maior mistura de etanol (PORTAL NOVACANA.COM, 2013). Juntos, Brasil e EUA apresentam-se como responsáveis por cerca de 90% da produção mundial de etanol (THOMSEN e HAUGAARD-NIELSEN, 2008).

Sob diversos pontos de vista o etanol brasileiro de cana-de-açúcar representa atualmente a melhor e mais avançada opção existente no mundo para produção de

biocombustíveis em larga escala (WORLDWATCH INSTITUT, 2008). No entanto, a demanda internacional pelo etanol tem aumentado muito nos últimos anos e poderá aumentar ainda mais, visto a necessidade crescente do produto. Estima-se que as matérias-primas atualmente utilizadas para a produção do etanol não serão suficientes para sustentar elevados níveis de produção (SHEN et al., 2011). Esta maior demanda, deverá ser, portanto acompanhada por avanços tecnológicos na produção, caso contrário, o preço do produto aumentaria significativamente. É importante que o incremento na produção das matérias-primas não envolva aumento e/ou desvio da área plantada em detrimento de outras lavouras, e respeite biomas ecologicamente frágeis (CONAB, 2009; SHEN et al., 2011). Entretanto, práticas agrícolas monoculturais em grandes extensões de terra têm sido verificado em regiões do Brasil que se especializaram na produção de cana-de-açúcar (GUEDES et al., 2006). A utilização de culturas alimentares como matérias-primas para a fabricação de etanol pode gerar um grande problema (PORZIO et al., 2011). Tal modelo agrícola baseado na monocultura para produção e exportação de cana e álcool se contrapõe às propostas de políticas que garantam soberania alimentar e deve ser revisto (CONAB, 2009). Tendo em vista esse panorama, aplicações de práticas agrícolas e industriais que se baseiam em sustentabilidade ambiental merecem atenção especial. Nesse sentido, novas tecnologias de produção dos biocombustíveis precisam ser implementadas, de modo a melhor se aproveitar o potencial dos países produtores, bem como das matérias-primas utilizadas, a fim de se reduzir a concorrência com áreas destinadas à produção de alimentos.

2.2.1.1 – Etanol de segunda geração

O termo biocombustível se refere a combustíveis líquidos ou gasosos primariamente aplicados no setor de transportes (REIJNDERS, 2006). A produção dos biocombustíveis se dá por meio da conversão das moléculas de carboidratos armazenados em forma de biomassa vegetal na matéria-prima utilizada. Essas moléculas são oriundas do processo fotossintético e podem ser convertidas em processos fermentativos (LOVETT, 2007). Por denominação, de maneira geral, os biocombustíveis derivados de produtos da agricultura alimentícia, são conhecidos como biocombustíveis de primeira geração. Os biocombustíveis produzidos pela utilização de culturas de lignocelulose que não são voltadas para a produção de alimentos são denominados biocombustíveis de segunda geração (TAYLOR, 2008; TAN et al., 2008; WOHLBACH et al., 2011). Para que a produção de etanol combustível se consolide como forma sustentável, é desejável o uso de substratos

mais baratos e mais abundantes (CARDONA et al., 2010; CLARK et al., 2012). O caminho para se reduzir o custo das matérias-primas é alterar o uso das culturas tradicionais baseadas em sacarídeos e amidos para o uso da biomassa lignocelulósica, por meio da implementação da tecnologia de produção de etanol de segunda geração (TAN et al., 2008; CLARK et al., 2012). Por meio da utilização de biomassa lignocelulósica não haveria necessidade de uma intensificação na produção agrícola como têm ocorrido para a produção do etanol de primeira geração (LOVETT, 2007; TAN et al., 2008). A lignocelulose é considerada um substrato atrativo para expandir a produção renovável e sustentável do bioetanol devido à sua disponibilidade em grandes quantidades a baixo custo (CARDONA e SÁNCHEZ, 2007; CLARK et al., 2012; PREMJET et al., 2013).

O desenvolvimento e a produção em larga escala do etanol lignocelulósico tem se pautado em numerosos estudos realizados em todo o mundo. Os principais programas de pesquisa e aplicação estão sendo conduzidos nos Estados Unidos e na Europa, basicamente em escalas experimentais de produção. Porém, o bioetanol de segunda geração pode se transformar em um biocombustível passível de ser produzido em quase todas as regiões do mundo, dada a alta disponibilidade de resíduos orgânicos gerados atualmente. Praticamente todos os resíduos de biomassa, produzidos nas atividades agrícolas e industriais, e mesmo o lixo urbano, apresentam elevados teores de materiais lignocelulósicos (MACEDO et al., 2008). Entretanto, o principal fator limitante é o elevado grau de complexidade inerente ao processamento da matéria-prima, tendo em vista a natureza e a composição da biomassa lignocelulósica. O processo de degradação dessa biomassa ainda não está completamente desenvolvido e demanda muitos gastos energéticos e financeiros para a consolidação (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008). Para a produção do etanol, os açúcares fermentáveis podem ser encontrados em forma de mono ou dissacarídeos (glicose, frutose e sacarose), amido ou carboidratos estruturais que compõe a biomassa lignocelulósica.

Os mono ou dissacarídeos podem ser convertidos diretamente em etanol; amidos (milho, mandioca, batata e raízes) devem primeiro ser hidrolisados. A lignocelulose (madeira, resíduos agrícolas, resíduos da indústria de papel), também deve ser primeiramente convertida a açúcares fermentáveis, que podem ser então convertidos por alguns grupos de micro-organismos. Particularmente, a conversão microbiana de pentoses tem sido identificada como o principal desafio para a tecnologia do etanol de segunda geração (FROMANGER et al., 2010).

Comumente, em fermentações etanólicas industriais, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o micro-organismo mais utilizado, e pode ser empregada na etapa de fermentação do hidrolisado celulósico, rico em monômeros de glicose, durante a produção de etanol. Em contrapartida, esta levedura não pode ser utilizada para a fermentação de hidrolisados hemicelulósicos devido à presença nestes, de pentoses, açúcares que não são fermentados por *S. cerevisiae* (KUMAR et al., 2009). No entanto, a conversão custo-efetiva, sustentável e economicamente eficiente da biomassa a etanol implica na utilização de linhagens microbianas capazes de fermentar todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos, com alto rendimento e produtividade em etanol (van MARIS et al., 2006; HAHN-HAGERDAL et al., 2007; BETTIGA et al., 2008; FUKUDA et al., 2009; FERREIRA et al., 2011).

Para a produção biotecnológica de etanol de segunda geração, alguns processos já estão consolidados. De uma maneira geral, a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos inclui quatro etapas principais: o pré-tratamento ou pré-hidrólise da biomassa lignocelulósica, a hidrólise da celulose e hemicelulose, a detoxificação do hidrolisado e a fermentação de hexoses e/ou pentoses (CARDONA et al., 2010).

No processo designado como hidrólise e fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation* - SHF), tem-se a hidrólise da celulose e a fermentação das hexoses liberadas a partir desse polissacarídeo ocorrendo separadamente, em unidades diferentes. Nesta etapa de fermentação, utilizam-se linhagens de *S. cerevisiae* (SÁNCHEZ e CARDONA, 2008; GÍRIO et al., 2010). Quando, além da fração de hexoses, a fração de pentoses obtida pela hidrólise de hemicelulose é também submetida à fermentação, a configuração é designada hidrólise e co-fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Co-fermentation* - SHCF) sendo as fermentações realizadas independentemente. A fermentação das pentoses se dá em uma unidade independente devido à necessidade do emprego de micro-organismos específicos, capazes de fermentar pentoses, comportamento este que não é exibido por linhagens indígenas de *S. cerevisiae*. O uso de micro-organismos geneticamente modificados, como linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de fermentar tanto hexoses quanto pentoses pode ser interessante para este processo, visto que a co-fermentação representa uma opção tecnológica ideal para uso de todos os açúcares liberados durante o pré-tratamento da biomassa. Desta forma, não haveria a necessidade de unidades independentes, já que a fermentação seria conduzida em uma única etapa (CARDONA et al., 2010; GÍRIO et

al., 2010). Quando a hidrólise da celulose e a fermentação se dão simultaneamente, numa única etapa, o processo é denominado de sacarificação e fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Fermentation* - SSF). Esse processo pode também incluir a co-fermentação das hexoses e pentoses, sendo chamado de sacarificação e co-fermentação simultâneas (*Simultaneous Saccharification and Co-fermentation* - SSCF). As enzimas necessárias à quebra das frações oligoméricas e das ligações monoméricas dos polissacarídeos podem ser produzidas também durante o processo, em uma via de produção enzimática, que torna desnecessária a adição de enzimas exógenas (comerciais ou não). Neste caso, a hidrólise e a fermentação dos açúcares são realizadas em uma única etapa, e o processo é denominado bioprocessamento consolidado (CBP) (GÍRIO et al., 2010).

A produção de etanol combustível a partir das frações hemicelulósicas é essencial para o sucesso econômico do etanol lignocelulósico, e deve ser realizada juntamente com a produção a partir da fração celulósica (GÍRIO et al., 2010). Entretanto, a conversão da hemicelulose representa um grande desafio a ser vencido, em função da própria composição dessa fração (incluindo açúcares D-xilose, L-arabinose, D-galactose, D-glicose e D-manose) e, portanto da necessidade de se utilizar linhagens de leveduras aptas a converter tais açúcares. Geralmente, a D-xilose é o principal açúcar hemicelulósico, e sua bioconversão torna-se um importante pré-requisito para o uso de materiais lignocelulósicos para a obtenção do etanol de segunda geração (SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2010; ROCHA et al., 2011). Particularmente, visto que a fermentação de D-xilose representa um desafio único, durante as últimas décadas, pesquisas têm sido focadas na descoberta e no estudo de micro-organismos fermentadores de xilose (HAHN-HAGERDAL et al., 2007; AGBOGBO et al., 2008).

2.2.2 - Xilitol

O xilitol, produto intermediário no metabolismo de leveduras fermentadoras de D-xilose, é um poliálcool cuja fórmula química é $C_5H_{12}O_5$, e que tem ligado em cada átomo de carbono de sua molécula um grupo hidroxila, formado por um átomo de oxigênio e um de hidrogênio. Este poliálcool apresenta-se como um pó branco, inodoro, de sabor doce, podendo ser encontrado em líquens, fungos, algas e vegetais, sendo também um intermediário do metabolismo de carboidratos no homem. Entretanto, na natureza, o xilitol pode ser obtido em pequenas concentrações, geralmente inferiores a 900 mg / 100g, o que torna sua extração um processo economicamente inviável (LIMA & BERLINCK, 2003). O xilitol foi sintetizado em laboratório pela primeira vez em

1891, pelo químico alemão Emil Fisher e com o passar do tempo, começou a ganhar destaque por possuir interessantes propriedades físico-químicas e fisiológicas. O uso do xilitol em produtos industrializados já foi aprovado em mais de 40 países e atualmente tem sido empregado nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos, odontológica e médica (FREITAS, 2003).

O xilitol começou a ser comercializado em 1960, sendo introduzido na dieta de diabéticos, quando sua utilização foi autorizada pela *Food and Drug Administration* (FDA), sendo incluída no grupo dos substitutos do açúcar em 1963 (ARAÚJO, 2007). Este poliol passou também a substituir a sacarose como conservantes de produtos alimentícios. Em virtude de sua elevada estabilidade química, o xilitol oferece resistência ao crescimento de micro-organismos, prolongando a vida de prateleira desses 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, reações estas que provocam diminuição no valor nutricional das proteínas. Dessa forma, o xilitol pode ser utilizado em produtos cujas reações de “Maillard” são indesejáveis, como em alimentos (MANZ et al., 1973).

Este poliol tem sido utilizado também na formulação de produtos destinados à higienização oral, em função de seu sabor refrescante, sobretudo por sua ação anticariogênica. Esta propriedade anticariogênica, é determinada principalmente pela não-fermentabilidade deste poliol por bactérias do gênero *Streptococcus*. As bactérias pertencentes a esse gênero são altamente cariogênicas e desencadeiam um processo infeccioso, resultando nas cáries dentárias. A utilização do xilitol em composições odontológicas limita então a proliferação destes micro-organismos na microbiota oral. Outro benefício para a saúde bucal é que o sabor agradável do xilitol estimula a salivação, e uma maior salivação produz aumento dos minerais presentes nela, promovendo uma melhor remineralização dos dentes e reversão dos casos de cáries em estágio inicial. O aumento da salivação promove também o aumento de pH e de enzimas que possuem ação bacteriostática (MUSSATO & ROBERTO, 2002).

Os benefícios do uso do xilitol podem se estender além da odontologia. Mattila et al. (1998) estudando ratas alimentadas com ração suplementada com 10 a 20% de xilitol constataram um aumento da massa óssea dos animais estudados. Os autores afirmaram que o xilitol estimula a absorção de cálcio pelo intestino, facilitando a passagem deste mineral do sangue para os ossos. Dessa forma, esse poliol poderia ser utilizado preventivamente ou no tratamento de casos de osteoporose em pessoas

de meia-idade, que receberiam doses diárias de xilitol por meio de suplementação alimentar. Além disso, o xilitol tem sido indicado para o tratamento de diabetes. Diferentemente dos açúcares convencionais, o metabolismo do xilitol é independente de insulina. De fato, nenhuma das principais vias de absorção do xilitol é mediada pela insulina, ocorrendo no fígado e na microbiota intestinal. Dessa forma ele pode ser utilizado clinicamente na dieta de pacientes portadores de *Diabetes Mellitus* Tipo I ou Tipo II, sem aumentar os níveis de glicemia no sangue desses pacientes (MUSSATO & ROBERTO, 2002). No Brasil, o xilitol está na fase de introdução e é aprovado como produto dietético pela ANVISA. Atualmente, o principal fabricante de xilitol no mundo é a empresa Danisco, da Dinamarca, seguida de empresas chinesas (FRANCESCHIN et al., 2011).

A produção industrial do xilitol se dá por hidrogenação catalítica sob condições de alta temperatura e pressão de soluções ricas em D-xilose, oriundas de biomassa lignocelulósica hidrolisada. Este é um processo oneroso, em função das várias e complexas etapas requeridas para a purificação do hidrolisado. Isso por que apenas D-xilose pura pode ser utilizada no processo de redução química (GRANSTROM et al., 2007). O hidrolisado hemicelulósico é purificado por exclusão de íons e por fracionamento cromatográfico para se obter uma solução concentrada de xilose. A solução é hidrogenada utilizando níquel como catalisador, e o xilitol é recuperado também por fracionamento cromatográfico utilizando resinas de troca iônica. Posteriormente são necessárias várias etapas para remoção do catalisador metálico, que é tóxico para os humanos. Na etapa seguinte, a solução de xilitol é concentrada, fracionada por cromatografia e cristalizada para obtenção do produto puro (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977).

Outra forma de produção de xilitol que tem sido muito pesquisada é a que se baseia na utilização de micro-organismos para a conversão de D-xilose a xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico. A conversão biotecnológica de soluções contendo xilose por bactérias, fungos filamentosos, leveduras ou enzimas purificadas capazes de reduzir a D-xilose em xilitol é uma alternativa promissora ao método convencional. A bioconversão da xilose a xilitol pode reduzir os custos do processo, já que não seria necessária a utilização de soluções puras de D-xilose e diferentes materiais contendo xilose poderiam ser utilizados como substrato (PRAKASHAM et al., 2009; CHANDEL et al., 2011). A produção biotecnológica de xilitol tem sido estudada por anos, e dentre os micro-organismos estudados, as leveduras são reconhecidas como as melhores produtoras de xilitol. Muitos estudos objetivando avaliar a eficiência de diferentes

espécies de leveduras na conversão de xilose em xilitol têm sido desenvolvidos (PREZIOZI-BELLOY et al., 1997; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998; MUSSATO e ROBERTO, 2004; RAO et al., 2006; SILVA et al., 2007; MISRA et al., 2011; ARRIZON et al., 2011; MISRA et al., 2012; BURNEO, 2013; PAL et al., 2013).

Para o estabelecimento de processos efetivos de produção biotecnológica de xilitol, fatores como pH, concentração inicial de xilose, temperatura, presença de compostos tóxicos no hidrolisado, devem ser levados em consideração (RODRIGES et al., 2003; FELIPE et al., 1997; FELIPE, 2004). O coeficiente volumérico de transferência de oxigênio ($K_L a$) é também um dos fatores mais importantes, uma vez que a variação acima ou abaixo de um valor ótimo leva a uma diminuição significativa do fator de conversão e/ou da produtividade em xilitol (BRANCO et al., 2009). Arelado ao estabelecimento ideal desses fatores, a recuperação do xilitol (purificação e cristalização) pode ser considerado o passo mais complexo de todo o processo fermentativo, devido à baixa concentração e complexa composição do caldo fermentado (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977; de FAVEREI et al., 2004). As técnicas atualmente empregadas baseiam-se na utilização de membranas para cristalização ou a extração com fluidos supercríticos. No trabalho realizado por Affleck (2000), a utilização de técnicas de separação de xilitol utilizando diferentes tipos de membranas permitiu cristalizar mais de 87% deste produto, a partir da fermentação de hidrolisado de palha de milho por *C. tropicalis*. Já Canilha (2006), recuperou cristais de xilitol com 92-94% de pureza, a partir da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. A técnica com fluidos supercríticos utiliza CO₂ como solvente e etanol como co-solvente. Este é um procedimento que tem mostrado grande potencial para extração e purificação de compostos orgânicos. O fluido supercrítico apresenta propriedades físico-químicas intermediárias entre líquido e gás. A densidade próxima à dos líquidos aumenta o poder de solvente e a baixa viscosidade acelera a transferência de massa, permitindo a fácil solubilização do xilitol, tornando-se um processo rápido e eficiente para exclusão da xilose e retenção do xilitol. (TRESINARI et al., 2011).

Além do estabelecimento de técnicas de produção e purificação do xilitol, a viabilização da produção biotecnológica deste, em nível industrial, está atrelada a uma etapa de bioconversão que ofereça rendimento elevado. Sendo assim, devem ser empregados micro-organismos hábeis na conversão da xilose a partir dos hidrolisados e devem ser obtidos resultados comparáveis aos da tecnologia atual.

2.2.3 – Fermentação de D-xilose para produção de etanol e xilitol

Durante as etapas de conversão da lignocelulose, os micro-organismos estão previstos para contribuir com os principais eventos fundamentais neste processo, como a fermentação de hexoses e de pentoses (GÍRIO et al., 2010). Tais açúcares, então disponibilizados, precisam ser fermentados por micro-organismos que apresentem tal habilidade (KLINKE et. al., 2002). Os açúcares provenientes da degradação da hemicelulose compõe uma mistura de hexoses (principalmente glicose) e pentoses (principalmente xilose) de acordo com o substrato analisado (GRAY et al., 2006). Dependendo do tipo de matéria-prima, o pré-tratamento utilizado e as condições das reações, pode ser recuperado de 80-95% das pentoses presentes na biomassa (FROMANGER et al., 2010).

Um importante fator para a geração de produtos a partir de matéria-prima lignocelulósica está relacionado à necessidade de se obter um alto rendimento, com eficiente taxa de fermentação da biomassa, para que o processo seja economicamente competitivo. Para tanto, é necessário que todos os substratos sejam utilizados completamente. Isto significa que todos os tipos de açúcares devam ser convertidos e que os micro-organismos envolvidos sejam eficientemente capazes de se adaptar às condições de produção industrial (DELGENES et. al., 1996; HAHN-HAGERDAL et al., 2006; van MARIS et al., 2006). As linhagens devem apresentar eficiente utilização das pentoses, alta produtividade, rápidas taxas de fermentação, viabilidade em baixos pH e altas temperaturas. Além disso, devem apresentar tolerância à ação de compostos inibitórios de crescimento que são produzidos a partir da hidrólise da biomassa lignocelulósica, e aos elevados níveis de etanol produzidos durante a fermentação (KLINKE et al. 2004, PASHA et al., 2007).

No que diz respeito a produção de bioetanol, a fermentação da biomassa lignocelulósica é mais complexa em relação à fermentação convencional, como da produção de etanol de primeira geração. Nesta, a produção de etanol é realizada pela fermentação de mono e dissacarídeos presentes na matéria-prima que são prontamente assimiláveis por linhagens de *S. cerevisiae* adaptadas ao processo industrial. Entretanto, *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar e fermentar as pentoses provenientes da hidrólise da hemicelulose (van MARIS et al., 2006). Dessa forma vários trabalhos têm sido voltados tanto para a seleção de linhagens indígenas hábeis na fermentação de pentoses, ou que sejam fonte de genes que possam ser utilizados para alterações nas vias metabólicas de *S. cerevisiae* por engenharia genética para a “construção” de leveduras que sejam capazes de fermentar esses açúcares (HAHN-

HAGERDAL, 2001; JEFFRIES & JIN, 2004; van MARIS et al., 2006, STAMBUK et al., 2008; ALPER & STEPHANOPOULOS, 2009; CADETE et al., 2009; CADETE et al., 2012a; KIM et al., 2012; LEE et al., 2012; CADETE et al., 2013; MORAIS et al., 2013).

Em relação à bioconversão de xilose a xilitol, a levedura *C. tropicalis* é preferencialmente utilizada e já foram estabelecidos parâmetros para a utilização desta, como concentração e idade do inóculo (FELIPE et al., 1997), pH (RODRIGUES et al., 2003), temperatura, concentração inicial de xilose (FELIPE et al., 1997), coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (SILVA, 1998; BRANCO et al., 2009), dentre outros. Além disso, trabalhos objetivando a seleção de linhagens ou espécies de leveduras naturalmente fermentadoras de pentoses com produção de xilitol têm sido desenvolvidos. Esses trabalhos visam a seleção de linhagens mais bem adaptadas às condições de fermentação (MISRA et al., 2011; ARRIZON et al., 2012; BURNEO, 2013).

A conversão microbiana de D-xilose tem sido identificada como o principal desafio para a geração tecnológica de produtos como o etanol ou xilitol, em função das leveduras utilizadas em processos de fermentações comerciais não serem capazes de fermentar essa pentose (AGUILAR et al., 2002; FROMANGER et al., 2010). Tal fato, contudo, não é uma característica geral observada dentre as leveduras. Diferentes espécies de leveduras, descritas como produtoras de etanol a partir de D-xilose têm sido isoladas de vários habitats, tais como exudatos de árvores (NIGAM et al., 1985), insetos habitantes de madeira (TOIVOLA et al., 1984; SUH et al., 2003), madeira em decomposição (TOIVOLA et al., 1984; CADETE et al., 2009; URBINA e BLACKWELL, 2012; CADETE et al., 2012a; CADETE et al., 2013; MORAIS et al., 2013b), frutas em decomposição e cascas de árvores (RAO et al., 2008). Os micro-organismos naturalmente fermentadores de D-xilose incluem linhagens pertencentes às espécies *Scheffersomyces stipitis*, *S. shehatae*, *S. lignosa*, *S. insectosa*, *C. tenuis* e *Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO et al., 2008; FERREIRA et al., 2011; WOHLBACH et al., 2011), *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN et al., 2006; CADETE et al., 2012a,), *S. arborariae* (CADETE et al., 2009; CUNHA-PEREIRA et al., 2011), *Candida tropicalis* (SANCHEZ et al., 2008) e *Kluveromyces marxianus* (ABDEL-BANAT et al., 2010). Recentemente, novas espécies de leveduras foram descritas como naturais fermentadoras de xilose, são elas: *Scheffersomyces illinoensis*, *S. quercinus*, *S. virginianus* (URBINA e BLACKWELL, 2012), *S. amazonensis* (CADETE et al., 2012b), *Sugiyamaella xylanicola* e *Sugiyamaella* sp.

(MORAIS et al., 2013b), *Spathaspora brasiliensis*, *Spathaspora suhii*, *Spathaspora roraimanensis* e *Spathaspora xylofermentans* (CADETE et al., 2013).

Observadas as características desejáveis, linhagens das leveduras *S. shehatae*, *P. tannophilus*, *S. stipitis* e *S. passalidarum* são consideradas as melhores leveduras naturalmente fermentadoras de xilose, embora apresentem baixa tolerância ao etanol, não sendo assim, adequadas à produção de bioetanol em larga escala (DU PREEZ et al., 1986; AGBOGBO et al., 2008; HOU, 2012). No trabalho realizado por Cadete et al. (2012a), os autores verificaram que linhagens de *S. passalidarum* mostraram melhor potencial para produção de etanol a partir de xilose, em função das altas concentrações de etanol produzidas, em curto período de tempo. Esses dados corroboram com o fato de que espécies naturalmente fermentadoras de xilose possam ser isoladas para serem diretamente utilizadas em processos fermentativos. Essas leveduras podem também representar uma interessante fonte de genes para o desenvolvimento de organismos modificados geneticamente, de modo a serem utilizados industrialmente na produção de bioetanol (HAHN-HAGERDAL et al., 2007; PASHA et al., 2007; STAMBUK et al., 2008). Organismos geneticamente modificados para fermentação de xilose são representados pela levedura *S. cerevisiae*, e as bactérias *Escherichia coli* e *Zymomonas mobilis* (AGBOGBO, 2008).

Em relação à bioconversão de xilose a xilitol, espécies de leveduras de diferentes gêneros têm sido descritas como produtoras deste poliol. Dentre essas espécies, podem ser citadas: *C. tropicalis* (SILVA e AFSCHEAR, 1994), *C. peltata* (SAHA e BOTHAST, 1999), *Candida boidinii* e *Candida guilliermondii* (PRAKASHAM et al., 2009), *P. tannophilus* (CHANDEL, 2010), *S. arborariae* e *Saccharomyces cerevisiae* (HICKERT et al., 2013), *Debaryomyces hansenii* (MISRA et al., 2012), *Candida amazonensis* (CADETE et al., 2012a), *Candida magnoliae* (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2012), *Lindnera* sp. (BURNEO, 2013) e *S. stipitis* (NEERU et al., 2013). Estudos com organismos geneticamente modificados visando a produção de xilitol, têm sido realizados. Pal et al., 2013 testaram linhagens de *D. hansenii* modificadas quanto a fermentação de xilose e estas foram capazes de produzir xilitol.

Dentre os micro-organismos assimiladores de D-xilose, apenas um pequeno número é capaz de fermentar essa pentose a etanol. Essa dificuldade é intrínseca à via metabólica da xilose. A via metabólica da xilose inicia-se pelo transporte da D-xilose através da membrana celular mediada por transportadores específicos de xilose ou de glicose (figura 1). Após a internalização da xilose, a conversão da pentose a etanol se dá pela ação de três enzimas: D-xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH), e xiluloquinase (XK). XR reduz a xilose a xilitol que é oxidado pela XDH a D-

xilulose. Esta é então fosforilada a D-xilulose 5-fosfato pela XK. A D-xilulose 5-fosfato é metabolizada na via Pentose-Fosfato em etanol (GRANSTROM e LEISOLA, 2002). O co-fator exigido para ação da xilose redutase (XR) que converte xilose a xilitol, é o NADPH, e NAD⁺ é requerido para a atividade da xilitol desidrogenase, que converte xilitol a xilulose. A conversão da xilose em xilulose produz um NADP⁺ e um NADH que precisam ser regenerados a NADPH e a NAD⁺ para restabelecer o balanço redox. O NADPH pode ser obtido pelo desvio de parte da frutose-6-fosfato produzida na etapa oxidativa na via da pentose-fosfato. Já o NADH pode ser re-oxidado, sob condições aeróbicas, via cadeia respiratória com o oxigênio molecular. Entretanto, sob baixas concentrações de oxigênio, ou em condições anaeróbicas, o NADH não pode ser re-oxidado a NAD⁺. Neste caso, outro acceptor de elétrons se faz necessário para re-oxidar o NADH. Se nenhum outro acceptor de elétrons estiver disponível, a célula não obtém o balanço redox, não sendo capaz de fermentar D-xilose a etanol e o acúmulo de xilitol é favorecido (BRUINENBERG et al., 1983; NOLLEAU et al., 1995). Hou (2012) mostrou que *S. passalidarum* foi capaz de fermentar xilose, com produção de etanol, sob condições anaeróbica. A autora considera que exista, para esta levedura, um balanço equilibrado entre a oferta e demanda de cofatores NADH e NAD⁺ para as enzimas XR e XDH, como hipótese para justificar o fato.

Dentro deste contexto, a etapa de fermentação eficiente depende da obtenção de micro-organismos, que possam ser empregados nos processos industriais. Particularmente, a fermentação de D-xilose representa um grande desafio, e a busca por organismos eficientemente aplicáveis tem sido consistente nas últimas décadas (AGBOGBO et al., 2008).

Levando-se em consideração os dados acima expostos, fica claro perceber que, para a utilização racional da biomassa lignocelulósica como matéria-prima, para geração de produtos como etanol de segunda geração ou xilitol, dentro do conceito de biorrefinarias, vários desafios tecnológicos ainda precisam ser vencidos. Torna-se necessário, portanto, o estabelecimento de parâmetros industriais efetivos, muitas das vezes relacionados com as características da biomassa vegetal, mas principalmente com as características metabólicas dos micro-organismos envolvidos nos processos fermentativos.

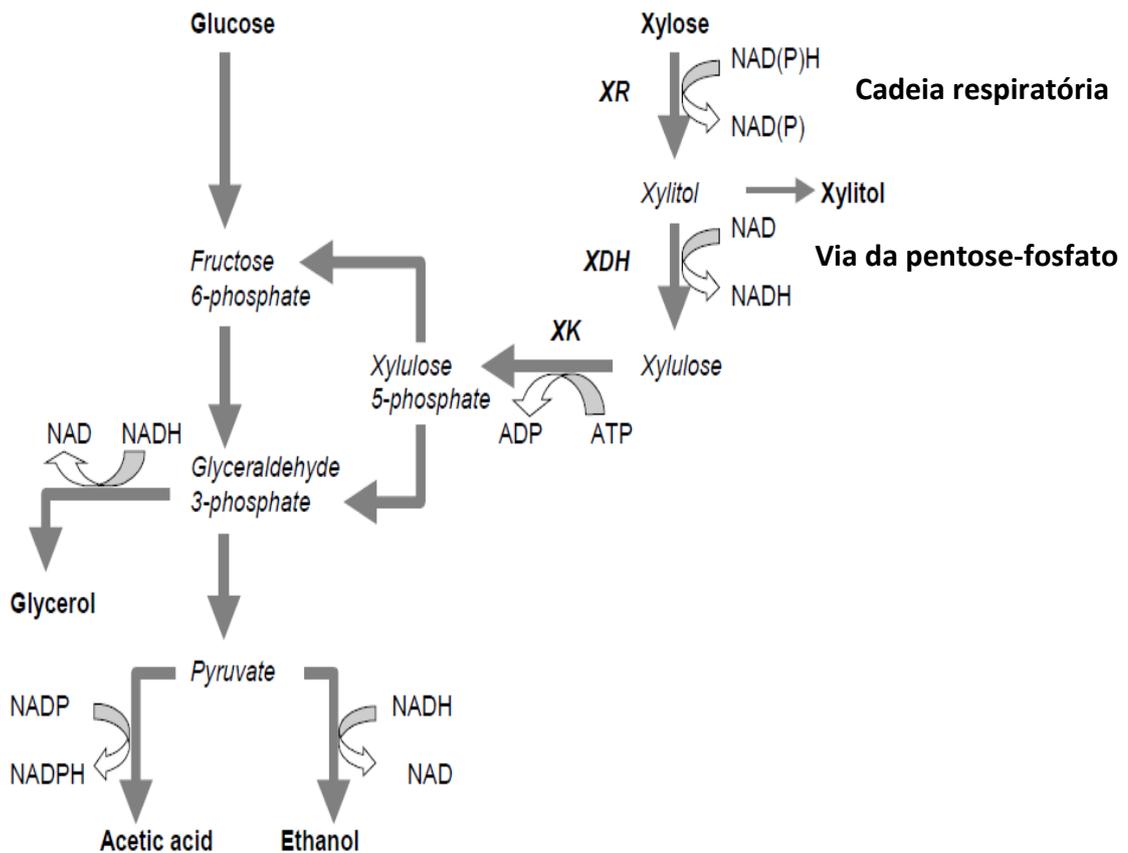


Figura 1: Vias metabólicas da fermentação de glicose e xilose em leveduras. Fonte: adaptada de Granström, 2002.

2.3 – Resíduos da indústria da cana-de-açúcar

2.3.1 – Bagaço de cana-de-açúcar

A história de formação do setor industrial para produção do etanol no Brasil, deu-se em 1975, quando o governo brasileiro criou o Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL), que diversificou a atuação da indústria açucareira com grandes investimentos apoiados pelo Banco Mundial. Esse setor destaca-se atualmente pelo aumento crescente da produção de açúcar e de álcool combustível no País, que pode ser evidenciado pelo aumento crescente no número de usinas. Nos dias atuais, o Brasil figura como maior produtor de cana-de-açúcar no mundo, sendo que a produção de cana-de-açúcar se concentra nas regiões Centro-Sul e Nordeste do Brasil, como mostrado no mapa (figura 2). A lavoura da cana-de-açúcar continua em expansão no Brasil, com progressivo aumento nos estados da região Centro-Oeste,

Sudeste e sul do País. A previsão total do volume de cana moída na safra de 2012/13 é de cerca de 600 milhões de toneladas, com aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12. Estima-se que a quantidade de cana moída será de 36 milhões de toneladas a mais que na safra anterior, volume suficiente para manter os níveis de produção de açúcar e etanol exigidos para consumo interno e exportação (CONAB, 2012).

Em detrimento da enorme produção agrícola de cana-de-açúcar observada no Brasil, muitos resíduos lignocelulósicos oriundos desta atividade são gerados, como uma grande quantidade de fibras na forma de bagaço, palha, e torta de filtros. A torta de filtros prensados ou torta de filtros rotativos, como é geralmente denominada, é acumulada nos filtros rotativos por decantação das partículas sólidas durante o tratamento de clarificação do caldo da cana-de-açúcar, sendo obtida e separada após extração da sacarose residual (SANTOS et al., 2009). Em geral, uma tonelada de cana-de-açúcar gera, em média, 140 quilos de bagaço e 40 quilos de torta de filtros (CENBIO, 2012). Sendo assim, pode-se estimar que somente na safra 2012/13 serão gerados cerca de 84 milhões de toneladas de bagaço de cana e 24 milhões de toneladas de torta de filtros como resíduos, que necessitam da aplicação de estratégias viáveis para a gestão dos mesmos.

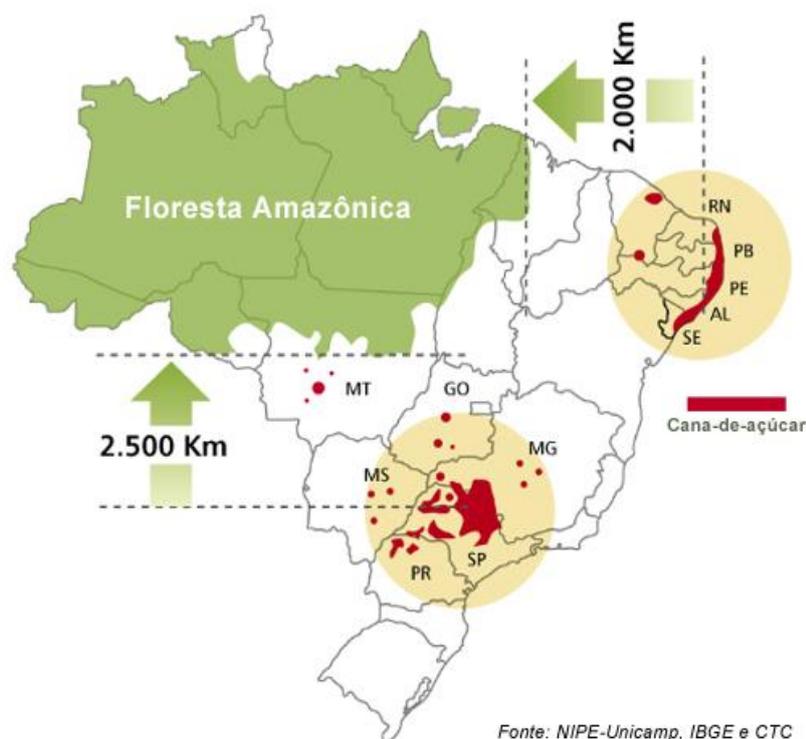


Figura 2: Localização das principais regiões produtoras de cana-de-açúcar no Brasil.

O bagaço da cana-de-açúcar é um dos principais resíduos agrícolas produzidos no mundo, em função da expressiva atividade sulcroatóica observada em países como Índia, Cuba, China, México, Indonésia, Colômbia e em especial no Brasil. Em comparação com outros resíduos agrícolas, o bagaço pode ser considerado um rico reservatório energético, devido ao seu alto rendimento no plantio (cerca de 80 toneladas/hectare em comparação com 1, 2 e 20 t/ha para trigo, outras gramíneas, e árvores, respectivamente), e grande capacidade de regeneração anual (PANDEY et al., 2000).

O bagaço de cana-de-açúcar obtido após a moagem, é um material fibroso que representa cerca de 30% da massa da cana e apresenta umidade em torno de 50% (MACHADO, 2000). O bagaço é primariamente composto de celulose (40-45%), hemiceluloses (30-35%) e lignina (20-30%) apresentando 1-3 % de cinzas (PENG et al., 2009). Devido ao baixo conteúdo de cinzas, quando comparado a de outros resíduos, como palha de arroz e palha de trigo (17,5% e 11% de cinzas, respectivamente) e ao conteúdo relativamente baixo de lignina e alto teor de açúcar, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser visto como uma matéria-prima viável para emprego em processos de bioconversão, oferecendo várias vantagens em comparação às demais matérias-primas agrícolas residuais (PANDEY et al., 2000; CARDONA et al., 2010). O setor sulcroatóico, em variados casos, realiza atividades de reaproveitamento dos resíduos. Um método de reutilização de resíduos inserido neste contexto que está sendo aplicado atualmente é a co-geração de energia por meio da queima do bagaço nas próprias usinas. Entre 60 % e 90 % desse resíduo são utilizados nas usinas como fonte de energia elétrica e desta forma, a queima é vista como um fim economicamente viável. Estima-se que o potencial de geração de energia a partir do bagaço brasileiro, seja equivalente a 25 mil GigaWatts/hora ou cerca de 6% dos GW/h gerados ao ano no País (SIMÕES, 2008). Entretanto, o restante não reutilizado (volume considerável, tendo em vista o montante de bagaço produzido nas safras) é empilhado e estocado, sem outra estratégia de destinação (CANILHA et al., 2010). Devido à importância do bagaço de cana como um substancial resíduo industrial, existe interesse no desenvolvimento de métodos para a produção biológica de produtos que possam oferecer vantagens estratégicas do ponto de vista econômico e ambiental, à destinação deste resíduo. O bagaço pode ser utilizado em bioprocessos que visem a produção industrial de enzimas, etanol, xilitol, ácidos orgânicos, dentre outros químicos (ADSUL et al., 2004; CHANDEL et al., 2011). Em aproximadamente 80 países produtores cana-de-açúcar existe potencial para se fazer melhor uso do bagaço (CARDONA et al., 2010). Para os produtores de cana, grandes benefícios no uso do bagaço podem ser evidenciados, devido à possibilidade da

utilização deste resíduo ser no mesmo local onde ele é produzido, anexada às unidades de produção de açúcar e etanol já em vigor. Isso implicaria em menores investimentos na infra-estrutura, logística e suprimento de energia para esta tecnologia (ROSSEL, 2006; FERREIRA-LEITÃO et al., 2010). De acordo com LEITE (2007), a produção de etanol, por exemplo, por tonelada de cana processada poderá crescer em torno de 50% com a utilização dos resíduos da cana. Dessa forma, uma maior quantidade de etanol pode ser obtida a partir da mesma quantidade de cana processada, fazendo-se uso da tecnologia de produção do etanol de segunda geração. Assim, e regiões agrícolas responsáveis pela produção de cana-de-açúcar poderão ser beneficiadas com a aplicação dessas tecnologias emergentes (CERQUEIRA-LEITE et al., 2009).

2.3.2 – Torta de filtros

Dentre os resíduos gerados na industrialização da cana-de-açúcar para produção de açúcar e álcool no Brasil, destaca-se também a torta de filtros. No Brasil, a importância deste resíduo resulta não só do grande volume em que é gerado (40 kg de torta por tonelada de cana-de-açúcar processada), como também da economia de insumos que se obtêm com a prática do seu aproveitamento na forma de fertilizante e/ou como condicionadora de solos (SANTOS et al., 2009; SIMPGEU, 2012). Este resíduo, basicamente composto por uma mistura de bagaço moído e lodo da decantação, é considerado um excelente produto orgânico para a recuperação de solos exauridos ou de baixa fertilidade. O resíduo é armazenado, estocado a céu aberto e transportado até a lavoura para ser reutilizado como fertilizante (SIMPGEU, 2012).

Segundo Nunes Junior (2008), a torta de filtros apresenta em sua composição cerca de 80% de umidade, além de altos teores de macro e micronutrientes como fósforo, nitrogênio, cálcio, potássio e magnésio. O fósforo (P) é o elemento predominante na composição química da torta de filtros, e apesar do pequeno requerimento deste elemento pelos vegetais, é um dos nutrientes aplicados em maiores quantidades nos solos brasileiros, em face da baixa disponibilidade natural deste, o que o torna um dos fatores limitantes da produção em solos tropicais (RAIJ, 1991). Portanto, um dos maiores entraves para a produção agrícola no Brasil é a baixa disponibilidade de P inorgânico no solo, sendo que sua deficiência pode reduzir a absorção de N. Dessa forma, a torta de filtro utilizada como adubo nas próprias

plantações de cana, amenizou as despesas que antes as usinas despendiam com a suplementação do solo (BITTENCOURT, 2006).

Os resíduos agroindustriais oriundos da atividade sulcralcooleira no Brasil podem representar materiais interessantes para o estabelecimento de comunidades microbianas. A torta de filtros, embora seja normalmente aplicada ao solo e recomendada como fertilizante, pode ser considerada uma fonte potencial para o isolamento de leveduras, em função da composição química. De acordo com Penatti (1991), os elevados teores de matéria orgânica e umidade observadas na torta podem propiciar boas condições físico-químicas para o estabelecimento de comunidades microbianas. Por outro lado, o bagaço de cana armazenado ao longo das safras, já apresentando diferentes estágios de decomposição, pode também ser colonizado por uma comunidade microbiana diversa, em função da composição orgânica e teores de umidade. Segundo Lachance (2006), a maioria das espécies de uma comunidade é adaptada àquele ambiente, e a composição desta comunidade está intimamente relacionada com as características de seu habitat. Sendo assim, pode-se inferir que os micro-organismos associados a estes substratos estariam melhores adaptados não só às características nutricionais, como também às condições industriais de estresse observadas nas usinas de álcool. Portanto, torna-se importante a identificação de espécies de leveduras a partir destes substratos, bem como a caracterização do potencial biotecnológico dos isolados obtidos.

Tendo em vista o fato de que não existem relatos a cerca da diversidade de leveduras associadas ao bagaço de cana-de-açúcar e à torta de filtros, e considerando o potencial do Brasil em albergar espécies e/ou linhagens de leveduras com potencial biotecnológico, o presente trabalho poderá ser de grande importância para o isolamento de novas espécies/linhagens de interesse industrial. O trabalho representa o primeiro estudo da diversidade de leveduras assimiladoras de D-xilose associadas a estes substratos, com enfoque na seleção de linhagens que sejam potencialmente aplicáveis na produção de etanol e/ou xilitol por meio da bioconversão do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Identificar as comunidades de leveduras assimiladoras de D-xilose associadas ao bagaço de cana-de-açúcar e à torta de filtros e testar os isolados quanto à fermentação de D-xilose, visando o emprego de tais micro-organismos na produção de xilitol.

3.2- Objetivos específicos

- Coletar amostras de bagaço de cana e de torta de filtros em decomposição amostrados em usinas sulcralcooleiras no Brasil e isolar leveduras a partir desses substratos;
- Verificar a assimilação de D-xilose pelas leveduras isoladas;
- Identificar todos os isolados por meio de métodos fisiológicos e moleculares;
- Calcular os índices de diversidade para as comunidades de leveduras obtidas;
- Triar todos os isolados quanto à fermentação de D-xilose, e selecionar linhagens produtoras de xilitol;
- Realizar ensaios fermentativos em meios de D-xilose e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, em escala de bancada, com os isolados selecionados;
- Realizar ensaios fermentativos de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em biorreator agitado, com os isolados selecionados;
- Determinar os parâmetros fermentativos para as leveduras fermentadoras de D-xilose nos ensaios realizados.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Realização das coletas

As amostras de bagaço de cana e/ou de torta de filtros foram coletadas em diferentes usinas de açúcar/álcool combustível no Brasil, entre as safras da cana dos anos de 2010 e 2011. As amostras de bagaço de cana foram coletadas em pontos aleatórios estatisticamente, numa profundidade de cerca de 10 cm nos montes de bagaço das safras anteriores acumulados ao relento nas delimitações das usinas. As amostras de torta de filtros foram obtidas diretamente no canavial adubado com o substrato, também nas delimitações das usinas. Dez gramas de cada amostra foram obtidos, armazenados em sacos plásticos esterilizados e processados em laboratório no prazo máximo de até 24 horas. As coletas foram realizadas nas principais regiões produtoras de açúcar e álcool do Brasil: Suldeste e Nordeste.

4.2- Isolamento das leveduras

Um grama de cada amostra obtida (bagaço de cana e torta de filtros) foi adicionado a frascos Erlenmeyers contendo 20 ml do meio YNB-xilana (xilana 1%, Yeast Nitrogen Base 0,67%, cloranfenicol 0,02%, pH 5,0 ± 0,2), 20 mL do meio YNB-D-xilose (D-xilose 0,5%, Yeast Nitrogen Base 0,67%, cloranfenicol 0,02%). Os frascos foram incubados em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25) a 150 rpm e 25°C por 3 a 10 dias. Dos frascos que apresentaram crescimento positivo, caracterizado pela turbidez do meio, uma alíquota de 500 mL foi transferida a tubos contendo 5 mL de meios correspondentes (YNB-xilana e YNB-D-xilose). Os tubos foram incubados sob as mesmas condições anteriores. Dos tubos que apresentaram crescimento, uma alçada foi semeada separadamente em placas de Petri contendo os mesmos meios acrescidos de 2% de ágar. As placas foram incubadas a 25°C até a observação do crescimento de colônias (CADETE et al, 2009; CADETE et al, 2012a).

4.3-Purificação e manutenção das leveduras

Das placas onde se observou crescimento de colônias de leveduras, cada morfotipo foi descrito quanto às características macroscópicas. Um representante de cada morfotipo foi purificado em meio ágar extrato de malte - extrato de levedura (YM -

glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) e preservado em caldo GYMP (glicose 2%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 1%, Na₂PO₄ 0,2%) com 20% de glicerol em ultra-freezer a - 80° C. As leveduras isoladas durante o estudo foram depositadas na Coleção de Microorganismos e Células da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.4. Identificação das leveduras

Os isolados de leveduras foram agrupados em perfis de acordo com testes fisiológicos e bioquímicos segundo procedimento descrito por Kurtzman et al. (2011a). Para tanto, cada levedura foi inoculada em tubos contendo água destilada esterilizada, na qual a concentração celular foi medida pelo cartão de *Wickerham* (grau +2). Uma alíquota de 400 µL de cada suspensão de células foi adicionada individualmente em poços de um replicador, que foi utilizado para inocular as leveduras em placas contendo diferentes fontes de carbono e nitrogênio. As placas foram incubadas por 21 dias, a 25°C, sendo as leituras dos crescimentos das leveduras realizadas com 7, 14 e 21 dias, em uma escala que variou de negativo (-) até 3 (positivo), de acordo com o crescimento das mesmas (-,1,2,3). Com base nos perfis fisiológicos idênticos assim determinados, representantes de cada grupo foram submetidos à análise molecular, para a realização do agrupamento em perfis moleculares distintos, por meio de PCR (Reação em Cadeira da Polimerase) utilizando o iniciador EI-1.

4.4.1 Extração do DNA

Para o agrupamento molecular, primeiramente, realizou-se a extração do DNA total das leveduras, onde os isolados foram crescidos em ágar extrato de malte e extrato de levedura (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) por 24 horas a 25°C. Após o crescimento, as colônias foram resuspendidas em 100 µL de tampão de lise e incubadas em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Transcorrida essa etapa do processo, foram adicionados 200 µL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) aos tubos e os mesmos foram vedados com parafilme, homogeneizados por inversão e centrifugados a 14.800 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado com auxílio de pipeta e transferido para outro tubo, ao qual foi adicionado v/v de isopropanol. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura ambiente para precipitação do DNA. Após essa etapa, os tubos foram centrifugados a 13.200 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado por inversão, e ao *pellet* formado foram acrescentados 200 µL de etanol 70%. Efetuou-se

novamente uma centrifugação a 13.200 rpm por 10 minutos. A lavagem do DNA com etanol foi repetida mais uma vez e, na última etapa do processo, o etanol foi retirado com auxílio de pipeta e descartado, e os tubos incubados *overnight* a temperatura ambiente para total evaporação do álcool. Após essa etapa, o DNA foi re-suspendido em 100 µL de tampão Tris EDTA 0,1M (TE) pH 8 e estocado a – 20 °C.

4.4.2 - PCR com o iniciador EI-1

A reação de PCR foi realizada de acordo com de Barros Lopes et al. (1996), em um volume final de 25 µL contendo 2,5 µL de tampão de PCR Fermentans 10 X, 1,5 µL de MgCl₂ 1,5 M, 1 µL de dNTP 0,05 mM, 1,5 µL do iniciador EI-1 (CTGGCTTGGTGTATGT) a 10 pmol/µL, 1 a 3 µL de DNA, 0,3 µL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/µL (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Dpec q.s.p. 25 µL. Utilizou-se o termociclador Eppendorf AG 6325. O programa de ciclagem consiste de uma desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos, seguido por 33 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 2 minutos de anelamento do iniciador a 45 °C e 90 segundos de extensão a 74 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 74 °C.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE 0,5 X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5 M, pH 8,0) durante aproximadamente 90 minutos a 80 V. Os amplicons obtidos foram corados com uma solução de agente intercalante Gelred™ (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação de gel (Vilber Lourmat, França). As leveduras com padrões de bandas de DNA idênticas agrupadas foram supostamente consideradas como pertencentes à mesma espécie (ROSA et al., 2007). Pelo menos uma linhagem representante de cada grupo formado a partir da PCR com o iniciador EI-1 foi submetido à análise da seqüência dos domínios D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA utilizando-se os iniciadores NL1 e NL4, conforme descrito a seguir. As linhagens fisiologicamente distintas com padrões de banda únicos também foram selecionadas para identificação pelo seqüenciamento da região D1/D2 do gene do rRNA.

4.4.3 - Amplificação utilizando os iniciadores NL1 e NL4

De cada perfil molecular distinto obtido a partir dos resultados com a PCR utilizando-se o iniciador EI-1, um isolado foi selecionado para o sequenciamento da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA com os iniciadores NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') e NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')

segundo Lachance et al. (1999). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 5 μL de tampão de PCR Fermentans 10X, 2 μL de MgSO_4 1,5M, 2 μL de dNTP 0,05 mM, 1 μL dos iniciadores NL1 e NL4 a 10 pmol/ μL (MWG Biotech), 2 a 5 μL de DNA, 0,2 μL de Taq DNA Polimerase 1,25 U/ μL (Taq DNA Polymerase Fermentans) e água Dpec q.s.p. 50 μL . As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o termociclador Eppendorf AG 6325. O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94°C, 25 segundos de anelamento do iniciador a 54°C e 20 segundos de extensão a 68°C, e uma extensão final por 10 minutos a 68°C. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X (54 g de tris base, 27,5 g de ácido bórico, 20 mL de EDTA 0,5M, pH 8,0) durante aproximadamente 20 minutos a 120 V. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante Gelred™ (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.4.4. - Amplificação utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4

O poder discriminatório das seqüências da região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA é considerado suficiente para descrever novas espécies de leveduras (KURTZMAN et al., 2011b). Entretanto, para a confirmação de potenciais novas espécies foram utilizados, adicionalmente, os iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), para amplificação e sequenciamento da região espaçadora transcrita interna (ITS) do gene do rRNA, conforme descrito por White et al. (1990). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 μL contendo 5 μL de tampão de PCR 10X (Fermentans, EUA), 2 μL de MgCl_2 25mM (Fermentans, EUA), 2 μL de dNTP 10 mM, 1 μL de cada iniciador ITS1 e ITS4 a 10 pmol⁻¹ (MWG Biotech), 0,2 μL de Taq DNA polimerase 1,25U (Fermentans, EUA), 1 a 5 μL do DNA e 50 μL q.s.p. de água deionizada autoclavada. As reações de PCR foram realizadas utilizando o termociclador Eppendorf AG 6325. O programa de ciclagem consistiu de uma desnaturação inicial a 95° C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C, 1 minuto de anelamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72 °C, e uma extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os amplicons foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5 X, eluídos durante aproximadamente 30 minutos a 120 V. Os géis foram corados com uma solução de agente intercalante Gelred™ (Biotium, EUA) a 0,2%, visualizados

sob luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de foto-documentação de gel (Vilber Lourmat, França).

4.4.5 - Purificação dos produtos de PCR e reação de sequenciamento

Aos amplicons gerados pela reação de PCR com os iniciadores NL1 e NL4, ITS1 e ITS4, foram adicionados 11,25 µL de EDTA 125 mM e 135 µL de etanol absoluto. O conteúdo dos tubos foi homogeneizado e os mesmos então centrifugados a 13.000 rpm por 25 minutos. O sobrenadante foi retirado e descartado com auxílio de pipeta. A seguir, foram adicionados 120 µL de etanol 70% gelado aos tubos, e os mesmos foram homogeneizados por inversão e centrifugados a 13.000 rpm por 10 minutos; o etanol foi retirado e descartado com auxílio da pipeta. Os tubos foram deixados *overnight* à temperatura ambiente para total evaporação do etanol e decorrida essa etapa, 10 µL de água Dpec foram adicionados e o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vortex por 15 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37 °C por 10 minutos. O produto obtido foi dosado em NanoDrop ND 1000 (NanoDrop Technologies). As reações de seqüenciamento foram realizadas utilizando-se o DYEnamic™ (Amersham Biosciences, USA) em combinação com o sistema de seqüenciamento automatizado MegaBACETM 1000. O seqüenciamento foi realizado no Núcleo de Análise de Genoma (NAGE) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Para a confirmação de potenciais novas espécies foram realizadas também reações de sequenciamento utilizando o Kit Big Dye versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) em combinação com o sistema de sequenciamento automatizado ABI 3730, no Laboratório de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, ICB/UFMG.

4.4.6 - Análise das seqüências

As seqüências obtidas foram montadas, editadas e alinhadas com o programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e comparadas com seqüências depositadas no Genbank, utilizando o programa BLASTn (*Basic Local Alignment Search Tool* - versão 2.215 do BLAST 2.0) disponível no portal NCBI desenvolvido pelo *National Center For Biotechnology* (ALTSCHUL et al., 1997). Isolados apresentando similaridade na seqüência analisada de 99% ou mais em relação a outro já depositado no GenBank foram considerados como pertencentes àquela espécie conhecida. Os isolados que

apresentaram três ou mais diferenças nucleotídicas não-contíguas para o D1/D2 quando comparados às espécies mais proximamente relacionadas foram considerados potenciais novas espécies. As sequências das espécies novas serão depositadas no GenBank.

4.5 - Cálculo dos índices de diversidade, similaridade e curvas de rarefação

O número total de isolados obtidos, o local de coleta, o substrato de isolamento e o meio de cultivo utilizados no presente trabalho, foram usados para determinação do cálculo da abundância de cada táxon, dentro da comunidade de leveduras obtida. Estes dados foram utilizados para determinar a prevalência de cada táxon em comparação com o total de táxons presente nas comunidades.

A diversidade de leveduras foi calculada utilizando-se os índices de diversidade, riqueza e dominância de: Fisher-Alfa, Margalef e Simpson, respectivamente. O índice de Fischer, relaciona-se com a diversidade de espécies e o índice de Margalef atribui valores quanto à riqueza de espécies, sendo que quanto maior o valor do índice, maior a riqueza de espécies. O índice de Simpson avalia a dominância e equitabilidade de espécies e atribui valores entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade de espécies e menor a dominância. Assim, quando maior, indica maior diversidade e ausência de dominância. Já os menores valores para este índice indicam menor diversidade e presença de dominância. Para avaliar a similaridade entre as comunidades de leveduras obtidas utilizou-se o coeficiente de Sorensen (QS). Este coeficiente relaciona-se com presença ou ausência de espécies. Atribui mais peso sobre as ocorrências comuns do que aos desencontros, e utiliza valores entre 0 (nenhuma similaridade) e 1 (similaridade absoluta). Todos os resultados foram obtidos com 95% de confiança, e os valores de *bootstrap* foram calculados a partir de 1000 repetições. Todos os índices foram calculados utilizando o programa computacional PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001). Curvas de rarefação foram calculadas afim de se avaliar a adequabilidade da amostragem, sendo utilizado o índice de Mao Tao (COWELL et al., 2004).

4.6 - Seleção das leveduras fermentadoras de D-xilose

Todos os isolados obtidos neste trabalho foram submetidos a um teste de triagem de fermentação de xilose e avaliados quanto a produção de etanol e/ou xilitol. Tendo em vista que condições microaeróbicas podem favorecer tanto a produção de

etanol quanto de xilitol, para diferentes espécies e linhagens de leveduras (Parajó et al., 1998), uma única condição de experimento foi empregada, como descrito abaixo.

4.6.1- Triagem quanto à produção de xilitol

As leveduras foram diluídas em água destilada esterilizada até o número 2 do cartão de *Wickerham*, e 200 µL dessa suspensão de células foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2 mL do meio YPX (extrato de levedura 1%, peptona 2%, xilose 3%), em duplicata. Os tubos foram incubado a 25° C, sob agitação de 150 rpm, em agitador horizontal (modelo New Brunswick Scientific CO. INC. series 25), a 28° C, durante 96 horas. Ao final deste período, todo o volume do meio foi centrifugado 13000 rpm por 15 min. O sobrenadante foi filtrado através de membranas de acetato de celulose de 13 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 µm e armazenado para posterior dosagem do consumo de xilose, e produção de xilitol; análises estas, realizadas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência). Utilizou-se a versão do programa 1.21 do *Lc-Solution*, *Detector* SPD-M20A; um detector de índice de refração (RI); e a coluna Supelco SUPELCOGEL™ C-610H HPLC *Column* (59320-U) (Sigma-Aldrich®) (300x 7,8 mm), nas seguintes condições: H₂SO₄ 5mM como eluente; 1.0 ml.min⁻¹ fluxo; temperatura da coluna à 65°C; detector da atenuação 16x; e volume de injeção da amostra 20 µL.

4.6.2 - Ensaio de fermentação

Foram realizadas fermentações de meios complexos à base de xilose, bem como a fermentação de xilose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Dos resultados obtidos a partir das fermentações em escala de bancada, foram selecionadas linhagens para serem testadas quanto a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em biorreator agitado, com volume de 2,4 L. Os ensaios fermentativos foram realizados no Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL) da Universidade de São Paulo (USP), sob orientação do Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, durante os meses de Abril a Junho de 2013.

4.6.2.1 Fermentação em meios de xilose

A partir dos testes fermentativos de triagem foram selecionadas leveduras para verificação da produção de xilitol. Com base nos resultados prévios, foram realizados ensaios de fermentação em dois meios à base de xilose, afim de se definir qual seria o meio mais apropriado para favorecer a produção de xilitol pelas leveduras selecionadas. Os ensaios foram conduzidos em duplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL dos meios de cultivo descritos abaixo:

Meio 1 – Meio de xilose suplementado com extrato de farelo de arroz - composto por D-xilose (30 g.L^{-1}), extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}), sulfato de amônio (2 g.L^{-1}) e cloreto de cálcio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). As soluções de sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) dihidratado foram preparadas separadamente nas concentrações de 50 g.L^{-1} . A solução de xilose na concentração de 250 g.L^{-1} , foi esterilizadas em autoclave a 1 atm por 15 minutos. Para utilização do extrato de farelo de arroz como nutriente, foram empregados 200 g de farelo para 1 litro de água destilada, e autoclavados por 15 minutos a 0,5 atm. Após o resfriamento, a solução foi centrifugada a $2.000 \times g$ por 30 minutos, em condições assépticas. A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e estocado em geladeira até a sua utilização (ARRUDA, 2011).

Meio 2 – Meio de xilose suplementado com extrato de levedura e peptona (YPX) - composto por extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}) e xilose (30 g.L^{-1}). As soluções de extrato de levedura, peptona e xilose foram preparadas separadamente nas concentrações de 250 g.L^{-1} e esterilizadas em autoclave a 1 atm por 15 minutos.

Uma alçada de cada levedura previamente crescida em ágar extrato de malte e extrato de levedura (glicose 1%, extrato de levedura 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona bacteriológica 0,5%, ágar 2%) por 24 horas a 25°C foi inoculada nos dois meios. Os frascos foram incubados a 30°C , por 24 horas em agitador horizontal (Quimis Q816M20) a 200 rpm. Essa condição de aeração garante que os ensaios fermentativos foram realizados sob condições microaeróbicas, consistindo no uso de agitação a 200 rpm e a razão do volume do frasco/volume do meio de cultivo ($V_{\text{frasco}}:V_{\text{meio}}$) equivalente a 2,5, estabelecida em um estudo recente como sendo de microaerofilia (SILVA et al., 2010).

Transcorrido o período de incubação, uma alíquota de 2 mL dos meios foi obtida para medição da absorção a 600 nm e posteriormente centrifugada e

preservada a -20°C , para dosagem do consumo de xilose, produção de etanol, xilitol e ácido acético em CLAE.

4.6.2.2 Determinação do inóculo inicial

Definido qual seria o meio mais apropriado para os ensaios fermentativos, a concentração celular inicial foi determinada a 600 nm, utilizando um espectrofotômetro Beckman DU^R 640 B, onde a concentração de células em g.L^{-1} foi calculada, utilizando uma curva-padrão que correlaciona a absorbância medida a 600 nm ao peso seco das células. O inóculo inicial foi feito em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo composto por D-xilose (30 g.L^{-1}), extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Os frascos foram incubados a 30°C por 24 horas em um agitador rotatório a 200 rpm. Transcorrido esse período, as leveduras foram recuperadas por centrifugação a $3.000 \times g$ durante 15 minutos, sendo o sobrenadante retirado e as células lavadas com a mesma quantidade original de água destilada esterilizada. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e centrifugadas a $3.000 \times g$, por 15 minutos. O sobrenadante foi novamente retirado, e ao *pellet* adicionou-se água destilada esterilizada, seguido da homogeneização em vórtex. Três mililitros da solução foram retirados e colocados em cadinhos previamente secos em estufa, dessecados e pesados, em triplicata. Os recipientes foram colocados na estufa a 100°C , por 24 horas, e no dessecador por 1 hora. Posteriormente cada cadinho foi pesado até não se observar variação significativa do peso. As medições foram feitas por um período de até 48 horas (ARRUDA, 2011).

4.6.2.3 Fermentação em meio de D-xilose suplementado com farelo de arroz

As leveduras foram previamente cultivadas em frascos com 100 mL de meio contendo D-xilose (50 g.L^{-1}), extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), com correção de pH para 5,5, sendo os frascos incubados em agitador horizontal a 200 rpm, a 30°C , por 24 horas. Para obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a $2.000 \times g$, durante 20 minutos, o *pellet* formado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada e ressuspenso diretamente em 10 % (v/v) do meio de fermentação, com a concentração celular em densidade óptica igual a 1 (DO - 600 nm), que corresponde a aproximadamente $0,5\text{-}1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células (em peso seco). As células obtidas foram inoculadas em frascos de

250 mL contendo 100 mL de meio (o mesmo descrito acima). As fermentações foram conduzidas em triplicata e os frascos incubados a 30 °C sob agitação de 200 rpm, por 96 horas. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas com 0, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação, para serem avaliadas quanto à concentração celular a 600 nm. As amostras foram obtidas para centrifugadas a 3.000 x g, durante 15 minutos, e estocadas a – 20 °C para determinação das concentrações de xilose, ácido acético, xilitol e etanol, por CLAE (ARRUDA, 2011).

4.6.3 - Hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar utilizado nos experimentos foi fornecido pela Usina de Açúcar e Álcool Costa Pinto do Grupo COSAN, localizada em Santa Terezinha, na cidade de Piracicaba, São Paulo. O bagaço foi submetido à tripla lavagem, para remoção de qualquer resíduo de açúcar. Após lavagem, o bagaço foi seco ao sol por aproximadamente 72 horas, até atingir 10% de umidade, sendo esta medida obtida por secagem em estufa até que o peso alcançasse um valor constante (ARRUDA, 2011).

4.6.3.1 - Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Os processos de hidrólises ácida para rompimento da estrutura lignocelulósica foram feitos em um reator de aço inoxidável AISI 316 com capacidade volumétrica de 350 L. O reator foi operado em regime descontínuo a 121 °C, por 20 minutos, utilizando 100 mg de ácido sulfúrico (98%) para 1 g de bagaço (matéria seca), em uma relação de sólido-líquido de 1:10. O hidrolisado resultante após este procedimento foi filtrado para remoção da massa residual de sólidos (celulignina). Posteriormente, o hidrolisado foi caracterizado quanto ao pH e quanto aos teores de glicose, xilose e arabinose. Também foi caracterizado quanto à concentração dos compostos tóxicos, como furfural, 5-hidroxi metil-furfural e ácido acético (ALVES, 2006). Após a caracterização, o hidrolisado foi concentrado a vácuo, utilizando um sistema de condensação à temperatura de 70 ± 5 °C, com a finalidade de aumentar o teor inicial de xilose (ALVES, 2006; ARRUDA, 2011).

4.6.3.2 - Detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado foi detoxificado pela alteração de pH, combinada à adsorção de carvão ativo. O pH ácido do hidrolisado, inferior a 2, foi elevado a 7,0 com adição de CaO, e posteriormente reduzido até 5,5 com H₃PO₄, seguido pela adição de carvão ativado (2,5% m/v) (pó refinado), a 30 °C, agitação de 200 rpm durante 60 minutos. Após cada tratamento, o hidrolisado foi filtrado em papel-filtro, sob vácuo, para remoção dos precipitados formados. O hidrolisado destoxificado foi autoclavado a 111 °C durante 15 minutos (ALVES et al., 1998; SILVA et al., 2007; SENE et al., 2011).

4.6.3.3 – Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada

As leveduras foram testadas quanto a fermentação de xilose em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Para o pré-inóculo, as leveduras foram inoculadas em frascos de 250 mL contendo 100 mL de D-xilose (30 g.L⁻¹), extrato de farelo de arroz (20 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2 g.L⁻¹) e CaCl₂.2H₂O (0,1 g.L⁻¹), em triplicata. Os frascos foram incubados a 30°C, sob agitação de 200 rpm, por 24 horas. Transcorrido esse período, para obtenção do inóculo, as células foram recuperadas por centrifugação a 2.000 x g por 20 minutos. O *pellet* formado foi lavado duas vezes com água destilada esterilizada e ressuspenso diretamente em 10 % (v/v) do meio de fermentação, com a concentração celular em densidade óptica igual a 1 (DO - 600 nm), que corresponde a aproximadamente 0,5-1,0 g.L⁻¹ de células (em peso seco). As células obtidas foram inoculadas em frascos contendo 100 mL de meio composto por hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (50 g.L⁻¹ de xilose), suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g.L⁻¹), (NH₄)₂SO₄ (2 g.L⁻¹) e CaCl₂.2H₂O (0,1 g.L⁻¹), sendo os frascos incubados em agitador rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 96 horas. Alíquotas de 1,5 mL foram retiradas nos tempos 0, 24, 36, 48, 72 e 96 horas de incubação, para serem avaliadas quanto à concentração celular a 600 nm. As amostras foram centrifugadas a 2.000 x g, por 15 minutos, e estocadas para posterior determinação das concentrações dos açúcares (xilose e glicose), ácido acético, glicerol, etanol e xilitol, por CLAE (FELIPE et al., 1997; SILVA et al., 2007; HUANG et al., 2011; SENE et al., 2011). As linhagens que apresentaram o melhor consumo de D-xilose e maior rendimento e produtividade em xilitol foram escolhidas para serem testadas em biorreator.

4.6.3.4 – Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator

Os inóculos das leveduras selecionadas foram preparados em frascos Erlenmeyer de 1000 mL, contendo D-xilose (30 g.L^{-1}) suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2 g.L^{-1}) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$), para um volume final de 600 mL. Os frascos incubados sob agitação de 200 rpm, a 30°C , por 24 horas. Após este período as células foram recuperadas por centrifugação a $3.000 \times g$ por 20 minutos, lavadas duas vezes com água destilada esterilizada e ressuspensas diretamente em 10 % (v/v) do meio de fermentação, com a concentração celular em densidade ótica igual a 1 (OD, 600 nm), que corresponde a aproximadamente $0,5\text{-}1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de células (em peso seco). Os ensaios de fermentação foram realizados no biorreator de tanque agitado (STR - *Stirred tank reactor*) tipo KLF2000, com capacidade de 2,4 litros (figura 3). O processo de esterilização do meio de cultivo foi realizado “in situ” com aquecimento elétrico (800W) e jaqueta de segurança. O fermentador foi equipado por sensores de pH, temperatura e oxigênio dissolvido (DO), um eixo agitador com turbina de seis pás planas (‘flat blade’) e um condensador de vidro. O fermentador foi operado em modo descontínuo. O ar comprimido de bancada passou por um filtro e foi adicionado constantemente durante o processo de fermentação. A instrumentação e controle do fermentador incluíram um sistema de controle direto dos parâmetros do processo temperatura e agitação. As medidas de vazão de ar foram controladas pelo rotâmetro, com auxílio do fluxímetro de bolha. Foi adotado um volume de 250 mL para analisar o tempo em que cada bolha percorria essa distância. Os parâmetros pH e DO foram medidos “in situ” por um transmissor Mettler Toledo M300 multiparâmetro de 2 canais.

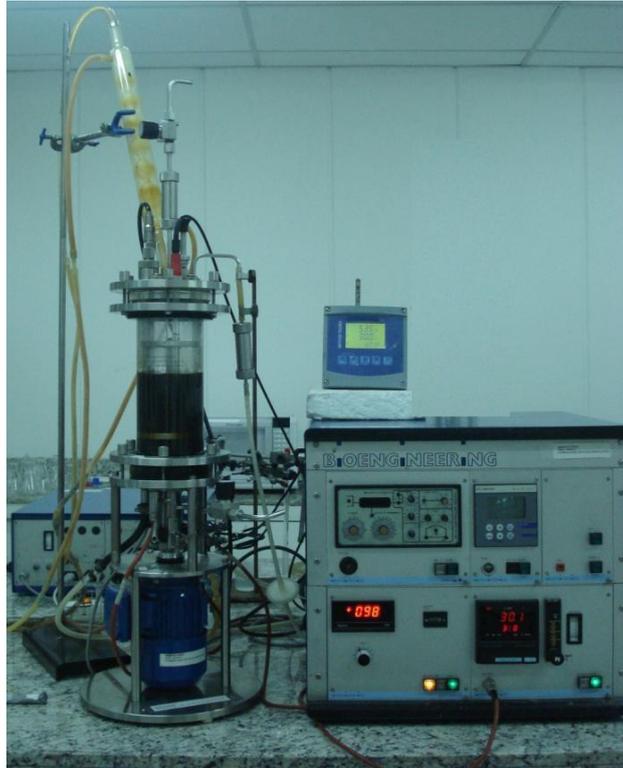


Figura 3: Biorreator de tanque agitado empregado no processo de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Dois ensaios de fermentação foram conduzidos, ambos contendo 1,5 L de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar previamente concentrado (xilose 50 g.L^{-1}), detoxificado e suplementado com extrato de farelo de arroz (20 g.L^{-1}), sulfato de amônio (2 g.L^{-1}) e cloreto de cálcio ($0,1 \text{ g.L}^{-1}$). Os ensaios foram feitos de acordo com os parâmetros descritos abaixo:

Experimento 1 - a agitação foi de 300 rpm e a aeração de 0,40 vvm. As fermentações foram conduzidas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por 72 horas, e o K_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) foi de $2,8 \text{ h}^{-1}$.

Experimento 2 - a agitação foi de 150 rpm e a aeração de 0,20 vvm. As fermentações foram conduzidas a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, por 72 horas, e o K_{La} foi de $1,89 \text{ h}^{-1}$.

Os ensaios foram realizados em duplicata. Para os dois experimentos, amostras de 5 mL foram coletadas nos tempos de 0, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas. As amostras foram avaliadas quanto à concentração celular a 600 nm e posteriormente centrifugadas a $2.000 \times g$, por 15 minutos, e estocadas para

determinação das concentrações dos açúcares (xilose e glicose), ácido acético, glicerol, etanol e xilitol, por CLAE.

4.7 – Métodos analíticos

4.7.1 - Determinação da concentração de açúcares, etanol, xilitol, ácido acético e glicerol

As amostras aliqüotadas foram filtradas com filtros Sep pak C18 (*Waters*, USA) e procedeu-se diluições apropriadas, feitas com água milli-Q. As análises quantitativas das concentrações de glicose, xilose, xilitol, glicerol, ácido acético e etanol foram feitas por CLAE (*Agilent Technologies 1200 Series*) (HUANG et al., 2011), usando um detector de índice de refração (RI), detector Bio-Rad Aminex HPX-87H, coluna HPX-87-H (300x 7,8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), mantida nas seguintes condições: 0,01 N H₂SO₄ 5 mM como eluente; 0,6 ml min⁻¹ fluxo; temperatura da coluna 45 °C; e volume de injeção 20 µL (FELIPE et al., 1997; SENE et al., 2011).

Para determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart 0,22 µm (Millipore). A determinação foi feita por CLAE, nas seguintes condições: Coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25 °C, detector de ultravioleta (SPD-10A UV-VIS), solução de acetonitrila /H₂O (1:8) com 1% de ácido acético como eluente, fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e um volume de injeção de 20 µL (ARRUDA, 2011; SENE et al., 2011). A concentração celular dos inóculos foi determinada comparando-se a densidade ótica da suspensão celular com a curva-padrão (absorbância a 600 nm x peso seco da célula) (FELIPE et al., 2007).

4.7.2 Cálculo do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O $k_L a$ foi determinado pela metodologia descrita por PIRT(1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi desgaseificado com nitrogênio, com o objetivo de reduzir a zero o oxigênio dissolvido no meio. O meio foi então agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo.

4.7.3 - Determinação dos parâmetros fermentativos

- **Fator de conversão de açúcar (D-xilose) em xilitol ($Y_{p/s}$)**

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de xilitol produzido por massa de xilose consumida, em gramas.

- **Produtividade volumétrica de xilitol (Q_p)**

A produtividade volumétrica expressa a concentração de xilitol produzido (g.L^{-1}) por tempo (h).

- **Eficiência de conversão (η)**

Este parâmetro fermentativo, expresso em porcentagem, representa a razão entre o fator de rendimento ($Y_{p/s}$) obtido e o fator de rendimento teórico (0,917 grama de xilitol/gramas de xilose) e o consumo de xilose (%) como porcentagem do açúcar consumido a partir da concentração inicial.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Coleta dos substratos e obtenção das leveduras

Cem amostras de bagaço de cana e 60 amostras de torta de filtros foram coletadas para realização deste trabalho, em diferentes usinas de álcool e açúcar de seis cidades do Brasil (tabela 2). Um total de 450 isolados de leveduras foi obtido, sendo 326 a partir das amostras de bagaço de cana e 124 a partir das amostras de torta de filtros. Em relação à região de isolamento, 147 isolados foram obtidos nas coletas realizadas em Minas Gerais, 208 isolados em São Paulo e 95 isolados nas usinas amostradas na Paraíba. Em função de uma maior amostragem ter sido realizada no estado de São Paulo, foi obtido um maior número de isolados nesta região, a partir dos dois substratos coletados. A distribuição dos isolados a partir das diferentes usinas pode ser visualizada na figura 4. O número de isolados em relação ao meio de cultivo também variou, sendo obtidos 245 em meio YNB-D- xilose e 205 em meio YNB - xilana.

Tabela 2: Locais de coleta e número de amostras de bagaço de cana e torta de filtros obtidas no presente trabalho.

Usinas	Local	Número de amostras de bagaço de cana	Número de amostras de torta de filtros
Usina 1	Lagoa da Prata (Minas Gerais)	20	-
Usina 2	Piracicaba (São Paulo)	20	20
Usina 3	Cláudio (Minas Gerais)	20	-
Usina 4	Iracemópolis (São Paulo)	20	20
Usina 5	João Pessoa (Paraíba)	20	-
Usina 6	João Pessoa (Paraíba)	-	20
Total		100	60

Os dados obtidos no presente trabalho são semelhantes aos encontrados em trabalhos realizados com o isolamento de leveduras assimiladoras de xilose, utilizando-se outros substratos vegetais. Rao et al. (2008) obtiveram 239 isolados a partir de troncos de eucalipto e 374 a partir de frutos podres. Cadete et al. (2012a), utilizando meios de cultivo contendo xilose e xilana como únicas fontes de carbono, isolaram um total de 224 leveduras a partir de 40 amostras de madeira em decomposição, sendo 118 a partir do meio a base de xilose e 106 em meio de xilana. Morais et al. (2013b) também isolaram leveduras a partir de amostras de madeira em decomposição, utilizando os mesmos meios de cultivo e obtiveras um total de 321 isolados, sendo 135 a partir do meio a base de xilose e 186 em xilana. Esses dados mostram que materiais vegetais em decomposição são uma boa fonte para o isolamento de leveduras e que os dois meios de cultivo utilizados são igualmente adequados para a obtenção de leveduras assimiladoras de D-xilose.

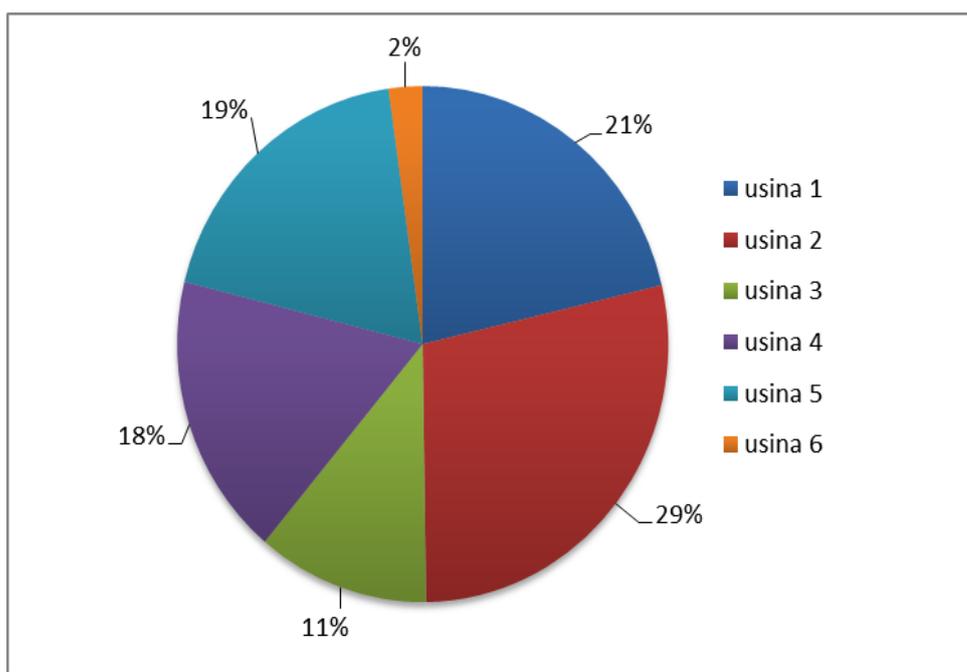


Figura 4: Distribuição em porcentagem de todos os isolados de leveduras obtidos nas diferentes usinas de álcool e açúcar amostradas no Brasil – usina 1: Lagoa da Prata (Minas Gerais); usina 2: Piracicaba (São Paulo); usina 3: Cláudio (Minas Gerais); 4: Iracemópolis (São Paulo); usina 5: João Pessoa (Paraíba); usina 6: João Pessoa (Paraíba).

5.2 – Diversidade de leveduras

Vinte e sete espécies de leveduras foram identificadas neste trabalho, sendo que 24 já são conhecidas e três podem representar espécies ainda não descritas. A identificação dos isolados é mostrada na tabela 3, bem como a região de amostragem, o substrato e os meios de cultivo para o isolamento.

O gênero *Trichosporon* foi prevalente, representado por sete espécies: *T. asahii*, *T. dermatis*, *T. loubieri*, *T. mucoides*, *T. mycotoxinivorans*, *Trichosporon* sp 1 e *T. laibachii*. O gênero *Candida* foi o segundo mais frequente, com seis espécies relacionadas aos seguintes clados: *Lodderomyces/Spathaspora*, *Metschnikowia*, *Starmera*, *Starmerella* e *Yamadazyma*. O gênero *Lindnera* foi representado por três espécies, enquanto os gêneros *Meyerozyma*, *Sugiyamaella* e *Zygoascus* foram representados por duas espécies cada. Os outros 5 gêneros obtidos foram representados por uma espécie cada. *Candida* (*Lodderomyces/Spathaspora*) *tropicalis* foi a espécie predominante, com 190 isolados, seguida de *Trichosporon mycotoxinivorans*, com 59 isolados. *Candida tartarivorans* (clado ainda indefinido filogeneticamente) foi a terceira espécie mais frequente, com 63 isolados identificados. Linhagens de *C. tropicalis* já foram isoladas a partir de frutos, flores, solo, água e em espécimes clínicos (LACHANCE et al., 2011). Esta espécie já foi caracterizada como produtora de etanol a partir de D-xilose (JEFFRIES, 1981; SILVA e AFSCHAR, 1994; RAO, 2008; MISRA et al., 2011). No entanto esta levedura tem sido investigada preferencialmente quanto a conversão biotecnológica de xilose a xilitol (PESSOA JR et al., 1997; CHOI et al., 2000; WALTHER et al., 2001; GRANSTRÖM, 2002; LIMA et al., 2003; RAO et al., 2006; JUCOSKY et al., 2007; SCHIRMER, 2007; CHENG et al., 2009; MISRA et al., 2011; BURNEO, 2013).

A espécie *T. mycotoxinivorans* já foi isolada a partir de bagaço de cana e de madeira em decomposição, sendo descrita como produtora de celulases extracelulares (CADETE, 2009; SANTOS, 2010; CADETE et al., 2012a). As espécies *T. asahii*, *T. laibachii* e *T. loubieri*, também já foram descritas como associadas com amostras de bagaço de cana e madeira em decomposição (CADETE, 2009; SANTOS, 2010).

Candida tartarivorans, descrita por Fonseca et al., (2000), foi isolada a partir de borras secas de fermentação de vinho, em Portugal. Os pesquisadores avaliaram uma grande variedade de substratos e testaram o isolado quanto a metabolização do ácido tartárico, sendo a espécie positiva para o teste. A espécie foi descrita, portanto,

baseada em apenas um isolado e dados relacionados à ecologia e biotecnologia dessa espécie são ainda desconhecidos. No presente trabalho, vários isolados desta espécie foram encontrados, mostrando que os substratos estudados podem ser um dos nichos ocupados por esta levedura.

A espécie *Meyerozyma guilliermondii* também apareceu em alta frequência (40 isolados obtidos). Esta espécie já foi relatada em associação com besouros habitantes de madeiras em decomposição (SUH et al., 2003; CADETE et al., 2012a). Em relação às demais espécies isoladas nesse trabalho, a maioria já foi encontrada em solo, flores, frutos, madeira em decomposição, intestino de coleópteros e insetos florícolas (KURTZMAN et al., 2011a).

Algumas características quanto à distribuição das espécies de leveduras obtidas no presente trabalho são relatadas a seguir. As três espécies mais frequentes foram isoladas nos dois substratos amostrados e nos dois meios de cultivo utilizados. Outras oito espécies [*C. intermedia*, *C. stellimalicola*, *C. tatarivorans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *M. guilliermondii*, *T. mycotoxinivorans* e *Zygoascus hellenicus*] ocorreram em ambos os substratos. *Blastobotrys adenivorans*, *Sugiyamaella* sp., *C. butyri*, *C. blankii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Lindnera bimundalis*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, *T. mucoides*, *Trichosporon* sp, *Wicherhamomyces anomalus* e *Z. meyeræ* foram isoladas apenas de amostras de bagaço de cana. Já as espécies de *Lindnera* sp., *L. fabianii*, *T. asahii*, *T. dermatis*, *T. loubieri* e *T. laibachii* foram isolados somente em amostras de torta de filtros. Algumas espécies foram restritas a apenas um local de coleta. As espécies *C. butyri*, *K. marxianus*, *P. kudriavzevii* e *T. mucoides* foram obtidas somente nas coletas realizadas em Minas Gerais. *C. intermedia*, *Lindnera* sp., *L. bimundalis*, *L. fabianii*, *T. asahii*, *T. dermatis* e *Z. meyeræ* foram isoladas apenas na região de São Paulo. *B. adenivorans*, *C. blankii*, *Sugiyamaella* sp., *Trichosporon* sp. e *T. laibachii* ocorreram somente na Paraíba. Cinco espécies (*C. blankii*, *Lindnera* sp., *Sugiyamaella* sp., *M. caribbica* e *Z. hellenicus*) foram isoladas somente em meio YNB-Xilose. Já outras dez espécies (*B. adenivorans*, *C. butyri*, *K. marxianus*, *L. fabianii*, *P. kudriavzevii*, *T. dermatis*, *T. mucoides*, *Trichosporon* sp, *Z. meyeræ* e *T. laibachii*) foram isoladas no YNB- xilana. Dez espécies ocorreram uma única vez, sendo estas: *B. adenivorans*, *Lindnera* sp., *Sugiyamaella* sp., *K. marxianus*, *L. fabianii*, *P. kudriavzevii*, *T. dermatis*, *Trichosporon* sp., *Z. meyeræ* e *T. laibachii*. De acordo com Lachance e Starmer (1998), a observação de uma espécie de levedura uma única vez em um substrato não permite tirar conclusões sobre a ecologia desta espécie.

Tabela 3: Identificação, ocorrência nas regiões de coleta, substratos de isolamento e meios de cultivo das leveduras isoladas nas usinas de álcool combustível no Brasil.

Espécie	Xilose- bagaço	Xilana-bagaço	Xilose- torta	Xilana- torta
³ <i>Blastobotrys adenivorans</i>	-	1	-	-
^{1,2,3} <i>Candida (Lodderomyces) tropicalis</i>	98	31	32	29
² <i>Candida (Metschnikowia) intermedia</i>	-	1	2	1
^{1,2,3} <i>Candida (Starmera) stellimalicola</i>	3	3	3	-
³ <i>Candida (Starmerella) blankii</i>	6	-	-	-
¹ <i>Candida (Yamadazyma) butyri</i>	-	2	-	-
^{1,2,3} <i>Candida tartarivorans</i>	34	24	3	2
^{1,2,3} <i>Cryptococcus laurentii</i>	-	7	1	7
¹ <i>Kluyveromyces marxianus</i>	-	1	-	-
² <i>Lindnera bimundalis</i>	1	1	-	-
² <i>Lindnera fabianii</i>	-	-	-	1
² <i>Lindnera sp.</i>	-	-	1	-
^{2,3} <i>Meyerozyma caribbica</i>	5	-	-	-
^{1,2,3} <i>Meyerozyma guilliermondii</i>	18	14	6	2
¹ <i>Pichia kudriavzevii</i>	-	1	-	-
^{1,2} <i>Sugiyamaella smithiae</i>	6	5	-	-
³ <i>Sugiyamaella sp.</i>	1	-	-	-
² <i>Trichosporon asahii</i>	-	-	2	3
² <i>Trichosporon dermatis</i>	-	-	-	1
³ <i>Trichosporon laibachii</i>	-	-	-	1
^{2,3} <i>Trichosporon loubieri</i>	-	-	3	15

Tabela 3: Continuação

¹ <i>Trichosporon mucoides</i>	-	2	-	-
^{1,2,3} <i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	19	34	2	4
³ <i>Trichosporon</i> sp.	-	1	-	-
^{1,2} <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	2	3	-	-
^{1,2} <i>Zygoascus hellenicus</i>	2	-	2	-
² <i>Zygoascus meyeræ</i>	-	1	-	-

¹Ocorrência nas amostras obtidas em Minas Gerais

²Ocorrência nas amostras obtidas São Paulo

³Ocorrência nas amostras obtidas na Paraíba

Algumas leveduras isoladas neste trabalho apresentaram três ou mais diferenças nucleotídicas não contíguas nos domínios D1/D2 e ITS do gene do rRNA quando comparadas com espécies conhecidas relacionadas. Esses isolados podem representar novas espécies de leveduras ainda não descritas (tabela 4). De acordo com Kurtzman et al. (2011a), isolados da mesma espécie usualmente apresentam no máximo duas diferenças nucleotídicas na região D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA. Nesse contexto, três novas espécies foram encontradas. Um isolado identificado como *Lindnera* sp. (isolado UFMG TX37) pode representar uma nova espécie pertencente ao gênero *Lindnera*. Esta espécie apresenta sequências na região D1/D2 do gene do rRNA idênticas a *Candida* sp. UFMG-HMD-7.2 (número de acesso no GenBank JQ695900). Estes dois isolados foram relacionados filogeneticamente com *Lindnera japonica*. Essas leveduras diferem de *L. japonica* por seis substituições na sequência do domínio D1/D2. Em relação às sequências da região ITS, a nova espécie apresentou diferença de 71 substituições e 27 *gaps* com a espécie *L. fabianii* (número de acesso no GenBank HQ651909). O isolado UFMG BX82-b foi identificado como *Sugiyamaella* sp. Este isolado apresenta sequência idêntica a *Candida* sp. A6-2 (número de acesso AB557760), espécie sem descrição formal publicada, e ambas foram filogeneticamente relacionadas como *S. lignohabitans*. Essas leveduras diferem de *S. lignohabitans* por 48 substituições na sequência do D1/D2 e 13 *gaps*. Em relação ao sequenciamento da região ITS, a

espécie apresentou 70 substituições e 18 *gaps* em relação à espécie *Candida* (*Sugiyamaella*) *lignohabitans* (ATCC MYA-4663 – número de acesso HM208608). *Trichosporon* sp. (isolado UFMG BH96-b) apresenta 98% de identidade com *T. mycotoxinivorans* (número de acesso JQ266O92) diferindo desta espécie por 10 substituições nucleotídicas na região ITS e um *gap*. A nova espécie difere de *T. mycotoxinivorans* UOA/HCPF:13878 (número de acesso JX111953) por 5 substituições na sequência do D1/D2 e 1 *gap*.

Tabela 4: Identificação das espécies novas com base nas sequências do domínio D1/D2 da subunidade maior do gene do rRNA.

Código	Resultado da pesquisa Blast (número acesso GenBank)	Identidade (%)	Pares de base analisados	Espécie proposta
UFMG TX37	<i>Candida</i> sp. UFMG-HMD-7.2 (JQ695900)	100	582	<i>Lindnera</i> sp.
UFMG BX82-b	<i>Candida</i> sp. A6-2 (AB557760)	100	564	<i>Sugiyamaella</i> sp.
UFMG BH96-b	<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i> UOA/HCPF:13878 (JX111953)	99	536	<i>Trichosporon</i> sp.

Os dados obtidos mostram uma aparente diferença na ocorrência de leveduras, tendo em vista o substrato e o meio de cultivo, em relação à região geográfica. A avaliação da diversidade de táxons obtidos neste trabalho foi feita por meio dos cálculos dos índices de diversidade de Fisher-alfa, Margalef e Simpson, a partir do total de 450 isolados. Os índices de Fisher e de Margalef atribuem valores para diversidade e riqueza de espécies, respectivamente. Os valores dos índices são mostrados nas tabelas 5 e 6. Pôde-se observar que em relação ao índice de Fisher-

alfa, avaliando-se as amostras de bagaço, que os maiores valores foram obtidos nos meios com xilana. O mesmo ocorreu quando se avaliou as amostras de torta, onde a partir do meio com xilana, os maiores valores para este índice foram obtidos. Isso indica que para os substratos analisados, o meio com xilana apresentou uma maior diversidade de leveduras, quando comparado com o meio à base de xilose. Os valores encontrados podem ser explicados, uma vez que o índice de Fisher atribui maior peso a diversidade de espécies e esses dados corroboram o fato do maior número de espécies descritas neste trabalho (11) ter sido obtido a partir do meio com xilana. O maior valor para o índice de Fisher foi obtido a partir de torta de filtros/xilana coletadas na Paraíba (7,82), indicando uma maior diversidade de leveduras a partir deste substrato nesta região.

Em relação ao índice de Margalef, o maior valor (2,58) foi obtido para o bagaço inoculado em meio de xilana na região de Minas Gerais. Entretanto, para as regiões de São Paulo e Paraíba, os maiores valores deste índice foram obtidos para o meio de xilose (1,74 e 1,75, respectivamente), quando avaliadas as amostras de bagaço. Já para torta de filtros, o meio de xilana foi mais adequado para se obter uma maior diversidade em São Paulo e na Paraíba, indicados pelos maiores valores para o índice de riqueza de Margalef (2,42 e 2,06 respectivamente).

O índice de Simpson, utilizado para avaliar a dominância de espécies, indica a probabilidade de dois indivíduos retirados ao acaso da comunidade pertencerem a espécies diferentes, atribuindo assim maior peso para a equitabilidade do que para dominância. Portanto, os maiores valores (próximos a 1) indicam maior diversidade e equitabilidade. O menores valores (próximos a 0) indicam maior dominância. Para as regiões de Minas Gerais e São Paulo, considerando-se o bagaço de cana, o meio com xilana foi o mais adequado para se obter uma menor dominância e maior diversidade de espécies, já que os maiores valores do índice de Simpson (0,82 e 0,75) foram obtidos a partir deste meio. Esses dados são semelhantes quando comparados aos índices de Fisher. Porém, para a região da Paraíba, o maior valor foi obtido a partir do meio com xilose (0,79), assim como o obtido pelo índice de Fisher, mostrando maior valor em xilose (2,57). Para as amostras de torta de filtros, a menor dominância e maior diversidade de espécies, também foram observadas a partir do meio com xilana, em São Paulo e na Paraíba, regiões onde este substrato foi obtido. Resultados semelhantes foram obtidos pelos índices de Fisher e Margalef, mostrando que houve uma distribuição mais homogênea das espécies (equitabilidade) obtidas nestas regiões.

O número total de leveduras obtidas neste trabalho foi usado também para calcular os índices de Fisher, Margalef e Simpson, somente para os meios e para os substratos, sem levar em consideração as regiões amostradas (tabela 7). Os resultados dos cálculos dos três índices mostram uma maior diversidade de espécies no meio de xilana e a partir das amostras de bagaço de cana. Entretanto, vale lembrar que um maior número de amostras de bagaço foram obtidos (100 amostras de bagaço; 60 amostras de torta) e isso pode ter interferido no cálculo dos índices de diversidade de espécies.

Tabela 5: Valores dos índices de diversidade de leveduras isoladas de bagaço de cana e torta de filtros a partir do meio YNB-Xilana, nas regiões amostradas.

Índice	YNB-Xilana-Bagaço			YNB-Xilana-Torta	
	MG**	SP**	PB**	SP**	PB**
<i>Simpson</i>	0,82 (0,75-0,85)*	0,75 (0,61-0,81)*	0,67 (0,54-0,74)*	0,71 (0,61-0,78)*	0,78 (0,45-0,78)*
<i>Margalef</i>	2,58 (1,64-2,58)*	1,67 (1,12-1,67)*	1,47 (0,59-1,47)*	2,42 (1,45-2,42)*	2,06 (0,51-2,06)*
<i>Fisher-alfa</i>	4,14 (2,32-4,14)*	2,59 (1,33-2,59)*	2,26 (0,83-2,26)*	3,89 (2,03-3,89)*	7,82 (0,94-7,82)*

*Intervalos de 95% de confiabilidade.

**Minas Gerais (MG); São Paulo (SP); Paraíba (PB).

Tabela 6: Valores dos índices de diversidade de leveduras isoladas de bagaço de cana e torta de filtros a partir do meio YNB-Xilose, nas regiões amostradas.

Índice	YNB-Xilose-Bagaço			YNB-Xilose-Torta	
	MG**	SP**	PB**	SP**	PB**
<i>Simpson</i>	0,56 (0,42-0,67)*	0,65 (0,50-0,74)*	0,79 (0,72-0,82)*	0,62 (0,46-0,74)*	0
<i>Margalef</i>	1,18 (0,71-1,18)*	1,74 (0,99-1,74)*	1,75 (1,25-1,75)*	2,26 (1,50-2,26)*	0
<i>Fisher-alfa</i>	1,57 (0,92-1,57)*	2,55 (1,58-2,55)*	2,57 (1,75-2,57)*	3,61 (2,14-3,61)*	0,53

*Intervalos de 95% de confiabilidade.

**Minas Gerais (MG); São Paulo (SP); Paraíba (PB).

Tabela 7: Diversidade de leveduras obtidas a partir dos meios YNB-Xilose e YNB-Xilana e a partir do bagaço de cana e torta de filtros.

Índices	YNB-Xilose	YNB-Xilana	Bagaço de cana	Torta de filtros
<i>Simpson</i>	0,70 (0,64-0,75)*	0,83 (0,79-0,85)*	0,77 (0,74-0,80)*	0,73 (0,64-0,79)*
<i>Margalef</i>	2,93 (2,01-2,93)*	4,12 (2,81-3,93)*	3,64 (2,60-3,47)*	2,9 (2,07-2,9)*
<i>Fisher-alfa</i>	4,20 (2,67-4,20)*	6,61 (4,04-6,22)*	5,36 (3,55-5,05)*	4,45 (2,91-4,45)*

*Intervalos de 95% de confiabilidade.

A similaridade entre as comunidades de leveduras nas três regiões, a partir dos dois meios de cultivo e os dois substratos de isolamento foi avaliada utilizando-se o coeficiente de Sorensen (figura 5). Tendo em vista tal coeficiente, a composição das comunidades de leveduras mostrou-se variada. Houve uma maior similaridade entre as espécies obtidas em xilose, para as amostras de bagaço coletadas em Minas Gerais e na Paraíba. Pôde-se observar semelhança também entre a comunidade de leveduras obtida a partir das amostras de bagaço coletadas em São Paulo e entre as amostras de torta de filtros obtidas também em São Paulo. Diferente dos resultados obtidos quando calculados os índices de diversidade, o coeficiente de Sorensen mostrou que, as espécies encontradas no presente trabalho tiveram distribuição similar entre os dois meios de cultivo utilizados. O mesmo foi observado por Moraes et al. (2013b). Os autores verificaram similaridade entre a distribuição de espécies isoladas a partir de madeira em decomposição utilizando meios YNB-Xilose e YNB-Xilana, quando analisado este coeficiente de similaridade. Tal fato pode confirmar que os meios sejam igualmente adequados para o isolamento de leveduras assimiladoras de xilose a partir de substratos vegetais. O coeficiente de Sorensen mostrou também, similaridade entre a diversidade de leveduras encontradas no bagaço de cana e na torta de filtros amostrados em São Paulo.

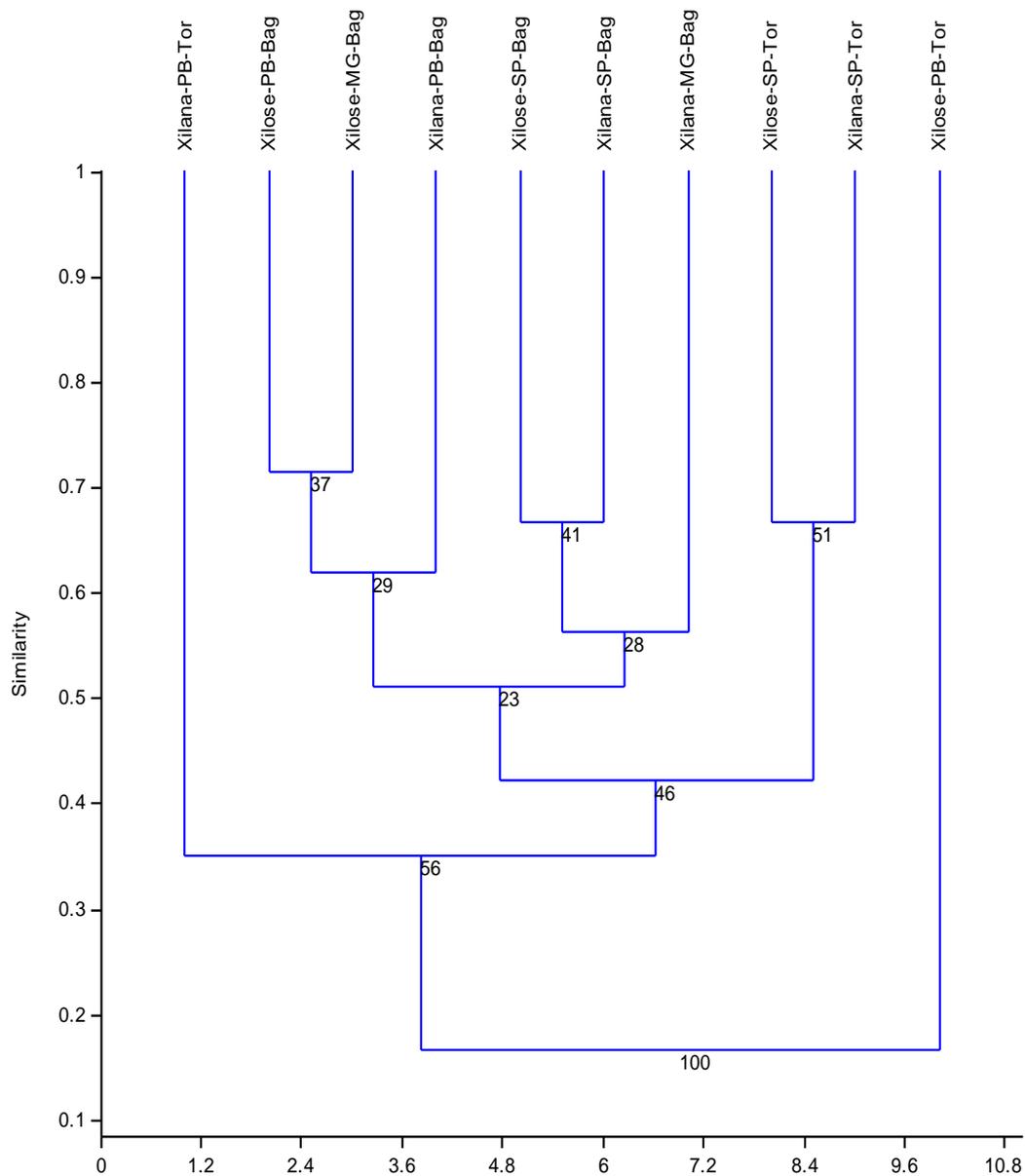
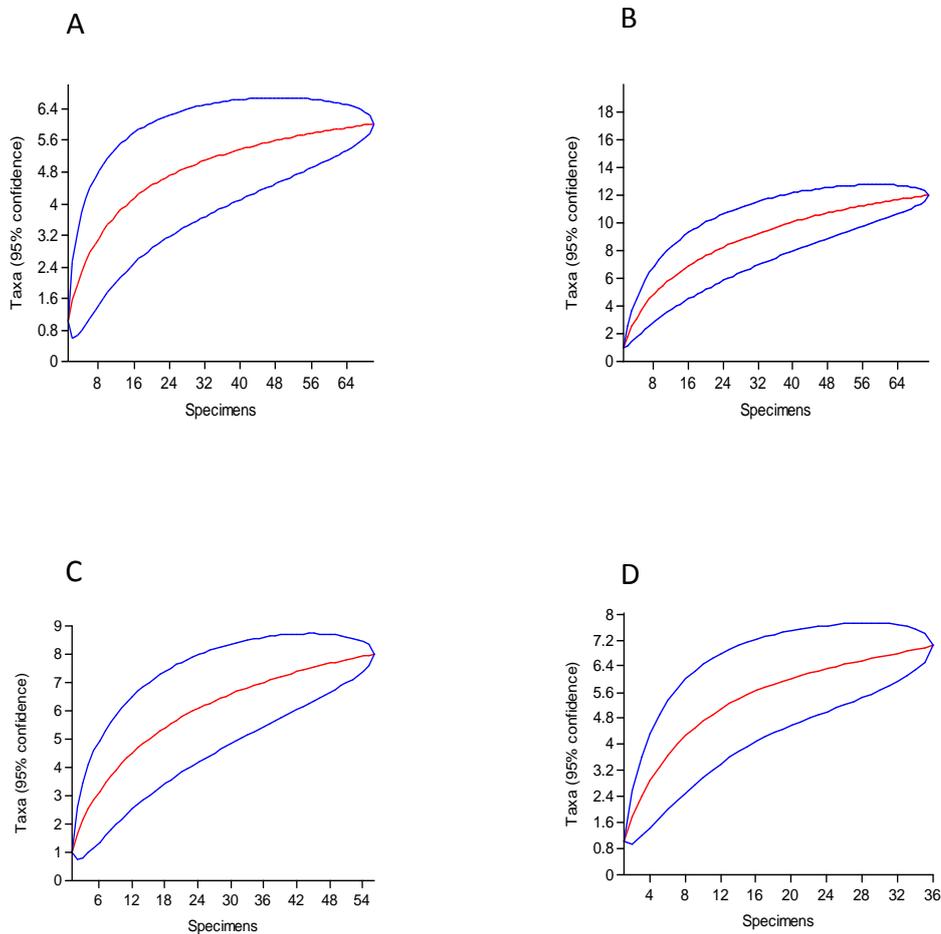


Figura 5: Dendrograma do coeficiente de Sorensen para avaliação da similaridade entre as leveduras obtidas - Xilana-PB-torta: torta de filtros coletada na Paraíba e inoculada em YNB-xilana; Xilose-PB-bag: bagaço de cana coletado na Paraíba e inoculado em xilose; Xilose-MG-bagaço: bagaço de cana coletado em Minas Gerais e inoculado em xilose; Xilana-PB-bag: bagaço de cana coletado na Paraíba e inoculado em xilana; Xilose-SP-bag: bagaço coletado em São Paulo e inoculado em xilose; Xilana-SP-bag: bagaço coletado em São Paulo e inoculado em xilana; Xilana-MG-bag: bagaço coletado em Minas Gerais e inoculado em xilana; Xilose-SP-torta: torta de filtros coletada em São Paulo e inoculado em xilose; Xilana-SP-torta: Torta de filtros coletada em São Paulo e inoculada em xilana; Xilose-PB-torta: torta de filtros coletada na Paraíba e inoculada em xilose.

De acordo com as curvas de rarefação (figura 6), pode-se observar que para os estados de Minas Gerais e São Paulo, as linhas tendem a estabilizar. Isso indica que a amostragem foi adequada para se inferir a cerca da diversidade de espécies associadas com o bagaço de cana e torta de filtros, com a metodologia empregada. Assim, possivelmente a diversidade de leveduras assimiladoras de xilose proveniente dos substratos amostrados foi identificada nessas regiões. O mesmo ocorreu para as amostras de bagaço de cana obtidas na Paraíba. Diferentemente, a curva de refração que representa as amostras de torta de filtros e meio de xilana, para as coletas realizadas na Paraíba (Figura 6 - I), mostram uma tendência a não estabilização. Isso indica que a diversidade de leveduras não foi suficientemente amostrada nessa região. Para xilose/torta/Paraíba, o número de isolados obtidos a partir da amostragem não foi suficiente para gerar curva de rarefração.



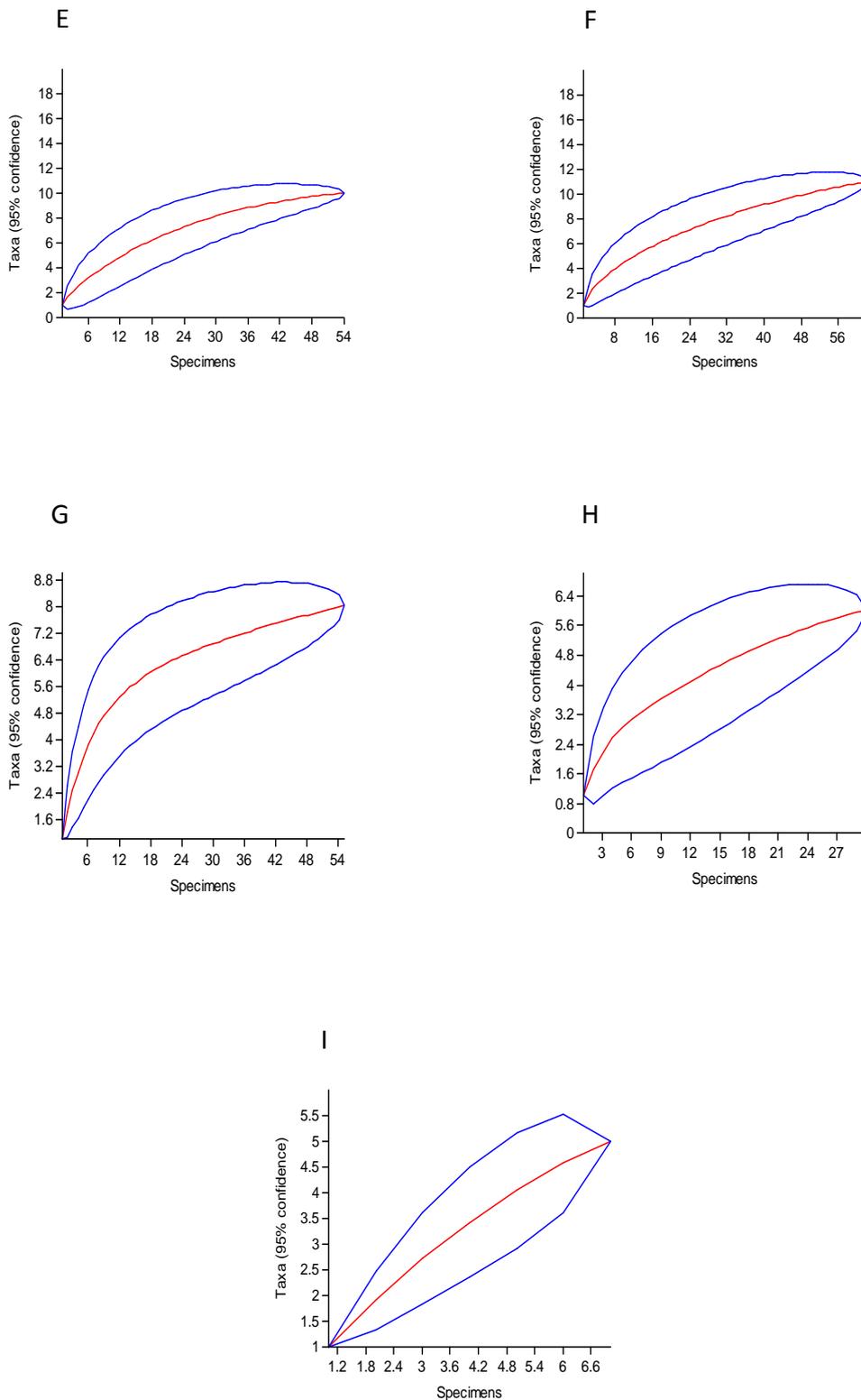


Figura 6: Amostragem e acumulação de espécies: (A) YNB-xilose-Bagaço-Minas Gerais (MG); (B) YNB-xilana-B G Mina Gerais (MG); (C) YNB-xilose-Bagaço-São Paulo (SP); (D) YNB-xilana-Bagaço-São Paulo (SP); (E) YNB-xilose-Torta-São Paulo (SP); (F) YNB-xilana-Torta-São Paulo (SP); (G) YNB-xilose-Bagaço-Paraíba; (H) YNB-xilana-Bagaço-Paraíba (PB); (I) YNB-xilana-Torta-Paraíba. Eixo Y (95% de confiabilidade).

5.3- Triagem de leveduras fermentadoras de D-xilose

Os 450 isolados obtidos neste trabalho foram avaliados quanto à fermentação de D-xilose no teste de triagem em tubos de ensaio. Sob as condições empregadas no presente trabalho, vinte isolados foram capazes de fermentar xilose e produzir xilitol e outros dez isolados foram capazes de produzir etanol, mesmo que em pequenas concentrações. A tabela 8 mostra as espécies positivas para o teste e os resultados referentes ao consumo de xilose, produção de xilitol e etanol obtidos.

As leveduras positivas quanto a produção de xilitol encontradas neste trabalho, foram isoladas de amostras de bagaço de cana, sendo: seis linhagens de *Candida tropicalis* (UFMG BX2-a, UFMG BX12-a, UFMG BX15, UFMG BH3, UFMG BX16-a, UFMG BX5-c), duas linhagens de *Lindnera bimundalis* (UFMG BX21-a e UFMG BH35-b), uma linhagem de *Sugiyamaella smithiae* (UFMG BH35-a) e a linhagem *Zygoascus meyeri* (UFMG BH72). Dentre as linhagens de *C. tropicalis*, duas (UFMG BX2-a e UFMG BX12-a) produziram as maiores concentrações de xilitol (12 e 14 g.L⁻¹, respectivamente). Em relação a produção de etanol, sete linhagens de *C. tropicalis* (UFMG BX8, UFMG BX28-a, UFMG BX21-b, UFMG BH27, UFMG TX33, UFMG TX24, UFMG TX19) e três de *Candida tartarivorans* (UFMG BH55-c, UFMG BX95-a, UFMG BH89-a) apresentaram essa característica fisiológica.

Em relação às espécies já descritas como naturais fermentadoras de xilose com produção de xilitol, destacam-se *C. boidinii*, *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* (PRAKASHAM et al., 2009). Atualmente, *C. tropicalis* figura como a principal espécie produtora de xilitol, sendo a levedura mais pesquisada em estudos que objetivam uma melhor compreensão das vias metabólicas envolvidas no processo de bioconversão da xilose a xilitol (da SILVA e AFSCHEER, 1994; CHOI et al., 2000; KO et al., 2006; MISRA et al., 2011). Relatos de estudos quanto a produção de xilitol pelas demais espécies citadas no presente trabalho como produtoras deste poliálcool são ainda desconhecidos. Porém, a otimização das melhores condições de aeração para a realização de experimentos para as diferentes leveduras faz-se necessária, visando uma melhor avaliação do metabolismo e da aplicação destes micro-organismos em processos biotecnológicos para produção desse poliálcool.

Candida tropicalis tem sido relatada como produtora de xilitol e etanol, a partir da fermentação de meio de D-xilose e hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos. Barbosa et al. (1988) testaram diferentes linhagens de leveduras quanto à fermentação de xilose e observaram que pequenas concentrações de etanol haviam sido produzidas (entre 1,1 e 2,0 g.L⁻¹) pelas linhagens de *C. tropicalis* testadas.

Sánchez et al. (2008) também mostraram produção de etanol pela linhagem de *C. tropicalis* NBRC 0618, a partir de xilose.

Um pequeno número de leveduras fermentadoras de D-xilose e produtoras de etanol e/ou xilitol foi descrito neste estudo, no entanto esses dados foram similares ao encontrado em outros trabalhos. Quanto à produção de etanol, Cadete (2009), testou 312 leveduras isoladas de madeira em decomposição quanto à fermentação de xilose. A autora relatou que 22 isolados converteram xilose a etanol. Em relação à produção de xilitol, Rao et al. (2007), isolaram 35 leveduras de intestino de besouros e testaram estas quanto a fermentação de xilose. Os autores mostraram que somente 12 leveduras converteram xilose a xilitol. Misra et al. (2011) obtiveram 115 isolados de flores de Hibiscus e desse total apenas 10 isolados foram capazes de produzir xilitol. Esses resultados podem estar relacionados às diferentes metodologia de isolamento empregadas nos estudos, bem como às características metabólicas das leveduras.

No metabolismo da D-xilose, esta pentose é reduzida a xilitol pela xilose redutase (XR) NADPH ou NADH-dependente, e o xilitol é oxidado a xilulose pela xilose desidrogenase (XDH) NAD⁺-dependente. A regeneração dos cofatores encontra-se fortemente relacionada à disponibilidade de oxigênio, e caso essa disponibilidade não seja verificada de forma ideal, o desbalanço redox pode ser observado. Isto interfere diretamente na produção de xilitol e dos demais subprodutos do metabolismo. De modo geral, a regeneração do cofator NADPH para a atividade da xilose redutase (XR) ocorre na via oxidativa da pentose fosfato e a regeneração do NAD⁺ ocorre, geralmente, na cadeia respiratória, tendo o oxigênio como acceptor final de elétrons. Desta forma, sob condições limitadas de oxigênio não há regeneração de NAD⁺, a atividade de XDH NAD⁺-dependente fica inibida e o acúmulo de xilitol é favorecido. Sendo assim, estas condições seriam ideais para a geração desse produto intermediário do metabolismo da xilose (BRUINENBERG et al., 1983). Entretanto, uma concentração ideal de oxigênio é exigida para geração de ATP e de co-fatores. Teoricamente essa concentração ótima de oxigênio é variada para diferentes linhagens de leveduras e se relaciona diretamente com a produtividade em xilitol. Por outro lado, um aumento na taxa de transferência de oxigênio permite a otimização do consumo de xilose com produção de biomassa celular ou etanol (GRANSTRÖM, 2002). Algumas leveduras podem expressar XR (xilose redutase) dual, que apresenta afinidade tanto por NADPH como por NADH, podendo utilizar um dos dois como cofatores. Quando isso acontece, a enzima reoxida NAD⁺, ao utilizar NADH, o que favorece a ação de XDH NAD⁺-dependente e conseqüentemente a produção de

etanol (GRANSTRÖM, 2002). Gírio et al. (1994) afirmam que leveduras que abrigam XR estritamente dependente de NADPH, como as espécies *D. hansenii* e *C. guilliermondii*, produzem xilitol como principal produto da fermentação de xilose sob condições de limitação de oxigênio. De acordo com Granstrom (2002), linhagens de *C. tropicalis* podem expressar atividade de XR dual, duplamente dependente de NADPH e de NADH, evidenciada pela produção de etanol, sob condições microaeróbicas de fermentação de xilose. Entretanto, a maioria dos estudos realizados para a avaliação das atividades enzimáticas de várias espécies e linhagens de leveduras, mostrou que XR tem uma preferência maior ou mesmo absoluta por NADPH (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

Tendo em vista os dados acima, relacionados com a teoria da fermentação de D-xilose, o número de leveduras produtoras de xilitol ou etanol obtido neste trabalho pode estar relacionado a três hipóteses. I) Pode-se inferir que as condições de aeração não tenham sido adequadas, e tenham favorecido a produção de biomassa, visto que grandes concentrações de xilose foram consumidas até o final do experimento (aproximadamente 70% com até 96 horas) pela maioria dos isolados, apesar da produção de etanol ou xilitol ter sido baixa. A aeração é considerada um fator de grande influência na fermentação de xilose, uma vez que determina a divisão do fluxo de carbono entre o crescimento do micro-organismo e a formação de produtos da via fermentativa (du PREEZ, 1994). No trabalho realizado por Cadete et al. (2012a), linhagens de duas novas espécies de levedura fermentadoras de xilose [*Spathaspora* sp.1 e *Spathaspora* sp. 2 – descritas posteriormente como *S. suhii* e *S. roraimanensis*, respectivamente (Cadete et al., 2013)] apresentaram um alto consumo de xilose (aproximadamente 90% de xilose com até 48 horas de experimento), quando submetidas a ensaios de fermentação de xilose sob condições microaeróbicas. Entretanto, essas linhagens produziram altas concentrações de etanol e/ou xilitol e baixa concentração de células. Os autores inferiram que as leveduras tenham desviado o consumo da xilose para a produção dos subprodutos da fermentação (etanol/xilitol) e não para o aumento de células. Isso indica que a exigência em termos de disponibilidade de oxigênio seja variada entre as diferentes leveduras, o que pode direcionar o metabolismo das mesmas. II) Pode ser que as leveduras produtoras de xilitol obtidas neste trabalho sejam XR dependente de NADP, e por não utilizarem NADH, não regeneram NAD⁺. Neste caso a produção deste poliol foi favorecida. III) Por outro lado, as leveduras que produziram etanol podem ser consideradas XR dual, podendo oxidar NADH a NAD⁺, favorecendo a atividade de XDH e produção de etanol. Além disso, pode-se considerar uma quarta hipótese para o isolamento de

poucas leveduras tidas como fermentadoras de D-xilose: os substratos amostrados podem não ser uma boa fonte de leveduras com essa característica metabólica, visto que se trata de substratos efêmeros, e que o tempo de decomposição não seja suficiente para o propiciar o estabelecimento destas leveduras.

Tabela 8: Consumo de D-xilose, produção de xilitol e etanol pelas espécies de leveduras avaliadas no teste triagem.

Espécie	Consumo de xilose (%)	Produção de xilitol (g.L⁻¹)	Produção de etanol (g.L⁻¹)
<i>Blastobotrys adenivorans</i>	74	<1,0	<1,0
<i>Candida blankii</i>	70-80*	<1,0	<1,0
<i>Candida butyri</i>	60-62*	<1,0	<1,0
<i>Candida intermedia</i>	65-68*	<1,0	<1,0
<i>Candida stellimalicola</i>	70-80*	<1,0	<1,0
<i>Candida tartarivorans</i>	50-60*	<1,0	1,2 – 2,3*
<i>Candida tropicalis</i>	75-85*	1,0 – 14,0*	2,0 – 2,9*
<i>Cryptococcus laurentii</i>	3-10*	<1,0	<1,0
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	18	<1,0	<1,0
<i>Lindnera bimundalis</i>	70-75*	7,0 -11,0*	<1,0
<i>Lindnera fabianii</i>	10	<1,0	<1,0
<i>Lindnera sp.</i>	80	<1,0	<1,0
<i>Meyerozyma caribbica</i>	70-80*	<1,0	<1,0
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	70-80*	<1,0	<1,0
<i>Pichia kudriavzevii</i>	10	<1,0	<1,0
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	60-75*	10,0	<1,0
<i>Sugiyamaella sp.</i>	75	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon asahii</i>	50-60*	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon dermatis</i>	10	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon laibachii</i>	30	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon loubieri</i>	60-80*	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon mucoides</i>	60-80*	<1,0	<1,0
<i>Trichosporon mycotoxinivorans</i>	70-85*	<1,0	<1,0

Tabela 8: Continuação

<i>Trichosporon</i> sp.	10	<1,0	<1,0
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	60-70*	<1,0	<1,0
<i>Zygoascus hellenicus</i>	60-70*	<1,0	<1,0
<i>Zygoascus meyeræ</i>	70	9,0	<1,0

*Intervalos entre os valores mínimos e máximos obtidos pelas linhagens

5.4- Ensaio fermentativo com meios complexos a base de D-xilose

Com base na triagem descrita acima, as linhagens que apresentaram produção de xilitol foram selecionadas para serem testadas em ensaios em escala de bancada. Estas foram duas linhagens de *C. tropicalis* (UFMG BX2-a e UFMG BX12-a – que produziram as maiores concentrações de xilitol) e as outras quatro linhagens das demais espécies positivas no teste. Primeiramente, foi realizado um ensaio no intuito de se definir qual meio de xilose seria o mais adequado para a obtenção de maiores concentrações de xilitol. De acordo com Ferreira et al. (2011), a dependência nutricional varia fortemente de acordo com o gênero e espécie do micro-organismo utilizado, e mesmo por linhagens da mesma espécie, e isso pode interferir na eficiência de conversão da xilose a xilitol pela levedura testada. No presente trabalho, pôde-se observar que o meio 1 (suplementado com extrato de farelo de arroz) foi o mais adequado, já que as leveduras mostraram uma melhor adaptação neste meio, evidenciada pelos maiores valores de xilitol e consumo de xilose, com exceção da linhagem de *Z. meyeræ* que produziu mais xilitol a partir do meio 2 (YPX). Sendo assim, o meio 1 foi escolhido como o meio complexo a base de xilose para a realização dos demais ensaios fermentativos.

Os valores de concentração de xilose, xilitol, etanol e ácido acético obtidos para os dois meios de cultivo testados são mostrados nas tabelas 9 e 10. Além da aeração, outros fatores, como os constituintes dos meios de fermentação, interferem diretamente com a biossíntese de xilitol por leveduras fermentadoras de xilose. Os processos metabólicos demandam vários íons inorgânicos, como Ca⁺⁺, K⁺ e Mg⁺⁺ para a geração de metabólitos e biomassa celular. Além disso, esses íons participam de reações enzimáticas e biossintéticas. Normalmente faz-se necessária a suplementação do meio de xilose com extrato de levedura, peptona e extrato de malte,

que estimulam o crescimento celular por serem fontes de vitaminas e aminoácidos (SILVA et al.,1998). Para muitas leveduras, o extrato de levedura é um nutriente importante para produção de xilitol. Outras leveduras, no entanto, utilizam preferencialmente uréia e aminoácidos para produção deste poliol (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Diferentes fontes de nitrogênio têm sido utilizadas como suplemento em ensaios visando a produção do xilitol, como sulfato de amônio e extrato de farelo de arroz (MEYRIAL et al., 1991; MAYERHOFF et al., 1997; SILVA e ROBERTO, 2001; RAO et al., 2006; CARVALHO et al., 2007; RAO et al., 2007; ARRUDA e FELIPE, 2009), embora a produção de xilitol já tenha sido verificada em ensaios suplementados apenas com extrato de levedura e peptona (CADETE et al., 2012a).

No presente trabalho, pôde-se observar que o meio 1 foi o mais adequado, já que as leveduras cresceram melhor neste meio, fato evidenciado pelos maiores valores de xilitol e consumo de xilose. A única exceção foi a linhagem de *Z. meyeræ* que produziu mais xilitol a partir do meio 2. Sendo assim, o meio 1 foi escolhido para a realização do ensaio fermentativo em escala de bancada.

Tabela 9: Consumo de D-xilose, produção de xilitol, etanol e ácido acético a partir do meio 1*, com 24 horas de experimento.

Espécie	Linhagem	Consumo de xilose (%)	Produção de xilitol (g.L ⁻¹)	Produção de etanol (g.L ⁻¹)	Produção de ácido acético (g.L ⁻¹)
<i>Candida tropicalis</i>	UFMG BX2-a	63	12,8	0,53	0,02
<i>Candida tropicalis</i>	UFMG BX12-a	77	12,37	0,65	0,07
<i>Lindnera bimundalis</i>	UFMG BX21-a	69	10,31	0,84	0,09
<i>Lindnera bimundalis</i>	UFMG BH35-b	68	10,51	0,78	0,06
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	UFMG BH35-a	69	9,42	0,62	0,02
<i>Zygoascos meyeriae</i>	UFMG BH72	50	4,39	0,02	0,02

* Meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz - D-xilose (30 g.L⁻¹), extrato de farelo de arroz (20 g.L⁻¹), sulfato de amônio (2 g.L⁻¹) e cloreto de cálcio (0,1 g.L⁻¹).

Tabela10: Consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e ácido acético a partir do meio 2, com 24 horas de experimento*.

Espécie	Linhagem	Consumo de xilose (%)	Produção de xilitol (g.L ⁻¹)	Produção de etanol (g.L ⁻¹)	Produção de ácido acético (g.L ⁻¹)
<i>Candida tropicalis</i>	UFMG BX2-a	61	9,74	0,52	0,03
<i>Candida tropicalis</i>	UFMG BX12-a	62	10,09	0,24	0,56
<i>Lindnera bimundalis</i>	UFMG BX21-a	63	10,14	0,66	0,69
<i>Lindnera bimundalis</i>	UFMG BH35-b	64	9,53	0,15	0,69
<i>Sugiyamaella smithiae</i>	UFMG BH35-a	58	6,83	0,22	0,64
<i>Zygoascos meyeriae</i>	UFMG BH72	37	5,91	0,04	0,52

* Meio YPX – meio de D-xilose suplementado com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹) e D-xilose (30 g.L⁻¹).

5.5- Ensaio fermentativo de D-xilose em escala de bancada

As linhagens selecionadas foram testadas quanto à fermentação de xilose e produção de xilitol em ensaios realizados em frascos Erlenmeyers contendo 100 mL de meio composto contendo 50 g.L⁻¹ de xilose, suplementado com extrato de farelo de arroz, sulfato de amônio e cloreto de cálcio. A bioconversão da xilose a xilitol por leveduras é regulada por diferentes fatores, como a concentração inicial de xilose. De acordo com Silva e Afschar (1994), elevadas concentrações de xilose exercem uma pressão osmótica que pode interferir com a produção de xilitol. Os autores mostraram que a produtividade específica máxima para *C. tropicalis* foi alcançada em concentração inicial de xilose de 50 g.L⁻¹. Os autores mostraram ainda que a conversão de D-xilose em xilitol ocorreu muito mais rapidamente nessa concentração de açúcar do que em outras concentrações testadas. Estudos feitos por Felipe et al. (1997), utilizando linhagem de *C. guilliermondii*, corroboraram esses dados. Portanto, essa foi a concentração de xilose utilizada no presente estudo.

Os parâmetros fermentativos Y_{p/s} (g.g⁻¹ - fator de conversão de xilose a xilitol), Q_p (g.L⁻¹ - produtividade em xilitol), η (% - eficiência de fermentação) e as concentrações de xilitol foram calculados de acordo com o tempo de máxima produção de xilitol para cada linhagem ou tempo de término do ensaio. Os resultados dos parâmetros fermentativos, concentração de xilitol e etanol (g.L⁻¹) estão sumarizados na tabela 11. O acompanhamento do consumo de xilose, produção de células e produção de xilitol ao longo da fermentação encontra-se representado na figura 7.

Quanto aos parâmetros fermentativos, a linhagem de *S. smithiae* UFMG BH35-a, apresentou o melhor rendimento e eficiência de fermentação (0,78 g.g⁻¹ e 85% respectivamente) e produtividade de 0,59 g.L⁻¹, dentre as leveduras testadas. O rendimento teórico de conversão de xilose a xilitol consiste em 0,917 g de xilitol .g⁻¹ de xilose (MUSSATO e ROBERTO, 2004). *Candida guilliermondii* FTI 20037, linhagem frequentemente investigada quanto a produção de xilitol, apresentou rendimento de 0,74 g.g⁻¹ no trabalho realizado por Arruda e Felipe (2009). Sendo assim, o rendimento em xilitol obtido pela linhagem *S. smithiae* UFMG BH35-a, pode ser considerado promissor. As linhagens de *C. tropicalis* UFMG BX2-a e UFMG BX12-a apresentaram, respectivamente, rendimento de 0,69 e 0,68 g.g⁻¹, produtividade de 0,58 e 0,56 g.L⁻¹ e eficiência de fermentação de 76,5 e 75,5%. Esses resultados foram muito próximos, mostrando semelhança no perfil metabólico de xilose para essas leveduras. O mesmo ocorreu para as linhagens de *L. bimundalis* UFMG BH35-b e UFMG BX21-a. Ambas

apresentaram rendimento de $0,75 \text{ g.g}^{-1}$ e eficiência de fermentação de cerca de 82%. Entretanto, a linhagem UFMG BH35-b apresentou melhor produtividade em xilitol ($0,60 \text{ g.L}^{-1}$), resultado este, maior também do que os obtidos pelas demais linhagens testadas. Os menores resultados dos cálculos dos parâmetros fermentativos foram obtidos pela linhagem de *Z. meyeræ* UFMG BH72, que apresentou rendimento, produtividade e eficiência de fermentação de $0,48 \text{ g.g}^{-1}$, $0,22 \text{ g.L}^{-1}$ e 53,3%, respectivamente. Os valores dos parâmetros fermentativos obtidos para as linhagens *S. smithiae* UFMG BH35-a, *L. bimundalis* UFMG BH35-b e UFMG BX21-a foram superiores aos obtidos pelas linhagens de *C. tropicalis*, levedura comumente pesquisada e testada quanto a bioconversão de xilose a xilitol, embora não exista até o momento, relatos sobre a produção de xilitol por estas duas espécies isoladas no presente trabalho. Entretanto, outras espécies de leveduras têm sido descritas como produtoras de xilitol. Cadete et al. (2012a) relataram a nova espécie *Candida amazonensis* como produtora de xilitol em meio contendo D-xilose (50 g.L^{-1}) suplementado com extrato de levedura e peptona. As linhagens da nova espécie apresentaram rendimento de 0,62 e 0,67 g/g. Burneo (2013), testando diferentes espécies de leveduras isoladas de madeira em decomposição quanto a produção de xilitol, relatou uma nova espécie pertencente ao gênero *Lindnera* como produtora deste poliálcool, em ensaios fermentativos a partir de 50 g.L^{-1} de xilose. A linhagem *Lindnera* sp. CLQCA-24SC-025 apresentou rendimento, produtividade e eficiência de fermentação de $0,5 \text{ g.g}^{-1}$, $0,23 \text{ g.L}^{-1}$ e 55,5%, respectivamente. Os dados obtidos para as linhagens testadas no presente trabalho sugerem que estas leveduras apresentem potencial para a produção de xilitol, justificando pesquisas futuras para otimizar a produção deste poliálcool por estas linhagens.

Todas as linhagens testadas no presente trabalho consumiram D-xilose. As linhagens que apresentaram maior consumo desta pentose foram *C. tropicalis* UFMG BX2-a (100%), UFMG BX12-a (99,3%) seguidas de *L. bimundalis* UFMG BX21-a e *S. smithiae* UFMG BH35-a (99%), *L. bimundalis* UFMG BH35-b (98%) e *Z. meyeræ* UFMG BH72 (81%), com até 72 horas de crescimento. As linhagens apresentaram resultados promissores para a produção de xilitol tendo em vista as condições testadas. Com exceção da linhagem UFMG BH72 que produziu $15,9 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol com 72 horas, as demais linhagens produziram xilitol em concentrações que variaram entre 27,3 e $29,06 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 horas de experimento. De acordo com Ferreira et al. (2011), a baixa produção de xilitol pode ser apontada como uma importante característica da linhagem, uma vez que uma baixa concentração de xilitol pode estar associada com a formação de etanol. De fato, a linhagem de *Z. meyeræ* UFMG BH72

produziu a maior concentração de etanol (2,35 g.L⁻¹) até o final do experimento. Apesar desse valor ter sido baixo, foi superior ao obtido pelas demais linhagens testadas, que produziram concentrações de etanol menores que 1 g.L⁻¹.

Além de xilitol e etanol, o metabolismo da xilose pode gerar uma variedade de produtos, como ácido acético e glicerol. No entanto, esses produtos foram encontrados em concentrações próximas a zero (dados não mostrados). Associada ao consumo de xilose, está a produção de biomassa (células). Os valores encontrados para esse parâmetro variaram entre 4,0 a 8,0 g.L⁻¹. A baixa concentração de células observada para a linhagem UFMG BH72 está de acordo com o também baixo consumo de xilose (81,4%). No entanto, a associação entre baixo consumo de xilose com uma menor produção de biomassa não foi verificada pelas demais linhagens, cujo consumo de xilose foi de 98 a 100% enquanto a produção de células foi ainda assim, baixa (4,1 – 8,0 g.L⁻¹). Nesse caso, as leveduras utilizaram a xilose para a produção de xilitol. Igualmente, linhagens de *S. amazonensis*, apresentaram valores de consumo de xilose de 99% e baixa produção de células (cerca de 10 g.L⁻¹) (CADETE et al., 2012a).

Com relação à produção de xilitol, os resultados obtidos para as linhagens testadas podem ser considerados promissores, tendo em vista dados já relatados para linhagens de *C. tropicalis*, levedura que destaca-se atualmente como a principal produtora de xilitol (GONG et al., 1981; HORITSU et al., 1992; SILVA e AFSCCHAR, 1994; RAO et al., 2006; RAO et al., 2008). Sánchez et al. (2008) verificaram a produção de xilitol por uma linhagem de *C. tropicalis* (linhagem NBRC O618). A linhagem produziu 24 g.L⁻¹ de xilitol a partir de 25 g.L⁻¹ de xilose. Misra et al. (2011) testaram 18 espécies de leveduras isoladas de flores de *Hibiscus* quanto à produção de xilitol a partir de meio com 50 g.L⁻¹ de xilose. Dentre estes isolados, 10 foram selecionados como melhores produtores de xilitol e identificados como *C. tropicalis*. Os isolados produziram cerca de 12 g.L⁻¹ em 72 horas de experimento. Burneo (2013) também relatou uma linhagem de *C. tropicalis* como produtora de xilitol, a partir de 50 g.L⁻¹ de xilose. A linhagem identificada pela autora produziu 25,6 g.L⁻¹ de xilitol. A produção de xilitol por linhagens de *C. tropicalis* tem sido bem pesquisada, embora os parâmetros fermentativos ideais ainda não tenham sido bem estabelecidos. Além disso, *C. tropicalis* é relatada como patógeno oportunista, o que limita o uso dessa levedura em processos industriais que visem a geração de produtos para o consumo humano (GRANSTROM, 2002). Desta forma, pesquisas que visam a obtenção de

novas espécies de leveduras potencialmente utilizáveis na bioconversão do xilitol têm sido realizadas.

Rao et al. (2007) testaram 35 linhagens de leveduras quanto a fermentação de xilose utilizando meio YPX contendo 40 g.L^{-1} de xilose e verificaram que 12 linhagens produziram xilitol. A concentração máxima obtida pelos ensaios foi de 23 g.L^{-1} de xilitol com 72 horas de experimento. Entretanto, os autores não identificaram os isolados a nível de espécie. Arruda e Felipe (2009) relataram a produção de $38,72 \text{ g.L}^{-1}$ de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037a partir de uma concentração inicial de 55 g.L^{-1} de xilose após 58 horas de cultivo em meio suplementado com extrato de farelo de arroz. Cadete et al. (2012a) relataram que as linhagens da nova espécie *C. amazonensis* produziram valores de xilitol entre $26,1$ a $27,8 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 horas. Burneo (2013) observou produção de xilitol pelas espécies *Lindnera* sp. e *Candida pseudointernedia* a partir de 50 g.L^{-1} de xilose, nas concentrações de $17,0$ e $13,9 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho, corroboram os dados já obtidos a cerca do potencial de diferentes espécies na bioconversão de xilose a xilitol.

Tabela 11 - Parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação de meio de D-xilose* em escala de bancada.

Linhagens	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Q_p (g.L ⁻¹)	η (%)	Etanol (g.L ⁻¹)	Xilitol (g.L ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)
<i>Candida tropicalis</i> UFMG BX2-a	0,69 ± 0,04	0,58 ± 0,00	76,5 ± 5,73	0,48	28,21	48
<i>Candida tropicalis</i> UFMG BX12- a	0,68 ± 0,03	0,56 ± 0,02	75,5 ± 4,26	0,3	27,03	48
<i>Zygoascus meyeriae</i> UFMG BH72	0,48 ± 0,02	0,22 ± 0,00	53,3 ± 2,45	1,79	15,9	72
<i>Sugiyamaella smithiae</i> UFMG BH35-a	0,78 ± 0,04	0,59 ± 0,03	85,0 ± 6,09	0,3	28,51	48
<i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BH35-b	0,75 ± 0,05	0,60 ± 0,00	82,9 ± 6,52	0,3	29,06	48
<i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BX21-a	0,75 ± 0,03	0,58 ± 0,04	82,4 ± 4,24	0,45	28,03	48

*Meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz - D-xilose (30 g.L⁻¹), extrato de farelo de arroz (20 g.L⁻¹), sulfato de amônio (2 g.L⁻¹) e cloreto de cálcio (0,1 g.L⁻¹);

Q_p (g.L⁻¹.h⁻¹) - produtividade de xilitol: concentração de xilitol produzido (g.L⁻¹) por tempo (h).

η (%) - eficiência de conversão: razão entre o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) obtido e o fator de rendimento teórico (0,917 grama de xilitol/gramas de xilose).

$Y_{p/s}$ (g.g⁻¹) - rendimento de xilitol: xilitol produzido por massa de xilose consumida

Tempo no qual foi obtida a máxima produção de xilitol.

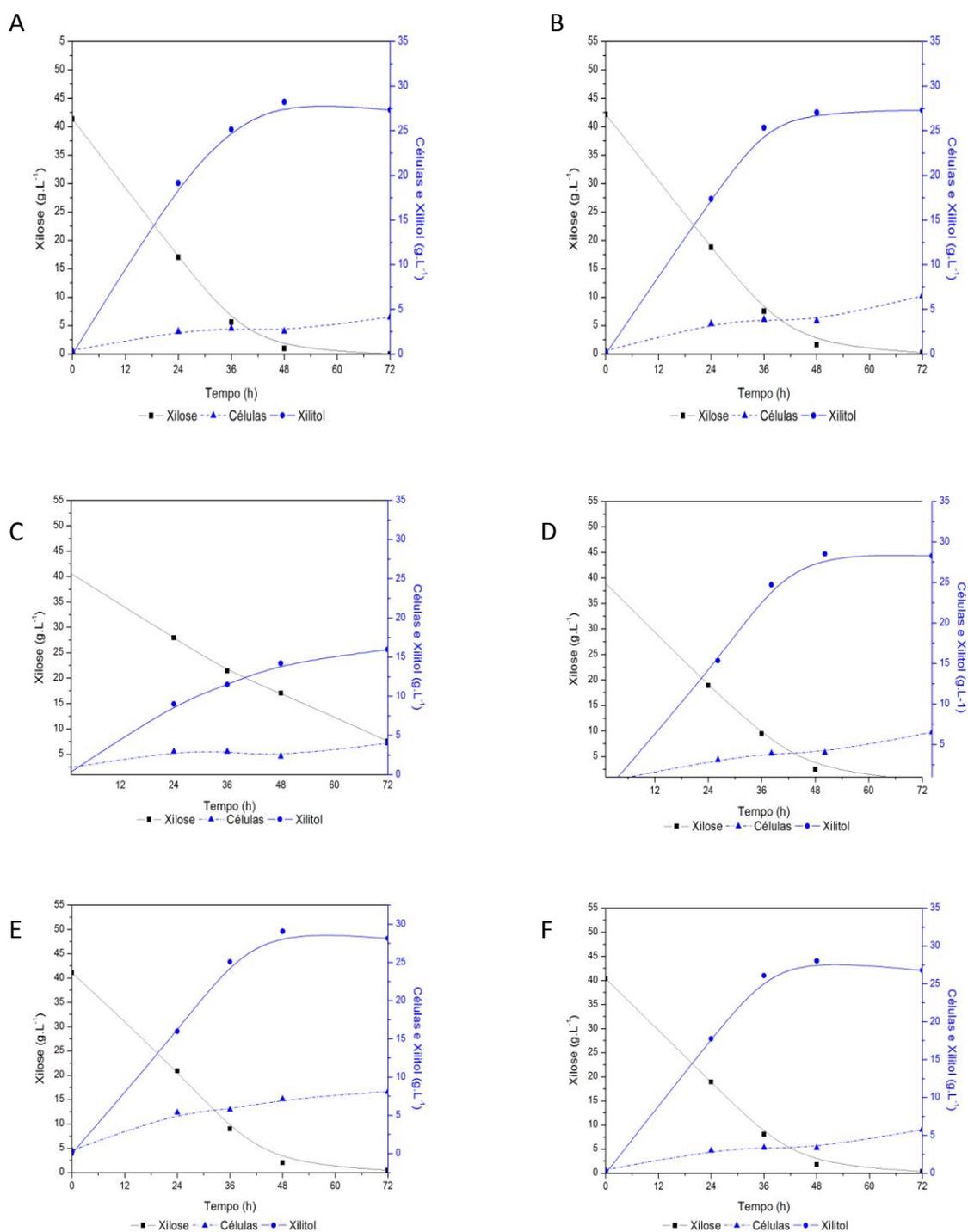


Figura 7: Concentração de D-xilose, produção de células e produção de xilitol exibidos pelas leveduras testadas em meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz: (A) *Candida tropicalis* UFMGBX2-a, (B) *Candida tropicalis* UFMGBX12-a, (C) *Zygoascus meyeriae* UFMGBH72, (D) *Sugiyamaella smithiae* UFMGBH35-a, (E) *Lindnera bimundalis* UFMGBH35-b, (F) *Lindnera bimundalis* UFMGBX21-a.

5.6 - Ensaio fermentativo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em escala de bancada

As mesmas leveduras testadas nos ensaios fermentativos em meio de D-xilose foram avaliadas no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Os resultados dos parâmetros fermentativos $Y_{p/s}$ (g.g^{-1} fator de conversão de xilose em xilitol), Q_p ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}$, produtividade em xilitol), η (%), eficiência de fermentação) e as concentrações de xilitol e etanol estão sumarizados na tabela 12. Os parâmetros foram calculados de acordo com o tempo de máxima produção de xilitol para cada linhagem ou tempo de término do ensaio (96 horas). O acompanhamento do consumo de xilose, produção de células e xilitol (g.L^{-1}) ao longo da fermentação encontra-se representado na figura 8.

As duas linhagens de *C. tropicalis*, UFMG BX2-a e UFMG BX12-a, apresentaram, respectivamente, rendimento de 0,71 e 0,70 g.g^{-1} , produtividade de 0,75 e 0,74 g.g^{-1} e eficiência de fermentação de 78,4 e 77,8%. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos no ensaio fermentativo em meio de xilose suplementado com farelo de arroz. A linhagem *L. bimundalis* UFMG BX21-a apresentou os maiores valores para os parâmetros fermentativos (rendimento de 0,80 g.g^{-1} , produtividade em xilitol de 0,78 g.L^{-1} e eficiência de fermentação de 88,5%) com 48 horas de experimento. *L. bimundalis* UFMG BH35-b apresentou rendimento de 0,65 g.g^{-1} , produtividade de 0,58 g.L^{-1} e eficiência de fermentação de 72,3%. *S. smithiae* UFMG BH35-a apresentou rendimento de 0,71 g.g^{-1} , produtividade de 0,70 g.L^{-1} e eficiência de fermentação de 79%. Diferentemente, UFMG BH72 apresentou os menores valores de $Y_{p/s}$, Q_p e η (%) (0,53; 0,25; 58,5 respectivamente), semelhante ao encontrado no meio de xilose suplementado com farelo de arroz.

Dentre as leveduras testadas, *L. bimundalis* UFMG BX21-a merece destaque, pois apresentou resultados de parâmetros fermentativos que podem ser considerados promissores. Não são conhecidos dados quanto à produção de xilitol para essa espécie, no entanto, existem relatos sobre a bioconversão de xilose em xilitol para outras espécies pertencentes a esse gênero. Kamat et al. (2012) mostraram que *Lindnera saturnus* foi capaz de produzir xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar contendo 20 g.L^{-1} de xilose. A linhagem apresentou rendimento de 0,51 g.g^{-1} após 72 horas, com consumo de 3,74 g.L^{-1} de xilose. Burneo (2013) mostrou a produção de xilitol por uma nova espécie do gênero *Lindnera* isolada de amostras de madeira em decomposição coletadas nas Ilhas Galápagos, Equador. A autora

mostrou que a linhagem *Lindnera* sp. CLQCA-24SC-025 apresentou 0,64 g.g⁻¹ de rendimento, produtividade de 0,33 g.L⁻¹ e 70,58% de eficiência de fermentação.

L. bimundalis UFMG BX21-a apresentou resultados dos parâmetros fermentativos superiores aos obtidos para as duas linhagens de *C. tropicalis* encontradas neste e em outros trabalhos, como discutido a seguir. Pessoa Jr. et al. (1997) e Rao et al. (2006), trabalhando com linhagens de *C. tropicalis*, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana mostraram que as leveduras apresentaram rendimentos máximos de 0,50 g.g⁻¹ e 0,43 g.g⁻¹, respectivamente. Arrizon et al. (2012) relataram uma linhagem de *C. tropicalis* produtora de xilitol também em hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar, com rendimento máximo de 0,4 g.g⁻¹ e produtividade de 0,15 g.L⁻¹. Trabalhos realizados com a levedura *C. guilliermondii* também reportam altos valores de rendimento e produtividade em xilitol. Alves et al. (1998) obtiveram 0,79 g.g⁻¹ de xilitol em experimentos com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar fermentado utilizando esta levedura. Resultados similares foram obtidos por Arruda (2011), trabalhando com a mesma espécie, cujo rendimento foi de 0,78 g.g⁻¹ de xilitol a partir da fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Esses dados confirmam o potencial de *L. bimundalis* UFMG BX21-a, visto que os dados dos parâmetros obtidos por esta linhagem foram semelhantes ou mesmo superiores aos já publicados para outras espécies em relação à produção de xilitol, a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. De uma maneira geral, os resultados dos parâmetros fermentativos para todas as linhagens testadas neste trabalho foram promissores. Rao et al. (2007) ressaltam que isolados com produção acima de 0,5 g.g⁻¹ são considerados produtores de elevadas concentrações de xilitol; os que produzem entre 0,25 e 0,5 g.g⁻¹ são produtores médios e aqueles isolados que produzem menos de 0,25 g.g⁻¹ são referidos como produtores de baixas concentrações de xilitol. Os resultados dos parâmetros obtidos pelas espécies testadas neste trabalho foram similares ou mesmo superiores aos encontrados nos estudos dos autores citados acima. Isso sugere que essas leveduras apresentam características metabólicas quanto a produção de xilitol que merecem ser exploradas em estudos futuros.

Com relação ao consumo de xilose, *Z. meyeræ* UFMG BH72 consumiu 93% desta pentose até o final do experimento, enquanto que o consumo das outras linhagens variou entre 99,2 e 100%. A concentração de células e a produção de xilitol verificada por *Z. meyeræ* foi menor (6,42 g.L⁻¹ e 24,6 g.L⁻¹, respectivamente) com 96 horas de experimento, em relação às outras leveduras testadas. As demais leveduras apresentaram concentração de células entre 10 e 23 g.L⁻¹ e produção de xilitol entre 31,3 a 37,6 g.L⁻¹. *L. bimundalis* UFMG 35-b consumiu 100% de xilose e produziu a

maior concentração de células (23 g.L¹). Pode-se concluir que essa linhagem tenha direcionado, preferencialmente, o consumo de xilose para o crescimento celular, já que produziu menos xilitol e mais células do que as outras leveduras. Esses resultados foram superiores aos verificados no meio com xilose suplementado com extrato de farelo de arroz, sugerindo que as leveduras apresentaram melhor adaptação ao hidrolisado de bagaço de cana. Isso se deve a composição do hidrolisado, que pode conter além de xilose, pequenas concentração de glicose e de compostos inorgânicos como manganês, ferro, magnésio, níquel, cálcio, sódio, potássio, cromo, vitaminas e aminoácidos que podem servir como macro e micronutrientes para as leveduras (ARRUDA, 2011). A adição desses suplementos acelera o consumo de xilose e a produção de xilitol pelas células, por prover precursores essenciais, necessários para maximizar o crescimento celular (CARVALHO et al., 2007). O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana preparado e utilizado no presente trabalho, continha uma pequena concentração de glicose (3,5 g.L¹ - dados não mostrados) que foi totalmente consumido pelas leveduras nas primeiras vinte quatro horas de experimento, paralelamente ao consumo de xilose. Conforme relatado por du Preez (1994), existe uma seqüência comum de prioridade na utilização de açúcares em meios de cultura, sendo as hexoses utilizadas antes das pentoses. O uso de xilose em paralelo ao uso de glicose, confirma a existência de uma concentração limiar de glicose, necessária para a repressão do metabolismo de xilose (PARAJÓ et al., 1998). Além disso, Yahashi et al. (1996) observaram que a xilose foi convertida em xilitol mais eficientemente por *C. tropicalis* na presença da glicose, já que esta pode ser utilizada para crescimento celular mais rapidamente do que a xilose, permitindo a regeneração do NADPH pelo metabolismo oxidativo da via pentose fosfato.

L. bimundalis UFMG BX21-a e UFMG BH35-b, *C. tropicalis* UFMG BX2-a e BX12-a e *S.smithiae* UFMG 35-a produziram altas concentrações de xilitol (37,6; 31,3; 36,8; 35,6 e 34g.L¹, respectivamente), com 48 horas de experimento. Vale salientar que *L. bimundalis* UFMG BX21-a produziu a maior concentração deste poliál. Cadete et al. (2012a) observaram a produção de xilitol para *Spathaspora suhii* UFMG-XMD-15.2 e *S. roraimanensis* UFMG-XMD-23.2 nas concentrações de 18,21 e 17,14 g.L¹ respectivamente, a partir do hidrolisado de bagaço de cana, com até 96 horas de experimento. Silva e Roberto (2001), avaliando *C. guilliermondii* FTI 20037, relataram uma produção de xilitol equivalente a 17 g.L¹ após 120 horas no ensaio de fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, com 90 g/L de xilose e suplementado com sais e extrato de farelo de arroz. Burneo (2013), avaliando *C. tropicalis* CLQCA-24SC-125, em fermentação de hidrolisado de bagaço de cana

contendo 50 g.L⁻¹ de xilose suplementado com farelo de arroz e cloreto de cálcio, obteve 27,1 g.L⁻¹ de xilitol. Carvalho et al. (2007) obtiveram 48,7 g.L⁻¹ de xilitol, produtividade de 0,5 g.L⁻¹ e rendimento de 0,55 g.g⁻¹ para *C. guilliermondii* FTI20037, com a adição de suplementos. Comparativamente, *L. bimundalis* UFMG BX21-a produziu uma menor quantidade de xilitol (37,6 g.L⁻¹). No entanto, o rendimento em xilitol foi maior (0,80 g.g⁻¹), o que indica que essa levedura obteve maior produção de xilitol por cada grama de xilose presente no hidrolisado. Portanto, essa levedura pode ser considerada promissora para futuros ensaios de obtenção desse poliálcool em hidrolisados hemicelulósicos.

Em relação à concentração de xilitol, pode-se observar uma diminuição desta, a partir de 48 horas. Isto indica que o produto passou a ser utilizado como fonte de carbono pelas leveduras, com exceção da linhagem UFMGBH72, visto a diminuição da concentração de xilose a partir desse momento, como pode ser observado na figura 8.

Outros subprodutos do metabolismo dos açúcares pelas leveduras nas fermentações do hidrolisado foram detectados, como o glicerol e o etanol. Para todas as leveduras houve formação de glicerol com concentrações máximas de 2,07 g.L⁻¹ já nas primeiras 24 horas de experimento. Para o etanol, apenas uma pequena concentração (1,77 g.L⁻¹) foi obtida com 24 horas de fermentação pela linhagem de *C. tropicalis* UFMG BX2-a. Arruda (2011) observou uma rápida formação de glicerol e etanol nas primeiras 24 horas de fermentação, com valores máximos de 1,32 e 3,2 g.L⁻¹, respectivamente, para a linhagem de *C. guilliermondii* testada, valores que coincidiram com a completa utilização da glicose, assim como observado no presente trabalho. Diferentemente, *Z. meyeræ* UFMG BH72 apresentou maior produção de glicerol com até 96 horas (2,64 g.L⁻¹), em um momento em que toda glicose já havia sido consumida (dados não mostrados). De acordo com Arruda e Felipe (2009), a produção lenta e contínua de subprodutos como o glicerol e etanol pode ocorrer, não estando especificamente relacionada com o metabolismo da glicose, mas também com o da xilose. Esses dados podem, portanto, justificar o comportamento exibido por *Z. meyeræ* BH72, quanto a produção de glicerol.

A demanda por xilitol nas indústrias de alimentos e farmacêutica como um adoçante alternativo tem estimulado o desenvolvimento de estratégias de produção deste poliálcool a baixo custo. De acordo com Saha (2003), a seleção de um micro-organismo que converta xilose em xilitol eficientemente na presença de açúcares hemicelulósicos se faz necessário. Aliado a isso, hidrolisados hemicelulósicos são considerados atrativos e economicamente viáveis para serem utilizados como substratos na produção biotecnológica do xilitol, ao invés do método tradicional que

emprega a xilose pura, reduzindo-se dessa maneira os custos da produção (RAO et al., 2006). No presente trabalho, *L. bimundalis* UFMG BX21-a obteve os maiores valores de parâmetros fermentativos e a maior concentração de xilitol no ensaio em hidrolisado de bagaço de cana. Portanto, esta levedura apresentou potencial para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Tabela 12 - Parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada.

Linagens	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	Qp (g.L ⁻¹)	η (%)	Etanol (g.L ⁻¹)	Xilitol (g.L ⁻¹)	Tempo de fermentação (h)
<i>Candida tropicalis</i> UFMG BX2-a	0,71 ± 0,04	0,75 ± 0,04	78,4	1,77	36,08	48
<i>Candida tropicalis</i> UFMG BX12- a	0,70 ± 0,05	0,74 ± 0,01	77,8	1,63	35,65	48
<i>Zygoascus meyeriae</i> UFMG BH72	0,53 ± 0,05	0,25 ± 0,02	58,5	1,75	24,64	96
<i>Sugiyamaella smithiae</i> UFMG BH35-a	0,71 ± 0,01	0,70 ± 0,06	79,0	1,63	34,04	48
<i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BH35-b	0,65 ± 0,04	0,58 ± 0,14	72,3	2,0	31,38	48
<i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BX21-a	0,80 ± 0,05	0,78 ± 0,05	88,5	1,98	37,60	48

Qp (g.L⁻¹.h⁻¹) - produtividade de xilitol: concentração de xilitol produzido (g.L⁻¹) por tempo (h).

η (%) - eficiência de conversão: razão entre o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) obtido e o fator de rendimento teórico (0,917 grama de xilitol/gramas de xilose).

$Y_{p/s}$ (g.g⁻¹) - rendimento de xilitol: xilitol produzido por massa de xilose consumida

Tempo no qual foi obtida a máxima produção de xilitol.

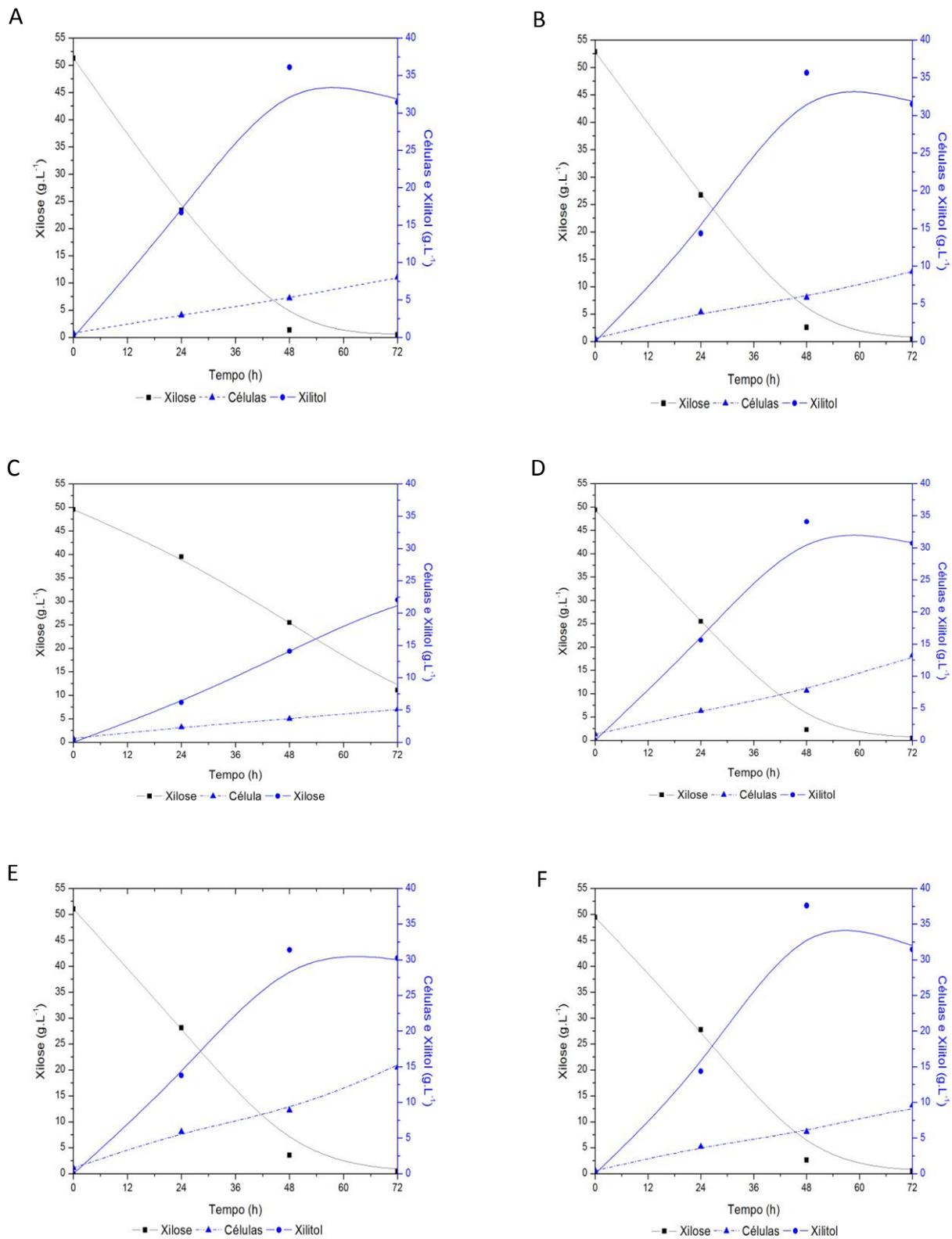


Figura 8: Concentração de D-xilose, produção de células e produção de xilitol exibidos pelas leveduras testadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em escala de bancada: (A) *Candida tropicalis* UFMGBX2-a, (B) *Candida tropicalis* UFMGBX12-a, (C) *Zygoascus meyeræ* UFMGBH72, (D) *Sugiyamaella smithiae* UFMGBH35-a, (E) *Lindnera bimundalis* UFMGBH35-b, (F) *Lindnera bimundalis* UFMGBX21-a.

5.7 - Ensaio fermentativo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em biorreator

Nesta etapa foram realizadas fermentações em biorreator para se verificar a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. A levedura *L. bimundalis* UFMG BX21-a foi selecionada para a realização deste ensaio, em função dos parâmetros fermentativos e produção de xilitol observados para essa levedura no ensaio de fermentação de xilose em hidrolisado de bagaço de cana em escala de bancada. No ensaio em biorreator foi avaliada a influência de fatores como agitação e aeração no metabolismo da xilose em hidrolisado de bagaço de cana. Os resultados dos parâmetros fermentativos Y_p/s ($g.g^{-1}$ fator de conversão de xilose xilitol), Q_p ($g.L^{-1}.h$, produtividade em xilitol), η (%), eficiência de fermentação) e as concentrações de xilitol e etanol estão sumarizados na tabela 13. Os parâmetros foram calculados de acordo com o tempo de máxima produção de xilitol para cada linhagem ou tempo de término do ensaio (72 horas). O acompanhamento do consumo de xilose, produção de células e xilitol ($g.L^{-1}$) ao longo da fermentação está representado na figura 9. Os resultados foram representados de acordo com as duas condições de aeração e agitação (0,4 VVM e 300 rpm – fermentação 1 e 0,2 VVM e 150 rpm – fermentação 2) empregadas.

Na fermentação 1, a levedura apresentou produtividade (Q_p) de $0,24 g.L^{-1}$, rendimento (Y_p/s) de $0,72 g.g^{-1}$ e eficiência de fermentação de 79,8%. Na segunda fermentação foram observados os maiores valores de rendimento (Y_p/s) de $0,74 g.g^{-1}$ e eficiência de fermentação (81,4%), porém, menor produtividade ($Q_p = 0,11 g.L^{-1}$), com até 72 horas de experimento. Da Silva et al. (2006), realizando ensaios em biorreator, com *C. guilliermondii* obtiveram rendimento de $0,59 g.g^{-1}$ e produtividade de $0,53 g.L^{-1}$, após 48 horas de fermentação, por parte da levedura. Arruda (2011) testou uma linhagem de *C. guilliermondii* quanto a produção de xilitol em biorreator agitado de 2,4L de volume. Os ensaios fermentativos também foram realizados com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, contendo $50 g.L^{-1}$ de xilose e suplementado com farelo de arroz, sulfato de amônio e cloreto de cálcio. A fermentação foi conduzida sob agitação de 450 rpm e aeração de 0,7 vvm. Sob estas condições, *C. guilliermondii* FT120037 obteve uma maior produtividade ($0,28 g.L^{-1}$), porém menor rendimento em xilitol e eficiência de fermentação ($0,69 g.g^{-1}$ e 75%, respectivamente) quando comparada com a linhagem de *L. bimundalis* testada no presente trabalho. Entretanto, Burneo (2013) testando linhagens de leveduras em biorreator, sob as mesmas condições de fermentação empregadas por Arruda (2011), obteve valores de parâmetros fermentativos superiores para a linhagem de *C.*

tropicalis testada. Esta linhagem apresentou rendimento, produtividade e eficiência de fermentação de 0,78 g.g⁻¹, 0,46 g.L⁻¹ e 86%, respectivamente, com 72 horas de experimento. A autora ainda relata que esses valores foram superiores aos obtidos nos ensaios realizados com a mesma levedura em escala de bancada. Entretanto, sob essas mesmas condições, Burneo (2013) não verificou produção de xilitol por *Lindnera* sp. CLQCA-24SC-025. Isto sugere que as condições empregadas pela autora tenham sido ideais apenas para a linhagem de *C. tropicalis*. Como dito anteriormente, as características metabólicas podem variar muito de acordo com o gênero e a espécie de micro-organismo testado, e mesmo entre linhagens da mesma espécie. Fatores como concentração inicial do substrato e do inóculo, agitação e nível de oxigênio podem afetar diretamente a conversão da xilose a xilitol pela levedura (FERREIRA et al., 2011). Portanto, para utilização de uma espécie em escala de produção e obtenção de altas concentrações de xilitol, os melhores parâmetros e condições de fermentação devem ser estabelecidos e otimizados, bem como a composição mais adequada do meio de fermentação.

Apesar do cálculo dos parâmetros fermentativos não ter apresentado grande diferença entre os valores para as duas condições empregadas, nota-se que as variações na aeração e agitação, exerceram influência significativa nos perfis de consumo de açúcares, produção de células e produção de xilitol pela levedura testada. Na primeira condição, a levedura produziu 8,76 g.L⁻¹ de células e 17 g.L⁻¹ de xilitol, a partir do consumo de 47,8% dos açúcares a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, composto por 50,55 g.L⁻¹ de xilose e 3,57 g.L⁻¹ de glicose. Já na segunda condição foi verificada a produção de 1,83 g.L⁻¹ de células e 8,08 g.L⁻¹ de xilitol, com um consumo de 22,09% de açúcares, a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço que continha 53 g.L⁻¹ de xilose e 3,43 g.L⁻¹ de glicose. Os valores obtidos no trabalho para consumo de xilose, produção de células e de xilitol em biorreator foram inferiores aos obtidos no ensaio realizado em hidrolisado em escala de bancada, para a mesma linhagem. Canilha (2006), realizando ensaios de fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo por *C. guilliermondii*, obteve valores de consumo de xilose e produção de células maiores em biorreator do que em escala de bancada. Arruda (2011) mostrou consumo de xilose de aproximadamente 50% e produção de biomassa em torno de 9,0 g.L⁻¹ com 72 horas de experimento em biorreator. Em relação às condições de transferência de oxigênio empregadas no presente trabalho, pode-se observar que no experimento 1, as condições foram mais adequadas para favorecer o consumo de xilose e produção de células (figura 9). Já as condições empregadas no segundo experimento, podem ter sido limitantes para o consumo de açúcares e produção de biomassa, visto os baixos valores obtidos. De

fato, a disponibilidade de oxigênio, definida pelas condições de aeração e agitação foram maiores no experimento 1. De acordo com Granstrom (2002), um aumento na taxa de transferência de oxigênio permite a otimização do consumo de xilose com produção de biomassa celular. No trabalho realizado por Burneo (2013), tanto as respostas de crescimento celular quanto o consumo de açúcares e produção de xilitol e etanol indicaram que os níveis de oxigênio utilizados no biorreator foram muito baixos para o metabolismo de *Lindnera* sp. CLQCA-24SC-025, já que a levedura não foi capaz de se multiplicar, nem de assimilar elevadas quantidades dos açúcares do meio.

Em relação à produção de xilitol, a variação nas condições de transferência de oxigênio também exerceram influência significativa. A linhagem testada produziu 37,6 g.L⁻¹ de xilitol no hidrolisado de bagaço de cana em escala de bancada, enquanto que no experimento 1 em biorreator produziu no máximo 17 g.L⁻¹ deste poliálcool. A produção de xilitol foi ainda mais reduzida (8,06 g.L⁻¹) nas condições empregadas no segundo experimento. No trabalho desenvolvido por Arruda (2011), *C. guilliermondii* produziu concentração máxima de xilitol em torno de 33 g.L⁻¹, com até 144 horas de experimento, também em biorreator, utilizando agitação de 450 rpm e aeração de 0,7 vvm. Burneo (2013), utilizando essas mesmas condições, verificou a produção de 37,2 g.L⁻¹ de xilitol com 96 h, pela linhagem de *C. tropicalis* CLQCA-24F-125 em biorreator, após 96 horas de experimento. No entanto, a linhagem *Lindnera* sp. CLQCA-24SC-025 também testada sob essas condições não produziu xilitol.

Em relação à produção de ácido acético, glicerol e etanol, estes também foram obtidos nos experimentos em biorreator. Concentrações máximas destes subprodutos foram obtidas no experimento 1 (2,23; 1,55 e 2,77 g.L⁻¹, respectivamente) enquanto que no experimento 2, as concentrações foram de 2,45, 1,72 e 3,68 g.L⁻¹, respectivamente (dados não mostrados). A formação desses subprodutos foi lenta ao longo da fermentação, não coincidindo com o consumo da glicose. A formação destes subprodutos foi lenta durante o metabolismo da xilose por *C. guilliermondii* foi observada em diferentes fermentações de hidrolisado de bagaço de cana (RODRIGUES et al., 2003; CHAUD, 2010; ARRUDA, 2011; BURNEO, 2013). A produção lenta e contínua de glicerol pode ocorrer sem estar necessariamente relacionada com o metabolismo da glicose, mas também com o da xilose (ARRUDA e FELIPE, 2009). Segundo Nevoigt e Stahl (1997), a formação de glicerol é um mecanismo no qual o micro-organismo evita a perda de água para o meio extracelular. Em relação à produção do ácido acético, no presente trabalho foi observado que o pico de concentração ocorreu com 36 horas de experimento. Esse subproduto pode ter sido consumido pela levedura como fonte de carbono, observado pela diminuição

da concentração deste com 72 horas de experimento e aumento do pH na fermentação 1 (pH inicial - 5,15; final – 5,50). O mesmo não ocorreu na fermentação 2, pois a concentração de ácido acético não diminuiu no transcorrer do período de fermentação e o aumento do pH não foi verificado (pH inicial – 5,12; final – 5,08).

Com base nos dados obtidos pode-se observar que as condições de oxigenação utilizadas no ensaio com biorreator não foram adequadas para favorecer o consumo de açúcares e conseqüentemente o aumento de células e/ou a produção de xilitol, principalmente na fermentação 2 (menores valores). No entanto, existe a necessidade de se estabelecer uma condição limitada de oxigênio para uma melhor produção de xilitol (BRUINENBERG et al., 1983). Comparando-se as fermentações 1 e 2 realizadas em biorreator neste trabalho, pode-se correlacionar o menor consumo de xilose, produção de células e xilitol com o menor coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La} 2,8 h^{-1} - experimento 1 e 1,89 h^{-1} – experimento 2). Os valores de K_{La} observados no presente trabalho foram também bem menores do que os obtidos em outros estudos. Burneo (2013) obteve K_{La} de 7 h^{-1} , enquanto Silva (2004) e Arruda (2011), trabalharam com os valores de 17 e 15 h^{-1} , respectivamente. De acordo com Rodrigues (2005), o K_{La} 15 h^{-1} é ideal para favorecer a conversão de xilose a xilitol pela linhagem de *C. guilliermondii*. Entretanto, como discutido anteriormente, esses valores são difíceis de serem padronizados para diferentes leveduras (FERREIRA et al., 2011).

O ensaio realizado em biorreator foi um teste inicial para a linhagem de *L. bimundalis* UFMG BX21-a. A otimização dos parâmetros de fermentação para essa linhagem devem ser, entretanto, melhor estudada a fim de se obter a bioconversão de D-xilose em xilitol, a partir de hidrolisados hemicelulósicos, de forma eficiente. Pôde-se constatar que o *screening* realizado em meio sintético, bem como as fermentações, sugerem que as leveduras podem apresentar mecanismos de resposta diferentes aos meios e às condições utilizadas para o crescimento celular, produzindo diferentes metabólitos, ou concentrações dos mesmos. Sendo assim, a definição das condições para a otimização da produção de xilitol, como agitação e aeração, precisam ser melhor estudadas para cada linhagem de interesse. Por fim, foi possível observar que as leveduras isoladas, especificamente de bagaço de cana-de-açúcar, e testadas nos ensaios de fermentação, apresentaram potencial para fermentação de hidrolisados hemicelulósicos visando a produção de xilitol.

Tabela 13 - Parâmetros fermentativos obtidos para *Lindnera bimundalis* UFMG BX21-a durante experimentos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator.

<i>Lindnera bimundalis</i> UFMG BX21-a	Fermentação 1				Fermentação 2			
	Y_{PS} (g.g ⁻¹)	QP (g.L ⁻¹)	η (%)	Xilitol (g.L ⁻¹)	Y_{PS} (g.g ⁻¹)	QP (g.L ⁻¹)	η (%)	Xilitol (g.L ⁻¹)
0 h	-	-	-	0,0	-	-	-	0
12 h	-	-	-	2,3	-	-	-	2,01
24 h	-	-	-	4,5	-	-	-	4,0
36 h	-	-	-	7,48	-	-	-	4,3
48 h	-	-	-	10,45	-	-	-	5,4
60 h	-	-	-	13,56	-	-	-	6,9
72 h	0,72 ± 0,00	0,24 ± 0,00	79,8 ± 0,03	17,86	0,74 ± 0,00	0,11 ± 0,00	81,4 ± 0,03	8,06

Q_p (g.L⁻¹.h⁻¹) - produtividade de xilitol: concentração de xilitol produzido (g.L⁻¹) por tempo (h).

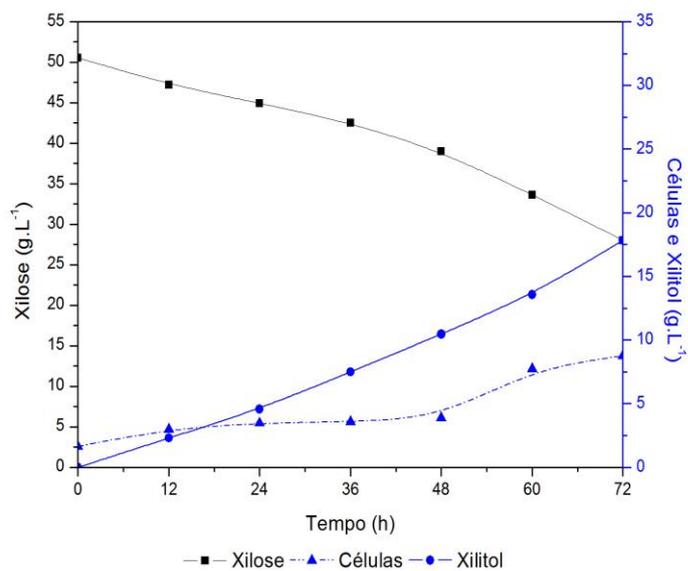
η (%) - eficiência de conversão: razão entre o fator de rendimento ($Y_{P/S}$) obtido e o fator de rendimento teórico (0,917 grama de xilitol/gramas de xilose).

$Y_{p/s}$ (g.g⁻¹) - rendimento de xilitol: xilitol produzido por massa de xilose consumida

Fermentação 1: Agitação – 300 rpm; aeração – 0,7 vvm.

Fermentação 2: agitação – 150 rpm; aeração – 0,2 vvm.

A



B

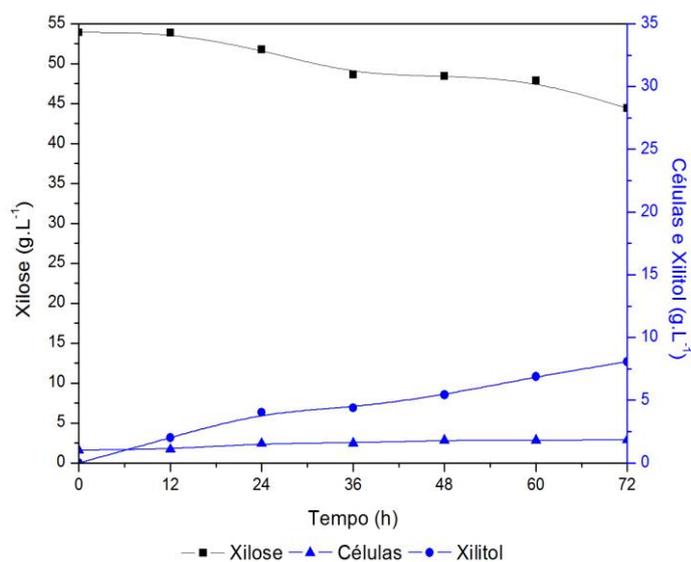


Figura 9: Fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em biorreator para a linhagem *Lindnera bimundalis* UFMG BX21-a. **A:** Consumo de D-xilose, produção de células e xilitol; fermentação 1 (agitação 300 rpm, aeração 0,4 vvm). **B:** Consumo de xilose, produção de células e xilitol; fermentação 2 (agitação 150 rpm, aeração 0,2 vvm).

6 - CONCLUSÕES

- As diferentes espécies de leveduras obtidas neste trabalho têm como habitat outros substratos e podem ser consideradas colonizadoras secundárias do bagaço de cana de açúcar e/ou torta de filtros.
- Além das vinte e quatro espécies já conhecidas, três possíveis novas espécies de leveduras foram obtidas neste trabalho, indicando que os substratos utilizados possam representar um nicho para a colonização de uma grande diversidade de leveduras assimiladoras de xilose.
- A partir do meio de xilana e do bagaço de cana foram obtidos o maior número de leveduras e a maior diversidade de espécies, mostrando que o meio de xilana e o bagaço de cana são adequados para o isolamento de leveduras assimiladoras de xilose.
- *Candida tropicalis* foi espécie predominante dentre os isolados obtidos, seguida por *Trichosporon mycotoxinivorans* e *Candida tartarivorans*, sendo tais espécies encontradas em amostras de bagaço de cana e de torta de filtros, em todos os locais de coleta e nos dois meios de cultivo utilizados. Estes resultados sugerem uma melhor adaptação destas espécies às fontes de carbono da biomassa vegetal estudada.
- No presente trabalho é feito pela primeira vez o registro do isolamento de 51 isolados da espécie *C. tartarivorans*, mostrando que o bagaço de cana-de-açúcar e a torta de filtros podem representar possíveis habitats para esta espécie.
- Dentre as leveduras obtidas, linhagens de *C. tropicalis*, *Lindnera bimundalis* e *Sugiyamaella smithiae* foram produtoras de xilitol em fermentações com meio de xilose e em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Os resultados obtidos mostram a necessidade de maiores estudos com estas leveduras visando estabelecer as condições experimentais mais adequadas para a produção de xilitol.
- O isolado *L. bimundalis* UFMG BX21-a foi responsável pelos melhores resultados de rendimento em xilitol, produtividade em xilitol e eficiência de fermentação no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana dentre as leveduras testadas. Esse isolado pode ser considerado promissor tendo em vista

o emprego de micro-organismos em pesquisas futuras voltadas para a produção de xilitol.

- *L. bimundalis* UFMG BX21-a quando testada em fermentações de hidrolisado em biorreator agitado não apresentou os mesmos valores de parâmetros fermentativos e produção de xilitol apresentados nos ensaios em escala de bancada. Isso sugere que as condições empregadas nas fermentações não foram ideais para a otimização da produção de xilitol por esta levedura. Portanto estudos futuros são necessários para definir as condições que favoreçam a eficiente conversão de xilose a xilitol por essa levedura.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Banat, B. M. A.; Hoshida, H.; Ano, A.; Nonklang, S.; Akada, R. High temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.85, p.861-867, 2010.

Adsul, M.G.; Ghule, J.E.; Singh, R.; Shaikh, H.; Bastawde, K.B.; Gokhale, D.V.; Varma, A.J. Polysaccharides from bagasse: applications in cellulose and xylanase production. *Carbohydrate Polymers*. v.57, p.67-72, 2004.

Affleck, R. P. *Recovery of Xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology*. 2000. *Dissertation de mestrado - Science in Biological Systems Engineering at Virginia Polytechnic Institute and State University (United States)*, 2000.

Agbogbo, F.K.; Coward-Kelly, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeasts, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters*. v.30, p.1515–1524, 2008.

Aguilar, R.; Ramirez, J.A.; Garrote, G.; Vazquez, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*. v.55, p.309-318, 2002.

Allen, S. G.; Schulman, D.; Lichwal, J.; Antal JR.; Laser, M.; Lynd, R. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. v.40, p.2934-2941, 2001.

Alper, H. and Stephanopoulos, G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potencial? *Nature Rev Microbiology*. v. 7, p. 715-723, 2009.

Altschul, S.F.; Madden, T.L.; Schaffer, A.A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D.J. Gapped BLAST nad PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. v.25, p.3389-3402, 1997.

Alves, M. A. Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico. 2006. *Tese de Doutorado* – Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2006.

Alves, L. A.; Felipe, M. G. A.; Silva, J. B. A.; Prata, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemical Biotechnology*. v. 70-72, p. 89-97, 1998.

Araújo, Lídia M. Produção de alimentos funcionais formulados com Xilitol a partir de Cupuaçu (*Theobroma Grandiflorum*) E Maracujá (*Passiflora Edulis F. Flavicarpa*). *Tese de Doutorado* – Universidade Federal do Amazonas, 2007.

Aristidou, A.; Penttila, M. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Current Opinion in Biotechnology*. v.11, p.187-198, 2000.

Arruda, P. V. Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. 2011. *Tese de Doutorado* – Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2011.

Arruda, P. V.; Felipe, M. D. G. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. *Current Microbiology*. v. 58, p. 274-278, 2009.

Arrizon, J.; Mateos, J. C.; Sandoval, G.; Aguilar, B.; Solis, J.; Aguilar, M. G. Bioethanol and xylitol production from different lignocellulosic hydrolysates by sequential fermentation. *Journal of Food Process Engineering*. v. 34, p. 437-454, 2011.

Balat, M.; Balat, H.; Cahide, O.Z. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion*. v. 34 p. 551-573, 2008.

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.

Barbosa, M.F.S.; Medeiros, M.B.; Mancilha, I.M.; Schneider, H. & Lee, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*. v.3, p.241-251, 1988.

Beg, Q.K.; Kapoor, M.; Mahajan, L.; Hoondal, G.S. Microbial xylanases and their industrial applications: a review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 56, p. 326–338, 2001.

Bettiga, M.; Hahn-Hägerdal, B.; Gorwa-Grauslund, M.F. Comparing the xylose reductase/xylitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways in arabinose and xylose fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology for Biofuels*. v.1, p.0-8, 2008.

Biodiesel BR <http://www.biodieselbrasil.com.br/> 2009.

Bittencourt, V. C. Torta de filtro enriquecida. *Idea News*. V.63, p. 2-6, 2006.

Branco, R. F.; Santos, J. C.; Sarrouh, B. F.; Rivalde, J. D.; Pessoa, A. Jr.; Silva, S. S. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. *Journal Chemical Technology Biotechnology*. v. 84, p.326-330, 2009.

Bruinenberg, P.M.; De Bot, P.H.M.; Van Dijken, J.P.; Scheffers W.A. The role of the redox balance in the anaerobic fermentation of xilose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 18, p. 287-292, 1983.

Burneo, M. C. G. Produção de xilitol a partir de leveduras isoladas de madeira em decomposição do Arquipélago das Ilhas Galápagos (Equador). *Dissertação de Mestrado* – Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, 2013.

Cadete, R.M. Isolamento e caracterização de leveduras fermentadoras de D-xilose, Larabinose ou D-celobiose e produtoras de celulasas e xilanasas associadas à madeira em decomposição. *Dissertação de mestrado* - Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG, 2009.

Cadete, R.M.; Santos, R.O.; Melo, M.A.; Mouro, A.; Gonçalves, D.L.; Stambuk, B.U.; Gomes, F.C.O.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Research*. v.9, p.1338-1342, 2009.

Cadete, R.M.; Melo, M.A.; Dussán, K.J.; Rodrigues, R.C.L.B.; Silva, S.S.; Zilli, J.E.; Vital, M.J.S.; Gomes, F.C.O.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. *Plos one*. v.7(8): e43135, 2012a.

Cadete, R.M.; Melo, M.A.; Lopes, M.R.; Pereira, G.M.D.; Zilli, J.E.; Vital, M.J.S.; Gomes, F.C.O.; Lachance, M.A.; Rosa, C.A. *Candida amazonensis* sp. nov., an ascomycetous yeast isolated from rotting wood in Amazonian Forest, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v. 62, 1438-1440, 2012b.

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. A.; 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. *Antonie van Leeuwenhoek*. v. 103, p. 421-431, 2013.

Canilha, L. Produção de xilitol no hidrolisado de palha de trigo. *Tese de doutorado*. Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena / Universidade de São Paulo, 2009.

Canilha, L.; Carvalho, W.; Felipe, M.G.A.; Silva, J.B.A.; Giulietti, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.161, p.84-92, 2010.

Cao, N.J.; Xu, Q.; Chen, L.F. Xylan hydrolysis in zinc chloride solution. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51/52, 97, 1995.

CanettieriA, E.V.; Almeida e Silva, J.B.; Felipe, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 38, p. 323-331, 2002.

Canilha, L.; Candido, J.; Almeida e Silva, J.B. Xylitol production from wheat straw hydrolysate using stirred tank reactor. *Paper presented at XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, 5-8 August, Florianópolis, 2003.

Cardona, C.A.; Sánchez, O.J. Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. v.98, p.2415-2457, 2007.

Cardona, C.A.; Quintero, J.A.; Paz, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*. v.101, p.4754-4766, 2010.

Carvalho, W.; Canilha, L.; Silva, S. S. Semi-continuous xylitol bioproduction in sugarcane bagasse hydrolysate: effect of nutritional supplementation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 43, p. 47-53, 2007.

CENBIO. Centro Nacional de Referência em Biomassa. Disponível em: <http://cenbio.iee.usp.br>. Acesso em: 27 de Setembro de 2013.

Cerqueira, D.A.; Rodrigues, G.; Meireles, C.D. Optimization of sugarcane bagasse cellulose acetylation. *Carbohydrate Polymers*. v.69, p.579-582, 2007.

Cerqueira-Leite, R.C.; Leal, M.R.L.V.; Cortez, L.A.B.; Griffin, W.M.; Scandiffio, M. I. G. Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*. v. 34, p.655-661, 2009.

Chandel, A. K.; Chandrasekhar, G.; Radhika, K.; Ravinder, R.; Ravindra, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. v. 6, p. 8-020, 2010.

Chandel, A. K.; Chanrasekhar, G.; Radhika, K.; Ravinder, R.; Ravindra, P. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. v.6, nº1, p.8-20, 2011.

Chandel, A.K.; Antunes, F. F. A.; Anjos, V.; Bell, M. J. V.; Rodrigues, L. N.; Sings, O. V.; Rosa, C. A.; Pagnocca, F.; Silvio, S.S. Ultra-structural mapping of sugarcane bagasse after oxalic acid fiber expansion (OAFEX) and ethanol production by *Candida shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology of Biofuels*. v. 6, p. 1-15, 2013.

Chaud, L. C. S. Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol. *Dissertação de Mestrado*, Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena / Universidade de São Paulo, 2010.

Cheng, K. K.; Cai, B. Y.; Zhang, J. A.; Ling, H. Z.; Zhou, Y. J.; Ge, J. P.; Xu, J.M. Sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by acid recovery process. *Biochemical Engineering Journal*. v. 38, p. 105-109, 2008.

Cheng, K. K.; Zhang, J. A.; Ling, H. Z.; Ping, W. X.; Huang, W.; Ge, J. P.; Xu, J. M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*. v. 43, p. 203-207, 2009.

Cherubini F.; Stromman, H. Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefinery*. v. 5, p. 548–561, 2011.

Choi, J. H.; Moon, K. H.; Ryu, Y. W.; So, J. H. Production of xylitol in cell recycle fermentations of *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*. v. 22, p. 1625-1628, 2000.

Claassen, P.A.M.; van Lier, J.B.; Lopez-Contreras, A.M.; van Niel, E.W.J.; Sijtsma, L.; Stams, A.J.M.; de Vries, S.S.; Weusthuis, R.A. Utilization of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.52, p.741-755, 1999.

Clark, J. H.; Luque, R.; Matharu, A. S. Green chemistry, biofuels and biorefinary. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. v. 3, p. 183-207, 2012.

Coopersucar. <http://www.copersucar.com.br/> , 1995.

Companhia Nacional de abastecimento (CONAB) – Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, setembro/2009 / Companhia Nacional de Abastecimento – Brasília, 2009.

Companhia Nacional de abastecimento (CONAB) – Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar, segundo levantamento, setembro/2013 - Brasília, 2013.

Colwell, R.K., Mao, C.X., Chang, J. Interpolating, extrapolating, and comparing incidence-based species accumulation curves. *Ecology*. v. 85, p. 2717-2727, 2004.

Cunha-Pereira, F.; Hickert, L.R.; Sehnem, N.T.; de Souza-Cruz, P.B.; Rosa, C.A.; Ayub, M.A.Z. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresource Technology*. v.102, p.4218-4225, 2011.

de Barros Lopes, M.; Soden, A.; Henschke, P.A.; Langridge, P. PCR differentiation of commercial yeasts strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*. v.62, p.4514-4520, 1996.

de Faveri, D.; Torre, P.; Perego, P.; Converti, A. Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. v. 61, p.407-412, 2004.

Delgenes, J.P.; Moletta, R.; Navarro, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 19, p. 220-225, 1996.

Dermibas, M. F. World Biofuel Scenario. In *Handbook of Plant-Based Biofuels*, editor Ashok Pandey, CRC Press, cap.2 , p.13-27, 2009.

Domingues, J.M.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 57, p. 49-56, 1996.

du Preez, J.C. Process parameters and environmental factors affecting xylose fermentation by yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. v.16, p.944-956, 1994.

Du Preez, J.C.; Bosch, M.; Prior, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* – effects of pH, temperature and substrate concentration. *Enzyme Microbiology. Technology*. v. 8, p. 360-364, 1986.

Elander, R.T.; Hsu, T. Processing and economic impacts of biomass delignification for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 51, p. 463-478, 2008.

EMBRAPA Agroenergia, Informativo Edição nº 44, Agosto de 2013.

Felipe, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. In: *Lignocellulosic Biodegradation*. American Chemical Society. p.300-315, 2004.

Felipe, M. G. A.; Vitolo, M.; Mancilha, I. M.; Silva, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v, 18, p. 251-254, 1997.

Felipe, M.G.A.; Haully, M.C.O.; Canetieri, E.V.; Candido, E.J.; Tamaninil, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. Paper presented at *XIV Simpósio Nacional de Fermentações*, 5-8 August, Florianópolis, 2003.

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. *Yeast*. v.28, p.547-554, 2011.

Ferreira-Leitão, V.; Gottschalk, L.M.F.; Ferrara, M.A.; Nepomuceno, A.L.; Molinari, H.B.C.; Bon, E.P.S. Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor*. v.1, p.65-76, 2010.

Fonseca, A.; Fell, J.W.; Kurtzman, C.P.; Spencer-Martins, I. *Candida tartarivorans* sp. nov., an anamorphic ascomycetous yeast with the capacity to degrade L(+)- and meso-tartaric acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.50, p. 389-394, 2000.

Franceschin, G.; Sudiro, M.; Ingram, T.; Smirnova, I.; Bruner, G.; Bertucco, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol a technical and economical assessment based on experimental data. *Chemical Engineering Research and Desig*. v. 89, p. 631-640, 2011.

Freitas, Maria T. Utilização da casca de semente de algodão como substrato para produção microbiológica de xilitol. *Tese de Mestrado - Microbiologia Agrícola*, Universidade Federal de Viçosa, 2003.

Fromanger, R.; Guillouet, S.E.; Uribebarrea, J.L.; Molina-Jouve, C.; Cameleyre, X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 37, p.437-445, 2010.

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

Galbe, M.; Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59, p. 618–628, 2002.

Gírio, F.M.; Roseiro, J.C.; Sá-Machado, P.; Duarte-Reis, A.R.; Amaral-Collaço, M.T. Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. *Enzyme and Microbial Technology*. v.16, p.1074-1078, 1994.

Gírio, F.M.; Fonseca, C.; Duarte, L.C.; Marques, S.; Bogel-Lukasik, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*. v.10, p.4775-4800, 2010.

Gong, C.S.; Chen, L.F.; Flickinger, M.C.; Chiang, L.C.; Tsao, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. v.41, p.430-436, 1981.

Granstrom, T.; Leisola, M. Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 58, p. 511–516, 2002.

Granstrom, T.B., Izumori, K., Leisola, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied and Environmental Microbiology* .v .74, p. 277–281, 2007.

Gray, K.A.; Zhao, L.; Emptage, M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*.v.10, p.141-146, 2006.

Guedes, S.N.R.; Shikida, P.F.A.; Terci, E.T.; Peres, M.T.M.; Peres, A.P. Mercado de Terra e de Trabalho na reestruturação da categoria social dos fornecedores de cana de Ribeirão Preto. *AGRIC/SP*. v. 53, p.107-122, 2006.

Hahn-Hagerdal, B.; Wahlbom, C.F.; Gardonyi, M.; Van Zil, W.H.; Cordero Otero, R.R.; Jonsson, L.J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. v. 73, p. 53–84, 2001.

Hahn-Hagerdal, B.; Galbe, M.; Gorwa-Grauslund, M.F.; Liden, G.; Zacchi, G. Bioethanol – The fuel of tomorrow with the residues of today. *Trends Biotechnology*. v. 24, p. 549-56, 2006.

Hahn-Hagerdal, B.; Karhumaa, K.; Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Gorwa-Grauslund M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.74, p.937-953, 2007.

Hamelinck, C.N.; van Hooijdonk, G.; Faaij, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short, middle and long term. *Biomass and Bioenergy*. v. 28, p.384-410, 2005.

Hammer, H. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, 2001.

Harmsen, P.F.H.; Huijgen, W.J.J.; Bermudez, L.M.; Bakker, R.R.C. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. P. 54, *Wageningen: Food & Biobased Research*, 2009.

Hickert, L. R.; Souza-Cruz, P. B.; Rosa, C. A.; Ayub, M. A. Z. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresource Technology*. v. 143, p. 112-116, 2013.

Horitsu, H. Yahashi, Y., Takamizawa, K. Kawai, K., Suzuki, T. and Watanabe, N., Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: Optimization of production rate. *Biotechnology Bioengineering*. v. 40, p. 1085 – 1091,1992.

Hou, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 94, p. 205-214, 2012.

Huang, C. F.; Jiang, Y. F.; Guo, G. L.; Hwang, W. S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 3322-3329, 2011.

Ingram, L.O.; Aldrich, H.C.; Borges, A.C.; Causey, T.B.; Martinez, A.; Morales, F.; Saleh, A.; Underwood, S.A.; Yomano, L.P.; York, S.W.; Zaldivar, J.; Zhou, S. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnology Progress*. v.15, p.855-866, 1999.

Jeffries, T.W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*. v.3, p.213-218, 1981.

Jeffries, T.W. Emerging technology for fermenting D-xylose. *Trends in Biotechnology*. v.3, p.208-212, 1985.

Jeffries, T.W., JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 63, p. 495-509, 2004.

Jeffries, T.W.; Kurtzman, C.P. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*. v. 16, p. 922-932, 1994.

Jucoski, M. C.; Maranhão, L.T.; Menegassi, J. A.; da Silva, L. Crescimento e consumo de Xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. *Evidência*. v. 7, p. 119-130, 2007.

Kamat, S.; Khot, M.; Zinjardel, S.; Ravikumar, A.; Gade, W. N. Coupled production of single cell oil as biodiesel feedstock, xylitol and xylanase from sugarcane bagasse in a biorefinery concept using fungi from the tropical mangrove wetlands. *Bioresource Technology*. v. 135, p. 1-8, 2013.

Kim, S. R.; Ha, S. J.; Kong, I. L.; Jin, Y. S. High expression of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. v. 14, p. 336-343, 2012.

Ko, S. B.; Rhee, C. H.; Kim, J. H. Enhancement of xylitol productivity and yield using a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis* under fully aerobic conditions. *Biotechnology Letters*. v. 28. p. 1159-1162, 2006.

Klinke, H.B.; Ahring, B.K.; Schmidt, A.S.; Thomsen, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour Technology*. v. 82, p. 15-26, 2002.

Klinke, H.B.; Thomsen, A.B.; Ahring, B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 66, p. 10-26, 2004.

Kumar, P.; Barret, D.; Delwiche, M.; Strove, P. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 48, p. 3713-3729, 2009.

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier, 2011a.

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T.; Robert, V. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v.1, p.87-110, 2011b.

Lachance, M.A.; Bowles, J.M.; Starmer, W.T.; Barker, J.S.F. *Kodamaea kakaduensis* and *Candida tolerans*, two new yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian Journal of Microbiology*. v.45, p.172-177, 1999.

Lachance, M.A. Yeasts biodiversity: How many and how much? In: Rosa, C.A.; Gábor, P. (Eds) Biodiversity and ecophysiology of yeasts. *Heidelberg: Springer-Verlag*. p. 1-10, 2006.

Lachance, M.A.; Boekhout, T.; Scorzetti, G.; Fell, J.W.; Kurtzman, C.P. *Candida* Berkhout (1923). In: Kurtzman, C.P.; Fell, J.W.; Boekhout, T (Ed.). *The Yeasts: a taxonomic study*. Fifth edition. Elsevier. v.2, p.987-1278, 2011.

Lee, H.; Sopher, C. R.; Yau. K. F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida Guilliermondii*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. v. 66, p.375-379, 1995.

Lee, S. H.; Kodak, T.; Park, Y. C.; Seo, J.H. Effects of NADH-preferring xylose reductase expression on ethanol production from xylose in xylose-metabolizing recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology*. v. 158, p. 184-191, 2012.

Leite, R.C.C.; Leal, M.R.L.V. O biocombustível no Brasil. *Novos Estudos. CEBRAP*. ISSN 0101-3300, 2007.

Li, X.; Yang, H.; Roy, B.; Wang, D.; Yue, W.; Jiang, L.; Park, E.Y.; Miao, Y. The most stirring technology in future: Cellulase enzyme and biomass utilization. *African Journal of Ecology*. v. 8, p. 2418-2422, 2009.

Lima, L. H. A.; Berlinck, C. N. Xilitol: o adoçante do futuro. *Ciência Hoje*. v.33, n.195, p.66- 69, 2003.

Lima, L. Estudos moleculares dos genes *XYL1* e *XYL2* de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol. 2006. 177 f. *Tese de Doutorado - Biologia Molecular*, Universidade de Brasília, 2006.

Lin, Y.; Tanaka, S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.69, p.627-642, 2006.

Lovett, J. C. Biofuels and ecology. *African Journal of Ecology*. v. 45, p. 117-119, 2007.

Macedo, I.C.; Seabra, J.E.A.; Silva, J.E.A.R, S. Greenhouse gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*. v. 32, p. 582-595, 2008.

Machado, G.O. Preparação e caracterização de CMC e CMC grafitizada. *Dissertação de Mestrado*. Instituto de Química de São Carlos, 2000.

Manz, U., Vanninen, E., Voirol, F. Xylitol - it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: F. R. A. *Symposium on sugar and sugar Replacements*, 10. London, 1973.

Mattila, P. T., Knuutila, 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.

Mayerhoff, Z. D. L.; Roberto, I. C.; Silva, S. S. *Biotechnology Letters*. v. 19, p. 407-409, 1997.

Melaja, A.J.; Hamalainen, L. *Process of making xylitol*. US. 4008285. Feb 15, 1977. Disponível em: <http://www.google.com/patents/US4008285>. Acesso em: 2 out. 2013.

Menon, V., Rao, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. v.38 , p.522-550, 2012.

Meyral, V.; Delgenes, J.P.; Moletta, R.; Navarro, J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. v. 13, p.281-286, 1991.

Misra, S.; Raghuwanshi, S.; Pritesh, G.; Kakoli, D.; Saxena, R.K. Fermentation behavior of osmophilic yeasts *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie Van Leeuwenhoek*. v.101, p.393-402, 2011.

Misra, S., Raghuwanshi, S., Saxena, R.K. Fermentation behavior of an osmotolerant yeast *D. hansenii* for Xylitol production. *Biotechnology Progress*. v. 28, p.1457–1465, 2012.

Monique, H.; Faaij, A.; van den Broek, R.; Berndes, G.; Gielen, D.; Turkenburg, W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. *Biomass and Bioenergy*. v.25 p.119-133, 2003.

Morais, C. G.; Cadete, R. M.; Uetanabaro, A. P. T; Rosa, L. H.; Lachance, M. A.; Rosa, C. A. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genetics and Biology*. v. 63, p.1-5, 2013a.

Morais, C. G.; Lara, C. A.; Marques, S.; Fonseca, C.; Lachance, M. A.; Rosa, C. A. *Sugiyamaella xylanicola* sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.63, p. 2356-2360, 2013b.

Mosier, N.; Wyman, C.; Dale, B.; Elander, R.; Lee, Y. Y.; Holtzapfel, M.; Ladisch, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* v.96, p.673–686, 2005.

Mussato, I. S.; Roberto, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. n.28, p.34-39, 2002.

Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. *Journal of Applied Microbiology*. v. 95, p. 331-337, 2003.

Mussato, S.I.; Roberto, I.C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. *Process Biochnology*. v. 39, p. 1433-1439, 2004.

Neeru, C.; Chandrajit, B.; Vidyasagar, J. Biological production of xylitol from corn husk and switchgrass by *Pichia stipitis*. *Research Journal of Chemical Sciences*. v. 3, p. 58-64, 2013.

Nevoigt, E.; Stahl, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Federation of European Microbiological Societies*. V. 21, p. 231-241, 1997.

Nguyen, N.H.; Suha, S-O.; Marshall, C.J.; Blackwell, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. *Mycological Research*. v.110, p.1232-1241, 2006.

Niga, E. Bioethanol from lignocellulosic biomass: A review. *Stefan cel Mare University*. v. 2, 2011.

Nigam, J.N.; Ireland, R.S.; Margaritis, A.; Lachance, M.A. Isolation and screening of yeasts that ferment D-xylose directly to ethanol. *Applied and Environmental Microbiology*. v.50, p.1486-1489, 1985.

Nolleau V, L Preziosi-Belloy and JM Navarro. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. *Biotechnology Letters*. v.17, p. 417– 422, 1995.

Nunes Junior, D. Torta de filtro: de resíduo a produto nobre. *Idea News*. v. 92, p. 22-30, 2008.

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

Oooi, B. G.; Le, T. T.; Markuszewski, B. M. The effects of glucose on the yeast conversion of xylose into xylitol by *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. v. 1, p. 189-202, 2002.

Pandey, A.; Soccol, C. R.; Nigam, P.; Soccol, V. T.; Vandenberghe, L. P. S.; Mohan, R. Biotechnological potential of agro-industrial residues: cassava bagasse. *Bioresource Technology*. v. 74, p. 81-87, 2000.

Pal, S.; Choudhary, V.; Kumar, A.; Biswas, D.; Mondal, A. K.; Sahoo, D. K. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*. v. 147, p. 449-455, 2013.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. v.74, p.25-33, 2000.

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

Pasha, C.; Kuhad R.C.; Rao, L. V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. *Journal of Applied Microbiology*. v.103, p.1480-1489, 2007.

Pasha, C.; Rao, L.V. Thermotolerant yeasts for bioethanol production using lignocellulosic substrates. In: Ingledew, W.M.; Kelsall, D.R.; Austin, G.D.; Kluhspies, C. (Ed.). *The Alcohol Text Book*. 5a ed. Nottingham University Press. p.581-588, 2009.

Penatti, C.P; Donzelli, J.L. Uso da Torta de Filtro em cana-de-Açúcar. Piracicaba. p.7, 1991.

Peng, F.; Ren, J.L.; Xu, F.; Bian, J.; Peng, P.; Sun, R.C. Comparative study of hemicelluloses obtained by graded ethanol precipitation from sugarcane bagasse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.57, p.6305-6317, 2009.

Perez, J.; Munoz-Dorado, J.; de la Rubia, T.; Martinez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. v. 5, p. 53–63, 2002.

Pessoa, Jr. A.; de Mancilha, I. M.; Sato, S. Evaluation of sugar cane hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v.18, p. 360-363, 1997.

Pessuti, O. A biomassa paranaense e sustentabilidade de novos sistemas produtivos. In: Seminário Paranaense de Biodiesel, Londrina. Anais eletrônicos, Disponível em: <http://www.tecpar.br/cerbio/Semina>, 2003.

Petersen, M. O.; Larsen, J.; Thomsen, M. H. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass and Bioenergy*. v.33, p.834-840, 2009.

Pirt, S.J. Principles of microbe and cell cultivation. New York: Blackwell Scientific, p.260-268, 1975.

Portal Novacana www.novacana.com/ acessado em Outubro de 2013.

Porzio, G. F.; Prussi, M.; Chiaramonti, D. Process analysis and modelling for 2nd generation lignocellulosic bioethanol production. *Chemical Engineering Transaction*. v. 25, p. 869-874, 2011.

Prakasham, R.S., Rao, R.S., Hobbs, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends Biotechnology*. v. 3, p. 8-36, 2009.

Premjet, S.; Pumira, B.; Pemjet, D. Determining the potencial of inedible weed biomass for bio-energy and ethanol production. *Bioresources*. v.8, p.701-716, 2013.

Preziosi-Belloy, L.; Nollet, V.; Navarro, J. M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*, *Enzyme and Microbial Technology*. v. 21, p. 124-129, 1997.

Rao, R.S.; Jyothi, C.P.; Prakasham, R.S.; Sarma, P.N.; Rao, L.V. Xylitol production from coern fiber and sugarcane bagasse hydrolysate by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*. v. 97, p. 1974-1978, 2006.

Rao, R. S.; Bhadra, B.; Shivaji, S. Isolation and characterization of xylitol producing yeasts from the gut of coleopteran insects. *Current Microbiology*. v. 55, p. 441-446, 2007.

Rao, R.S.; Bhadra, B.; Shivaji, S. Isolation and characterization of ethanol- producing yeasts from fruits and tree barks. *Letters in Applied Microbiology*. v.47, p.19–24, 2008.

Raij, B. van. Fertilidade do Solo e Adubação. Ed. Agronômica Ceres Ltda., Piracicaba, p. 343, 1991.

Reijnders, L. Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. *Energy Policy*. v. 34, p. 863–876, 2006.

Riano A. M. S.; Morales, A. G.; Hernandez, J. A. M.; Barrero, C. A.. R. Producción de bioetanol a partir de subproductos agroindustriales lingocelulosicos. *Tumbaga*. v. 5, p. 61-91, 2010.

Roberto, I.C., Felipe, M.G.A., Lacis, L.S., Silva, S.S., Mancilha, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Bioresource Technology*. v.36, p. 271–275, 1991.

Roberto, I.C.; Mancilha, I.M.; de Souza, C.A.; Felipe, M.G.A.; Sate, S.; de Castro, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. v. 16, p.1211-1216, 1994.

Rocha, G.J.M.; Martin, C.; Soares, I.B.; Souto-Maior, A.M.; Baudel, H.M.; Abreu, C.A.M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. v. 35, p.663–670, 2011.

Rodrigues, R.C.L.B.; Felipe, M.G.A.; Almeida, J.B.S.; Vitolo, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. *Process Biochemistry*. v. 38, n. 8, p. 1231-1237, 2003.

Rodrigues, R. C. L. B. Influência da disponibilidade de no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana. *Tese de Doutorado*, Faculdade Inter-Unidades, USP/Butantã/IPT, SP, 2005.

Rosa, C.A.; Lachance, M-A.; Teixeira, L.C.R.S.; Pimenta, R.S.; Morais, P.B. *Metschnikowia cerradonensis* sp. nov., a yeast species isolated from ephemeral flowers and their nitidulid beetles in Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.57, p.161-165, 2007.

Rossel, C.E.V. Conversion of lignocellulose biomass (bagass and straw) from the sugar-alcohol industry into bioethanol. ED. Telma Franco ISBN 85-98951-06-4, Industrial perspectives for bioethanol. cap 8, p.123-142, 2006.

Saha, B.C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v.30, p.279-291, 2003.

Saha, B. C.; Bothast, R. J. Production of xylitol by *Candida peltata*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v. 22, p. 633-636, 1999.

Sánchez, O.J.; Cardona, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. v.99, p.5270-5295, 2008.

Sanderson, K. A chewy problem. *Nature Outlook Biofuels*. v. 474, issue 7352, 2011.

Santos, J. D.R.; Abreu, N. R.; Baldanaz, R.F. O Impacto do Marketing Verde nas Indústrias Sucroalcooleiras de Alagoas. *Revista Econômica do Nordeste*. v.40, 2009.

Santos, R.O. Leveduras fermentadoras de pentoses e produtoras de xilanas e celulases associadas ao bagaço de cana-de-açúcar em decomposição. *Dissertação de mestrado* apresentada ao departamento de Microbiologia – ICB/UFMG, 2010.

Schmirmer, A. C. *Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja*. 2007. *Dissertação de Mestrado*, Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

Schmidell, W.; Lima, U.D.A.; Aquarone, E.; Borzani, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. *Biotechnologia Industrial*. p.123-178, 2001.

Sene, L.; Arruda, P. V.; Oliveira, S. M. M.; Felipe, M. D. G. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. v. 42, p. 1141-1146, 2011.

Silva, S.S.; Afschar, A.S. Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. v.11, p.129-134, 1994.

Silva, S. S.; Felipe, M. G. A.; Mancilha, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 70, p. 70-72, 1998.

Silva, C. J. S.; Roberto, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Letters in Applied Microbiology*. v. 32, p. 248-252, 2001.

Silva, D. D. V. Efeito da relação glicose:xilose na bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. *Tese de Doutorado* - Departamento de Bioquímica, Escola de Engenharia – Universidade São Paulo, 2004.

Silva, C. J. S. M.; Mussato, S. I.; Roberto, I. C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. *Journal of Food Engineering*. v. 75, p. 115-119, 2006.

Silva, S.S.; Mussatto, S.I.; Santos, J.C.; Santos, D.T.; Polizel, J. Cell immobilization and xylitol production using sugarcane bagasse as raw material. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.141, p.215-227, 2007.

Silva, J.P.A.; Mussato, S.I.; Roberto, I.C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.162, p.1306-1315, 2010.

Simões, J. Aproveitamento da energia gerada com bagaço depende de estímulo, 2008. Disponível em: http://www.inovacao.unicamp.br/etanol/report/newsenergia_bagaco. Acesso em Outubro de 2013.

SIMPGEU – III Simpósio de Pós Graduação em Engenharia Urbana – 7 a 8 de Novembro, 2012.

Sirisansaneeyakul, S.; Wannawilai, S.; Chistic, Y. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnolia* TISTR 5663. *Journal Technology and Biotechnology*. v. 88, p. 1121-1129, 2012.

Shen, F.; Kumar, L.; Hu, J.; Saddler, J. N. Evaluation of hemicellulose removal by xylanases and delignification of SFH and SSF for bioethanol production with steam-pretread substrates. *Bioresource Technology*. v. 102, p. 8945-8950, 2011.

Stambuk, B.U, Eleutherio E.C.A, Flores-Pardo, L.M, Souto-Maior, A.M. & Bon, E.P.S. Brazilian potencial for biomass ethanol: of using hexoses and pentose co-fermenting yeast strain. *Journal Science Industrial Resource*. v. 67, p. 918-926, 2008.

Suh, S-O.; Marshall, C. J.; Hugh, J. V. M.; Blackwell, M. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology*. v.12, p.3137-3145, 2003.

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

Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. p.1-6, 2011.

Tan, K.T.; Lee, K.T.; Mohamed, A.R. Role of energy policy in renewable energy accomplishment: the case of second-generation bioethanol. *Energy Policy*. v.36, p.3360- 3365, 2008.

Taylor, G. Biofuels and the biorefinery concept. *Energy Policy*. v.36, p.4406-4409, 2008.

Thomsen, M.H.; Haugaard-Nielsen, H. Sustainable bioethanol production combining biorefinery principles using combined raw materials from wheat undersown with clovergrass. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. v.35, p.303-311, 2008.

Toivola, A.; Yarrow, D.; van den Bosch, E.; van Dijken, J.P.; Scheffers, W.A. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. v.47, p.1221-1223, 1984.

Tresinari, D.S.; Sotelo, A.F.; Foad, B.S.; Sarrouh, B.F.; Palacios, N.R.; Silva, S.S. Tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*. v. 32, n. 2, p. 621-632, 2011.

Urbina, H.; Blackwell, M. Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and characterization of the N-Terminal region of xylose reductase gene. *Plos One*. v. 7 (6): e39128, 2012.

Walther, T.; Hensirisak, P.; Agblevor, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*. v. 76, p.213-220, 2001.

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

White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A.; Gelfand, D. H.; Sninsky, J. J.;

White, T. J. (Eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press. p. 315-322, 1990.

Wohlbach, D.J.; Kuo, A.; Sato, T.K.; Potts, K.M.; Salamov, A.A.; LaButti, K.M.; Sun, H.; Clum, A.; Pangilinan, J.L.; Lindquist, E.A.; Lucas, S.; Lapidus, A.; Jin, M.; Gunawan, C.; Balan, V.; Dale, B.E.; Jeffries, T.W.; Zinkel, R.; Barry, K.W.; Grigoriev, I.V.; Gasch, A.P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. *PNAS*. v.108, p.13212-13217, 2011.

Worldwatch Institut. www.worldwatch.org/node/5982, 2008.

van Maris, A.J.A.; Abbott, D.A.; Bellissimi, E.; Van Den Brink, J.; Kuyper, M.; Luttik, A.H.; Wisselink, H.W.; Scheffers, W.A.; Van Dijken, J.P.; Pronk, J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie van Leeuwenhoek*. v.90, p.391-418, 2006.

YahashiA, Y.; Hatsu, M.; Horitsu, H.; Kawai, K.; Suzuki, T.; Takamizawa, K. D-glucose feeding for improvement of xylitol productivity from D-xylose using *Candida tropicalis* immobilized on a non-woven fabric. *Biotechnology Letters*. v.18, p.1395-1400, 1996.

Yu, J.; Stahl, H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresource Technology*. v. 99, p. 8042-8048, 2008.

Zaldivar, J.; Nielsen, J.; Olsson, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v.56, p.17-34, 2001.

ANEXO 1

Análises Estatísticas:

Diferenças estatísticas entre os resultados obtidos para os parâmetros fermentativos foram determinadas por meio do teste de análise de variância (ANOVA) levando em consideração análise do intervalo de confiança para as médias dos tratamentos, utilizando-se probabilidade máxima de erro de 5%.

Análise 1: Estatística dos valores de parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação de meio de D-xilose suplementado com extrato de farelo de arroz em escala de bancada.

Linhagens	$Y_{p/s}$	Qp (g.L ⁻¹)	Eficiencia %
UFMGBH35-a	0,76 A*	0,59 A	84,02 A
UFMGBH35-b	0,75 A	0,61 A	81,88 A
UFMGBX21-a	0,73 A	0,58 A	79,82 A
UFMGBX2-a	0,7 AB	0,59 A	76,75 AB
UFMGBX12-a	0,67 AB	0,56 A	73,31 AB
UFMGBH72	0,59 B	0,3 B	64,94 B

* Valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA .

Análise 2: Estatística dos valores de parâmetros fermentativos obtidos durante experimentos de fermentação com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em escala de bancada.

Linhagens	$Y_{p/s}$	Q_p (g.L⁻¹)	Eficiencia %
UFMGBX21-a	0,8 AC*	0,78 A	88,22 AC
UFMGBX2-a	0,72 A	0,75 A	79,33 A
UFMGBH35-a	0,72 AB	0,71 A	79,41 AB
UFMGBX12-a	0,71 AC	0,74 A	78,23 AC
UFMGBH35-b	0,65 AC	0,59 A	71,4 AC
UFMGBH72	0,56 C	0,29 B	61,92 C

* Valores seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste ANOVA .