



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASCA DE ARROZ  
(*Oryza sativa*) E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE  
BIOCONVERSÃO DESTE HIDROLISADO A ETANOL E  
XILITOL POR LEVEDURAS**

**Aluna: Lílian Raquel Hickert**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Priscila Brasil de Souza-Cruz

Coorientador: PhD. Marco Antônio Záchia Ayub



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASCA DE ARROZ (*Oryza sativa*) E  
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIOCONVERSÃO DESTE HIDROLISADO  
A ETANOL E XILITOL POR LEVEDURAS**

**Lilian Raquel Hickert**

Química Industrial - UFSM

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Ambiental e Agrícola.

Orientador: Dr.<sup>a</sup> Priscila Brasil de Souza-Cruz

Coorientador: Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Programa de Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela oportunidade de realização do mestrado. A FAENQUIL, em Lorena, pelo auxílio prestado.

A professora e orientadora Priscila Brasil de Souza Cruz pelos ensinamentos, pela amizade, paciência, pelo pouso e pelas risadas compartilhadas. Por ter sido amiga e até mãe em certos momentos. Obrigada por tudo até pelos puxões de orelha que foram válidos.

Ao professor e co-orientador Marco Antônio Záchia Ayub, pelos ensinamentos passados, pelo apoio e amizade. Por ter confiado em mim desde o começo.

A professora Rosane Rech, por ter disponibilizado equipamentos do laboratório e muitos ensinamentos da parte de estatística, com muita paciência.

A professora Maria do Carmo Ruaro Peralba, pela disponibilização de equipamentos, como cromatógrafos, e auxílio nas análises dos mesmos.

Ao professor Plinho Francisco Hertz pela ajuda no trabalho, pelas risadas e brincadeiras.

Aos meus colegas de laboratório, por tudo. Pela paciência quando tiveram que me ensinar, pela parceria e pelo auxílio na hora do desânimo. Em especial, a Fernandinha Pereira que teve que fazer meio trabalho comigo e a Ana Cassales, que corrigiu essa dissertação, rindo em alguns momentos. A Nicole Sehnem, a Elis Aquino, a Débora Faccin, a Ângela Machado, a Janis, a Sabrina Gabardo, a Fernanda Rech, e aos outros do BiotecLab, obrigada por tudo e pela paciência que tiveram.

As gurias do 210 (principalmente a Carlinha e a Van) pelos momentos de descontração e por desligarem a centrífuga toda vez que eu esquecia.

As minhas bolsistas, Mariana Engels e Samantha Zucatti pela disponibilidade e pela ajuda sempre que foi preciso.

As pessoas que estão do meu lado desde sempre, meus amigos de Santa Rosa e Santa Maria, Vanessa, Rosi, Tati, Léo, Sil, Cris. E as gurias que estavam aqui, pertinho, e que perdoam todas as ausências por causa de compromissos do mestrado, Lou, Babi, Lu, Ju, Tisi. Aos meus parentes que estavam aqui e sempre que podiam estavam comigo, Tia Guegue e Tio Galo (e os guris) e Tia Sandra e o Tio Kiko (e a Dani e Rodrigo). Obrigada por tudo, pelas cevas, churrascos, conselhos e o apoio de sempre.

Ao meu namorado Leonardo Dias da Cruz, pela ajuda, companheirismo e muita motivação para que este mestrado fosse concluído. Por ter estado do meu lado nas angústias e alegrias. Além das idas ao ICTA nos sábados de noite e nos domingos de manhã. A toda família dele por ter me acolhido como se eu fizesse parte da mesma.

E finalmente a minha família. Meus pais e meu irmão. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram por mim. Espero poder retribuir. Agradeço a vocês pela confiança depositada sempre, pelo carinho e amor que nunca me faltaram. Aos meus avós e a Nona, que sempre acreditaram em mim. Muito obrigada de coração.

## RESUMO

### Otimização da hidrólise da casca de arroz (*Oryza sativa*) e avaliação da capacidade de bioconversão deste hidrolisado a etanol e xilitol por leveduras <sup>1</sup>

**Autor:** Lilian Raquel Hickert

**Orientador:** Dr<sup>a</sup> Priscila Brasil de Souza-Cruz

**Co-Orientador:** Marco Antônio Záchia Ayub

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz, são fontes abundantes e de baixo custo de celulose e hemicelulose, para produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado, como os alcoóis, etanol e xilitol. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise ácida diluída da casca de arroz, utilizando como ferramenta o planejamento experimental, e ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de etanol e xilitol, mediante o cultivo de microrganismos sobre esse hidrolisado. Um planejamento composto central 2<sup>2</sup> com três pontos centrais foi realizado abrangendo apenas as variáveis significativas para liberação de açúcares (temperatura e concentração de ácido). A máxima solubilização dos açúcares (70% de eficiência) foi obtida a 150°C e 3 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> sólido seco (SS), gerando cerca de 2,3 g L<sup>-1</sup> de tóxicos totais (soma de inibidores ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural). No entanto, é desejável que o hidrolisado contenha baixo teor de compostos tóxicos, já que estes podem comprometer a eficiência da fermentação. Sendo assim, a condição que empregou a temperatura de 129°C e 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, apresentando 52% de eficiência na liberação de açúcares e apenas 0,18 g l<sup>-1</sup> de inibidores, foi selecionada. Cultivos sobre meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 30°C, foram realizados em agitador orbital, utilizando leveduras fermentadoras de hexoses e pentoses, como *Saccharomyces cerevisiae*, e *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Spathaspora arborariae*, respectivamente, em cultivos isolados e em co-cultivo. As cepas testadas isoladamente apresentaram valores de produtividade de etanol (Y<sub>P/S</sub>) entre 0,35 e 0,46 g g<sup>-1</sup>, enquanto que o rendimento dos co-cultivos variou de 0,30 a 0,77 g g<sup>-1</sup> de etanol, sobre ambos os meios. Cultivos foram conduzidos em biorreatores submersos utilizando *S. cerevisiae*, individualmente e em consórcio com *S. arborariae* sobre hidrolisado de casca de arroz (1 vvm de aeração e 300 rpm). O maior rendimento de etanol foi obtido no cultivo isolado de *S. cerevisiae*, com Y<sub>P/S</sub> de 0,52 g g<sup>-1</sup>, enquanto que o co-cultivo apresentou um Y<sub>P/S</sub> de 0,42 g g<sup>-1</sup>. Foi avaliado o desempenho do processo de sacarificação e fermentação simultânea sobre hidrolisado de casca de arroz não filtrado, associando um complexo enzimático (contendo celulasas e xilanasas) ao co-cultivo (*S. cerevisiae* - *S. arborariae*), este processo aumentou a produtividade de etanol em 26%.

1. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

## ABSTRACT

### Rice hull hydrolysis optimization and evaluation of this hydrolysate bioconversion to ethanol and xylitol by yeasts <sup>1</sup>

**Author:** Lilian Raquel Hickert

**Supervisor:** Dr<sup>a</sup> Priscila Brasil de Souza-Cruz

**Co- Supervisor:** Marco Antônio Záchia Ayub

Agroindustrial lignocellulosic residues such as rice hulls, are abundant resources and low cost of cellulose and hemicellulose, compounds for biotechnological production of high value by-products, such as alcohols, ethanol and xylitol. This study aimed to optimize the dilute acid hydrolysis of rice hull, using the experimental design tool and expand knowledge about the biotechnological production of ethanol and xylitol by cultivation of microorganisms on the hydrolysate. A 2<sup>2</sup> central composite design with three central points was carried out covering only the significant variables for the release of sugars (acid concentration and temperature). The maximum sugars solubilization (70% efficiency) was obtained at 150°C and 3 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> dry solids (SS), generating about 2.3 g L<sup>-1</sup> of toxic compounds (sum of acetic acid inhibitors, furfural and hydroxymethylfurfural). However, it is desirable that the hydrolysate contains low levels of toxic compounds, as these can compromise the efficiency of fermentation. Thus, the condition that used the temperature of 129°C and 4.4 mmol g<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, with 52% efficiency in the release of sugars and only 0.18 g l<sup>-1</sup> inhibitors, has been selected. Cultures on semi-synthetic medium and hydrolysate rice hull at 180 rpm and 30°C, were performed in shaker, using yeast that ferment hexoses as *Saccharomyces cerevisiae*, and pentoses as *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* and *Spathaspora arborariae*, in isolated cultures and co-cultivation. The strains tested alone showed ethanol yields coefficients values (Y<sub>P/S</sub>) between 0.35 and 0.46 g g<sup>-1</sup>, while the yields of co-cultures varied from 0.30 to 0.77 g g<sup>-1</sup> ethanol, on both media. Cultures were conducted in submerged bioreactors using *S. cerevisiae*, both individually and in consortium with *S. arborariae* on hydrolysate rice hull (1 vvm aeration and 300 rpm). The highest ethanol yield coefficient was obtained in the culture isolate of *S. cerevisiae*, with Y<sub>P/S</sub> = 0.52 g g<sup>-1</sup>, while the co-culture showed Y<sub>P/S</sub> of 0.42 g g<sup>-1</sup>. The performance of the simultaneous saccharification and fermentation process of rice hull hydrolysate (unfiltered), involving an enzyme complex (containing cellulases and xylanases) to co-cultivation (*S. cerevisiae*-*S. arborariae*), were evaluated, and this process increases the ethanol yield in 26%.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>4</b>
2.1. BIOMASSA.....	4
2.1.1 Materiais lignocelulósicos.....	4
2.1.1.1. <i>Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos</i> .....	8
2.2. BIORREFINARIA.....	9
2.2.1. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Etanol.....	12
2.3. SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF).....	14
2.4. CO FERMENTAÇÃO .....	15
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
3.1. CASCA DE ARROZ.....	17
3.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA CASCA DE ARROZ.....	17
3.2.1. Determinação do teor de lignina.....	18
3.2.2. Determinação do teor de celulose e hemicelulose .....	18
3.2.3. Determinação dos parâmetros fermentativos e de hidrólise .....	19
3.2.4. Determinação do teor de cinzas.....	19
3.3. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DE ARROZ.....	20
3.4. MEIOS DE CULTIVO.....	21
3.4.1. MEIO SEMISSINTÉTICO .....	21
3.4.2. HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ - HCA.....	21
3.5. MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E INÓCULO .....	22

3.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS DOS GÊNEROS <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> e <i>Spathaspora</i> EM MEIO SEMISSINTÉTICO E HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ .....	23
3.7. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL SOBRE HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ EM BIORRETORES DE CULTIVO SUBMERSO .....	24
3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS .....	25
3.8.1. Determinação da concentração celular .....	25
3.8.2. Determinação da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético .....	26
3.8.3. Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural .....	26
3.8.4. Determinação da concentração dos fenóis totais .....	26
3.8.5. Determinação de pH e Pressão Osmótica .....	27
3.8.6. Determinação de proteína .....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ .....	29
4.2. HIDRÒLISE ÁCIDA DILUÍDA DA CASCA DE ARROZ .....	31
4.2.1. Identificação dos fatores que influenciam a hidrólise da casca de arroz .....	31
4.2.1.1 <i>Cinéticas de reação</i> .....	31
4.2.1.2 <i>Análises estatísticas</i> .....	35
4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Saccharomyces</i> , <i>Candida</i> , <i>Pichia</i> e <i>Spathaspora</i> , EM AGITADOR ORBITAL, SOBRE MEIO SEMISSINTÉTICO E HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ .....	41
4.3.1. Cultivo em meio semissintético .....	42
4.3.1.1. <i>Avaliação da cinética do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol pelos microrganismos cultivados isoladamente em meio semissintético</i> .....	42
4.3.1.2. <i>Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por co-cultura de leveduras em meio semissintético, em agitador orbital</i> .....	46
4.3.2. Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por leveduras sobre hidrolisado de casca de arroz em agitador orbital .....	51
4.3.2.1. <i>Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por cultivo de leveduras isoladas, sobre hidrolisado de casca de arroz</i> .....	51

4.3.2.2. Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por co-culturas em meio hidrolisado de casca de arroz .....	56
<b>4.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS LEVEDURAS DO GÊNERO <i>Saccharomyces</i> e <i>Spathaspora</i> SOBRE HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ EM BIORREADORES DE CULTIVO SUBMERSO.....</b>	<b>60</b>
4.4.1. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso .....	60
4.4.1.1. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..	60
4.4.1.2. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de <i>Saccharomyces</i> e <i>Spathaspora arborariae</i> .....	62
4.4.1.3. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando sacarificação e co-fermentação simultâneas de <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> e enzima Powercell.....	65
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>68</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
APÊNDICE 1 .....	79
APÊNDICE 2 .....	80



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Produção de arroz em toneladas por tempo em anos. ....	7
Figura 2 - Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos (Adaptado de OCTAVE & THOMAS, 2009). ....	10
Figura 3: Representação esquemática da sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). (Adaptado de OLOFSSON <i>et al.</i> , 2008). ....	14
Figura 4 - Cinéticas de liberação de: (A) xilose; (B) glicose; (C) arabinose; (D) furfural (E) HMF; (F) ácido acético; a partir de hidrólise ácida diluída de casca de arroz durante 20, 30 e 40 minutos.. ....	32
Figura 5. Superfície de resposta para a concentração de xilose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída. ....	36
Figura 6. Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída. ....	37
Figura 7. Superfície de resposta para a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída. ....	38
Figura 8: Superfície de resposta para a concentração de (A) ácido acético (B) furfural e (C) HMF em $\text{g L}^{-1}$ , presentes no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída. ....	40
Figura 11. Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em meio semissintético, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ). ....	43
Figura 12. Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol pelas leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> , (B) <i>S. arborariae</i> , (C) <i>P. stipitis</i> e (D) <i>C. shehatae</i> sobre meio semissintético.. ....	44
Figura 13. Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em meio semissintético, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ). ....	47
Figura 14. Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol, em consórcio, pelas leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> ( <i>Sc-Sa</i> ); (B) <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> ( <i>Sc-Ps</i> ) e (C) <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i> ( <i>Sc-Cs</i> ) em meio semissintético (agitador orbital). ....	49
Figura 15. Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ). ....	52
Figura 16. Cinética do consumo, em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 30°C em agitador orbital, pelas leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> , (B) <i>S. arborariae</i> , (C) <i>P. stipitis</i> e (D) <i>C. shehatae</i> sobre hidrolisado de casca de arroz. ....	53
Figura 17. Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo. Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ). ....	56

Figura 18. Cinética do consumo em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 30°C pelo consórcio das leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> , ( <i>Sc-Sa</i> ); (B) <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i> ( <i>Sc-Cs</i> ) e (C) <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> ( <i>Sc-Ps</i> ) .....	57
Figura 19. Cinética de crescimento celular de <i>S. cerevisiae</i> sobre hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30°C). Contagem de colônias (UFC mL <sup>-1</sup> ). .....	61
Figura 20. Produção de etanol pela levedura <i>S. cerevisiae</i> sobre hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30°C). .....	62
Figura 21. Cinética do crescimento celular apresentados em ln UFC mL <sup>-1</sup> , do co-cultivo <i>Sc-Sa</i> em hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30°C). .....	63
Figura 22. Cinética de consumo dos açúcares e a produção de etanol e xilitol a partir do co-cultivo <i>Sc-Sa</i> sobre hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300 rpm, 30°C).. .....	64
Figura 23. Crescimento celular do co-cultivo <i>Sc-Sa</i> em ln UFC mL <sup>-1</sup> , em hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300 rpm, 30°C). .....	65
Figura 24. Cinética de produção de etanol e xilitol a partir pelo co-cultivo <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> , ( <i>Sc-Sa</i> ) sobre hidrolisado de casca de arroz, com 15 FPU de enzima, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30°C). .....	67

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1- Níveis dos fatores utilizados no planejamento central composto $2^2$ com três repetições no ponto central. ....	20
Tabela 2- Esquema da matriz do planejamento central composto $2^2$ com três repetições no ponto central.....	21
Tabela 3. Composição química da casca de arroz. ....	29
Tabela 4. Composição química de resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão em etanol. ....	30
Tabela 5. Análise da variância para a concentração de xilose presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída. ....	35
Tabela 6. Análise da variância para a concentração de glicose no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação. ....	36
Tabela 7. Análise da variância para a concentração de arabinose no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação. ....	38
Tabela 8. Análise da variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação. ....	39
Tabela 9. Análise da variância para a concentração de furfural no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação. ....	39
Tabela 10. Análise da variância para a concentração de HMF no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação. ....	39
Tabela 11. Composição ( $\text{g L}^{-1}$ ) do hidrolisado de casca de arroz original e concentrado 2,8 vezes. ....	51
Tabela 12. Parâmetros da cinética de produção de etanol e xilitol em frascos agitados em hidrolisado de casca de arroz, a 180rpm e 30°C, por <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. arborariae</i> , <i>P. stipitis</i> e <i>C. shehatae</i> .....	54
Tabela 13. Produtividade de etanol de cepas fermentadoras de pentoses. ....	55
Tabela 14. Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em frascos agitados, em hidrolisado de casca de arroz a 180 rpm e 30°C, pelos consórcios de leveduras <i>Sc-Cs</i> , <i>Sc-Sa</i> e <i>Sc-Ps</i> . ....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\eta$	Eficiência de conversão	<b>LAD</b>	L-arabinitol 4-desidrogenase
$\beta_F$	Coefficiente de furfural	<b>LXR</b>	L-xilulose redutase
$\beta_{HMF}$	Coefficiente de HMF	<b>Xyl</b>	Xilose
$A_{LIG}$	Absorbância de todos os compostos	<b>Q<sub>P</sub></b>	Produtividade volumétrica
<b>AR</b>	L-arabinose (aldose) redutase	<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>Ara</b>	Arabinose	<b>SL</b>	Lignina solúvel
$C_F$	Concentração de furfural	<b>SQ</b>	Soma quadrática
$C_{HMF}$	Concentração de HMF	<b>GL</b>	Graus de liberdade
$C_{LIG}$	Concentração de lignina solúvel	<b>MQ</b>	Média Quadrática
<b>DO</b>	Densidade óptica	<b>SS</b>	Sólido seco
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência	<b>TOT</b>	Total (g de produto g <sup>-1</sup> total açúcares)
<b>ESP</b>	Específico (g produto g <sup>-1</sup> glicose ou xilose)	<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>g</b>	Aceleração da gravidade	<b>W</b>	Peso
<b>FP</b>	Fator de perda por hidrólise para celulose	<b>vvm</b>	Volume de ar/ volume de meio/minuto
<b>Hac</b>	Ácido acético	<b>XDH</b>	Xilitol desidrogenase
<b>Fur</b>	Furfural	<b>Sc-Ps</b>	<i>P. stipitis</i> e <i>S. cerevisiae</i>
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural	<b>Sc-Sa</b>	Consórcio <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i>
<b>ICP–</b>	Espectrometria de emissão óptica	<b>Sc-Cs</b>	<i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i>
<b>AES</b>	com plasma acoplado indutivamente	<b>YM</b>	meio extrato levedura e extrato de malte (Yeast Malt)

# 1. INTRODUÇÃO

O estudo em torno da produção biotecnológica de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais tem se tornado cada vez mais importante, por figurar como uma tecnologia “limpa”. A produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos poderá aumentar a disponibilidade de recursos energéticos além de diminuir a poluição e o acúmulo de CO<sub>2</sub> no ar.

Os resíduos lignocelulósicos agroindustriais possuem baixo valor econômico e a transformação destes resíduos em material energeticamente aproveitável deverá diminuir a ocorrência de competição entre alimentos e combustíveis. O aumento das áreas de plantio, afeta o meio ambiente de forma expressiva, no que diz respeito à substituição de áreas ocupadas por florestas nativas ou por plantações de culturas como cana-de-açúcar e soja.

Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumuladas no meio ambiente decorrentes da produção agrícola e do beneficiamento de cereais, por exemplo. O acúmulo de tais resíduos pode acarretar em problemas de origem ambiental, decorrentes do desequilíbrio do meio ambiente gerado pela sua decomposição descontrolada, além da degradação desses resíduos representarem a perda de potenciais recursos energéticos, uma vez que, são recursos passíveis de biotransformação a compostos de elevado valor agregado como combustíveis (etanol). A produção de etanol a partir de hidrolisados de resíduos lignocelulósicos agroindustriais tem sido tema de inúmeros trabalhos científicos, já que é possível converter a celulose e a hemicelulose a etanol através de bioprocessos. Estima-se que a fixação de CO<sub>2</sub> pelas plantas terrestres é de aproximadamente 56x10<sup>9</sup> toneladas/ano e que a produção de biomassa mundial é de 170-200 x10<sup>9</sup> ton/ano, dessas, 70% são parede celular (150-170 x10<sup>9</sup> ton/ano) composta por 70% de celulose e hemicelulose que é a fração dessa biomassa passível de transformação a bioetanol.

Atualmente utiliza-se apenas  $2 \times 10^9$  ton/ano dessa biomassa oriunda de parede celular sendo que  $1,05 \times 10^9$  e  $9,5 \times 10^8$  são utilizados para produção de energia e fabricação de madeira e papel, respectivamente (PAULY *et al*, 2008).

Uma visão geral das publicações envolvendo resíduos agroindustriais aponta um aproveitamento regional de produtos, verificando-se produções científicas empregando subprodutos do processamento do milho, por grupos norte-americanos; e do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil. Porém, no Brasil, além da cultura de cana-de-açúcar que se concentra na região sudeste do país, nós temos a cultura de milho, trigo, algodão, arroz entre outras. A China é o principal produtor mundial de arroz, com 184 mil toneladas, ou seja, 29% do total produzido, seguida pela Índia com 21,5%. A produção brasileira corresponde a 1,8% da produção mundial e tem se mantido próxima a 10 milhões de toneladas, em 2006.

Em 2006, o Rio Grande do Sul foi o maior produtor nacional de arroz, com 50% do total produzido no país. O manufaturamento do arroz gera grandes quantidades de resíduos, como a palha e a casca de arroz. Mais de 113 milhões de toneladas de casca de arroz são geradas a cada ano no mundo (YU *et al*, 2009). Para que os resíduos lignocelulósicos, como a casca de arroz, sejam bioconvertidos, é necessária a utilização de pré-tratamentos, que liberem os açúcares fermentescíveis existentes na composição dos materiais lignocelulósicos. Esses pré-tratamentos podem ser realizados mediante hidrólise química ou enzimática. Uma técnica fundamentada e bastante difundida é a hidrólise ácida diluída. Através dela ocorre a liberação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (glicose, manose, galactose e outros) constituintes da hemicelulose.

Um conceito que se busca atualmente, quando falamos em processos fermentativos de hidrolisados oriundos de materiais lignocelulósicos é de biorrefinaria, o qual visa aproveitar as sinergias entre a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos

de alto valor agregado, aumentando a diversidade econômica da biorrefinaria. Tanto etanol quanto xilitol, um composto amplamente usado na indústria alimentícia e farmacêutica, podem ser formados no processo fermentativo dos materiais lignocelulósicos. A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos a etanol e/ou xilitol requer a presença de microrganismos que fermentem tanto as hexoses quanto às pentoses do meio, inserindo-se no contexto de biorrefinaria. Para isso, sistemas de co-fermentações são interessantes, utilizando tanto microrganismos que convertam simultaneamente glicose e xilose a etanol e xilitol. As condições de fermentação empregadas são as que irão determinar os produtos finais do processo.

A conversão de resíduos agroindustriais mediante processos biotecnológicos permite, também, o desenvolvimento de tecnologia e ciência em países subdesenvolvidos, onde este tipo de material é mais abundante justamente pelo fato de esses países apresentarem grandes produções agrícolas, matérias-primas, e baixas produções de materiais manufaturados, cujo valor agregado é superior.

Com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de etanol a partir da conversão de hidrolisado de casca de arroz por leveduras, elaboraram-se estudos que compreenderam: a otimização da hidrólise ácida diluída da casca, seleção de leveduras eficientes produtoras de etanol, estudo da conversão biotecnológica do hidrolisado em produto e avaliação da sacarificação e fermentação simultânea do hidrolisado a etanol e xilitol, em biorreatores.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. BIOMASSA

Atualmente o Brasil tem mais de 80% de seus veículos rodando com bioetanol e até mesmo motores para pequenos aviões estão sendo desenvolvidos. Com a crescente instabilidade dos preços do petróleo do Oriente Médio, muitos países decidiram optar por uma política energética para a utilização de biocombustíveis. Isso inicia uma pressão para a produção de culturas que fortaleça a produção de bioetanol. No entanto, o uso de culturas alimentares como milho, beterraba, etc. para produção de bioetanol podem provocar conflito com a produção de alimentos (SOCCOL *et al.*, 2010).

A produção de bioetanol a partir da biomassa lignocelulósica é uma forma de reduzir o consumo e o esgotamento dos combustíveis fósseis e a poluição ambiental. A biomassa pode ser obtida a partir de resíduos florestais que, devido as grandes quantidades de resíduos disponíveis, tem potencial para se tornar significativas fontes de matérias-primas para o processo de transformação da biomassa em etanol (GIL *et al.*, 2010).

A biomassa vegetal é composta por duas classes, a primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose que é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias e de bioconversão a etanol. A segunda classe é composta pelas partes estruturais da planta, é o caso da lignocelulose, que é formada por açúcares mais complexos e de difícil acesso (OCTAVE e THOMAS, 2009).

#### *2.1.1 Materiais lignocelulósicos*

Devido à diminuição de reservas de combustíveis fósseis, fontes alternativas de energia devem ser renováveis, sustentáveis e eficientes, ter custo conveniente e seguro



(CHUM e OVEREND, 2001). A biomassa lignocelulósica representa uma matéria-prima abundante para produção de etanol, e não concorre para uso como alimento. Os biocombustíveis denominados como de segunda geração, tais como os derivados da biomassa lignocelulósica, estão tornando-se amplamente aceitos como superiores aos denominados biocombustíveis de primeira geração, derivados de culturas alimentares (SIVAKUMAN *et al.*, 2008). Arroz, trigo, cana e algodão contabilizam 66% do total de resíduos gerados na produção industrial (PRASAD e SINGH, 2007). Os materiais lignocelulósicos são amplamente disponíveis a baixo custo e renováveis a serem considerados ideais para a produção de etanol (JONNISON *et al.*, 2007). Na prática, o hidrolisado de biomassa lignocelulósica pode ter diferentes proporções de glicose/xilose em função dos diferentes métodos de hidrólise e diferentes substratos (ZHAO *et al.*, 2008).

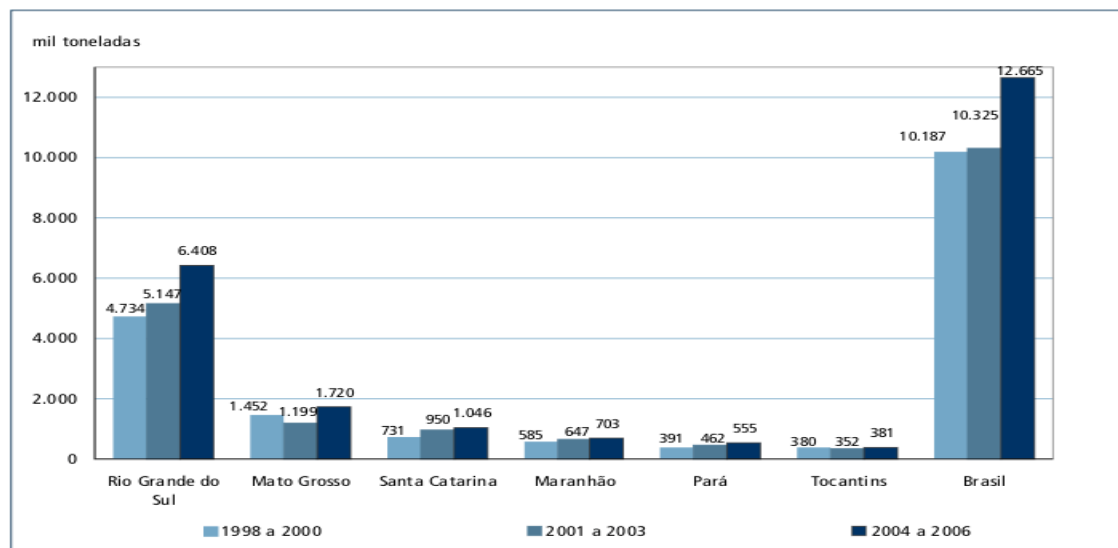
Segundo KUMAR e colaboradores (2008) os maiores componentes da parede celular de plantas são a celulose, a hemicelulose e a lignina, além de vários extrativos e compostos inorgânicos. A proporção destes componentes varia na composição dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES e JIN, 2000). A celulose é um homopolímero extremamente ordenado de celobiose, o qual é dímero de glicose, que possui em sua extensão cerca de 10.000 unidades glicosídicas formando uma cadeia rígida em forma de fibras. A hemicelulose por sua vez é um heteropolímero menor, com grau de polimerização entre 100 e 200 e possui muitas ramificações contendo diferentes carboidratos como a xilose, arabinose, manose, galactose, glicose, assim como ácidos urônicos. Dependendo da predominância do tipo de açúcar as hemiceluloses podem ser chamadas de arabino-xilanas, mananas, glucanas ou galactanas. Esses açúcares contêm cinco (pentoses) ou seis (hexoses) carbonos em sua estrutura e são unidos por ligações glicosídicas do tipo 1-3, 1-4 e 1-6, quase sempre acetiladas, formando uma estrutura fraca e hidrofílica que serve como uma conexão entre a

lignina e as fibras de celulose, além de conferir rigidez ao complexo celulose-hemicelulose-lignina (STAMBUK *et al.*, 2008). A lignina por sua vez é uma macromolécula tridimensional composta basicamente por unidades de fenilpropano, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmílicos precursores (guaiacil, siringil e p-hidroxifenil). Na parede celular, a lignina está associada às polioses através de interações físicas e ligações covalentes. O fato de a lignina envolver as células funcionando como uma “cola” dificulta a biodegradação, protege a planta contra o ataque de microrganismos e confere coesão à estrutura interna além de resistência ao esforço mecânico (FENGEL E WEGENER, 1989; HOFRICHTER, 2002; READING *et al.*, 2003).

Em estimativa feita por KIM e YUM (2006) são gerados 1,5 trilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica por ano, tornando essa uma fonte inesgotável de matéria-prima para formação de bioprodutos, como o etanol e o xilitol. Esse enorme acúmulo de resíduos lignocelulósicos provém em grande parte do processamento de culturas agrícolas. Nesse âmbito, merecem destaque as significativas quantidades de resíduos de plantas remanescentes e inutilizadas após as colheitas de sementes e grãos, bem como os resíduos oriundos do manufaturamento em indústrias.

No Brasil, a área ocupada atualmente com a cultura de cana-de-açúcar, por exemplo, é de aproximadamente 9 milhões de hectares, superior em 11,5 % à safra anterior (MAPA/CONAB, 2009). A cada ano são produzidas toneladas de resíduos oriundos dessa cultura, o chamado bagaço de cana, o qual é massivamente estudado para bioconversão a etanol por grupos de pesquisa do sudeste brasileiro. Estados como o Rio Grande do Sul (RS), que não participam do mercado alcooleiro e não produzem bagaço de cana com grande expressão. Em compensação o RS é um dos maiores produtores de arroz do Brasil e conseqüentemente de resíduos provenientes do processamento desse grão. A Região Sul é

a principal produtora de arroz, colheu 7 531 984 toneladas em 2004, que correspondeu a 56,73% do total produzido no País. O Rio Grande do Sul, principal estado produtor, deteve 47,74% do total produzido, tendo sua produção apresentado um crescimento de 34,94% (IBGE, 2006). A Figura 1 nos mostra a proporção em comparação com outros estados brasileiros.



Fonte: IBGE - Produção Agrícola Municipal, 2006.

**Figura 1:** Produção de arroz em toneladas por tempo em anos.

A casca de arroz torna-se, neste contexto, um resíduo muito abundante e de baixo valor agregado pelo seu baixo valor como ração animal, pois é de difícil digestibilidade, baixa densidade, e em grande quantidade de cinzas/sílica como componentes e características abrasivas (SAHA e COTTA, 2008).

### ***2.1.1.1. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos***

Os materiais lignocelulósicos devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentescíveis ou aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática (LEE, 1997).

A conversão de biomassa lignocelulósica a etanol segue uma metodologia semelhante, que inclui um pré-tratamento para melhorar a acessibilidade dos polissacarídeos da parede celular de hidrólise das enzimas, podendo ser seguido ou não por uma hidrólise enzimática dos polissacarídeos em açúcares componentes e, finalmente, a fermentação dos açúcares monoméricos em etanol (SIVAKUMAN *et al.*, 2008).

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por uma mistura de carboidratos polimerizados (celulose, hemicelulose) e lignina. A fração celulósica dos resíduos agroindustriais pode ser convertida em glicose por hidrólise enzimática, utilizando celulasas, ou por via química, utilizando ácidos como o sulfúrico (MOSIER *et al.*, 2005). A hemicelulose se diferencia da celulose substancialmente por ser um polímero ramificado, tornando-a mais fácil de ser hidrolisada que a celulose, que é um polímero linear que possui partes amorfas e cristalinas (SINGH e MISHRA, 1995). O bioetanol será resultante da conversão dos açúcares fermentescíveis como glicose e xilose, liberados pela hidrólise ácida dos resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

Os pré-tratamentos se fazem necessários, pois provocam efeitos como o aumento na acessibilidade na área de superfície, redução na cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização da hemicelulose e/ou lignina e a modificação da estrutura da lignina (MARGEOT *et al.*, 2009). Dentre os pré-tratamentos, o realizado com ácido diluído e temperaturas intermediárias é considerado geralmente o mais eficaz em relação custo-benefício, e atua pelo afrouxamento da parede celular da matriz através da degradação de hemicelulose (SIVAKUMAN *et al.*, 2008). Um fator importante a ser

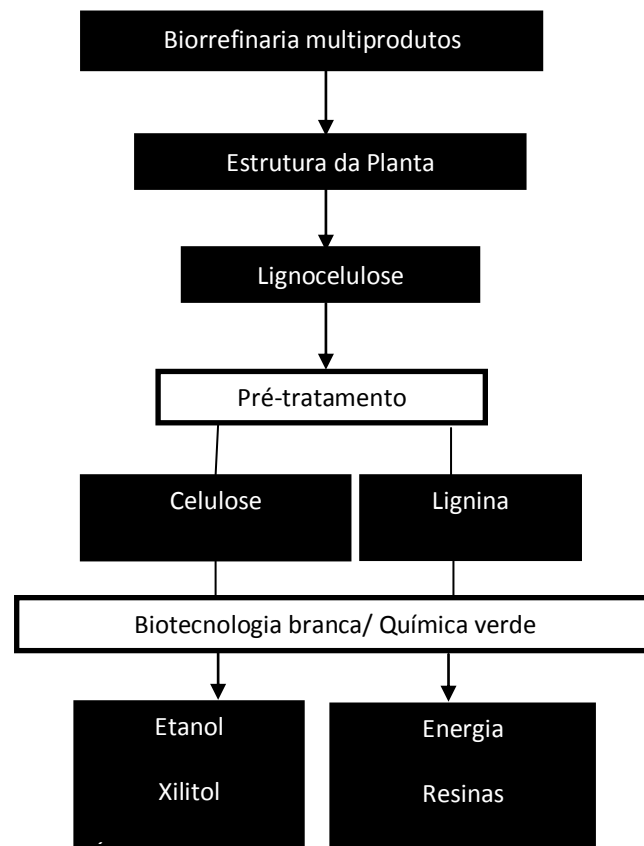
considerado é que durante a hidrólise ácida diluída, dependendo das condições empregadas, compostos secundários dos açúcares e da lignina podem ser gerados, inibindo o crescimento de microrganismos fermentadores que serão utilizados posteriormente a esta etapa (MUSSATO e ROBERTO, 2004). Segundo PALMQVIST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

Para tratamentos físicos existem diversos tipos de moagem, já os tratamentos químicos e físicos incluem explosão a vapor, extração por água líquida quente (LHW), explosão de fibra com amônia (AFEX), hidrólise alcalina, extração por solventes, hidrólise ácida diluída, entre outros (SUN e CHENG, 2002). Além desses processos, ainda existe o tratamento de deslignificação biológica e a própria hidrólise enzimática da celulose, que necessita de maior tempo de processo e possui alto custo de produção, respectivamente (SUN e CHENG, 2002).

## **2.2. BIORREFINARIA**

Biorrefinaria é um conceito para a coleção de processos utilizados para conversão de biomassa em produtos químicos e energia. A biomassa lignocelulósica pode ser fracionada em diversos componentes por tratamentos seqüenciais que separaram produtos que podem ser utilizados para diferentes aplicações, permitindo a maximização dos benefícios de um recurso renovável (AMIDON *et al.*, 2008).

A Figura 2 mostra produtos para diferentes cenários de uma biorrefinaria de materiais lignocelulósicos: (a) simples utilização (todo açúcar convertido em etanol e lignina como combustível de queima), (b) utilização parcial (todo açúcar convertido em etanol, metade da lignina como combustível de queima e a outra metade transformados em materiais poliméricos e ácido acético como *commodities*), (c) utilização completa (glicose convertida em etanol, xilose e outros açúcares menores em produtos de alto valor agregado, toda lignina usada na produção de materiais poliméricos e ácido acético como *commodities*), respectivamente (ZHANG *et al.*, 2008).



**Figura 2** - Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos (Adaptado de OCTAVE & THOMAS, 2009).

A biorrefinaria (Figura 2) pode ser dita de primeira geração quando utiliza açúcares considerados reservas metabólicas da planta, é o caso da sacarose e do amido, que são

açúcares facilmente acessíveis e que já têm tecnologias firmadas para produção de bioetanol tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos. Ou ainda, a biorrefinaria pode ser dita de segunda geração, a qual se baseia na produção de bioetanol, entre outros produtos, através da utilização do complexo lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina). As vantagens na utilização de materiais lignocelulósicos como matéria-prima são a abundância na natureza e o fato de não haver concorrência com produção de alimentos (OCTAVE e THOMAS, 2009).

Segundo ZHANG e colaboradores (2008), as refinarias de petróleo com o objetivo de atingir taxas máximas de eficiência econômica, acabam sempre produzindo múltiplos produtos (diesel, gasolina, óleo lubrificante, etc.). Isso porque uma planta que produz apenas um produto será um grande risco para os investidores e obterá um fraco desempenho perante as flutuações do mercado econômico. Dessa forma, é preciso aproveitar as sinergias entre a produção de biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado, pois mais tarde isso irá aumentar a diversidade econômica da biorrefinaria de biomassa (WYMAN *et al.*, 2003).

Os biocombustíveis têm potencial para substituir uma grande parte dos combustíveis fósseis, no entanto considera-se que a utilização de biomassa lignocelulósica, através de tecnologias de segunda geração, será necessária para que isso seja alcançado e economicamente sustentável. A matriz lignocelulósica é complexa e recalcitrante à conversão, mas a investigação em biorrefinarias está avançando rapidamente e instalações comerciais esperados no curto prazo (HAYES *et al.*, 2009).

### 2.2.1. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Etanol

A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos a etanol requer a presença de microrganismos que fermentem tanto as hexoses (glicose, manose e galactose), quanto às pentoses (xilose e arabinose) na presença de compostos inibitórios, incluindo ácidos fracos, furaldeídos e fenóis (MARGEOT *et al.*, 2009).

Muitas leveduras são conhecidas por fermentar xilose, incluindo gêneros como *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Schawannyomyces*, entre outras. As espécies de leveduras reconhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são *Pichia stipitis*, *P. tannophilus* e *Candida shehatae*. Dentre elas, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de 0,30 – 0,44 g g<sup>-1</sup> de substrato (STAMBUCK *et al.*, 2008). As leveduras *P. stipitis* e *C. shehatae*, são capazes de converter xilose em etanol, no entanto, têm um rendimento relativamente baixo do etanol e baixa tolerância aos inibidores (TIAN *et al.*, 2009).

Um dos fatores que afeta significativamente a taxa de utilização dos carboidratos disponíveis e sua eventual conversão a etanol é aeração do cultivo (SAHA e WOODWARD, 1997). A limitação de oxigênio pode estar associada ao acúmulo de etanol no meio. Sob condições aeróbias, grande parte da xilose metabolizada é convertida a xilitol, que é o principal co-produto formado nos cultivos de xilose sob condições limitadas de oxigênio, comprometendo assim, a produção de etanol. Inúmeras causas são atribuídas para a ineficiente incorporação das moléculas derivadas da metabolização da xilose, na rota bioquímica central, que culmina na formação de etanol. A causa mais importante consiste no desequilíbrio redox entre os co-fatores das enzimas xilose-redutase e xilitol desidrogenase, o qual ocorre sob condições limitadas de oxigênio, necessárias para que o



substrato seja convertido em etanol e não a biomassa. Outra causa consiste nas limitações metabólicas que ocorrem a partir da xilitol desidrogenase, incluindo a etapa de conversão de xilulose a xilulose-5-fosfato catalisada pela xiluloquinase (WALFRIDSSON *et al.*, 1995). Além disso, quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns microrganismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, isso foi demonstrado em microrganismos como *P. tannophilus* (MALESZKA e SCHNEIDER, 1982), *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* (SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008).

Quanto à conversão de hexoses, *Saccharomyces cerevisiae* é um dos microrganismos mais utilizados na produção de etanol de milho, melado, e cana de açúcar, devido à sua alta eficiência na fermentação de hexoses a etanol, e tolerância superior ao mesmo e ao baixo pH. Além disso, possui alta tolerância a

os compostos inibitórios presentes na biomassa lignocelulósica pré-tratada (KLINKE *et al.*, 2004). No entanto, devido à falta de uma via metabólica da xilose em xilulose, *S. cerevisiae* não pode utilizar xilose, apenas se as cepas forem reconstruídas por engenharia metabólica (MATSUSHIKA *et al.*, 2009). Várias pesquisas atualmente objetivam o desenvolvimento de linhagens modificadas de *S. cerevisiae* que consigam utilizar as pentoses presentes nos hidrolisados (HANH – HAGERDAL *et al.*, 2007).

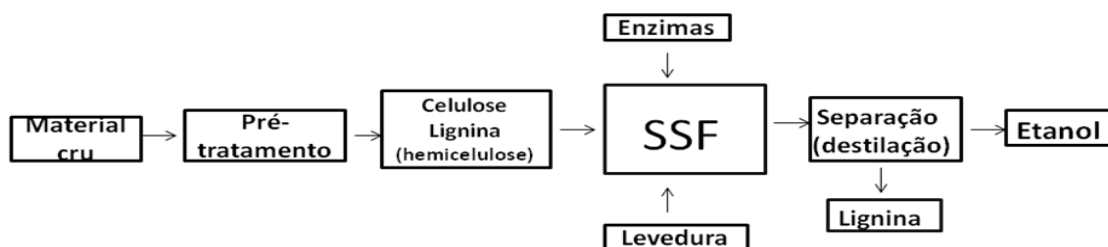
As co-fermentações têm sido bastante utilizadas tanto na forma livre como imobilizada, com o objetivo de utilizar as pentoses e as hexoses presentes em hidrolisados lignocelulósicos (HINFRAY *et al.*, 1995). Meios de fermentação com misturas de açúcares têm tido sucesso na conversão a etanol utilizando leveduras geneticamente modificadas e bactérias (MONIRUZZAMAN, 1996). Porém outro investimento além da produção de etanol pode ser a formação simultânea de xilitol por consórcios de leveduras como *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* (LATIF e RAJOKA, 2001). Desta forma o resíduo é totalmente

bioconvertido a produtos de grande interesse comercial, tornando essa tecnologia mais rentável.

### 2.3. SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF)

Várias etapas estão envolvidas na produção de combustíveis e produtos químicos a partir da biomassa lignocelulósica, como preparação de matérias-primas, pré-tratamento, fracionamento, hidrólises enzimáticas (sacarificação), fermentação etc. Dentre os sistemas de produção de etanol a partir da celulose, a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) é um dos processos mais estudados. Após o pré-tratamento, normalmente usa-se microrganismos que somente utilizam açúcares monoméricos, então a hemicelulose presente necessita ser hidrolisada enzimaticamente antes da fermentação, e com a SSF isso ocorre concomitantemente à fermentação. O processo SSF oferece benefícios como aumento da produção de etanol, reduzindo a inibição exercida por produtos de sacarificação e também elimina a necessidade de reatores separados para sacarificação e a fermentação, que resulta em redução de custos (KRISHNA *et al.*, 2000). As enzimas podem ser comerciais ou provindas da natureza, reduzindo muito o custo do processo.

A Figura 3, apresentada em OLOFSSON *et al.*, 2008, representa uma representação esquemática da SSF.



**Figura 3:** Representação esquemática da sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). Adaptado de OLOFSSON *et al.*, 2008.

Apesar da vantagem econômica do SSF frente à hidrólise e fermentação em separado (SHF), o maior problema com o SSF é a diferença de temperatura ótima das celulases e do microrganismo de fermentação. Linhagens de *Saccharomyces* suportam uma temperatura máxima de 35°C. Enzimas celulases são freqüentemente aplicadas em hidrólise da celulose têm uma temperatura ideal de 50°C. Uma possível solução para resolver este problema é usar leveduras termotolerantes ao invés de linhagens de *Saccharomyces*, que permitem altas temperaturas de processamento. (KÁDÁR *et al.*, 2004). Em uma indústria, o processo de SSF deve ter concentrações de enzimas e de células microbianas balanceadas para minimizar o custo com fermento e produção de enzima (OLOFSSON *et al.*, 2008).

#### **2.4. CO FERMENTAÇÃO**

Para o processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos ser viável economicamente, todas as hexoses (glicose) e as pentoses (xilose, arabinose etc) devem ser convertidas. Não há um microrganismo naturalmente capaz de fermentar todos estes açúcares a etanol. (FU *et al.*, 2008).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a mais utilizada para o processo de produção de etanol em batelada, sendo uma eficiente fermentadora do hidrolisado. Porém esta levedura não fermenta nem utiliza pentoses no seu metabolismo (OHGREN *et al.*, 2006).

Um co-cultivo de dois microrganismos, um fermentador de hexoses e um fermentador de pentoses têm sido muito estudados, como *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (GROOTJEN *et al.* 1991). Porém, deve-se observar certas dificuldades nesta operação,

como encontrar uma aeração e pHs ideais para a co-fermentação, além de utilizar microrganismos resistentes aos inibidores presentes no hidrolisado (ZHANG *et al.*, 2010).

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. CASCA DE ARROZ**

A casca de arroz utilizada nos experimentos foi cedida pela empresa Nelson Wendt, localizada na cidade de Pelotas, RS. A casca foi moída em partículas menores que 1 mm de diâmetro, ensacada e armazenada a temperatura ambiente até a realização das hidrólises.

### **3.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA CASCA DE ARROZ**

A análise da casca de arroz foi feita de acordo com a metodologia descrita por DUNNIG e DALLAS (1949), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A umidade da casca foi determinada em balança de infravermelho (OHAUS) por 30 minutos a 105°C. Para a análise de 2g de casca (massa seca) foram pesadas e transferidas para um béquer ao qual foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). A mistura foi agitada continuamente com bastão de vidro e climatizada em banho-maria a 50 °C por 7 minutos. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros. Após completar o tempo da hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 mL de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Em uma etapa de pós-hidrólise, a suspensão foi autoclavada a 121°C por 15 minutos. Após resfriamento, a suspensão foi filtrada em papel de filtro, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com água destilada. O resíduo sólido, (após várias lavagens) foi seco em estufa a 105°C e pesado até massa constante. A diferença entre a massa seca do resíduo e a massa seca inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina presente na casca de arroz. A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE) para determinar as concentrações dos componentes do material lignocelulósico (ácido glucurônico, celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético) utilizados para o cálculo da porcentagem de celulose e hemicelulose da casca de arroz.

Para determinação das cinzas, 1 g de casca de arroz (massa seca) foi submetida a um tratamento térmico em mufla elétrica a 600 °C, durante 4 horas, até combustão total da matéria orgânica. Em seguida, esta foi pesada até obter-se massa constante (SILVA e QUEIROZ, 2005).

O teor de proteína foi determinado conforme metodologia descrita por HORWITZ (1975), utilizando o método de KJELDAHL, empregando-se fator de 6,25 para casca de arroz.

### 3.2.1. Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi calculado conforme descrito por Rocha (2000):

$$\% \text{ lignina} = \left[ \frac{\text{massa de lignina (g)} \times 10000}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (g)}} \right] \quad (\text{Eq. 1})$$

### 3.2.2. Determinação do teor de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados conforme descrita por IRICK *et al.* (1988).

$$\% \text{ celulose} = \left[ \frac{\text{glicose (g/L)} \times 50 \times 100 \times \text{FC} \times \text{FP}}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (\%)}} \right] \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: FC = fator de conversão da celulose (0,9)

FP = fator de perda por hidrólise para celulose (1,06)

$$\% \text{ hemicelulose} = \left[ \frac{(\text{xilose (g/L)} \times 50 + \text{arabinose (g/L)} \times 50) \times 100 \times \text{FC} \times \text{FP}}{\text{massada amostra (g)} \times \text{massasecada amostra (g)}} \right] \quad (\text{Eq.3})$$

Em que: FC = fator de conversão da hemicelulose (0,88)

FP = fator de perda por hidrólise para hemicelulose (1,15)

### 3.2.3. Determinação dos parâmetros fermentativos e de hidrólise

A conversão de açúcares ( $YS \text{ g g}^{-1}$ ) e a eficiência de hidrólise ( $\eta$ , %) foram calculadas pelas seguintes equações:

$$YS = (CV / M) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\eta = (YS / Y_{\max}) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:  $C$  = concentração dos componentes da fase líquida ( $\text{g L}^{-1}$ );

$M$  = massa seca de casca de soja utilizada no experimento (g);

$V$  = volume da solução líquida (L);

$Y_{\max}$  = conversão máxima de açúcares (g por 100 g matéria seca).

### 3.2.4. Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada conforme descrito por SILVA E QUEIROZ (2005):

$$\% \text{ cinzas} = \left[ \frac{\text{massa cinzas (g)} \times 100}{\text{massa seca da amostra (\%)}} \right] \quad (\text{Eq. 6})$$

### 3.3. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DE ARROZ

Um planejamento experimental foi realizado abrangendo variáveis significativas para liberação de açúcares. Neste planejamento fatorial as variáveis independentes avaliadas foram: a concentração de ácido sulfúrico e a temperatura, bem como os efeitos de possíveis interações entre estas, sobre a hidrólise dos polissacarídeos presentes na casca de arroz. A relação sólido-líquido foi fixada em 1:5. O planejamento experimental baseou-se em um planejamento composto central  $2^2$  com três repetições no ponto central. Os valores das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 ilustra a matriz experimental do planejamento estudado.

Os ensaios foram conduzidos em ampolas de inox 316 com capacidade para 100 mL de solução, contendo casca de arroz previamente moída e solução de ácido sulfúrico 1%. Os reatores foram imersos em banho de silicone sob as diferentes temperaturas por períodos de 20, 30 e 40 minutos. Posteriormente a fração líquida obtida foi analisada por CLAE.

Este desenho permitiu a estimativa da significância dos parâmetros e sua interação com o F-teste. Os resultados foram avaliados com o software Statistica 7,0.

**Tabela 1-** Níveis dos fatores utilizados no planejamento central composto  $2^2$  com três repetições no ponto central.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	120	128,72	150	171,28	180
Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mmol g <sup>-1</sup> sólido seco)	1	1,58	3	4,42	5



**Tabela 2-** Esquema da matriz do planejamento central composto  $2^2$  com três repetições no ponto central.

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura (°C)	Concentração de ácido ( $\text{mmol g}^{-1}$ sólido seco)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	+1,41
8	0	-1,41
9	0	0
10	0	0
11	0	0

### 3.4. MEIOS DE CULTIVO

#### 3.4.1. MEIO SEMISSINTÉTICO

O meio semissintético utilizado nos ensaios denominado  $G_{20}X_{20}A_{10}$ , era composto em  $\text{g L}^{-1}$ , por: extrato de levedura, 3; peptona, 5; xilose, 20; glicose, 20 e arabinose, 10.

#### 3.4.2. HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ - HCA

O hidrolisado utilizado nos cultivos de microrganismos foi obtido através da hidrólise da casca de arroz, em autoclave, utilizando frascos de vidro Pyrex de 20L. A relação sólido: líquido (casca de arroz moída:ácido sulfúrico 1% v/v) foi de 1:10. A hidrólise foi conduzida a  $121^{\circ}\text{C}$  durante 95 minutos (aquecimento: 15 minutos, tempo de reação: 60 minutos e resfriamento: 20 minutos). O hidrolisado resultante foi resfriado em banho-maria e filtrado em sacos de algodão. O sobrenadante foi estocado em câmara fria a  $4^{\circ}\text{C}$  para posterior concentração e tratamento. Este hidrolisado foi concentrado 2,8 vezes

em concentrador de inox a 70°C, sob vácuo. A confecção deste hidrolisado foi realizada na Universidade de São Paulo – Escola de Engenharia de Lorena, no Departamento de Biotecnologia. Antes do cultivo o pH do hidrolisado foi corrigido para 5,5, com NaOH sólido e este foi centrifugado a 3000 g para retirar o precipitado formado, sendo em seguida submetido a esterilização por autoclavagem (0,5 atm, 111°C, 30 minutos).

O hidrolisado utilizado no experimento de fermentação e sacarificação simultânea, em biorreator de cultivo submerso, foi preparado em autoclave a 121°C durante 95 minutos (rampa de aquecimento: 15 minutos, tempo de reação: 60 minutos e rampa de resfriamento: 20 minutos), com relação sólido:líquido de 1/10 (casca de arroz moída:ácido sulfúrico 1% v/v). As condições de hidrólise anteriormente otimizadas não foram obedecidas neste experimento por falta de equipamentos laboratoriais. Este hidrolisado não foi filtrado para que celulose contida na fração sólida fosse hidrolisada por ação enzimática, simultaneamente ao processo fermentação pelas leveduras. Antes do cultivo o hidrolisado teve seu pH corrigido para 5,5, com NaOH sólido e esterilizado por autoclavagem (0,5 atm, 111°C, 30 minutos).

Ambos os hidrolisados foram suplementados com 3 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura e 5 g L<sup>-1</sup> peptona, antes da esterilização.

### **3.5. MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E INÓCULO**

As leveduras utilizadas nos experimentos foram *Saccharomyces cerevisiae* (ICV d953), *Candida shehatae* (HM52.2), *Spathaspora arborariae* (HM19.1a) e *Pichia stipitis* (IMH43.2). As linhagens HM52.2, HM19.1a e IMH 43.2, foram gentilmente doadas pelo professor Dr. Carlos Augusto Rosa do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais. *Saccharomyces cerevisiae* (ICV d953) é uma linhagem comercial

isolada de uvas Syrah da região do Vale Rhône (França) produzida pela Lalvin, Institut Coopératif du Vin.

As leveduras foram mantidas em tubo inclinado contendo ágar YM ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 10; ágar, 20. O meio utilizado para preparo do inóculo continha em  $\text{g L}^{-1}$ : extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 30. A glicose foi esterilizada separadamente em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Os pré inóculos foram preparados através do cultivo de cada microrganismo separadamente em frasco Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de meio YM. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm,  $25^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 g por 15 minutos. O *pellet* formado foi lavado com solução salina e ressuspensão diretamente no mesmo meio de fermentação. Os inóculos dos cultivos isolados e dos consórcios foram padronizados para que a concentração celular da suspensão atingisse densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) igual a 1. O volume de inóculo perfazia 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados nos experimentos.

### **3.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS DOS GÊNEROS *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Spathaspora* EM MEIO SEMISSINTÉTICO E HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ**

Foram realizados experimentos sob diferentes condições de cultivo (meio de cultura ( $\text{G}_{20}\text{X}_{20}\text{A}_{10}$  e HCA) e condição de agitação) para avaliar o consumo de açúcares fermentescíveis, produção de etanol e de outros produtos de fermentação por *S. cerevisiae*, *C. shehatae*, *P. stipitis* e *S. arborariae* individualmente e em consórcio com *S. cerevisiae* (co-fermentação).

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 2 L contendo 450 mL de meio G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> ou HCA, em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 28°C por 108 horas e 240 horas, respectivamente. Alíquotas de 10 mL de amostra foram coletadas as 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 horas no meio G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> e 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 144, 168, 192, 216, 240 horas no HCA, para determinar a concentração celular (peso seco e UFC – unidades formadoras de colônia) e quantificar glicose, xilose, arabinose, xilitol e etanol, através de análise cromatográfica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

### **3.7. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL SOBRE HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ EM BIORREATORES DE CULTIVO SUBMERSO**

Experimentos foram realizados em biorreatores de cultivo submerso (Biostat B model, Braun Biotech International, Alemanha), contendo 1,5 L de hidrolisado de casca de arroz concentrado, com aeração de 1vvm, agitação de 300 rpm, temperatura de 30°C e pH controlado em 5,5 com NaOH e HCl, ambos 1M.

O tempo de cultivo foi de 120 horas em biorreatores contendo somente *S. cerevisiae* e de 240 horas nos outros cultivos. Alíquotas de 10 ml foram retiradas a cada 12 horas nas primeiras 120 horas de cultivo, e a cada 24 horas, até completarem 240 horas; para acompanhamento do crescimento celular (UFC) e do consumo de açúcares e produção de etanol. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

O co-cultivo com *S. cerevisiae* e *S. arborariae*, foi conduzido nas mesmas condições de cultivo, e o inóculo foi padronizadas para que a concentração celular da

suspensão atingisse densidade óptica ( $DO_{600}$ ) igual a 1 para as duas espécies proporcionalmente.

A sacarificação e fermentação simultânea foi realizada em biorreator, nas mesmas condições de cultivo empregadas anteriormente no início deste item, utilizando para a sacarificação o complexo enzimático POWERCELL e para fermentação *S. cerevisiae* e *S. arborariae*. A carga enzimática utilizada foi de 15 FPU. O complexo enzimático POWERCELL é um sistema de enzimas desenvolvido para a sacarificação da biomassa lignocelulósica, gentilmente cedido pela PROZYN.

### **3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS**

A caracterização da casca de arroz foi feita por análises químicas (teor de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas e proteína). A caracterização dos hidrolisados (original e concentrado) foi feita pela determinação das concentrações de açúcares (xilose, glicose e arabinose), concentração de inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), pressão osmótica e pH. Os resultados foram descritos na forma de gráficos e tabelas.

#### **3.8.1. Determinação da concentração celular**

Para o preparo dos inóculos foi adotado o método de espectrofotometria. As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro) no comprimento de onda de 600 nm. A avaliação do crescimento celular (células  $mL^{-1}$ ) dos experimentos realizados em frascos agitados com meio sintético foi feita por biomassa seca, utilizando estufa (Fanem 315 SE) a 75 °C até obtenção de peso constante. A avaliação celular (células  $mL^{-1}$ ) nos experimentos realizados em frascos

agitados com hidrolisado de casca e biorreatores foram determinadas através do método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC).

### **3.8.2. Determinação da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético**

Os teores de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético foram determinados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45°C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5 mM) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep-Pack” C18 (Millipore).

### **3.8.3. Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural**

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinadas por CLAE, sob as seguintes condições: coluna Nucleosil C-18 mantida a 25°C; detector ultravioleta/visível SPD-M20A a 276nm, tendo acetonitrila/água (2:8) com 1% de ácido acético como eluente em fluxo de 1,1 mL minuto<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ME25 com 0,45 µL e D13 mm.

### **3.8.4. Determinação da concentração dos fenóis totais**

A concentração de fenóis totais foi determinada pela quantificação da lignina Klason solúvel em meio ácido de acordo com a metodologia proposta por ROCHA (2000):

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de solução de hidróxido de sódio 6 M e diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a 1 unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280nm, utilizando-se como referência solução de hidróxido de sódio 6 M. A concentração de lignina foi calculada por meio das equações 7 e 8:

$$C_{LIG} = 4,187 * 10^{-2} ( A_{LIG\ 280} - A_{PD\ 280} ) - 3,279 * 10^{-4} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:  $C_{LIG}$  = concentração de lignina solúvel em meio ácido ( $\text{g L}^{-1}$ ) e

$A_{LIG}$  = absorbância de todos os compostos em 280 nm

$$A_{PD\ 280} = C_F \beta_F + C_{HMF} \beta_{HMF} \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que:  $C_F$  e  $C_{HMF}$  = concentração de furfural e HMF determinadas por CLAE

$\beta_F$  e  $\beta_{HMF}$  = coeficientes a 280 nm de furfural ( $146,85 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e HMF ( $114 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### 3.8.5. Determinação de pH e Pressão Osmótica

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

### 3.8.6. Determinação de proteína

A análise de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl (HORWITZ, 1975), o qual se baseia na transformação do nitrogênio da proteína em borato de amônio para posterior quantificação com solução ácida padronizada. Inicialmente a amostra foi digerida, para isso foram pesadas 700 mg de casca de soja previamente moída em tubos digestores. Adicionou-se 2,5 g de sulfato de sódio e entre 12 e 14 mL da solução sulfocúprica. Logo após as amostras foram colocadas no aparelho digestor por 50 minutos a

240°C. Após a digestão da amostra, entre 12 e 14 mL de uma solução de ácido bórico a 4% foi vertida em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 40 mL de água destilada e 3 gotas de indicador Tashiro. Conectou-se o Erlenmeyer ao destilador de modo que a ponteira ficasse submersa no líquido. Em seguida, passou-se quantitativamente a amostra digerida para um balão de destilação KJELDAHL de 800 mL, com o auxílio de água destilada, novamente foram colocadas 3 gotas de indicador Tashiro. Adicionou-se hidróxido de sódio a 40 % até a obtenção da coloração verde. O balão foi então acoplado ao destilador, deixando-se destilar até atingir a marca de 125 mL no Erlenmeyer. Logo após a ponta que estava submersa foi retirada e destilou-se novamente até atingir a marca de 150 mL. Por fim, a solução destilada foi titulada com solução de ácido sulfúrico 0,1 N até a viragem da cor verde para roxo. A equação 9 foi utilizada para calcular a percentagem de proteína da amostra. O resultado é a média de 3 experimentos.

$$\% \text{ proteínas} = \left[ \frac{K \times V \times \text{Fator}}{P} \right] \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que:  $K = FC \times 0,0014 \times 100$

P = peso da amostra

FC = fator de correção da solução de ácido sulfúrico a 0,1 N (0,209)

V = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto

Fator = fator de conversão do nitrogênio para proteína (6,25)



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE ARROZ

A Tabela 3 apresenta a composição química da casca de arroz empregada no presente trabalho. Esta composição pode variar conforme o processamento e condições de crescimento desta cultura.

**Tabela 3.** Composição química da casca de arroz.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Celobiose	0,4
Glicose	34,1
Xilose	12,7
Arabinose	1,3
Ácido acético	1,3
HMF	0,3
Furfural	0,9
Lignina insolúvel	22,9
Lignina solúvel	6,1
Extrativos	3,1
Cinzas	16,9
Insolúveis	9,7
Proteína	2,0

O principal açúcar da casca de arroz em concentração é a glicose, seguido de xilose e arabinose, assim como na maioria resíduos lignocelulósicos (HOWARD *et al.*, 2003). A alta concentração de cinzas presente na casca do arroz é um dos fatos que restringe a utilização deste resíduo como ração animal. Já a presença de lignina e cinzas em grandes proporções pode dificultar a bioconversão da casca do arroz a etanol segundo SAHA e colaboradores (2005). A comparação da composição química da casca de arroz com a composição de outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão em etanol, e com este mesmo resíduo, reportadas em diferentes referências bibliográficas, encontra-se na Tabela 4.

**Tabela 4.** Composição química de resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão em etanol.

<b>Resíduo Lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina Total (%)</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
Casca de arroz	34	13	29	Este trabalho
Casca de arroz	30	28	22	Mansilla <i>et al.</i> , 1998
Casca de arroz	35	12	15	Saha <i>et al.</i> , 2005
Palha de arroz	43	22	17	Roberto <i>et al.</i> , 2003
Palha de trigo	31	26	24	Canilha, <i>et al.</i> , 2006
Bagaço de cana	39	26	24	Laser <i>et al.</i> , 2002
Casca de soja	38	10	3	Mielenz <i>et al.</i> , 2009

Conforme observado na Tabela 4, a quantidade de açúcares fermentescíveis (celulose e hemicelulose) neste trabalho (47%) foi semelhante à encontrado por SAHA e colaboradores (2005) (47%) e inferior a 58% relatado por MANSILLA e colaboradores (1998). Os teores de lignina total foram 25 e 50 % maiores que os descritos por MANSILLA e colaboradores (1998) e SAHA e colaboradores (2005). A diferença entre a quantidade de componentes dos materiais lignocelulósicos avaliados pode estar associada à origem da casca e também diferenças nas técnicas de análise. Outros resíduos que vem sendo empregados com sucesso em processos de hidrólise para posterior conversão a etanol como bagaço de cana de açúcar, bagaço de malte, palha de arroz e palha de trigo possuem em torno de 18%, 27%, 17% e 20% de lignina, respectivamente (SUN *et al.*, 2004; MUSSATTO e ROBERTO 2006; SUN *et al.*, 2005). Um dos possíveis problemas gerados pelo alto conteúdo de lignina de um resíduo lignocelulósico está relacionado ao pré-tratamento de hidrólise ácida diluída, que pode gerar o aparecimento de compostos fenólicos inibidores do processo fermentativo, oriundos da degradação parcial desta macromolécula (ALMEIDA *et al.*, 2007).

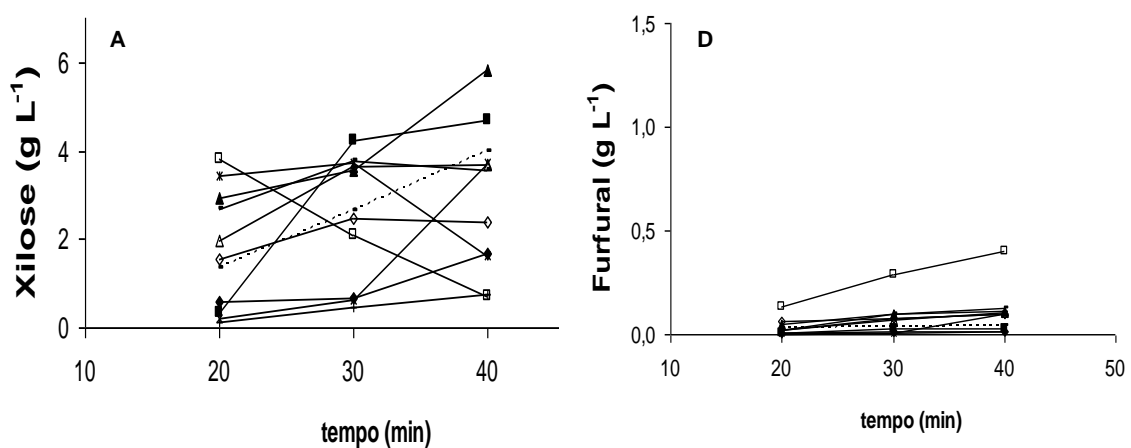
## 4.2. HIDRÓLISE ÁCIDA DILUÍDA DA CASCA DE ARROZ

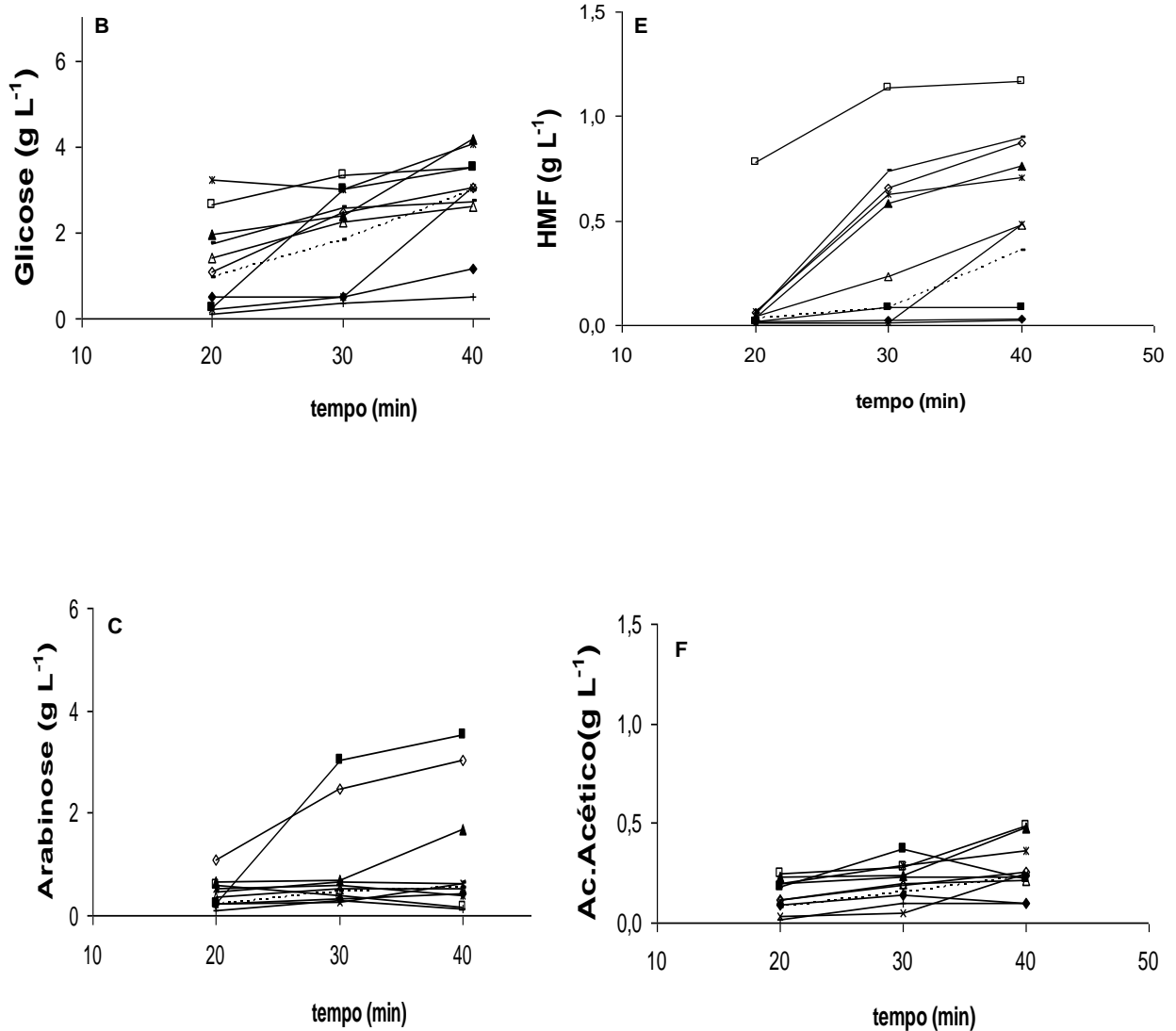
### 4.2.1. Identificação dos fatores que influenciam a hidrólise da casca de arroz

A hidrólise ácida diluída da casca de arroz foi realizada em reatores de aço inoxidável, testando-se as variáveis, temperatura e concentração de ácido sulfúrico. Foi realizado um planejamento composto central  $2^2$ , com três repetições no ponto central, com o objetivo de identificar os fatores que influenciavam nas concentrações finais dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), furaldeídos (furfural e HMF) e ácido acético, obtidas após a hidrólise ácida diluída da casca de arroz.

#### 4.2.1.1 Cinéticas de reação

As cinéticas de liberação dos componentes da casca de arroz para cada tratamento ao longo do tempo de reação (40 minutos) encontram-se na Figura 4. Os fatores avaliados foram temperatura e concentração de ácido, e estes influenciaram de diferentes formas na liberação de cada componente da estrutura lignocelulósica da casca de arroz.





**Figura 4** - Cinéticas de liberação de: (A) xilose; (B) glicose; (C) arabinose; (D) furfural (E) HMF; (F) ácido acético; a partir de hidrólise ácida diluída de casca de arroz durante 20, 30 e 40 minutos. Tratamentos: (—◆—) 129°C; 1,6 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—■—) 129°C; 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—▲—) 150°C; 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—\*—) 171°C; 1,6 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—×—) 150°C; 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—○—) 171°C; 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—□—) 180°C; 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (---) 150°C; 1,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—) 150°C, 5,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—+—) 120°C, 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, (—△—) 150°C, 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS.

Para a liberação de glicose (Figura 4-B), pode-se verificar que entre os tratamentos, as condições que empregaram temperatura e concentração de ácido de 150°C e 3 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS; e 129°C e 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, respectivamente, em 40 minutos, mostraram-se mais eficazes liberando 23 e 19 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de casca de arroz. Em um dos poucos estudos realizados sobre hidrolisado de casca de arroz, SAHA e colaboradores (2005), obtiveram rendimentos de 29 e 40 mg de glicose.g<sup>-1</sup> de casca de arroz, empregando processos de hidrólise ácida diluída de casca de arroz com relação sólido/líquido (15% (w/v)) e tempo diferentes da utilizada neste trabalho tempo (15 minutos), concentração ácido sulfúrico de 1,0% (v/v) em 140°C e 160°C respectivamente. Quanto à liberação de xilose, neste trabalho, o tratamento 150°C e 3,0 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS foi o mais eficiente liberando 22 % desta pentose. Nos processos de hidrólise ácida diluída, a fração hemicelulósica é mais facilmente despolimerizada em temperaturas mais baixas do que as empregadas em processos de liberação da fração celulósica (KARIMI *et al.*, 2006; TAHERZADEH e KARIMI, 2007). A utilização de temperaturas mais brandas durante a hidrólise ácida diluída impede a degradação dos monossacarídeos (*i.e.* glicose e xilose), melhorando o rendimento da hidrólise e também evitando os problemas associados com a inibição da fermentação dos açúcares a etanol e xilitol (SANCHEZ *et al.*,2004).

Apesar de algumas condições de hidrólise serem consideradas severas, as concentrações de ácido acético não ultrapassaram 0,5 g L<sup>-1</sup>, sendo que para a maioria dos microrganismos 3 g L<sup>-1</sup> é considerado tóxico (HELLE *et al.*,2003). Os inibidores mais importantes são os ácidos fracos, compostos fenólicos e furanos, como o furfural e hidroximetilfurfural (HMF), sendo que estes dois últimos compostos são formados pela desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente (TAHERZADEH, 1999). Estes compostos podem ser gerados por altas concentrações de ácido, ou altas temperaturas de hidrólise. Este fenômeno pode ser observado na Figura 4 (D e E), no tratamento em que foi

utilizada a maior temperatura do planejamento experimental (180°C), onde a produção destes inibidores (HMF e furfural) foi maior. Como consequência deste efeito foi possível verificar ainda neste tratamento que houve uma queda na concentração de glicose e xilose devido à decomposição destes açúcares em seus respectivos inibidores.

Considerando apenas a máxima liberação dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), o tratamento com temperatura de 150°C e 3,0 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS (40 minutos de reação), mostrou-se bastante eficiente dentre os demais tratamentos avaliados (70% de eficiência). Todavia, o hidrolisado oriundo deste tratamento apresentou o maior teor de compostos tóxicos, 2,3 g L<sup>-1</sup> (ácido acético (0,79 g L<sup>-1</sup>), HMF (1,08 g L<sup>-1</sup>) e furfural (0,43 g L<sup>-1</sup>)). Para que esse hidrolisado possa ser utilizado em processos biotecnológicos, uma etapa de destoxificação se tornaria imprescindível. Preconizando a aplicação da hidrólise ácida diluída em escala industrial, um processo que evite o passo de destoxificação seria desejável para reduzir custos e a complexidade do processo de produção de etanol (von SIVERS *et al.*, 1994). Sendo assim, uma alternativa interessante seria empregar um processo de hidrólise ácida diluída, cujo hidrolisado apresente a combinação da maior concentração de açúcares com a mínima concentração de compostos tóxicos. Neste contexto a condição 129°C, 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS mostrou-se mais adequada, com uma 52% de eficiência de liberação de açúcares, e apenas 0,18 g L<sup>-1</sup> de inibidores, concentração essa facilmente suportada pelas leveduras (PALMQVIST *et al.*, 2000).

Avaliando as cinéticas de liberação dos açúcares, observou-se que a glicose, xilose, arabinose foram detectadas em maiores concentrações aos 40 minutos de reação. Desta forma, decidiu-se analisar estatisticamente os dados obtidos neste tempo.

#### 4.2.1.2 Análises estatísticas

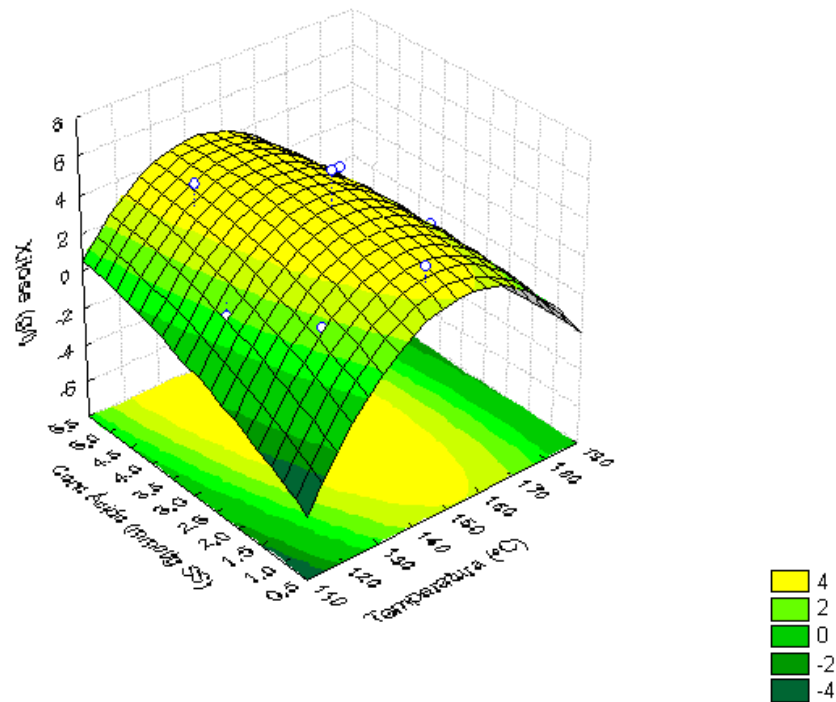
Pela metodologia de planejamento de experimentos foram avaliados os efeitos significativos, bem como as interações entre as variáveis avaliadas (temperatura e quantidade de ácido) que influenciaram nas concentrações dos açúcares, furaldeídos e ácido acético, encontradas no hidrolisado de casca de arroz provenientes da hidrólise ácida diluída deste resíduo. As Tabelas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 apresentam as análises de variância (ANOVA), utilizadas para verificar o nível de significância estatística dos efeitos determinados sobre as variáveis independentes. As Figuras 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mostram as superfícies de resposta geradas a partir da análise de variância para cada variável independente.

A análise de variância (Tabela 5) para a concentração de xilose mostrou significância para o efeito quadrático da temperatura.

**Tabela 5.** Análise da variância para a concentração de xilose presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	0,76807	1	0,76807	0,61422	0,468685
Temperatura (Q)	17,26107	1	17,26107	13,80358	0,013779
Ácido (L)	1,24302	1	1,24302	0,99404	0,364531
Ácido (Q)	0,34286	1	0,34286	0,27418	0,622910
1(L) by 2(L)	1,26078	1	1,26078	1,00824	0,361415
<b>Erro</b>	6,25239	5	1,25048		
Total	27,28517	10			

Nesta análise a temperatura de 150°C foi mais eficaz, liberando 22 % (3,45 g L<sup>-1</sup>) de xilose, como se pode notar na superfície de resposta gerada na Figura 5. Em altas temperaturas (160 - 180°C) ou concentração de ácido (3 - 20%), o rendimento de xilose é menor, devido a sua degradação em furfural e posteriormente em ácido fórmico (MANSILLA *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Superfície de resposta para a concentração de xilose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída.

Os fatores que influenciaram significativamente, para a liberação da glicose, na análise da variância (Tabela 6), foram o efeito linear da temperatura e o efeito da interação entre as variáveis, a quantidade de ácido e a temperatura.

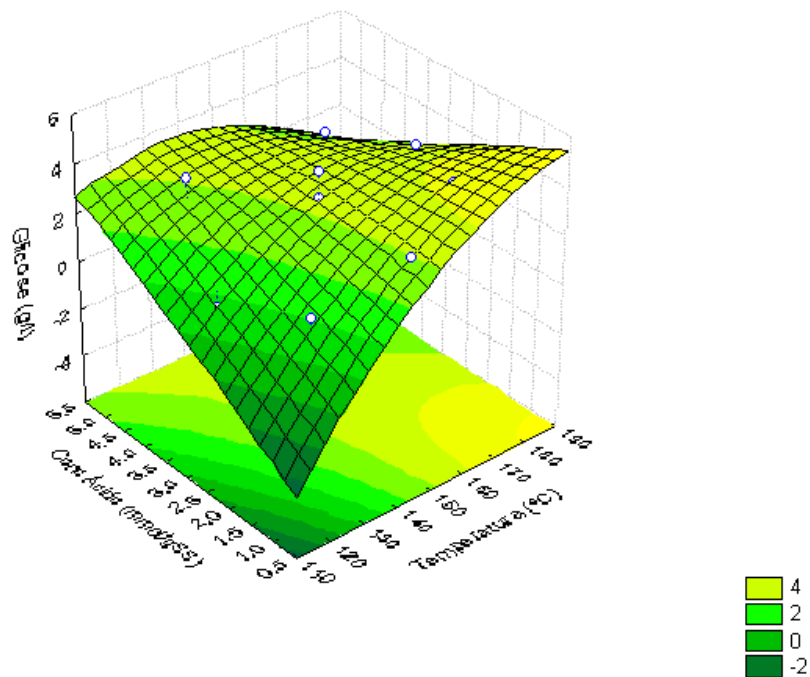
**Tabela 6.** Análise da variância para a concentração de glicose no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	5,59907	1	5,599073	11,00646	0,021064
Temperatura (Q)	1,48413	1	1,484127	2,91745	0,148329
Ácido (L)	0,11995	1	0,119947	0,23579	0,647795
Ácido (Q)	0,04010	1	0,040098	0,07882	0,790145
1(L) by 2(L)	2,83787	1	2,837869	5,57858	0,064598
<b>Erro</b>	2,54354	5	0,508708		
Total	12,61601	10			

Através da superfície de resposta (Figura 6) foi possível verificar que conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam a concentração de glicose no hidrolisado



também aumenta. Com altas temperaturas (172 °C) e concentrações de ácido, nota-se uma diminuição da concentração de glicose no hidrolisado, pois provavelmente ocorre a decomposição desse açúcar, formando HMF e sequencialmente ácido fórmico e levulínico. ASGHARI e YOSHIDA (2006) relataram que a condição ótima para a maior decomposição de glicose a HMF (65%) foi obtida a uma temperatura de 240°C para um tempo de residência de 120 segundos.



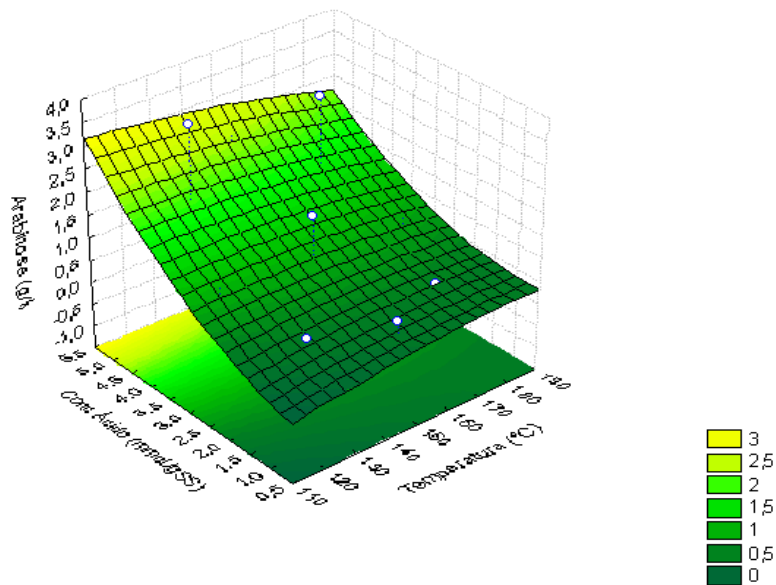
**Figura 6.** Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída.

Segundo a análise de variância (Tabela 7) realizada para a arabinose, nenhum dos fatores testados teve efeito significativo.

**Tabela 7.** Análise da variância para a concentração de arabinose no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	0,02648	1	0,026480	0,014430	0,909062
Temperatura (Q)	0,00783	1	0,007829	0,004266	0,950454
Ácido (L)	4,32845	1	4,328446	2,358758	0,185178
Ácido (Q)	0,16172	1	0,161722	0,088129	0,778506
1(L) by 2 (L)	0,04814	1	0,048138	0,026233	0,877675
<b>Erro</b>	9,17527	5	1,835053		
Total	13,78878	10			

Apesar de não ser efeito significativo, pela análise da superfície de resposta grafada para o rendimento de arabinose (Figura 7), nota-se que conforme aumenta a concentração de ácido utilizada maior é a liberação de arabinose da casca de arroz no processo de hidrólise, no entanto, sob altas temperaturas (160°C) pouca arabinose é encontrada no hidrolisado, pois provavelmente esta é degradada.



**Figura 7.** Superfície de resposta para a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) presente no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída.

Segundo as análises da variância (Tabelas 8, 9 e 10), realizadas para avaliação da liberação de ácido acético, furfural e HMF no hidrolisado, o fator significativo foi o efeito linear da temperatura, para todos os inibidores (Figura 8).

**Tabela 8.** Análise da variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação.

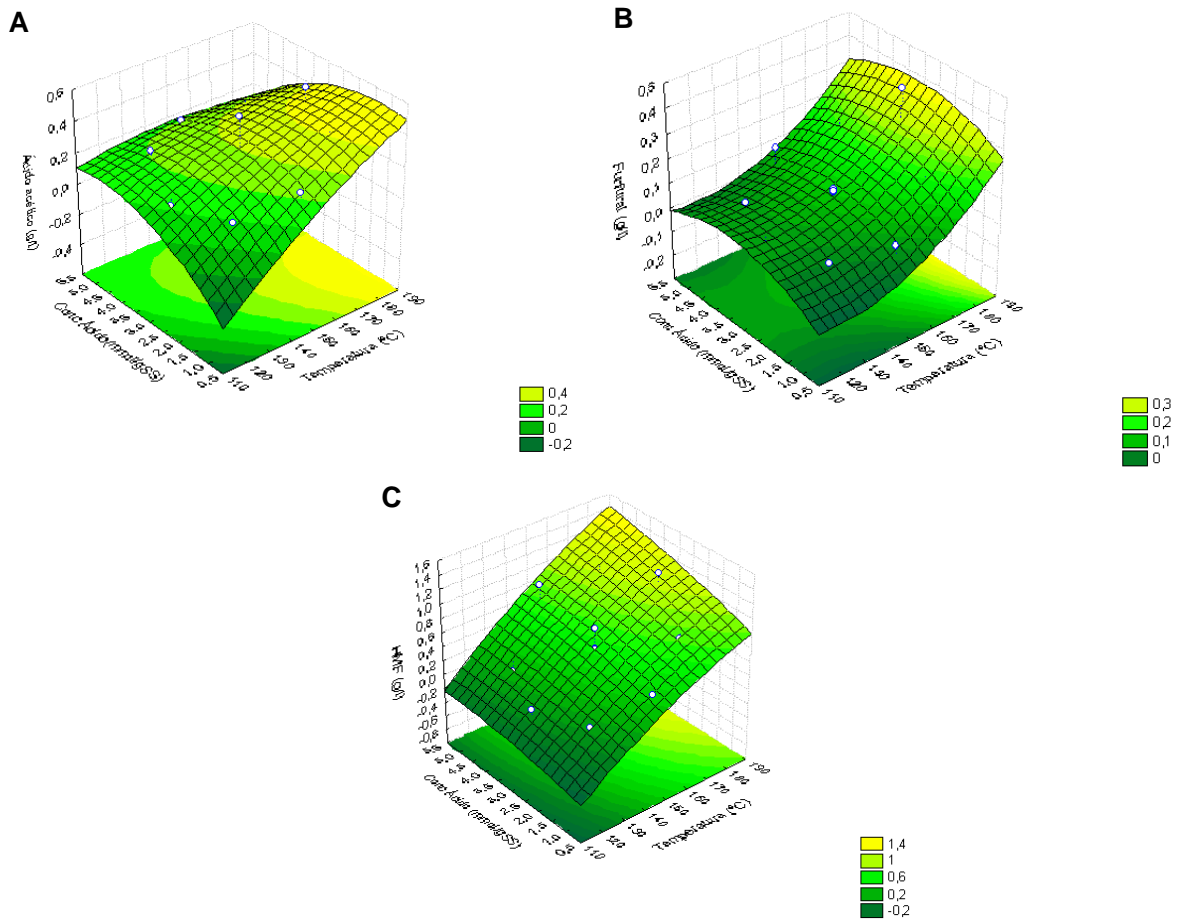
Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	0,089172	1	0,089172	8,700720	0,031897
Temperatura (Q)	0,001557	1	0,001557	0,151958	0,712723
Ácido (L)	0,000041	1	0,000041	0,004009	0,951969
Ácido (Q)	0,012965	1	0,012965	1,265045	0,311774
1(L) by 2(L)	0,013478	1	0,013478	1,315090	0,303372
<b>Erro</b>	0,051244	5	0,010248		
Total	0,166928	10			

**Tabela 9.** Análise da variância para a concentração de furfural no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	0,061678	1	0,061678	8,793794	0,031322
Temperatura (Q)	0,005179	1	0,005179	0,738353	0,429451
Ácido (L)	0,002259	1	0,002259	0,322044	0,594913
Ácido (Q)	0,005275	1	0,005275	0,752043	0,425483
1(L) by 2 (L)	0,000034	1	0,000034	0,004790	0,947505
<b>Erro</b>	0,035069	5	0,007014		
Total	0,114039	10			

**Tabela 10.** Análise da variância para a concentração de HMF no hidrolisado de casca de arroz obtido em 40 minutos de reação

Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
Temperatura (L)	1,183992	1	1,183992	36,69488	0,001769
Temperatura (Q)	0,007660	1	0,007660	0,23741	0,646694
Ácido (L)	0,121552	1	0,121552	3,76721	0,109940
Ácido (Q)	0,002490	1	0,002490	0,07718	0,792280
1(L) by 2 (L)	0,002899	1	0,002899	0,08983	0,776450
Erro	0,161329	5	0,032266		
Total	1,478034	10			



**Figura 8:** Superfície de resposta para a concentração de (A) ácido acético (B) furfural e (C) HMF em  $\text{g L}^{-1}$ , presentes no hidrolisado de casca de arroz obtido após 40 minutos de reação de hidrólise ácida diluída.

Pode-se observar na superfície de resposta gerada na Figura 8 para todos os inibidores do processo fermentativo, que conforme a temperatura aumenta maior são as concentrações de ácido acético, furfural e HMF encontrada no hidrolisado. A quantidade de ácido utilizada não teve efeito significativo para os três inibidores analisados. O ácido acético é um produto resultante da degradação dos grupos acetil da hemicelulose (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). SAHA e colaboradores (2005) relataram que em 140°C com ácido sulfúrico 1% (v/v), nenhuma liberação de HMF foi observada, assim como neste trabalho, nas mesmas condições.

Comparando os dados encontrados neste trabalho aos de MARTIN e colaboradores (2007), com temperatura de 122 °C durante 20, 40 ou 60 minutos utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2% com proporção sólido/líquido de 1: 10, comprova-se que o hidrolisado de casca de arroz, por ter uma baixa concentração de tóxicos (não seria necessário destoxificação), e uma alta concentração de açúcares, torna-se especialmente atraente para a fermentação etanólica.

#### **4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL POR LEVEDURAS DO GÊNERO *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia* e *Spathaspora*, EM AGITADOR ORBITAL, SOBRE MEIO SEMISSINTÉTICO E HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ**

Atualmente, diversas pesquisas apontam que a viabilidade econômica do processo de produção de bioetanol, depende da conversão de todos os açúcares (pentoses e hexoses) que compõem os hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Além disso, busca-se alcançar o processo de biorrefinaria, que consiste na recuperação de diversos produtos de alto valor agregado oriundos da conversão dos materiais lignocelulósicos, como a obtenção simultânea de etanol e xilitol a partir das hexoses e pentoses provenientes do hidrolisado de resíduo agroindustrial (LATIF e RAJOKA, 2001). Sendo assim, a utilização de microrganismos competentes em fermentar hexoses (glicose, manose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose), e/ou consórcios de microrganismos que fermentem ambos os açúcares a etanol e/ou xilitol é bastante desejável (MARGEOT *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2009). A excelente eficiência de conversão de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* é bastante reconhecida, no entanto, apesar de um grande número de espécies de levedura metabolizar xilose e arabinose, apenas cerca de 1% desses microrganismos são capazes de fermentar xilose a etanol, como *P. stipitis* (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007). A fermentação de xilose a xilitol é bastante comum entre leveduras do gênero *Candida*, onde são encontradas as

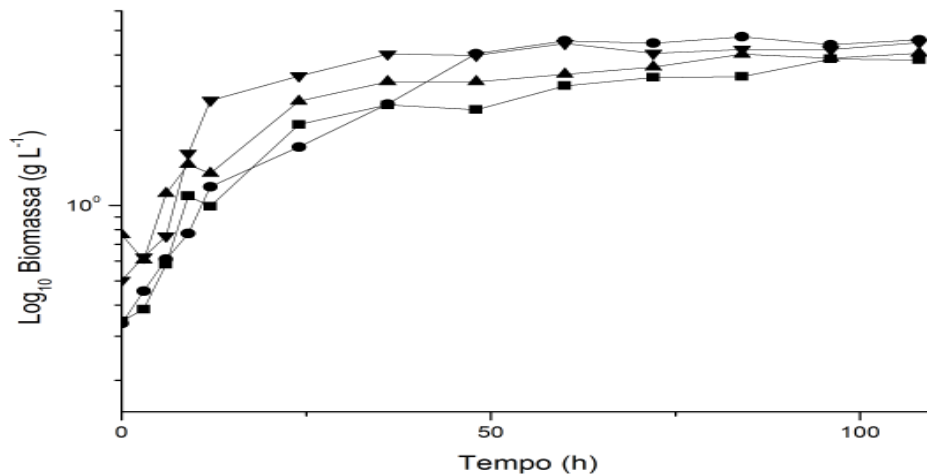
espécies conhecidas como maiores produtoras de xilitol a partir de xilose (ex. *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. biodinii* e *C. mogii*) (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Outro gênero que se destaca na produção de xilitol é *Debaryomyces*, em especial, *D. hansenii* (PARAJÓ *et al.*, 1998a).

#### **4.3.1. Cultivo em meio semissintético**

Com o intuito de avaliar a capacidade de conversão dos açúcares fermentescíveis por leveduras selecionadas conforme a capacidade da linhagem e/ou gênero produzir xilitol e/ou etanol já descrito na literatura, ensaios utilizando meio semissintético G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>, sem a presença de inibidores provenientes do processo fermentativo (comum nos hidrolisados) e com menor pressão osmótica do que a do hidrolisado (402 mOsm.Kg<sup>-1</sup>), foram realizados em agitador orbital, a 180 rpm e 30°C.

##### ***4.3.1.1. Avaliação da cinética do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol pelos microrganismos cultivados isoladamente em meio semissintético***

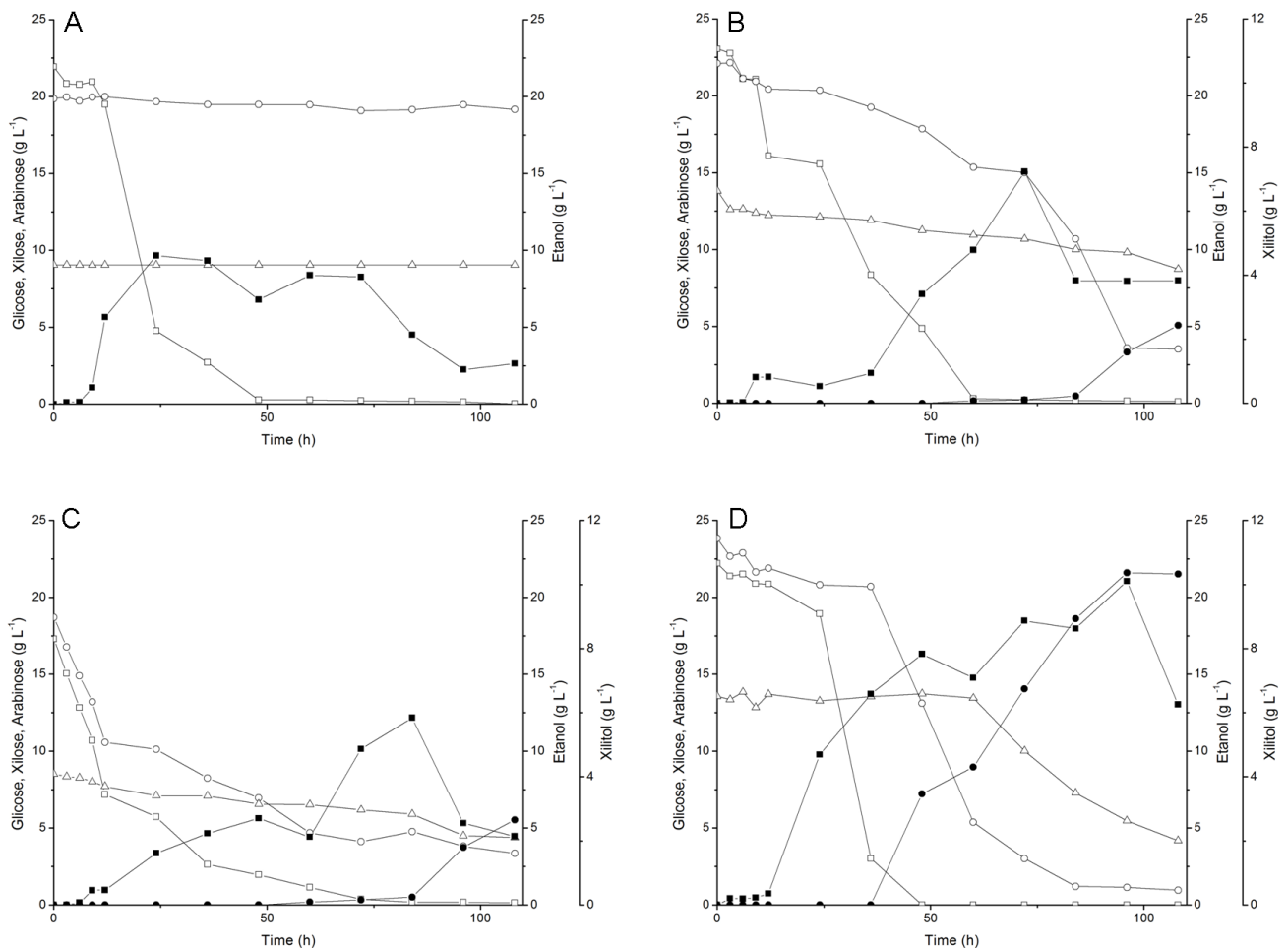
O crescimento celular do meio semissintético foi avaliado com base no peso seco. Todas as leveduras testadas tiveram crescimentos similares, podendo-se observar o início da fase exponencial a partir das 6 horas de cultivo. *C. shehatae* e *P. stipitis* obtiveram o máximo crescimento em 108 horas de cultivo com 4,5 g L<sup>-1</sup> e 4 g L<sup>-1</sup> respectivamente, *S. cerevisiae* obteve um máximo de crescimento após 96 horas de cultivo 3,8 g L<sup>-1</sup> e *S. arborariae* em 84 horas de crescimento (4,7 g L<sup>-1</sup>) (Figura 11).



**Figura 9.** Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em meio semissintético, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *P. stipitis* (▲), *S. cerevisiae* (■), *S. arborariae* (●) e *C. shehatae* (▼).

A cinética de consumo dos açúcares e de produção de etanol e xilitol dos cultivos sobre meio semissintético, por *C. shehatae*, *P. stipitis*, *S. cerevisiae* e *S. arborariae*, isoladamente, estão apresentados na Figura 12.

*C. shehatae*, *P. stipitis*, *S. arborariae* e *S. cerevisiae* consumiram toda a glicose disponível no meio, sendo que mais de 83% da xilose foi consumida pelas três primeiras leveduras, separadamente em meio semissintético. O consumo de arabinose foi de 69% para a *C. shehatae*, seguida por 49 e 37% para *P. stipitis* e *S. arborariae*, respectivamente. Nos cultivos com *S. cerevisiae* a xilose e a arabinose não foram consumidas, o que é característica do metabolismo desta espécie (STAMBUCK *et al.*, 2008) que é citada na literatura como excelente fermentadora de hexoses a etanol (MERICCO *et al.*, 2007). Sendo assim, se faz necessário ressaltar que os cálculos do coeficiente de rendimento de etanol para *S. cerevisiae* é específico, pois é calculado somente com base na conversão de glicose a etanol; enquanto que para as demais leveduras este cálculo se refere à conversão do total de açúcares (glicose, xilose e arabinose) presente nos meios em etanol.



**Figura 10.** Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae*, (B) *S. arborariae*, (C) *P. stipitis* e (D) *C. shehatae* sobre meio semissintético. glicose (□), xilose (○), arabinose (△), xilitol (●) e etanol (■).

*C. shehatae* e *P. stipitis* consomem glicose e xilose simultaneamente desde o início do cultivo, com comportamentos semelhantes para ambos os açúcares. *S. arborariae* apresenta um comportamento diferente destas leveduras, pois consome a maior parte da xilose apenas após o esgotamento da glicose. É possível verificar este fato através do cálculo da taxa de consumo de glicose e xilose por hora de cultivo (quantidade de açúcar consumido, dividido pelo tempo em horas). Nas primeiras 60 horas de cultivo a taxa de consumo de glicose para *S. arborariae* foi de 0,45 g h<sup>-1</sup>, enquanto que a de xilose foi 0,08 g



$\text{h}^{-1}$ , mostrando que esta levedura apresenta clara preferência pela glicose. Após a exaustão da glicose a taxa de consumo de xilose aumentou para  $0,41 \text{ g h}^{-1}$ . Em trabalho utilizando a mesma levedura, CADETE e colaboradores (2009) constataram que a xilose foi consumida apenas após o consumo total da glicose, semelhante ao comportamento encontrado neste trabalho. Para *C. shehatae* e *P. stipitis*, as taxas de consumo de glicose e xilose foram semelhantes até o período de cultivo em que a glicose foi exaurida, sendo estas  $0,46 \text{ g h}^{-1}$  de glicose e  $0,47 \text{ g h}^{-1}$  de xilose e  $0,25 \text{ g h}^{-1}$  de glicose e  $0,26 \text{ g h}^{-1}$  de xilose, respectivamente, mostrando que estas leveduras não apresentam preferência por nenhum dos dois açúcares.

Comparando a produtividade de etanol entre as cepas avaliadas, verificou-se que *S. cerevisiae* apresentou maior coeficiente de rendimento de etanol ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,53 \text{ g de etanol g}^{-1}$  de glicose, seguida por *S. arborariae*, *C. shehatae* e *P. stipitis* ( $0,46$ ;  $0,40$  e  $0,36 \text{ g de açúcar g}^{-1}$  de etanol). O rendimento máximo de conversão a etanol obtido por *S. arborariae* foi ligeiramente inferior ao encontrado por *S. cerevisiae*, nas mesmas condições de cultivo.

Taxas de conversão de açúcares contidos no meio em etanol, semelhantes às obtidas neste trabalho, foram encontradas por ROUHOLLAH e colaboradores (2007), em experimento conduzido sobre meio sintético composto em por glicose, xilose, manose, e galactose (agitador orbital a  $100 \text{ rpm}$ ) onde *S. cerevisiae* e *P. stipitis* apresentaram a mesma produtividade de etanol ( $0,4 \text{ g etanol g}^{-1}$  de glicose).

A levedura *S. arborariae* é uma espécie recentemente isolada e descrita como uma promissora fermentadora de xilose a etanol (CADETE *et al.*, 2009), assim como a *C. shehatae* e a *P. stipitis*, já conhecidas na literatura. STAMBUCK e colaboradores (2008) concluíram que dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de  $0,3 - 0,44 \text{ g g}^{-1}$  de substrato. Em experimento contendo apenas glicose como fonte de

carbono, em agitador orbital com 160 rpm e 28°C, CADETE e colaboradores (2009) relataram que *S. arborariae* teve uma produtividade de etanol de 0,35 g etanol g<sup>-1</sup> de glicose, já em cultivo sobre meio semissintético contendo uma mistura de glicose e xilose, nas mesmas condições de cultivo, *S. arborariae* apresentou rendimento de etanol maior, chegando aproximadamente a 0,50 g etanol g<sup>-1</sup> de açúcar (Y<sub>P/S</sub>).

A maior produtividade de xilitol foi obtida no cultivo que empregou *C. shehatae*, Y<sub>P/S</sub> = 0,45 g de xilitol g<sup>-1</sup> de xilose, seguida por *P. stipitis* e *S. arborariae* (Y<sub>P/S</sub> = 0,17 e 0,13 g de xilitol g<sup>-1</sup> de xilose, respectivamente). CADETE e colaboradores (2009) reportaram que a produtividade *S. arborariae* em cultivo somente sobre xilose (160 rpm), foi de 0,37 g etanol g<sup>-1</sup> xilose. Como uma maior aeração (maior agitação 180 rpm, utilizada neste trabalho) privilegia a produção de xilitol (van MARIS *et al.*, 2006), esperava-se obter um maior coeficiente de rendimento de xilitol que o encontrado nos experimentos referidos por CADETE e colaboradores (2009), no entanto, é possível que a presença de todos os açúcares no meio possam ter afetado a conversão específica de xilose pela preferência por glicose.

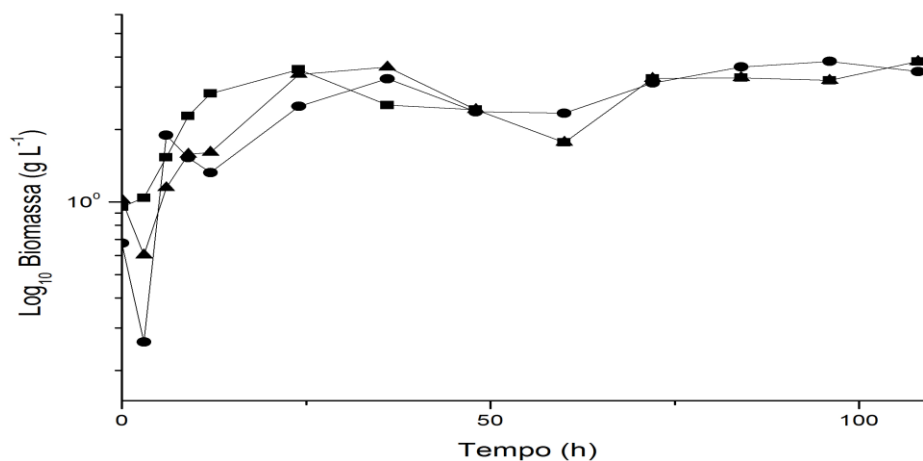
#### ***4.3.1.2. Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por co-cultura de leveduras em meio semissintético, em agitador orbital***

Para melhorar a competitividade de custos da produção de bioetanol e maximizar a rentabilidade de um processo industrial, se faz necessária a conversão eficiente de todos os monossacarídeos presentes no hidrolisados lignocelulósicos (GUPTA *et al.*, 2009; FU *et al.*, 2009). A conversão microbiana de pentoses, que representam 25-40% de açúcares presentes nos materiais lignocelulósicos, foi identificada como um dos principais desafios a ser superado para tornar a tecnologia do etanol de segunda geração viável industrialmente (FROMANGER *et al.*, 2010). Como a xilose não pode ser fermentada por linhagens

selvagens de *S. cerevisiae*, e cepas recombinantes desta espécie ainda não se mostraram tão eficientes na escala industrial (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2007), uma possível solução para conversão de pentose em etanol seria a utilização de co-cultivos de cepas eficientes em fermentação de xilose simultaneamente a *S. cerevisiae*. A utilização de co-culturas pode ser vantajosa em relação à fermentação individual por causa do potencial para a utilização sinérgica das vias metabólicas de todas as cepas envolvidas em uma situação de co-cultura. (BADER *et al.*, 2009).

Objetivando maximizar a conversão dos açúcares (hexoses e pentoses) em etanol, foram realizados co-cultivos (consórcio) em meio semissintético descrito em 4.3.1., combinando uma levedura conhecidamente fermentadora de glicose, como *S. cerevisiae*, à leveduras fermentadoras de pentoses como *S. arborariae*, *C. shehatae* ou *P. stipitis*.

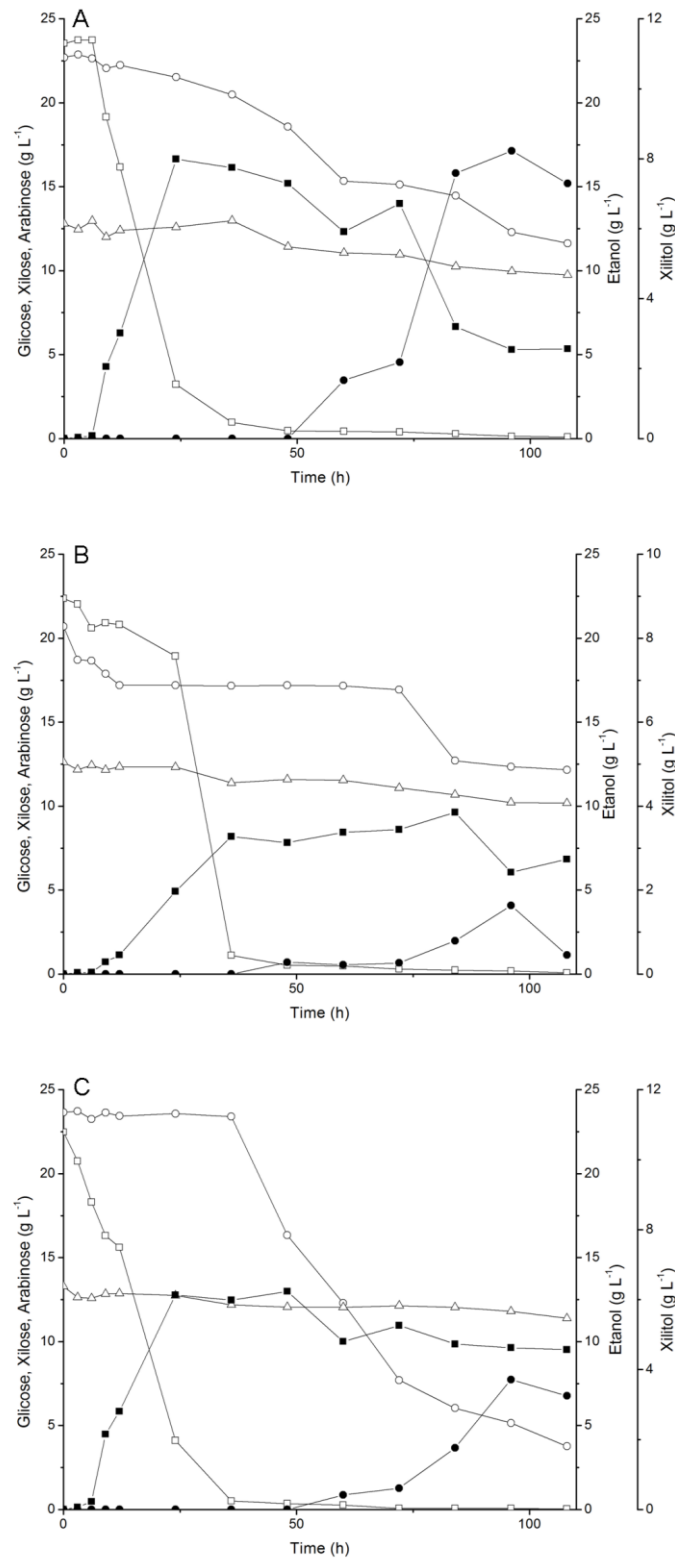
O crescimento celular dos consórcios (Figura 13) foi avaliado com base no peso seco.



**Figura 11.** Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em meio semissintético, a 180 rpm, 30°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (●); *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (▲); *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (■).

A partir das 9 horas de cultivo pode-se observar o início da fase exponencial para os três cultivos, sendo que *S. cerevisiae* e *P. stipitis* demonstraram um crescimento mais lento inicialmente, obtendo valores menores de concentração celular até 9 horas de cultivo. O máximo crescimento obtido para esse consórcio foi de 4,1 g L<sup>-1</sup> ao final do cultivo. Os consórcios *S. cerevisiae* e *C. shehatae* e *S. cerevisiae* e *S. arborariae* obtiveram o máximo crescimento em 108 horas de cultivo (3,8 g L<sup>-1</sup>).

Na Figura 14 está grafada a cinética do consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol, pelos co-cultivos de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (*Sc-Sa*), *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (*Sc-Ps*) e *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (*Sc-Cs*) sobre meio semissintético, em agitador orbital.



**Figura 12.** Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol, em consórcio, pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (Sc-Sa); (B) *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (Sc-Ps) e (C) *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (Sc-Cs) em meio semissintético (agitador orbital): (—□—) glicose, (—○—) xilose, (—△—) arabinose, xilitol (—●—) e etanol (—■—).

O consumo de glicose teve o mesmo comportamento em todos os consórcios, possivelmente pela presença da levedura *S. cerevisiae*, com toda a glicose sendo consumida em aproximadamente 48 horas. A xilose foi mais consumida pelo consórcio com *C. shehatae*, seguido por *S. arborariae* e *P. stipitis* (85; 49 e 41 % respectivamente).

A maior produtividade de etanol foi encontrada no consórcio com *S. arborariae* de 0,77 g de etanol g<sup>-1</sup> de açúcar, enquanto que os outros consórcios mantiveram valores muito próximos aos mostrados em cultivo isoladamente (*P. stipitis* e *C. shehatae*, Y<sub>P/S</sub> de 0,30 e 0,42 g g<sup>-1</sup>). Se o rendimento máximo de etanol (Y<sub>P/S</sub>) for calculado considerando apenas a glicose como fonte potencial para a produção de bioetanol, o valor encontrado para *S. arborariae* (Y<sub>P/S</sub> = 0,77) é superior ao rendimento teórico proposto para esta conversão (Y = 0,51), fato esse que pode sugerir que uma parte das pentoses também foi convertida em etanol. No entanto, devido à presença dos três açúcares (xilose, glicose e arabinose) no meio de cultura é difícil determinar qual parte de cada açúcar foi destinada à produção de biomassa e que foi tomada para formar subprodutos. O etanol presente no meio foi consumido nas horas finais do cultivo com os consórcios. MALEZCA e SCHNEIDER (1982) relataram que quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns microrganismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, isso foi demonstrado em microrganismos como *P. tannophilus*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* (SCHIRMER-MICHEL *et al.*, 2008). Em estudo realizado com co-cultivo de *Z. mobilis* e *P. tannophilus* para produção de etanol em meio sintético, contendo glicose (60 g L<sup>-1</sup>) e xilose (40 g L<sup>-1</sup>), FU e PERIS (2008) obtiveram 26 g L<sup>-1</sup> de etanol em 12 h de cultivo, originados do consumo de glicose por *Z. mobilis*, uma vez que *P. tannophilus* foi inoculada após o consumo da glicose.

A produção de xilitol também foi maior em cultivo com consórcio com *S. arborariae* (Y<sub>P/S</sub> 0,79 g g<sup>-1</sup>) do que o mostrado em cultivo isoladamente (Y<sub>P/S</sub> 0,13 g g<sup>-1</sup>). LATIF e

RAJOKA (2001) em estudo sobre hidrolisado de sabugo de milho observaram que a produção de xilitol exibiu uma fase lag de 24 horas, enquanto que nos cultivos realizados neste trabalho a produção de xilitol foi detectada apenas após 48 horas de cultivo.

#### **4.3.2. Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por leveduras sobre hidrolisado de casca de arroz em agitador orbital**

O hidrolisado de casca de arroz utilizado nesses ensaios, não foi submetido a processo de destoxificação, e foi suplementado com peptona e extrato de malte, respectivamente. A composição do meio original e concentrado está descrita na Tabela 11.

**Tabela 11.** Composição ( $\text{g L}^{-1}$ ) do hidrolisado de casca de arroz original e concentrado 2,8 vezes.

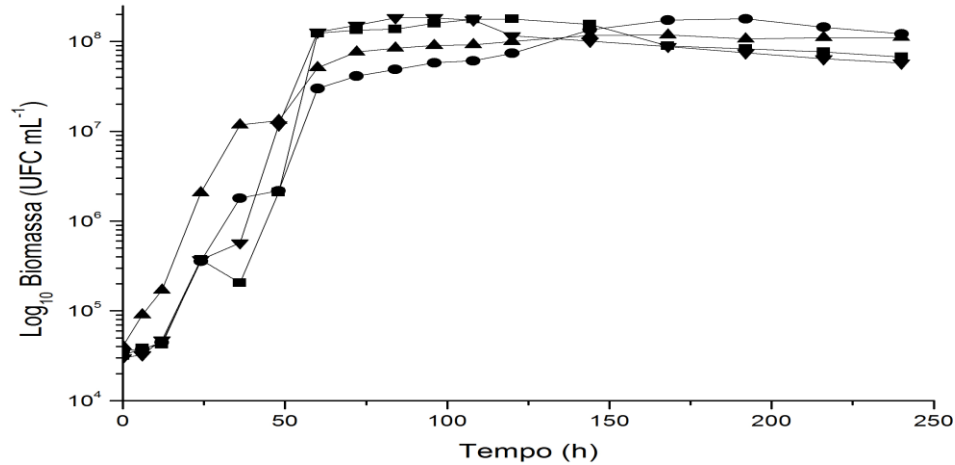
<b>Hidrolisado</b>	<b>Glicose</b>	<b>Xilose</b>	<b>Arabinose</b>	<b>Ác. Acético</b>
Original	13,2	5,7	0,7	0,9
Concentrado 2,8 vezes	37,1	16,0	2,0	2,6

Comparando-se os hidrolisados observa-se que o teor dos açúcares presentes no hidrolisado original aumentou de maneira proporcional ao fator de concentração utilizado.

##### **4.3.2.1. Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por cultivo de leveduras isoladas, sobre hidrolisado de casca de arroz**

A avaliação da capacidade de fermentação do hidrolisado de casca de arroz pelas leveduras *S. cerevisiae*, *S. arborariae*, *C. shehatae* e *P. stipitis* foi conduzida em agitador orbital, a 180 rpm e 30°C. O crescimento dos cultivos sobre esse hidrolisado foi medido

utilizando o método de contagem de colônias (UFC), e grafado sob a forma de logaritmo natural (Figura 15).



**Figura 13.** Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 30°C, por 240 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *P. stipitis* (▲); *S. cerevisiae* (■); *S. arborariae* (●) e *C. shehatae* (▼).

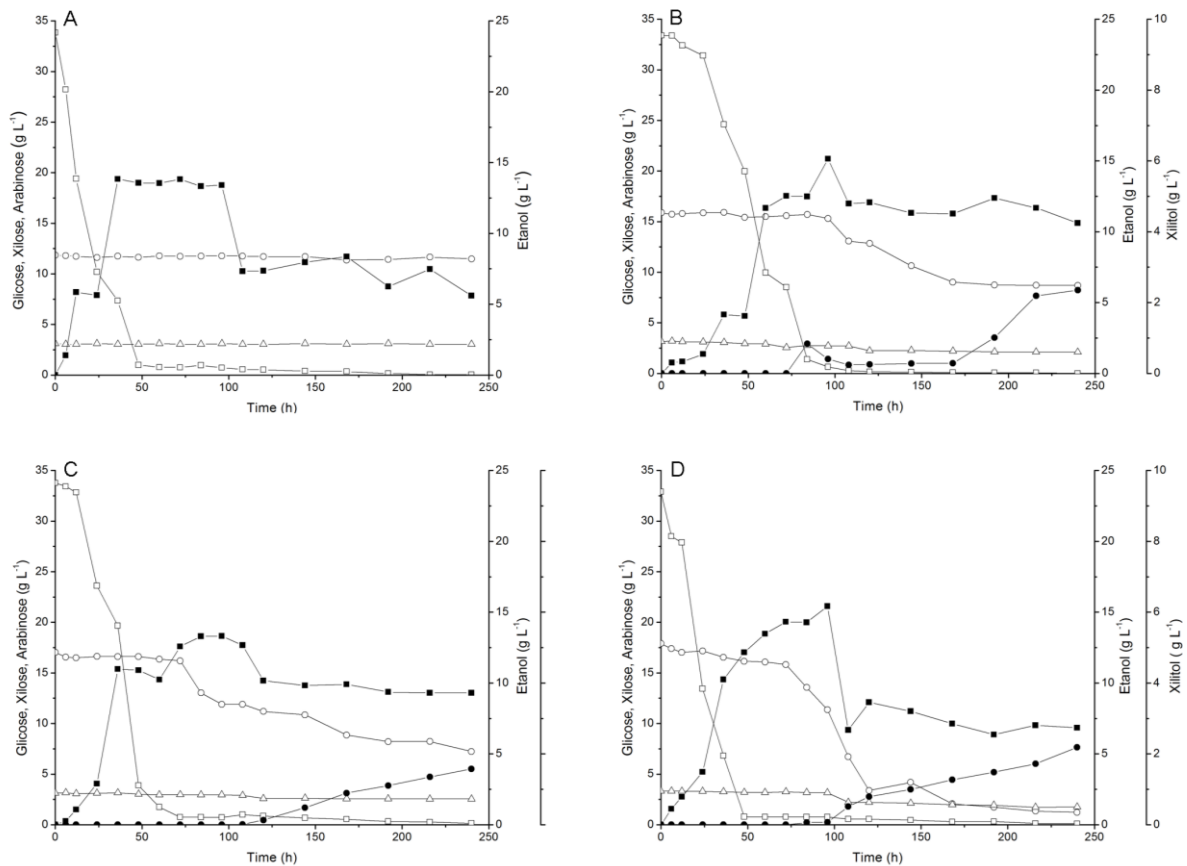
A partir de 9 horas de cultivo todas as espécies apresentam crescimento na fase log, e após 60 horas, a multiplicação celular permaneceu praticamente constante para todas as leveduras.

Uma das características dos hidrolisados provenientes de diferentes resíduos lignocelulósicos é a alta pressão osmótica (PAPOUSKOVA *et al.*, 2007). De acordo com LIU e colaboradores (2006), uma pressão osmótica de  $2108 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$  é suficiente para inibir o crescimento de leveduras, inclusive para espécies osmofílicas como *Candida krusei*. Segundo D'AMORE e colaboradores (1988) uma diminuição do crescimento celular e nas taxas de fermentação está associado com o aumento na pressão osmótica. Apesar da pressão osmótica do hidrolisado de casca de arroz concentrado utilizada neste trabalho ser de  $1539 \text{ mOsmKg}^{-1}$ , todas as leveduras cresceram e mantiveram o crescimento constante nesse



hidrolisado. Segundo HOHMANN (2002), as células de leveduras podem desenvolver mecanismos para ajustar, dentro de certos limites, a alta osmolaridade externa.

O consumo dos açúcares presentes no hidrolisado (glicose, xilose e arabinose) e a formação dos produtos etanol e xilitol pelas leveduras empregadas nesse ensaio estão grafados na Figura 16.



**Figura 14.** Cinética do consumo de glicose (□), xilose (○) e arabinose (△) e produção de xilitol (●) e etanol (■), em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 30°C em agitador orbital, pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae*, (B) *S. arborariae*, (C) *P. stipitis* e (D) *C. shehatae* sobre hidrolisado de casca de arroz.

Os parâmetros da cinética de produção de etanol e xilitol a partir de açúcares fermentescíveis do hidrolisado de casca de arroz em cultivos com *S. cerevisiae*, *S. arborariae*, *P. stipitis* e *C. shehatae*, isoladamente, estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Parâmetros da cinética de produção de etanol e xilitol em frascos agitados em hidrolisado de casca de arroz, a 180rpm e 30°C, por *S. cerevisiae*, *S. arborariae*, *P. stipitis* e *C. shehatae*.

	$Y_{P/S}$ ET (g g <sup>-1</sup> )	$\eta$ ET (%)	Q (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ XIL (g g <sup>-1</sup> )
<i>C. shehatae</i>	0,40	77,88	0,16	0,13
<i>P. stipitis</i>	0,35	68,07	0,14	0,16
<i>S. cerevisiae</i>	0,52*	101,43	0,38	-
<i>S. arborariae</i>	0,45	88,01	0,16	0,33

\*  $Y_{P/S}$  calculado com base na glicose

Toda a glicose disponível no hidrolisado de casca de arroz foi consumida por todas as leveduras avaliadas, porém a *S. arborariae* apresentou um consumo mais lento quando comparada às demais. *C. shehatae* apresentou o maior consumo de xilose (93%), seguida por *P. stipitis* e *S. arborariae* (57 e 45%, respectivamente). Foram consumidos 47; 33 e 19% de arabinose por *C. shehatae*, *S. arborariae* e *P. stipitis*, respectivamente.

*S. cerevisiae* apresentou a melhor produtividade de etanol ( $Y_{P/S}$  0,52 g g<sup>-1</sup>), seguida por *S. arborariae* ( $Y_{P/S}$  0,45 g g<sup>-1</sup>), *C. shehatae* ( $Y_{P/S}$  0,40 g g<sup>-1</sup>) e *P. stipitis* ( $Y_{P/S}$  0,35 g g<sup>-1</sup>), como pode ser observado na Tabela 12. ZHONG e colaboradores (2009), em estudo sobre palha de arroz a 30 °C e 150 rpm, relataram que *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST) apresentou uma produtividade volumétrica de 0,26 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, maior que o encontrado neste trabalho (0,16 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>), que pode ser explicada pela menor aeração do meio, o que provavelmente provocou uma fermentação anaeróbica dos componentes do hidrolisado. A mesma explicação pode ser referida a *C. shehatae* NCIM 3501 em estudo realizado por CHANDEL e colaboradores (2007), em bagaço de cana de açúcar (150 rpm e 30°C), que demonstrou um rendimento de etanol 19% maior que o obtido nesse trabalho para a mesma espécie de

levedura ( $0,48 \text{ g g}^{-1}$ ). Frente ao hidrolisado de palha de arroz, SILVA e colaboradores (2010) em cultivo com 200 rpm de agitação em agitador orbital, obtiveram  $Y_{P/S} = 0,37 \text{ g g}^{-1}$ , para *P. stipitis*, semelhante ao encontrado neste trabalho ( $Y_{P/S} = 0,35 \text{ g g}^{-1}$ ). *S. arborariae* apresentou rendimentos bastante satisfatórios quando comparada as demais leveduras reconhecidamente fermentadoras de pentoses, como as utilizadas nesse trabalho, *P. stipitis* e *C. shehatae*, e as empregadas em diversos estudos (Tabela 13). Nas horas finais do cultivo, foi observado que as leveduras utilizadas neste estudo metabolizaram etanol.

**Tabela 13.** Produtividade de etanol de cepas fermentadoras de pentoses.

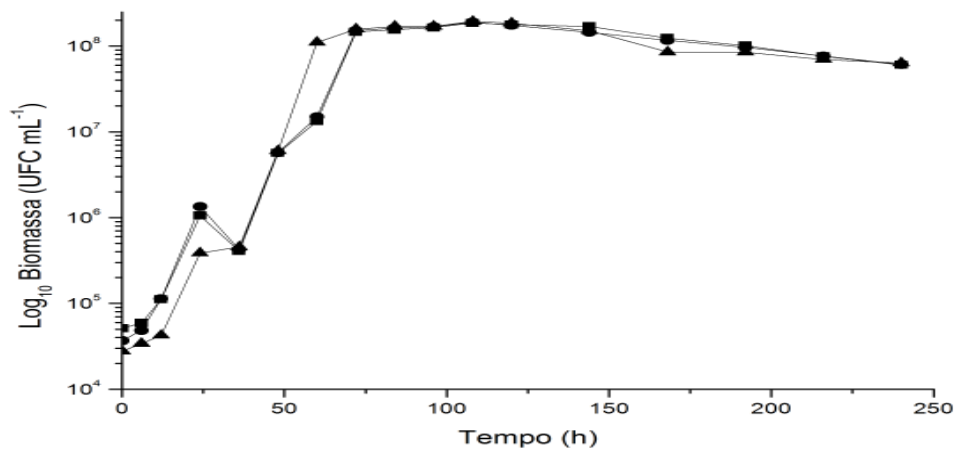
Cepa	Resíduo Lignocelulósico	$Y_{P/S} (\text{g g}^{-1})$	Referência Bibliográfica
<i>Spathaspora arborariae</i>	Casca de arroz	0,45	Este trabalho.
<i>Candida shehatae</i>	Bagaço de cana	0,48	CHANDEL <i>et al.</i> , 2007
<i>Pichia stipitis</i>	Palha de arroz	0,37	SILVA <i>et al.</i> , 2010
<i>Pachysolen tannophilus</i>	Bagaço de cana	0,35	CHENG <i>et al.</i> , 2007

A conversão de xilitol foi maior nos cultivos com *S. arborariae* ( $Y_{P/S} = 0,33$ ), seguida por *C. shehatae* e *P. stipitis* ( $Y_{P/S} = 0,16$  e  $0,13$ ). Segundo a literatura, a produção microbiana de xilitol depende de uma série de condições experimentais que influenciam sobre o desempenho do microrganismo, tais como pH, concentração inicial de substrato, nível de inóculo, composição do meio e o suprimento de oxigênio. Dois desses fatores, a concentração inicial de substrato e oxigênio, são considerados variáveis críticas (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). As leveduras *C. shehatae* e *P. stipitis* apresentaram perfis semelhantes para a produção de xilitol com conversões de  $0,13$  e  $0,16 \text{ g g}^{-1}$ , respectivamente. A produção deste álcool foi detectada apenas nas últimas 60 horas de cultivo. Segundo DU PREEZ (1989) este fato pode ser explicado pela menor taxa de utilização da xilose frente à glicose durante a produção de etanol, isso resulta de uma

repressão catabólica que a glicose exerce na indução da enzima aldose-reductase (SUGAI e DELGENES, 1995).

#### 4.3.2.2. Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por co-culturas em meio hidrolisado de casca de arroz

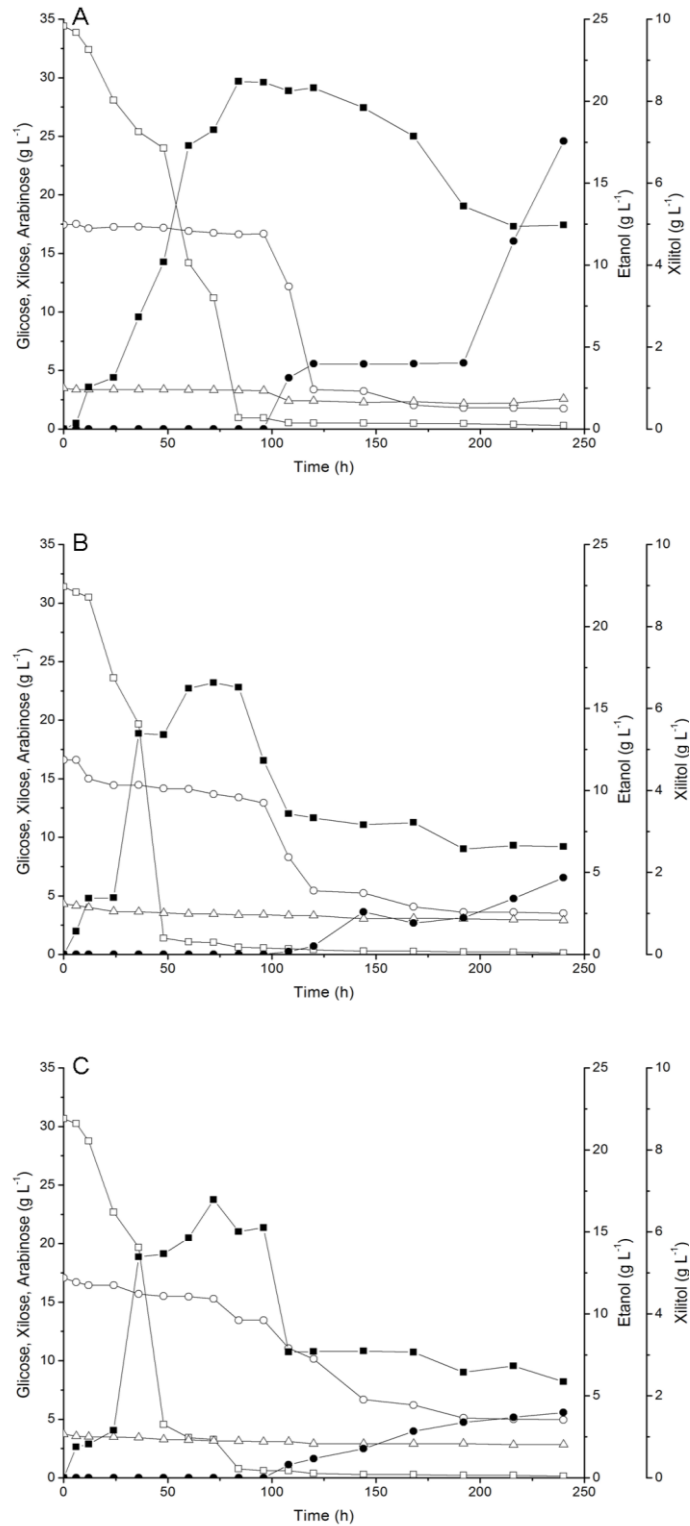
O crescimento celular dos consórcios em hidrolisado de casca de arroz foi realizado por contagem de colônias, em UFC e o resultado encontra-se na Figura 17.



**Figura 15.** Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 30°C, por 240 horas de cultivo. Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ) de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (●); *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (▲); *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (■).

Todos os co-cultivos tiveram crescimentos semelhantes, com a fase log podendo ser observada nas 12 horas iniciais de cultivo.

Com o objetivo de converter o máximo de hexoses e pentoses presentes no hidrolisado de casca de arroz em etanol e xilitol, avaliaram-se co-cultivos, com as leveduras fermentadoras de pentoses (*S. arborariae*, *C. shehatae* ou *P. stipitis*) e a levedura *S. cerevisiae*, conhecida fermentadora de hexoses (Figura 18).



**Figura 16.** Cinética do consumo de glicose (□), xilose (○) e arabinose (△) e produção de xitol (●) e etanol (■) em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 30°C pelo consórcio das leveduras: (A) *S. cerevisiae* e *S. arborariae*, (Sc-Sa); (B) *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (Sc-Cs) e (C) *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (Sc-Ps)

Em todos os co-cultivos a glicose foi totalmente consumida, porém no co-cultivo com *Sc-Sa* ocorreu mais lentamente. Houve grande consumo de xilose, sendo 90% para o consórcio *Sc-Sa*, 78% para o consórcio *Sc-Ps* e 70% para o consórcio *Sc-Cs*. Cerca de 30% de arabinose foi consumida nos cultivos testados.

**Tabela 14.** Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em frascos agitados, em hidrolisado de casca de arroz a 180 rpm e 30°C, pelos consórcios de leveduras *Sc-Cs*, *Sc-Sa* e *Sc-Ps*.

	$Y_{P/S}$ ET (g g <sup>-1</sup> )	$\eta$ ET (%)	Q(g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	$Y_{P/S}$ XIL (g g <sup>-1</sup> )
<b>Sc-Sa</b>	0,62	120,79	0,25	0,45
<b>Sc-Ps</b>	0,49	95,15	0,23	0,14
<b>Sc-Cs</b>	0,57	111,75	0,24	0,13

O consórcio *Sc - Sa* apresentou o maior coeficiente de rendimento de etanol, com um  $Y_{P/S}$  de 0,62 g g<sup>-1</sup> como pode ser observado na Tabela 14. LATIF e RAJOKA (2001) utilizaram *Candida tropicalis* e *S. cerevisiae* em co-cultura sobre hidrolisado de sabugo de milho (30°C e 150 rpm), obtendo como resultado para o consórcio na produção de etanol e xilitol,  $Y_{P/S}$  de 0,26 g g<sup>-1</sup> e 0,15 g g<sup>-1</sup>, respectivamente. Neste mesmo trabalho utilizando o co-cultivo de *S. cerevisiae* e *C. shehatae* obtiveram maiores rendimentos de etanol, com  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  de 0,57 g g<sup>-1</sup> e 0,24 g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, respectivamente. Cultivando *S. cerevisiae* e *P. tannophilus* em consórcio sobre hidrolisado de coníferas, em agitador orbital (30°C e 120 rpm), QUIAN e colaboradores (2006), obtiveram 0,49 g g<sup>-1</sup> de etanol. A produtividade dos autores citados foi inferior ou igual à encontrada neste trabalho, apesar da aeração de 180 rpm ser maior que a utilizada pelos mesmos. Segundo FROMANGER e colaboradores (2010), uma fase aeróbia favoreceria o crescimento celular, enquanto a limitação de oxigênio favorece a produção de etanol.

O melhor rendimento de xilitol ocorreu no consórcio *Sc - Sa*, com uma conversão de 0,45 g g<sup>-1</sup>, seguida pelos consórcios *Sc - Cs* e *Sc - Ps*, com 0,14 e 0,13 g g<sup>-1</sup>. A conversão de

xilitol no meio pode ser explicada pela aeração utilizada neste trabalho de 180 rpm, diretamente ligada a quantidade de oxigênio disponível. A aeração é condição experimental crítica para produção de xilitol. O suprimento de oxigênio determina se D-xilose será fermentada ou não, regulando o equilíbrio do consumo de carbono para bioconversão e crescimento (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). A produção de xilitol em meio hidrolisado de casca de arroz alcançou  $7 \text{ g L}^{-1}$  ( $Y_{P/S}$  de 0,45) para o consórcio *Sc - Sa*, apresentando menor rendimento que o co-cultivo com *Candida guilliermondii*, estudada por MUSSATO e ROBERTO (2006) em shaker (200 rpm) com ( $Y_{P/S}$  de 0,67).

Esperava-se que nas fermentações de hidrolisado os valores de parâmetros como  $Y_{P/S}$  e  $Q_p$ , de etanol e xilitol, fossem inferiores aos encontrados no meio semissintético devido a presença dos inibidores no hidrolisado (ácido acético, furfural, HMF, ácidos fracos e compostos fenólicos). Estes são produtos da desidratação dos açúcares (xilose e glicose) e de degradação da lignina após a hidrólise ácida diluída, que podem afetar a eficiência de fermentação, pois são tóxicos aos microrganismos e inibem o seu metabolismo (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). Nos co-cultivos utilizando *S. cerevisiae* - *P. stipitis* e *S. cerevisiae* - *C. shehatae*, este fenômeno não foi observado, pois os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_p$  foram maiores em hidrolisado do que no meio semissintético.

A maior conversão de etanol e xilitol foi obtida utilizando o consórcio de *S. cerevisiae* e *S. arborariae*, com  $Y_{P/S}^{ET}$  de 0,77 e  $Y_{P/S}^{XIL}$  0,79  $\text{g.g}^{-1}$  em meio semissintético e  $Y_{P/S}^{ET}$  de 0,62  $Y_{P/S}^{XIL}$  de 0,45  $\text{g g}^{-1}$  em hidrolisado de casca de arroz. Estes valores comprovam a alta conversão de etanol e xilitol produzida por este co-cultivo quando comparada aos outros consórcios estudados neste trabalho com as leveduras conhecidamente fermentadoras de pentoses a etanol e xilitol, *P. stipitis* e *C. shehatae*.

O consumo dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), bem como a produção de etanol e xilitol, em meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz, em agitador orbital a

180 rpm e 30°C de temperatura pelas leveduras isoladamente e em co-cultivo encontram-se no ANEXO 1 deste trabalho.

#### **4.4. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL PELAS LEVEDURAS DO GÊNERO *Saccharomyces* e *Spathaspora* SOBRE HIDROLISADO DE CASCA DE ARROZ EM BIORREATORES DE CULTIVO SUBMERSO.**

##### **4.4.1. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso**

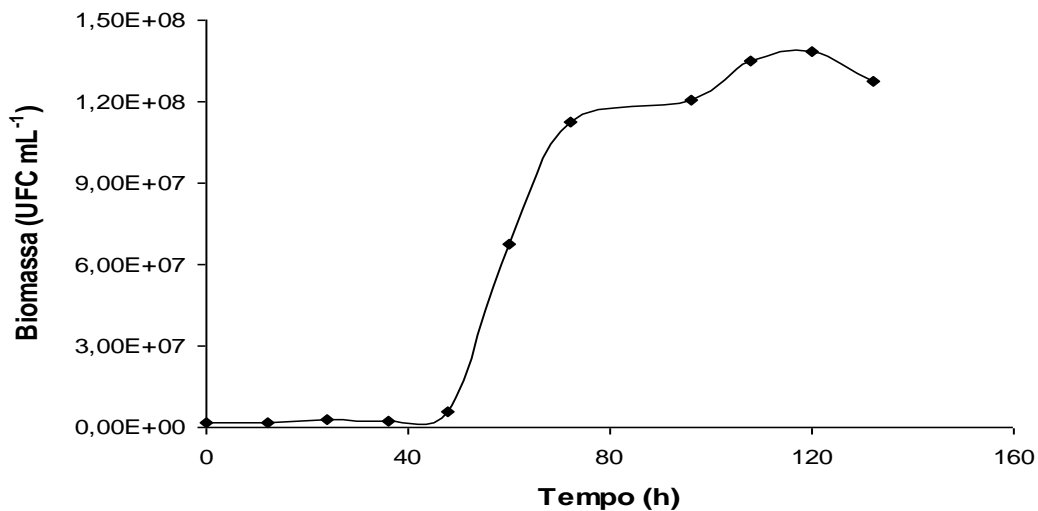
O processo fermentativo biotecnológico que engloba o uso de biorreatores é interessante do ponto de vista econômico, pois visa um aumento de escala e conseqüentemente possibilitaria a implantação de plantas industriais. Sendo assim, foi avaliada a capacidade de conversão dos açúcares em alcoóis pelas leveduras *S. cerevisiae*, o co-cultivo de *S. cerevisiae* com *S. arborariae* e o mesmo co-cultivo com adição de um complexo de enzimas contendo celulasas e hemicelulasas, sobre hidrolisado de casca de arroz não filtrado, em biorreatores de cultivo submerso. Os biorreatores foram conduzidos a uma aeração de 1 vvm, 300 rpm de rotação e pH padronizado em 5,5 com HCl e NaOH ambos 1M.

##### **4.4.1.1. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando *Saccharomyces cerevisiae***

A levedura *S. cerevisiae* foi avaliada nas condições citadas no item 4.4.1. A Figura 19 mostra a cinética de crescimento desta levedura sob hidrolisado de casca de arroz.

O crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* atingiu o máximo em 120 horas de cultivo com  $1,38 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, semelhante ao crescimento da biomassa em frascos agitados, sob o mesmo hidrolisado de casca de arroz ( $1,79 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).





**Figura 17.** Cinética de crescimento celular de *S. cerevisiae* sobre hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30<sup>0</sup>C). Contagem de colônias (UFC mL<sup>-1</sup>).

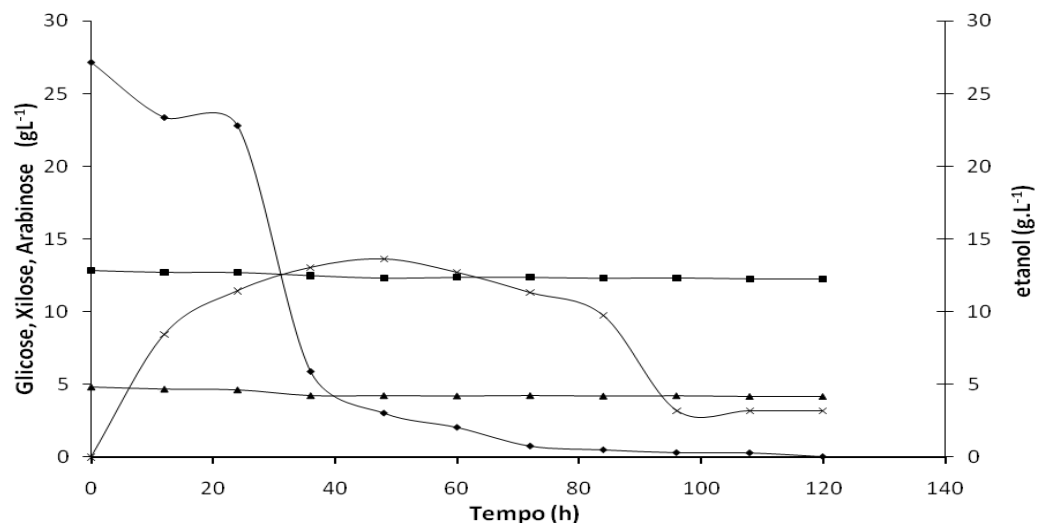
Quanto ao consumo dos açúcares, *S. cerevisiae* consumiu 100% da glicose disponível no meio, em aproximadamente 80 horas de cultivo. Já a produção de etanol obteve alta taxa de bioconversão ( $Y_{P/S} = 0,52 \text{ g g}^{-1}$ ), e produtividade volumétrica de  $0,28 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$  (Tabela 15) o mesmo valor atingido em agitador orbital com a mesma levedura e mesmo substrato. SAHA e colaboradores (2005), utilizando casca de arroz como substrato, com a bactéria recombinante *Escherichia coli* obtiveram  $0,43 \text{ g g}^{-1}$  de etanol provindo de todos os açúcares fermentescíveis. Em hidrolisado de mandioca, CHOI e colaboradores (2010) relataram que ao utilizar *S. cerevisiae* CHY1011 e *S. cerevisiae* CHFY0901 a 32°C, durante 66 horas, houve uma produtividade de etanol de  $0,46 \pm 0,05 \text{ g g}^{-1}$  e  $0,43 \pm 0,04 \text{ g g}^{-1}$ , valor semelhante ao encontrado neste trabalho. Neste cultivo, o etanol formado foi consumido pelos microrganismos subseqüentemente a sua produção.

**Tabela 15.** Resultados obtidos para a produção de etanol em hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30<sup>0</sup>C) por *S. cerevisiae*.

	Glicose (%)	$Y_{P/S} ET$ (g g <sup>-1</sup> )	$\eta ET$ (%)	$Q$ (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )
<i>S. cerevisiae</i>	100	0,52*	100%	0,28

\*  $Y_{P/S}$  calculado com base na glicose

A produção de alcoóis bem como o consumo dos açúcares do consórcio em hidrolisado de casca de arroz está representada pela Figura 20.

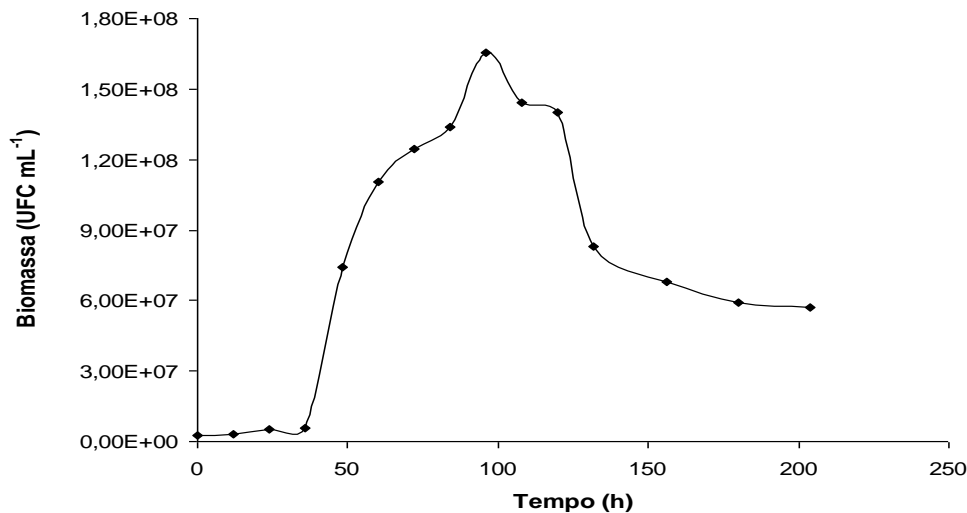


**Figura 18.** Produção de etanol pela levedura *S. cerevisiae* sobre hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30<sup>0</sup>C). (◆) glicose, (■) xilose, (▲) arabinose, (x) etanol.

#### 4.4.1.2. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de *Saccharomyces* e *Spathaspora arborariae*

Conforme os resultados obtidos no cultivo feito em agitador orbital sobre hidrolisado de casca de arroz, o consórcio que utilizou os microrganismos *S. cerevisiae* e *S. arborariae* apresentou melhor produção de etanol (0,66 g etanol g<sup>-1</sup> de açúcar). Por esta razão um co-cultivo em biorreatores submersos foi realizado utilizando esses microrganismos nas condições citadas no item 4.4.1.

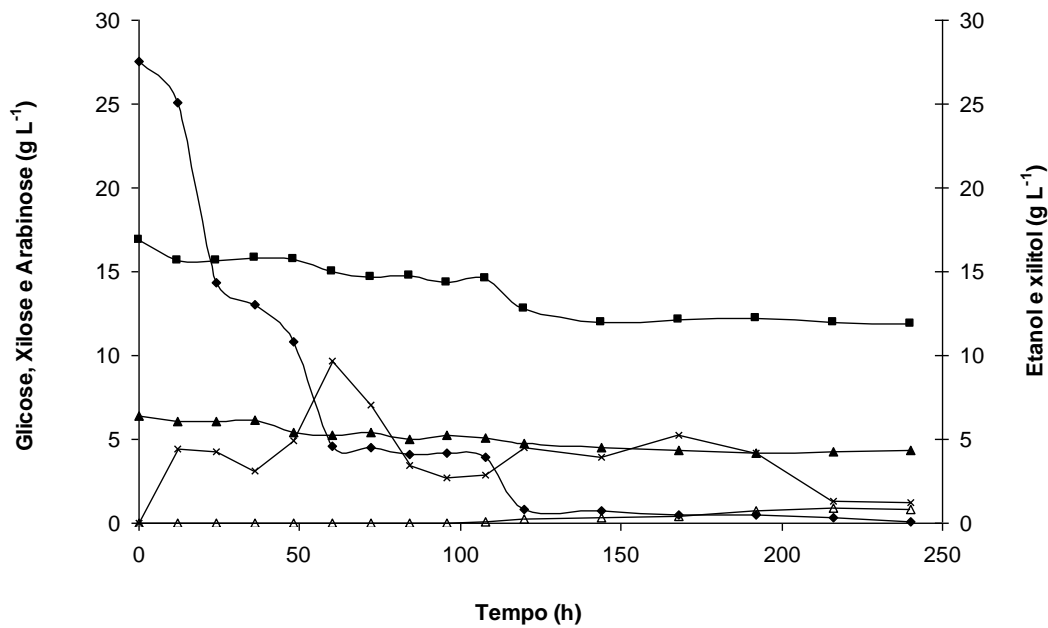
A Figura 21 mostra a cinética de crescimento celular do co-cultivo de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (*Sc-Sa*), sobre hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso.



**Figura 19.** Cinética do crescimento celular apresentados em  $\ln$  UFC mL<sup>-1</sup>, do co-cultivo *Sc-Sa* em hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300 rpm, 30°C).

O máximo crescimento do co-cultivo ocorreu em 96 horas de cultivo ( $1,38 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>) em biorreatores, semelhante ao valor encontrado de crescimento de biomassa para o mesmo co-cultivo sobre o hidrolisado de casca de arroz ( $1,86 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). A partir do máximo crescimento a fase de declínio torna-se nítida, pois há um decréscimo na quantidade de açúcares fermentescíveis do hidrolisado.

O consumo dos açúcares disponíveis no meio (glicose, xilose e arabinose) e a produção de etanol e xilitol estão representados na Figura 22. A maior produção de etanol foi em 60 horas com 9 g L<sup>-1</sup>. A xilose e a arabinose foram pouco consumidas no meio, com 29 e 31 % de consumo, respectivamente.



**Figura 20.** Cinética de consumo dos açúcares e a produção de etanol e xilitol a partir do co-cultivo *Sc-Sa* sobre hidrolisado de casca de arroz em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300 rpm, 30<sup>0</sup>C). (◆) glicose, (■) xilose, (▲) arabinose, (x) etanol e (Δ) xilitol.

A conversão para etanol do co-cultivo foi de 0,42 g de etanol g<sup>-1</sup> de glicose (Tabela 16). Neste cultivo observa-se a formação de xilitol, que inicia-se a partir de 108 horas de cultivo, com uma máxima produtividade de 0,07 g g<sup>-1</sup>. Em trabalho realizado por SCHIRMER-MICHEL e colaboradores (2009) *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 foi cultivada em microaerofilia, sobre hidrolisado destoxificado de casca de soja concentrado 2 vezes, durante esse cultivo, etanol e xilitol foram produzidos, sendo que a concentração máxima de etanol foi atingida com taxa de conversão de  $Y_{P/S}$  0,40 g etanol g<sup>-1</sup> açúcar, e a produção de xilitol encontrada (< 2,5 g L<sup>-1</sup>) foi alta, quando comparada a deste trabalho (0,22 g de xilitol g<sup>-1</sup> xilose). Neste cultivo observa-se o consumo de etanol produzido nas horas finais do cultivo. Segundo DELGENES e colaboradores (1998) o consumo de etanol está relacionado a uma incompleta conversão da xilose.

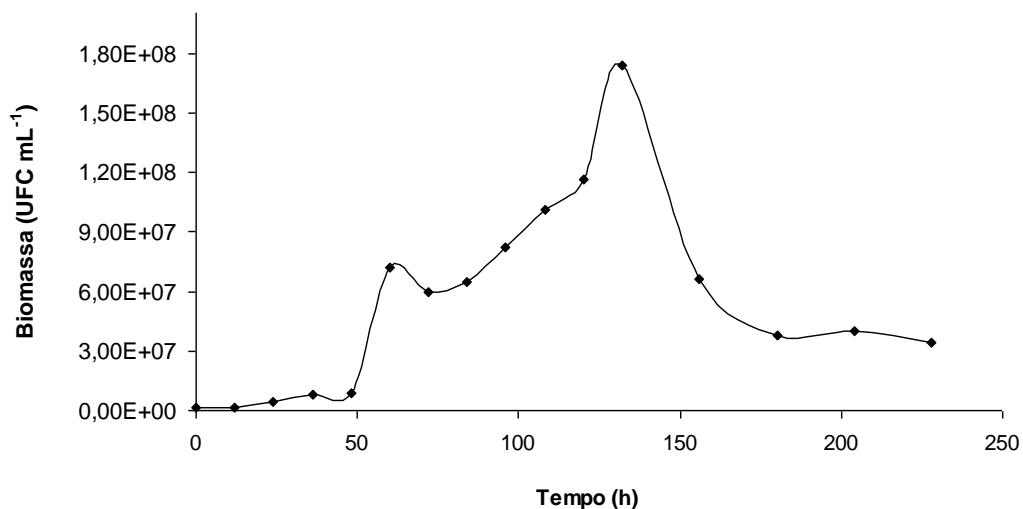
Em frascos agitados os valores de produtividade foram maiores que os encontrados em biorreatores (Tabela 16), provando que maiores estudos devem ser feitos para aperfeiçoar as condições do cultivo. A maior agitação do meio provoca efeito negativo na fermentação da glicose e conversão da celulose, em fermentações com ou sem o uso de enzimas (MUSSATTO *et al.*, 2006).

**Tabela 16.** Valores de produtividade de etanol em co-cultivo *Sc-Sa* em agitador orbital e em biorreator de cultivo submerso.

	$Y_{P/S}$ ET ( $\text{g g}^{-1}$ )	$\eta_{ET}$ (%)	$Q(\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1})$	$Y_{P/S}$ XIL ( $\text{g g}^{-1}$ )
<i>Sc-Sa</i> biorreator	0,42	83	0,16	0,07
<i>Sc-Sa</i> agitador orbital	0,62	121	0,25	0,45

#### 4.4.1.3. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando sacarificação e co-fermentação simultâneas de *S. cerevisiae* e *S. arborariae* e enzima Powercell

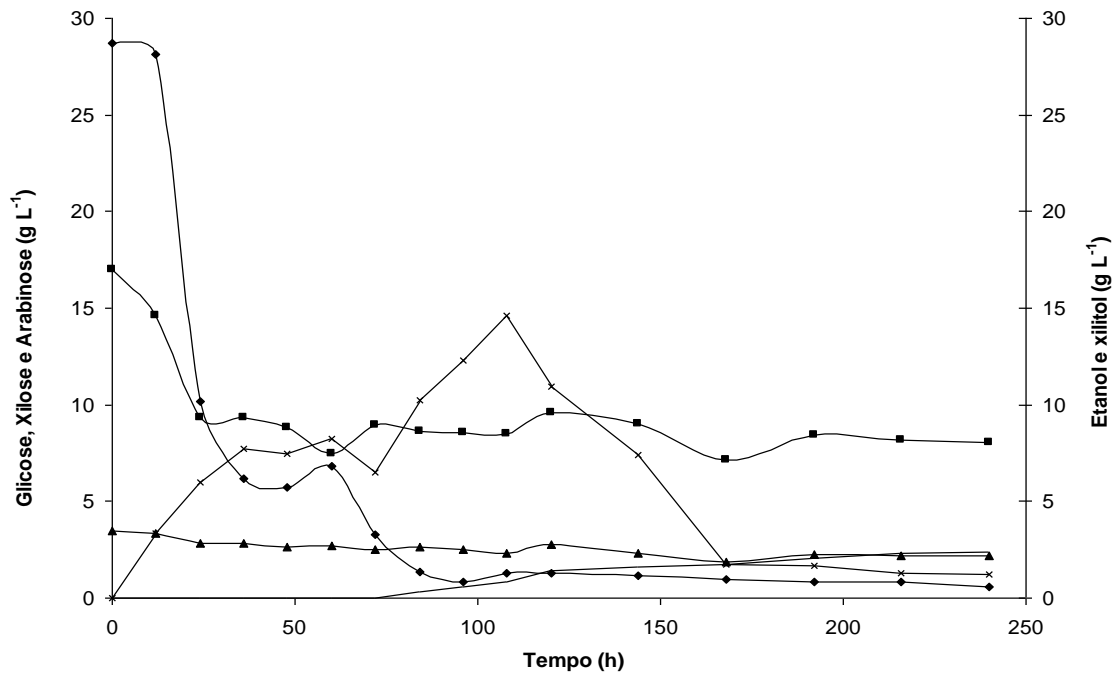
O crescimento celular dos microrganismos está na Figura 23, com um máximo de  $1,73 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ , semelhante ao encontrado em cultivo sem adição de enzima com o mesmo consórcio de microrganismos ( $1,65 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ).



**Figura 21.** Crescimento celular do co-cultivo *Sc-Sa* em  $\ln \text{ UFC mL}^{-1}$ , em hidrolisado de casca de arroz, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300 rpm,  $30^{\circ}\text{C}$ ).

A produção de etanol e xilitol e o consumo dos açúcares presentes no meio estão demonstrados na Figura 24. Com o uso de enzimas, a glicose foi totalmente consumida em 168 horas, enquanto que nos biorreatores com o co-cultivo sem enzima foi consumida em 120 horas. A enzima atuou também na xilose e na arabinose presentes no meio, sendo que os níveis das mesmas mantiveram-se estáveis a partir das 24 horas iniciais do cultivo. A máxima produção de etanol foi obtida em 108 horas de cultivo com  $14,5 \text{ g L}^{-1}$ , sendo a conversão igual a  $0,53 \text{ g de etanol g}^{-1}$  de glicose. A conversão de xilitol foi de  $0,36 \text{ g g}^{-1}$ .

Ao comparar o co-cultivo realizado com enzima ao sem enzima (Tabela 17), sob as mesmas condições e com os mesmos microrganismos, nota-se que tanto a produtividade de etanol ( $Y_{p/s}$   $0,53$  e  $0,42 \text{ g g}^{-1}$ ) quanto à de xilitol ( $Y_{p/s}$   $0,36$  e  $0,07 \text{ g g}^{-1}$ ) foram maiores. OHGREN e colaboradores (2006) utilizando o chorume pré-tratado de milho, com as enzimas Celluclast 1.5 L ( $65 \text{ FPU/g}$  e  $17\text{-glucosidase IU/g}$ ) e Novozyme 188 ( $376 \text{ -glucosidase IU/g}$ ), com atividades enzimáticas de  $15 \text{ FPU/g}$  com a levedura *S. cerevisiae* TMB3400, obtiveram uma produtividade de  $0,54 \text{ g g}^{-1}$  de etanol, valor semelhante ao encontrado neste trabalho.



**Figura 22.** Cinética de produção de etanol e xilitol a partir pelo co-cultivo *S. cerevisiae* e *S. arborariae*, (*Sc-Sa*) sobre hidrolisado de casca de arroz, com 15 FPU de enzima, em biorreator de cultivo submerso (1 vvm, 300rpm, 30<sup>0</sup>C). (◆) glicose, (■) xilose, (▲) arabinose, (x) etanol e (Δ) xilitol.

Os cultivos em biorreatores submersos mostraram que o uso de hidrolisado de casca de arroz em fermentação etanólica produz altas taxas de produtividade a etanol. A casca de arroz é um resíduo rico em celulose, com potencial para ser fermentado tanto por sacarificação simultânea quanto pelo uso de co-cultivos simultaneamente.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que a casca de arroz é um substrato com grande potencial para bioprocessos após tratamento de hidrólise ácida diluída.

Considerando apenas a máxima recuperação dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), o tratamento com temperatura de 150°C e 3,0 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS aos 40 minutos de reação foi o mais eficiente entre todos os avaliados (12 g L<sup>-1</sup>). Todavia, neste tratamento houve uma excessiva liberação de compostos tóxicos que possivelmente causariam inibição do crescimento celular em posteriores processos de bioconversão deste hidrolisado (2,3 g L<sup>-1</sup>). Para que esse hidrolisado possa ser utilizado em processos biotecnológicos uma etapa de destoxificação possivelmente seria necessária. Neste contexto a condição 129°C, 4,4 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS foi a mais eficaz, com apenas 0,18 g L<sup>-1</sup> de inibidores formados, o que é facilmente suportado pelos microrganismos fermentadores.

Quanto às fermentações em frascos agitados, foram obtidos resultados satisfatórios, as maiores concentrações de etanol foram encontradas nas fermentações realizadas utilizando o consórcio (*S. cerevisiae* e *S. arborariae*), sobre meio hidrolisado de casca de arroz ( $Y_{P/S}$  0,62 g g<sup>-1</sup>). A levedura *S. arborariae* apresentou-se promissora para a fermentação de pentoses.

O cultivo em biorreatores submersos necessita ser otimizado para aumentar a conversão dos açúcares fermentescíveis contidos no hidrolisado de casca de arroz a etanol e/ou xilitol pelos consórcios selecionados neste trabalho, apesar dos resultados encontrados serem satisfatórios ( $Y_{P/S}$  0,42 g g<sup>-1</sup>). Maiores estudos também devem ser feitos quanto ao



uso de enzimas no processo de fermentação da casca de arroz ( $Y_{P/S}$  0,53 g g<sup>-1</sup>), avaliando-se também a sacarificação enzimática e a fermentação separadamente.

## 6. PERSPECTIVAS

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

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIDON T., WOOD C., SHUPEE A., WANG Y., GRAVES M., LIU S. Biorefinery: Conversion of Woody Biomass to Chemicals. **Energy and Materials**. 2008.

ALMEIDA J.R.M., RÖDER A., MODIG T., LAADAN, B. e LIDÉN G., GORWA-GRAUSLUND M. NADH - vs NADPH-coupled reduction of 5-hydroxymethyl furfural (HMF) and its implications on product distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 78, 939 – 945. 2007.

ASGHARI F., YOSHIDA H. Acid-Catalyzed Production of 5-Hydroxymethyl Furfural from D-Fructose in Subcritical Water. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 45, 2163-2173. 2006.

BADER, J., MAST-GERLACH E., POPOVIC M.K., BAJPAI R., STAHL U. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**. 109, 371 - 387. 2009.

CADETE R., SANTOS R.; MELO M., MOUROZ A., GONÇALVES D., STAMBUKZ B., GOMES F., LANCHANCE M., ROSA C. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil . **Yeast Research**. 9, 1338 - 1342. 2009.

CANILHA L., CARVALHO W., SILVA J. B. A. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 86, 1371 – 1376. 2006.

CHANDEL A., KAPOOR R., RAMESH A., KUHAD C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**. 98, 1947–1950. 2007.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Avaliação da safra agrícola 2007/2008**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 23.

CORREDOR D.Y., SUN X. S., SALAZAR J. M., HOHN K. L., WANG D. Enzymatic Hydrolysis of Soybean Hulls Using Dilute Acid and Modified Steam-Explosion Pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. 2, 1 - 8. 2008.

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

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

DELGENES J., 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 and Microbial Technology**. 19, 220 – 225. 1996.

DELGENES J.P., ESCARE M.C., LAPLACE J.M., MOLETTA R., NAVARRO J.M. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. **Industrial Crops and Products**. 7, 101 – 111. 1998.

- DU PREEZ J.C., BOSCH M., PRIOR B.A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 23, 228 – 233. 1986.
- DU PREEZ J.C., VAN DRIESSEL B., PRIOR B.A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Candida tenuis* on D-xylose. **Archives of Microbiology**. 152, 143 - 147, 1989.
- DUNNING, J.W., DALLAS D.E. Analytical procedures for control of sacharification process. **Analytical chemistry**. 21, 727 – 729. 1949.
- FELIPE M.G.A. Effect of acetic acid on xylose fermentation by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**. 35, 171 - 177. 1995.
- FENGEL D., WEGENER G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 613. 1989.
- FROMANGER R., GUILLOUET S.E., URIBELARREA J.L., MOLINA-JOUVE C., CAMELEYRE X. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 7, 437-445. 2010.
- FU N., PEIRIS P., MARKHAM J., BAVOR J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**. 45, 210 – 217. 2009.
- FU N., PEIRIS P. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol. by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24, 1091-1097. 2008.
- GIL N., FERREIRA S., AMARAL M.E., DOMINGUES F., DUARTEA.P. The influence of diluide acid pretreatment conditions on the enzymatic saccharification of *Erica* SSP for bioethanol production. **Industrial crops and products**. 2010.
- GOES T., MARRA R. Biocombustíveis – Uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008>. Acessado em 20/06/2010.
- GROOTJEN D.R.J., JANSEN M.L., Van der LANS R.G.J.M., LUYBEN KCHAM (1991a) Reactors in series for the complete conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiology and Technology**. 13, 828–833. 1991.
- GUPTA R., SHARMA K., KUHAD C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. **Bioresource Technology**. 100, 1214-1220. 2009.
- HAHN-HAGERDAL B., KARHUMAA K., FONSECA C., SPENCER-MARTINS I., GORWA-GRAUSLUND M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 74. 937 - 953. 2007.
- HAYES D.; An examination of biorefining processes, catalysts and challenges. **Catalysis Today**. 2009.

- HELLE S., CAMERON D., LAM J., WHITE B., DUFF S. Effect of inhibitory compounds found in biomass hydrolysates on growth and xylose fermentation by a genetically engineered strain of *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology** 33,786–792. 2003.
- HINFRAY C., JOUENNE T., JUNTER G.A. Simultaneous saccharification and fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* co-immobilised in a double chambered bioreactor. **Biomass for energy environment agriculture and industry**.2. 1291 – 1302. 1995.
- HOFRICHTER M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**. 30, 454 – 466. 2002
- HOHMANN S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and molecular biology reviews** 66, 300–372 .2002.
- HORWITZ W. Official methods of analysis of the Association of Official **Analytical Chemists**. 12. Ed. Washington: AOAC, 2, 15. 1975. Modificado por ICTA – UFRGS.
- HOWARD R.L., ABOTSI E., JANSEN van RENSBURG E.L., HOWARD S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**. 2, 602 - 619. 2003.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=931](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=931). Acessado em 17/08/2010. 2004.
- IRICK T.J., WEST K., BROWNELL H.H., SCHWALD W., SADDLER J.N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. Scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 17, 137 – 149. 1988.
- JEFFRIES T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 27, 31-32. 1983.
- JEFFRIES T.W., JIN Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63, 5, 495 - 509. 2000.
- JEFFRIES T.W., SHI N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**. 65, 117 – 161. 1999.
- JONSSON ING-M., VERDRENGH M., BRISLERT M., LINDBLAD S., BOKAREWA M., ISLANDER U., CARLSTEN H., OHLSSON C., NANDAKUMAR S., HOLMDAHL R., TARKOWSKI A. Ethanol prevents development of destructive arthritis. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America**. 104, 258 – 263. 2007.
- KÁDÁR Z., SZENGYEL Z., RÉCZEY K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Industrial Crops and Products**. 2004.
- KAPARAJU P., SERRANO M., THOMSEN A., KONGJAN P., ANAGELIDAKI I. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept. **Bioresource Technology**. 100, 2562 – 2568. 2009.
- KARIMI K., EMTIAZI G., TAHERZADEH M.J. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 40, 138 – 144. 2006.

- KIM J., YUN S. Discovery of Cellulose as a Smart Material. **Macromolecules**. 39, 4202 - 4206, 2006.
- KLINKE H.B., THOMPSEN A.B., AHRING B.K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 66, 10 – 26. 2004.
- KRISHNA H., CHOWDARY G. Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. **Industrial Crops and Products**. 20, 103–110. 2004.
- KUHAD R.C., SINGH A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**. 13, 2, 151 – 172. 1993.
- KUMAR R., SINGH S., SINGH O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**. 35, 377 – 391. 2008.
- LASER M., SCHULMAN D., ALLEN S. G., LICHWA J., ANTAL M. J., LYND L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**. 81, 33 – 44. 2002.
- LATIF F., RAJOKA M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**. 77, 57-63. 2001.
- LEE J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**. 56, 1 – 24. 1997.
- MALESZKA R., SCHNEIDER H. Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**. 28, 360 – 363. 1982.
- MAPA/CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Anuário Estatístico da agroenergia** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 161. 2009.
- MARGEOT A., HAHN-HAGERDAL B., EDLUND M., SLADE R., MONOT F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**. 20, 372 – 380. 2009.
- MATSUSHIKA, A., INOUE, H., KODAKI, T., SAWAYAMA, S., 2009. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology** 84, 37–53. 2009.
- MERICO A., SULO P., PISKUR J., COMPAGNO C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**. 274, 656 – 666. 2007.
- MIELENZ J. R., BARDSLEY J. S., WYMAN C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**. 100, 3532 – 3539. 2009.
- MONIRUZZAMAN M. Ethanol production from AFEX pretreated corn fiber by recombinant bacteria. **Biotechnology Letters**. 18, 985 - 990, 1996.
- MOSIER N., WYMAN C., DALE B., ELANDER R., LEE Y.Y., LADISCH M. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 2005.

- MUSSATTO S.I., DRAGONE G., ROBERTO I.G. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. **Biotechnology Progress**. 21, 1352 – 1356. 2005.
- MUSSATTO S.I., ROBERTO I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**. 93, 1 - 10. 2004.
- MUSSATTO S.I., ROBERTO I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 81, 268 – 274. 2006.
- OCTAVE S., THOMAS D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**. 91, 659 – 664, 2009.
- OHGREN K., BERGTSSON O., GRAUSLUND G., GALBE M., HAHN--HARGEDAL B, ZACCHI G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. **Journal of biotechnology**. 2006.
- OLOFSSON K., BERTILSSON M., LIDÉN G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnology for Biofuels**. 2008.
- PALMQVIST E., HAHN-HÄGERDAL B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**. 74, 25 – 33. 2000.
- PAPOUSKOVA K., SYCHROVA H. The co-action of osmotic and high temperature stresses results in a growth improvement of *Debaryomyces hansenii* cells. **International Journal of Food Microbiology**. 118, 1 – 7. 2007.
- PARAJÓ J. C., DOMINGUEZ H., DOMINGUEZ J. M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**. 21, 18-24. 1997.
- PARAJÓ J.C., DOMINGUEZ H., DOMÍNGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**. 65, 191 – 201. 1998a.
- PARAJÓ J.C., DOMINGUEZ H., DOMÍNGUEZ J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**. 65, 203 – 212, 1998b.
- PAULY M., KEEGSTRA K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. Department of Energy Plant Research Laboratory and Department of Biochemistry and Molecular Biology. 2008.
- PRASAD A. S., SINGH H. C. J. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Bioresource Technology**. 3. 2007.
- QIAN M, TIAN S, LI X, ZHANG J, PAN Y, YANG X. Ethanol production from dilute-acid softwood hydrolysate by co-culture. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 134, 273 – 283. 2006.

- READING N.S., WELCH K.D., AUST S.D. Free radical reactions of wood-degrading fungi. In: Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World, **Washington: ACS Symposium Series**. 845, 16 - 31. 2003.
- ROBERTO I.C. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**. 26, 15 – 21. 1991.
- ROBERTO I.C., MANCILHA I.M., SATO S. Influence of  $k_{La}$  on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**. 21, 505 – 508. 1999.
- ROBERTO, I.C., MUSSATTO S.I., RODRIGUES R.C. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**. 17, 171 - 176. 2003.
- ROCHA G.J.M. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. Tese (Doutorado em Química), IQSC, USP, São Carlos, 136, 2000.
- ROUHOLLAH H.; IRAJ N., GITI E., SORAH A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**. 6, 1110 – 1114. 2007.
- SAHA B.; COTTA M. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. **Biomassa and Bioenergy**. 32, 971 – 977. 2008.
- SAHA B., ITEN L., COTTA M., WU V. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnology Progress**. 21, 816-822. 2005.
- SAHA B.C., HAYASHI K. Lignocellulose biodegradation. **New Orleans: American Chemical Society**. 315. 2004.
- SAHA B.C., WOODWARD J. Fuels and Chemicals from Biomass. **Ed. American Chemical Society**. 1997.
- SANCHEZ G., PILCHER L., ROSLANDER C., MODIG T., GALBE M., LIDEN. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material. **Bioresource Technology**. 93, 249 – 56. 2004.
- SCHIRMER-MICHEL A. C., FLÔRES S. H., HERTZ P. F., AYUB M.A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. 84, 223 – 228. 2009.
- SCHIRMER-MICHEL A. C., FLÔRES S. H., HERTZ P. F., MATOS G. S., AYUB, M.A.Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**. 99, 2898 – 2904. 2008.
- SIGLER K., MATOULKOVA D., DIENSTBIER M., GABRIEL P. Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavor, and haze. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 82, 1027 – 1035. 2009.
- SILVA A., MUSSATTO S.I., ROBERTO I. The Influence of Initial Xylose Concentration, Agitation, and Aeration on Ethanol Production by *Pichia stipitis* from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 162, 1306 – 1315. 2010.



- SILVA D.J., QUEIROZ A.C. Análise dos Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos. UFV. 2005.
- SINGH A., MISHRA P. Microbial Pentose Utilization. **Current applications in Biotechnology Progress in Industrial Microbiology**. 33, 1995.
- SIVAKUMAN G., VAILUM D., XUM J., BURNEZ D., LAY J., GEM X., WEATHERS P. Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. 2, 100 – 120. 2008.
- SIVERS M.V., ZACCHI G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**. 51, 43 – 52. 1995.
- SOCOL C., VANDERBERGHEL., PEDRONIA.,KARPS., BUCKERIDGE M., RAMOS L.P., PITARELO A., LEITÃO V., GOTTSCHHALK L., FERRARA M., SILVA E., MORAES L., ARAUJO J., GOLÇALVEZF. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**. 101, 4820 - 4825 .2010.
- STAMBUK B.U., ELEUTHERIO E.C.A., FLOREZ-PARDO L.M., SOUTO-MAIOR A., BOM E.P.S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**. 67, 918 – 926. 2008.
- SUGAI J.K., DELGENES J.P. Catabolite repression of inductin fo aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**. 31, 239 – 244. 1995.
- SUN J.X., SUN X.F., SUN R.C., SU Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**. 56, 195 – 204. 2004.
- SUN J.X., XU F., SUN X.F., XIAO B., SUN R.C. Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. **Polymer Degradation and Stability**. 88, 521 – 531. 2005.
- SUN Y., CHENG J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**. 83, 1 – 11. 2002.
- TAHERZADEH M.J. Ethanol from lignocellulose: physiological effects of inhibitors and fermentation strategies. Goteborg, Sweden: **Chalmers Publication of Technology**. 1999.
- TAHERZADEH M.J., KARIMI K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources Technology**. 4, 707 – 738. 2007.
- TIAN S., ZHOU G., YAN F., YU Y., YANGO X. Yeast strains for ethanol production from lignocellulosic hydrolysates during in situ detoxification. **Biotechnology Advances**. 2009.
- van MARIS A., ABBOTT D.A., BELLISSIMI E., VAN DEN BRINK J., KUYPER M., LUTTIK M.A., WISSELINK W., SCHEFFERS A., VAN DIJKEN J.P., PRONK J.T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**. 90, 391 - 418. 2006.
- von SIVERS M., ZACCHI G., OLSSON L., HAHN-HAGERDAL B. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**. 10, 555 – 560. 1994.

- YU J., ZHANG J., HE J., LIU Z., YU Z. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**. 100, 903 – 908. 2009.
- WALFRIDSSON M. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains over expressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied Environmental Microbiology**. 61, 4184 – 4190. 1995.
- WINKELHAUSEN E., KUZMANOVA S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 86, 1 – 14, 1998.
- WYMAN C.E. Potential Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, and Power. **Biotechnology progress**. 19 , 254 – 262. 2003.
- ZHANG W., FRANCO C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Engineering in Life Science**. 2, 409 - 414. 2002.
- ZHANG X., SHEN Y., SHI W., BAO X. Ethanolic cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. **Bioresource Technology**. 18, 7104 – 7110. 2010.
- ZHAO L., ZHANG X., TAN T. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass and bioenergy**. 32, 1156 – 1161. 2008.
- ZHONG C., LAU M., BALAN V., DALE B., YUAN Y. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 84, 667 – 676. 2009.

## APÊNDICE 1

Tabela contando a síntese do consumo de açúcares (glicose, xilose e arabinose), produção de etanol e de xilitol em frascos agitados a 180 rpm e 30°C sobre meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz, por cultivos isolados e em co-cultura.

Meio	Tipo de Cultivo	Microrganismo	Gli (%)	Xil (%)	Ara (%)	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )	ηET (%)	Q (gL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> XIL (g g <sup>-1</sup> )
Meio Semissintético	Cultivo Individual	<i>C. shehatae</i>	100	96	69	0,4	78	0,22	0,45
		<i>P. stipitis</i>	99	82	49	0,36	71	0,14	0,17
		<i>S. cerevisiae</i>	100	0	0	0,53	104	0,4	-
		<i>S. arborariae</i>	100	84	37	0,46	89	0,21	0,13
	Cultivo em Consórcio	<i>S. cerevisiae</i> +	100	49	24	0,77	151	0,69	0,79
		<i>S. arborariae</i>							
		<i>S. cerevisiae</i> +	100	41	19	0,3	59	0,11	0,02
		<i>P. stipitis</i>							
		<i>S. cerevisiae</i> +	100	84	14	0,42	83	0,27	0,2
		<i>C. shehatae</i>							
Hidrolisado de Casca de Arroz	Cultivo Individual	<i>C. shehatae</i>	100	93	47	0,4	78	0,16	0,13
		<i>P. stipitis</i>	100	58	19	0,35	68	0,14	0,16
		<i>S. cerevisiae</i>	100	0	0	0,52	101	0,38	-
		<i>S. arborariae</i>	100	45	33	0,45	88	0,16	0,33
	Cultivo em Consórcio	<i>S. cerevisiae</i> +	99	90	26	0,62	121	0,25	0,45
		<i>S. arborariae</i>							
		<i>S. cerevisiae</i> +	100	79	32	0,49	95	0,23	0,14
		<i>P. stipitis</i>							
		<i>S. cerevisiae</i> +	100	71	24	0,57	112	0,24	0,13
		<i>C. shehatae</i>							

## APÊNDICE 2

Primeiro artigo intitulado: "Conversion of toxic rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations" foi submetido ao periódico Bioresource Technology.

**Conversion of toxic rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations**

**Fernanda da Cunha-Pereira<sup>1,#</sup>, Lilian Raquel Hickert<sup>1,#</sup>, Nicole Teixeira Sehnem<sup>1</sup>, Priscila Brasil de Souza-Cruz<sup>1</sup>, Carlos Augusto Rosa<sup>2</sup>, and Marco Antônio Záchia Ayub<sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup>Biotechnology & Biochemical Engineering Laboratory (BiotecLab), Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil; <sup>2</sup>Biological Science Institute, Federal University of Minas Gerais.

**ABSTRACT**

In this research it was studied the production of ethanol by a new yeast specie, *Spathaspora arborariae*, using concentrate rice hull hydrolysate as substrate. Fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*, alone or in co-cultures with *S. arborariae*, were also carried out over these substrates and in semi-synthetic medium in order to gather physiological information on these systems, specially concerning their ability to grow and produce ethanol in the presence of acetic acid, furfural, and hydroxymethylfurfural. *S. arborariae* showed the ability to metabolize both pentoses and hexoses present in the hydrolysate, with ethanol yields ( $Y_{P/S}$ ) of 0.45 g ethanol g<sup>-1</sup> sugars. The highest ethanol yield was achieved in the co-cultures, with  $Y_{P/S}$  of 0.77 and 0.62 g ethanol g<sup>-1</sup> sugars on

---

\* Corresponding author. Phone: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.

E-mail address: [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br) (MAZ Ayub).

#The first and the second authors contributed equally to this research.

semi-synthetic medium and on rice hull hydrolysate, respectively. When the toxic compounds were added to the semi-synthetic medium, either alone or in combination, their presence showed negative effects on biomass formation and ethanol productivity. This work shows good prospects for the use of the new yeast *S. arborariae* and co-cultures with *S. cerevisiae*.

**Keywords:** Bioethanol, rice hull hydrolysate, *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, culture inhibitors.

## 1. INTRODUCTION

Global interest in ethanol biofuel has increased during recent years due to concerns on fossil fuels exhaustions and carbon dioxide emissions (MARTIN and THOMSEN, 2007). Chief sources of ethanol production are sucrose from sugar cane and maize starch, as used by the two biggest ethanol producers, Brazil and United States (SOCCOL et al., 2010; ROUHOLLAH et al., 2007). However, the great bulk of biomass consists of cellulose, hemicellulose, and lignin, which can be used to greatly expand the renewable and sustainable resources for fuel ethanol, without competing with food production (ROUHOLLAH et al., 2007; FROMANGER et al., 2010). Cellulose and hemicellulose fractions coming from agroindustrial residues can be depolymerized into fermentable sugars such as the hexoses glucose and mannose, and the pentoses xylose and arabinose, either by enzymatic or chemical hydrolyses (MOSIER et al., 2005). An efficient conversion of all sugars present in lignocellulosic hydrolysates to ethanol is a prerequisite for maximizing the profitability of an industrial process and to improve the cost-

competitiveness of bioethanol production (GUPTA et al., 2009; FU et al., 2009). The microbial conversion of pentoses, which represent 25-40 % of the total sugars of these polymeric materials, has been identified as the major research challenge for the second-generation ethanol technology (FROMANGER et al., 2010). The pentose sugar xylose is the main monosaccharide liberated from plant hydrolysates, which cannot be fermented by wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*, by far the most extensively used microorganism for ethanol production. In order to overcome this limitation, several attempts to develop recombinant strains of *S. cerevisiae* based on its capacity to ferment xylulose into ethanol have been reported in the literature, but so far only a limited number of industrial *S. cerevisiae* strains with this capacity have been tested because the metabolic regulations of yeasts are still poorly understood (VAN ZYL et al., 2007). Consequently, there are relatively few studies on the performance of these strains under industrial conditions using lignocellulosic hydrolysates (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Yeasts like *Pachysolen tannophilus* and *Candida tropicalis* have been shown to ferment xylose to ethanol (Van MARIS et al., 2006), but since no wild-type strains of these yeasts are able to efficiently carry out this conversion, the combination of them and the construction of genetically modified cells have been reported in the literature (FU and PEIRIS, 2008). Co-cultures of yeasts appear to be advantageous because of the potential for synergistic utilization of the metabolic pathways of all strains (BADER et al., 2009).

Another important factor involved in the second-generation bioethanol production is the formation of cell inhibitory substances such as weak acids, furan derivatives, and phenolic compounds, which will always arise from chemical hydrolyses of lignocellulosic materials (PALMQVIST and HÄHN-HÄGERDAL, 2000a; KLINKE et al., 2004). Inhibitors affect the overall cell physiology and often result in decreased cell viability,

ethanol yields, and productivity (ZALDIVAR et al., 2001). For instance, for *S. cerevisiae*, furans at high concentrations exert an inhibitory effect, interfering with glycolytic enzymes and macromolecules syntheses, while acetic acid, which is relatively abundant in lignocellulosic hydrolysates, has cytotoxic effects at elevated concentrations (KEATING et al., 2006). In this context, the aims of this research were to investigate the kinetics of glucose, xylose and arabinose conversion to ethanol in cultures of *Spathaspora arborariae* (a completely new strain of yeast) and *Saccharomyces cerevisiae*, and in the combined co-cultures of these strains, under micro-aerobic conditions, using semi-synthetic medium and concentrate rice hull hydrolysate. The individual and combined effects of the toxic compounds hydroxymethylfurfural (HMF), furfural and acetic acid on sugar consumption, cell growth, and ethanol productivity were also evaluated in semi-synthetic medium.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Microorganisms, cell maintenance, and materials**

The strains used in this study were *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 (Lalvin, Institut Coopératif du Vin, France), and *Spathaspora arborariae* (NRRL Y-48658). *S. cerevisiae* ICV D254 is a commercial wild-type strain isolated from Syrah grapes from the Rhône Valley region, in France, used for wine fermentation and it has been chosen for this research due to its good ethanol. *S. arborariae* NRRL Y-48658 was recently isolated from rotting wood collected in the *Serra do Cipó* National Park, State of Minas Gerais, Brazil, and was characterized by CADETE *et al.*, (2009) as an efficient D-xylose fermenting yeast. Yeasts were kept frozen at -20 °C in stock cultures of 20 % glycerol and 80 % of



culture medium containing (in g L<sup>-1</sup>): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, and glucose, 5.

Rice hull was obtained from a local rice mill as dried material and processed without any further treatments before hydrolysis (see bellow). All chemicals used in this research were of analytical grade and purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), unless otherwise stated.

## **2.2. Inocula preparation**

Inocula for all cultivations were prepared by cultivating the yeasts in synthetic medium according to compositions described bellow in 500 mL Erlenmeyer flask filled with 150 mL of medium. Cultivations were carried out in an orbital shaker (Marconi MA 830, Brazil) at 180 rpm, 30° C for 24 hours. Late exponential-phase cells were collected by centrifugation at 3,000 g for 10 minutes, and the pellet formed was washed with sterile distilled water and resuspended directly into the medium to be used in the fermentation to obtain a cell concentration of optical density 1 at 600 nm. Fractions of 10 % (v/v) of these cell suspensions were then used as the inocula in all experiments.

## **2.3. Cultivation conditions**

The microorganisms, both isolated and in consortium, were cultivated in semi-synthetic medium and in rice hull hydrolysate (RHH). The semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>) was composed of (in g L<sup>-1</sup>): yeast extract, 3; peptone, 5; xylose, 20; glucose, 20, and arabinose 10, pH adjusted to 5 with 1 M HCl. Hydrolysate was obtained by the acid diluted

hydrolysis of rice hull in autoclave (121° C, 60 minutes, solid:liquid ratio of 1:10, 1 % (v/v) sulfuric acid). The liquid fraction was separated by filtration and the pH was adjusted to 5 with solid sodium hydroxide. The hydrolysate was vacuum-concentrated (70 °C) 2.8 times in order to increase sugars concentration to final amounts of (in g L<sup>-1</sup>): glucose, 35, xylose, 13 and, arabinose, 4. No detoxification and supplementation was made. Cultures were carried out in 2 L Erlenmeyer flasks containing 450 mL of either G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> or RHH in an orbital shaker at 180 rpm, 28°C for 108 and 240 hours, respectively. Samples were collected at stipulated points for determination of biomass by cell counting (CFU) and quantification of sugars, xylitol, ethanol, and acetic acid. All experiments were conducted in duplicates.

#### **2.4. Tolerance towards toxic compounds**

The effects of furfural, HMF, and acetic acid toxicity on cultures were evaluated using semi-synthetic medium composed of (in g L<sup>-1</sup>) glucose, 20; xylose, 15; arabinose, 3; yeast extract, 3; peptone, 5, added with varying concentrations of the toxic compounds (in g L<sup>-1</sup>): furfural 2 and 3, HMF 2.5 and 5, acetic acid 1.6 and 3.2, either alone or in combinations of the three. The same medium without addition of the toxic compounds was used as control. Cultures were carried out in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 60 mL of medium, initial pH 5, at 28°C, 180 rpm on a rotary shaker, for 120 hours. Samples were collected at determined times for the determination of sugars, ethanol, and toxics concentration, and for biomass.

## 2.5. Analytical methods

Glucose, xylose, arabinose, ethanol, xylitol, and acetic acid concentrations were determined by HPLC (Shimadzu, Japan) equipped with a refractive index detector and Bio-Rad HPX-87H column (300 × 7.8 mm) using 5 mM sulfuric acid as eluent at 45°C, flow rate of 0.6 mL/min and sample volumes of 20 µL. Furfural and HMF were determined by HPLC with a UV detector (at 276 nm) using a Nucleosil C18 column (250 × 4.6 mm) at room temperature, using acetonitrile–water (2:8) containing 10 g L<sup>-1</sup> acetic acid as eluent, flow rate of 1.1 mL min<sup>-1</sup> and sample volumes of 20 µL. Cell growth was analyzed and expressed either as dry weight or as CFU (colony forming units).

## 2.6 Kinetic parameters calculation

The ethanol conversion yield ( $Y_{E/G}$ , g g<sup>-1</sup>) was defined as the ratio of the concentration of ethanol produced and glucose consumed when *S. cerevisiae* was used as the sole microorganism. When cultivation was with *S. arborariae*, the ethanol conversion yield ( $Y_{P/S}$ , g g<sup>-1</sup>) was defined as the ratio of the concentration of ethanol produced and total sugars consumed, while xylitol conversion yield ( $Y_{X/X}$ , g g<sup>-1</sup>) was calculated as the ratio of concentration of xylitol produced and xylose consumed.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Culture kinetics of *S. cerevisiae* and *S. arborariae* on G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> and RHH

The kinetics of *S. cerevisiae* ICV D254 cultivation on G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> and RHH is shown in Figure 1 A and B, while the kinetic parameters in comparison with the other cultivations

are shown in Table 1. *S. cerevisiae* consumed all available glucose, showing good ethanol conversion yields on both media, with  $Y_{E/G}$  values of 0.53, and 0.52 in  $G_{20}X_{20}A_{10}$  and RHH, respectively, showing that *S. cerevisiae* ICV D254 can be cultivated in hydrolysates containing diluted concentrations of toxic compounds. Using similar semi-synthetic medium and culture conditions, ROUHOLLAH et al., (2007) reported the ability of a commercial strain of *S. cerevisiae* used in wine fermentation to produce ethanol with  $Y_{P/S} = 0.32$ . SAHA et al., (2005) reported the cultivation of a recombinant ethanologenic strain of *Escherichia coli* (FBR 5), under micro-aerobiosis on RHH (obtained under the same hydrolysis conditions employed in our paper), obtaining ethanol bioconversions yields of  $Y_{P/S} = 0.43$ . Although the results for *S. cerevisiae* ICV D254 were reasonably good compared to *E. coli*, a major hindrance for using this yeast for lignocellulosic hydrolysate fermentation is its inability to metabolize and ferment pentose sugars such as xylose and arabinose to ethanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007, BERA et al., 2010).

The kinetics of *S. arborariae* NRRL Y-48658 cultivation in  $G_{20}X_{20}A_{10}$  and RHH is shown in Figure 2 A and B, and the kinetic parameters, in comparison with the other cultivations, are shown in Table 1. Unlike *S. cerevisiae*, this yeast was able to use all glucose and most of xylose present in the media, following a diauxic kinetic. The preferential utilization of glucose over xylose is not an uncommon phenomenon, also shown to occur for *Candida utilis*, *C. shehatae*, and *P. stipitis*, due to glucose repression of enzymes involved in the xylose metabolism or by inactivation of high affinity transport systems (PREZIOSI-BELLOU et al., 1997). Arabinose was also used, although less efficiently. Ethanol was produced with yields of  $Y_{P/S} = 0.45$  on  $G_{20}X_{20}A_{10}$  and 0.45 on RHH, respectively, reaching concentrations over  $15 \text{ g L}^{-1}$  in both media. Efficiencies of xylose and arabinose utilization by this yeast were 84 % and 37 % in  $G_{20}X_{20}A_{10}$  and 45 % and 33 % in RHH, respectively.

These results showed that this new yeast compared very well with other yeasts capable of metabolizing both pentoses and hexoses, converting them into ethanol. For instance, HAHN-HÄGERDAL et al., (2006) reported ethanol yields of  $Y_{P/S} = 0.41$  for *Pichia stipitis* cultivated in detoxified wheat straw hydrolysate. HUANG et al., (2009), obtained ethanol yields of  $Y_{P/S} = 0.40$  for non-adapted strains of *P. stipitis* cultivated in neutralized rice straw hydrolysate. Moreover, *S. arborariae* NRRL Y-48658 was also able to produce xylitol in both media with good yields, especially in RHH, with  $Y_{X/X}$  of 0.33. Again, these results are suggesting the good biotechnological potential of this yeast. Growing in brewers spent grain hemicellulosic hydrolysate, the standard xylitol producer, *Candida guilliermondii*, showed yields  $Y_{P/S}$  of 0.37, as reported by MUSSATTO et al., (2005).

### **3.2. Kinetics of co-cultures of *S. cerevisiae* and *S. arborariae***

Although *S. cerevisiae* is efficient in converting hexoses into ethanol, it is unable to metabolize the pentoses present in lignocellulosic hydrolysates. Co-cultures of this yeast with other genera have been proposed as a way to overcome this problem (ROUHOLLAH et al., 2007). The kinetics of co-cultures of *S. cerevisiae* ICV 254D and *S. arborariae* NRRL Y-48658 in  $G_{20}X_{20}A_{10}$  and RHH are shown in Figure 3 A and B. These experiments were aimed at investigating the synergistic effects of these two yeasts on the consumption of substrates and ethanol production. Ethanol yields were consistently higher than for isolate cultures of these yeasts, reaching  $Y_{P/S}$  of 0.77 in  $G_{20}X_{20}A_{10}$ , and  $Y_{P/S}$  of 0.63 in RHH, respectively. ROUHOLLAH et al., (2007) reported ethanol yields of  $Y_{P/S} = 0.41$  and  $Y_{P/S} = 0.36$  for co-cultures of *S. cerevisiae* and *P. stipitis*, and for *S. cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus*, respectively, in semi-synthetic medium containing glucose, xylose, mannose, and galactose, up to a total sugar concentration of  $80 \text{ g L}^{-1}$ . In another

study, TANIGUCHI et al., (1997) reported ethanol yields of  $Y_{P/S} = 0.50$  in semi-synthetic medium containing glucose and xylose in a co-culture of *P. stipitis* and a respiratory-deficient mutant of *S. cerevisiae*.

In these experiments, xylitol was also produced reaching up to  $8.2 \text{ g L}^{-1}$  ( $Y_{X/X} = 0.79$ ) in G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub> and  $7 \text{ g L}^{-1}$  ( $Y_{X/X}$  of 0.45) in RHH. Since xylitol must be attributed to *S. arborariae* metabolism, these results suggest that this yeast is an excellent candidate for further studies on xylitol production from xylose-rich hydrolysates.

### **3.3. Influence of toxic compounds on *S. arborariae* fermentation**

In order to investigate the ability of *S. arborariae* NRRL Y-48658 to grow and produce ethanol in the presence of toxic compounds formed during hydrolysis of RHH, assays were carried out in semi-synthetic medium cultures with HMF, furfural, and acetic acid, either alone or in combination of the three. The results showing the kinetics of biomass formation and consumption of toxic compounds for cultures where the compounds were added isolated are depicted in Figure 4. Table 2 shows the values for substrate consumption, and ethanol and biomass productions. The experiment where the 3 toxics were added is not shown, since this condition totally inhibited cell metabolism. As it can be seen, HMF, furfural, and acetic acid caused growth inhibition, extending the lag phase until they were completely depleted from the medium. Ethanol productivity was also affected when compared to the control. The lag phase is dependent on the ability of cells to metabolize the inhibitors. Except for the highest concentration of furfural ( $3.0 \text{ g L}^{-1}$ ), *S. arborariae* NRRL Y-48658 was capable of metabolizing these compounds. Furans degradation has been described for *S. cerevisiae*, *C. guilliermondii*, and in *P. stipitis* when these yeasts were grown in semi-synthetic media, but the mechanisms were not elucidated (DELGENES *et al.*, 1996).

Studies indicate that exist a clear dose-dependent inhibition of the yeast by furfural and HMF (LIU et al., 2008).

Despite the clear negative effects of HMF, furfural, and acetic acid on *S. arborariae* metabolism, this yeast was able to efficiently consume the medium sugars and produce ethanol, except for the cultivation in presence of 3 g L<sup>-1</sup> of furfural, in which glucose and xylose consumptions were almost completely inhibited. These results suggest that HMF has a lower inhibitory effect on *S. arborariae* than furfural. High concentrations of furfural and HMF have been reported to affect yeasts survival, growth rates, cell budding, ethanol yield, and some enzymes activities (GORSICH et al., 2006). For *S. cerevisiae*, the presence of HMF has been shown to inhibit triose-phosphate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and pyruvate dehydrogenase (PETERSSON et al., 2006). Furfural and HMF can be reduced in NAD(P)H-dependent reactions to less toxic compounds, as furfuralic and 5-hydroxymethyl furfuryl alcohol (LIU et al., 2004; PALMQVIST and HÄHN-HAGERDAL, 2000b ).

Ethanol production was affected by furfural, acetic acid, and HMF even when sugar consumption was higher than 60 % (for both glucose and xylose), showing coefficient yields approximately 60 % lower than that for the control ( $Y_{P/S} = 0.48$ ). High concentrations of furans have shown to interfere with glycolytic enzymes and macromolecule synthesis, while acetic acid can permeate across cellular membranes, causing cytosol acidification, impairing metabolic processes essential for microbial growth, subsequently decreasing ethanol productivity (KEATING et al., 2006).

#### 4. CONCLUSION

Second-generation ethanol from lignocellulosic materials presents two important challenges for bioprocesses. While *S. cerevisiae* remains the most important yeast in the fermentation industry of ethanol, its incapacity to convert pentoses into this alcohol is one of the bottlenecks of ethanol production from lignocellulosic hydrolysates. Co-cultures of *S. cerevisiae* and other yeasts have been attempted to overcome this shortcut, with varying degrees of success. On the other hand, the liberation of toxic compounds during the hydrolysis of these residues negatively affects the fermentation process. Solutions that are sought to solve this problem involve the expensive purification of hydrolysates and the search for new yeast strains capable of either support their presence in the medium or metabolize them. In this work we demonstrated the possibility of using rice hull hydrolysate as a substrate for ethanol and xylitol production by *S. cerevisiae* ICV D254 and *S. arborariae* NRRL Y-48658, a totally new yeast strain. In particular, *S. arborariae* proved to be a efficient converter of hexoses and pentoses to ethanol. Co-cultures of these yeasts proved to be efficient for ethanol production, with yields as high as  $Y_{P/S} = 0.77$  and 0.62 in semi-synthetic medium and RHH, respectively, with lower product yields in RHH being attributed to the presence of toxic compounds. Further studies are granted in order to optimize cultures of *S. arborariae*, either alone or in co-cultures with other ethanologenic microorganisms, specially on lignocellulosic hydrolysates.



## 5. REFERENCES

Bader, J., Mast-Gerlach, E., Popovic, M.K., Bajpai, R., Stahl U., 2009. Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. *J. of Appl. Microbiol.* 109, 371-87.

Bera, K.A., Sedlak, M., Khan, A., Ho, N.W., 2010. Establishment of L-arabinose fermentation in glucose/xylose co-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) by genetic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1803-1811.

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

Delgenes, J., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme Microbial. Technol.* 19, 220–225.

Fromanger, R., Guillouet, S.E., Uribebarrea, J.L., Molina-Jouve, C., Cameleyre, X., 2010. Effect of controlled oxygen limitation on *Candida shehatae* physiology for ethanol production from xylose and glucose. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 437-445.

Fu, N., Peires, P., Markham, J., Bayor, J., 2009. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. *Enzyme Microb. Technol.* 45, 210-217.

Fu, N., Peiris, P., 2008. Co-fermentation of a mixture of glucose and xylose to ethanol. by *Zymomonas mobilis* and *Pachysolen tannophilus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1091-1097.

Gorsich, S.W., Dien, B.S., Nichols, N.N., Slininger, P.J., Liu, Z.L., Skory, C.D., 2006. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71, 339-349.

Gupta, R., Sharma, K., Kuhad, C., 2009. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technol.* 100, 1214-1220.

Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Martins, S., Gorwa-Grauslund, M.F., 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 937-953.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M., Lidén, G., Zacchi, G., 2006. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol.* 24, 549-556.

Huang, C., Lin, T.H., Guo, G.L., Wen-Song, H., 2009. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol.* 100, 3914-3920.

Keating, J.D., Panganiban, C., Mansfield, S.D., 2006. Tolerance and Adaptation of Ethanologenic Yeasts to Lignocellulosic Inhibitory Compounds. *Wiley InterScience.* 93, 1196-1206.

Klinke, H.B., Thomsen, A., Ahring, B., 2004. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66, 10-26.

Liu Z.L., Slininger P.J., Dien B.J., 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for a HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 345–352.

Liu, Z.L., Moon, J., Andersh, B.J., Slininger, P.J., Weber, S., 2008. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification

of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 743–753.

Martin, C., Thomsen, A., 2007. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 1740-181.

Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y.Y., Ladisch, M., 2005. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technol.* 96, 673-686.

Mussatto, S.I., Dragone, G., Roberto, I.C., 2005. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. *Biotechnol. Prog.* 21, 1352-1356.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.* 74, 17-24.

Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000b. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. *Bioresource Technol.* 74, 25 – 33.

Petersson, A., Almeida, J.R.M., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Marie, F., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G., 2006. A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast* 23, 455–464.

Preziosi-Belloy, L., Nollet, V., Navarro, M., 1997. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. *Enzyme Microb. Technol.* 21, 124-129.

Rouhollah, H., Iraj, N., Giti, E., Sorah, A., 2007. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiae*, and an isolated xylose-fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. *Afr. J. Biotechnol.* 6, 1110-1114.

Saha, B., Iten, L., Cotta, M., Wu, V., 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnol. Prog.* 21, 816-822.

Socol, C., Vanderberghel, L., Medeiros, A., Karp, S., Buckeridge, M., Ramos, L.P., Pitarelo, A.P., Ferreira-Leitão, V., Gottschalk, L., Ferrara, M.A., Bon, E., Moraes, L., Araújo, J., Torres, F., 2010. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. *Bioresour. Technol.* 101, 4820-4825.

Taniguchi, M., Tohma, T., Itaya, T., Michihiro, F., 1997. Ethanol Production from a Mixture of Glucose and Xylose by Co-Culture of *Pichia stipitis* and a Respiratory-Deficient Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ferment. Bioeng. 83, 364-370.

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

Van Zyl, W., Lynd, L., den Hann, R., McBride, J., 2007. Consolidated Bioprocessing for Bioethanol Production Using *Saccharomyces cerevisiae*. Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.108, 205–235.

**Table 1:** Kinetic parameters for *S. cerevisiae* ICV 254D, *S. arborariae* NRRL Y-48658, and for the co-culture of both yeasts in semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>) or rice hull hydrolysate (RHH)

Medium	Microorganism	For Ethanol			Y <sub>X/X</sub> (g g <sup>-1</sup> )
		Y <sub>E/G</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Time (h)	
G <sub>20</sub> X <sub>20</sub> A <sub>10</sub>					
	<i>S. cerevisiae</i>	0.53		24	-
	<i>S. arborariae</i>		0.46	72	0.13
	Co-culture		0.77	24	0.79
RHH					
	<i>S. cerevisiae</i>	0.52		36	-
	<i>S. arborariae</i>		0.45	96	0.33
	Co-culture		0.62	84	0.45

Y<sub>E/G</sub>: ethanol coefficient yield (g ethanol per g glucose consumed);

Y<sub>P/S</sub>: ethanol coefficient yield (g ethanol per g total sugar consumed);

Y<sub>X/X</sub>: xylitol coefficient yield (g xylitol per g xylose consumed);

**Table 2:** Comparison of biomass production; consumption of glucose, xylose and arabinose; degradation of acetic acid, furfural and HMF; and yield of ethanol production in different concentration of toxic compounds.

	Consumption (%)						Production		
	Glucose	Xylose	Arabinose	Acetic Acid	Furfural	HMF	Biomass (g L <sup>-1</sup> )	Ethanol Y <sub>P/S</sub> (g g <sup>-1</sup> )	Time (h) for Y <sub>P/S</sub>
CONTROL	100	99	0	-	-	-	6.87	0.48	24
HMF									
2.5 g L <sup>-1</sup>	100	98	0	-	-	100	6.60	0.0	48
5 g L <sup>-1</sup>	100	29	0	-	-	100	5.39	0.18	96
FURFURAL									
2 g L <sup>-1</sup>	100	60	0	-	99	-	5.70	0.16	72
3 g L <sup>-1</sup>	2	4	0	-	65	-	0.02	0.00	72
ACETIC ACID									
1.6 g L <sup>-1</sup>	100	67	0	88	-	-	7.70	0.03	24
3.2 g L <sup>-1</sup>	74	0	0	82	-	-	4.99	0.09	48
SYNERGISM									
LC	7	2	0	3	36	3	0.02	0.00	72
HC	7	0	0	0	34	0	0.03	0.00	48



## Figures Captions:

Fig. 1: Kinetics of substrate consumption, ethanol and biomass production of *S. cerevisiae* strain ICV D254 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); and ethanol (■). Results are the mean of duplicates.

Fig. 2: Kinetics of substrate consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of *S. arborariae* strain NRRL Y-48658 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■); and xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

Fig. 3: Kinetics of substrates consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of co-cultures of *S. cerevisiae* ICV 254D and *S. arborariae* NRRL Y-48658 on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■); and xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

Fig. 4: Effects of toxic compounds over cultures of *S. arborariae* NRRL Y-48658. (A) Concentrations of (in g L<sup>-1</sup>): furfural 2, HMF 2.5, acetic acid 1.6; (B) Concentrations of (in g L<sup>-1</sup>): furfural 3, HMF 5, acetic acid 3.2. Biomass production in condition control (\*); biomass production in culture with of acetic acid (■); biomass production in culture with

of HMF (●); biomass production in culture with of furfural (▲); acetic acid concentration (□); HMF concentration (○); and furfural concentration (△).

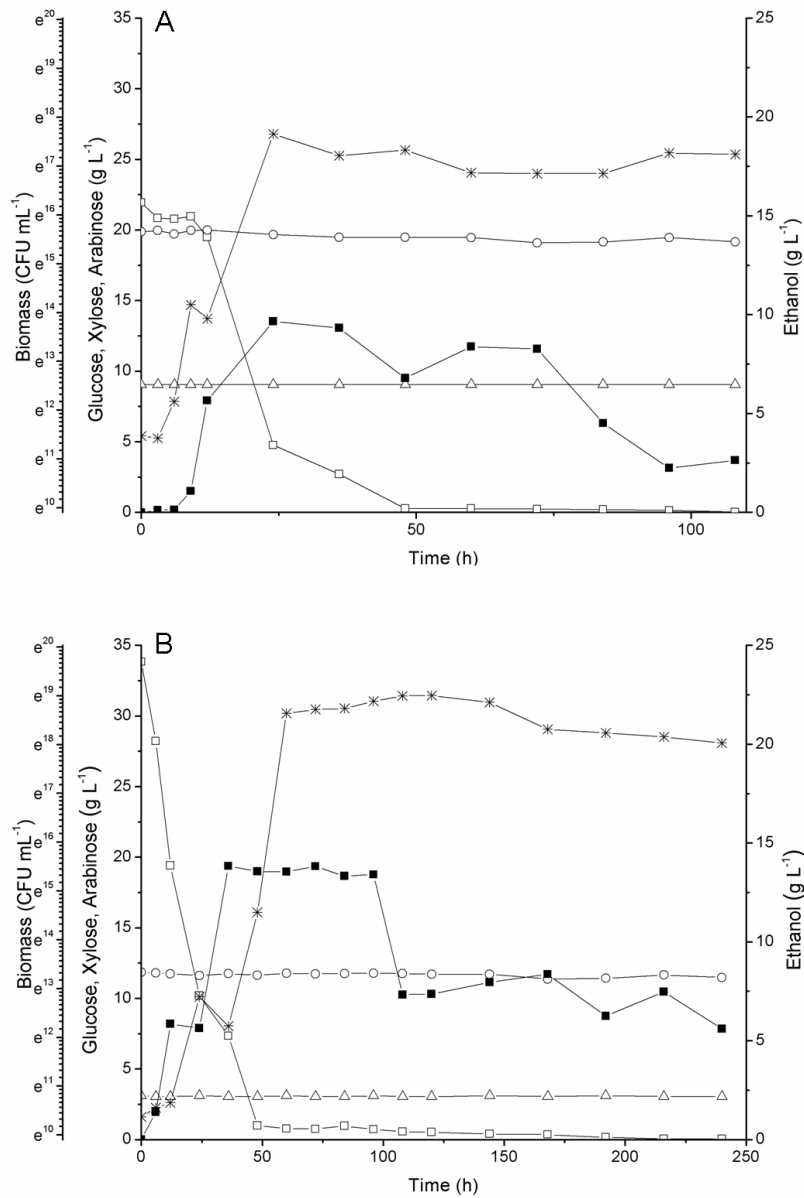


Fig. 1: Kinetics of substrate consumption, ethanol and biomass production of *S. cerevisiae* strain ICV D254 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); and ethanol (■). Results are the mean of duplicates.

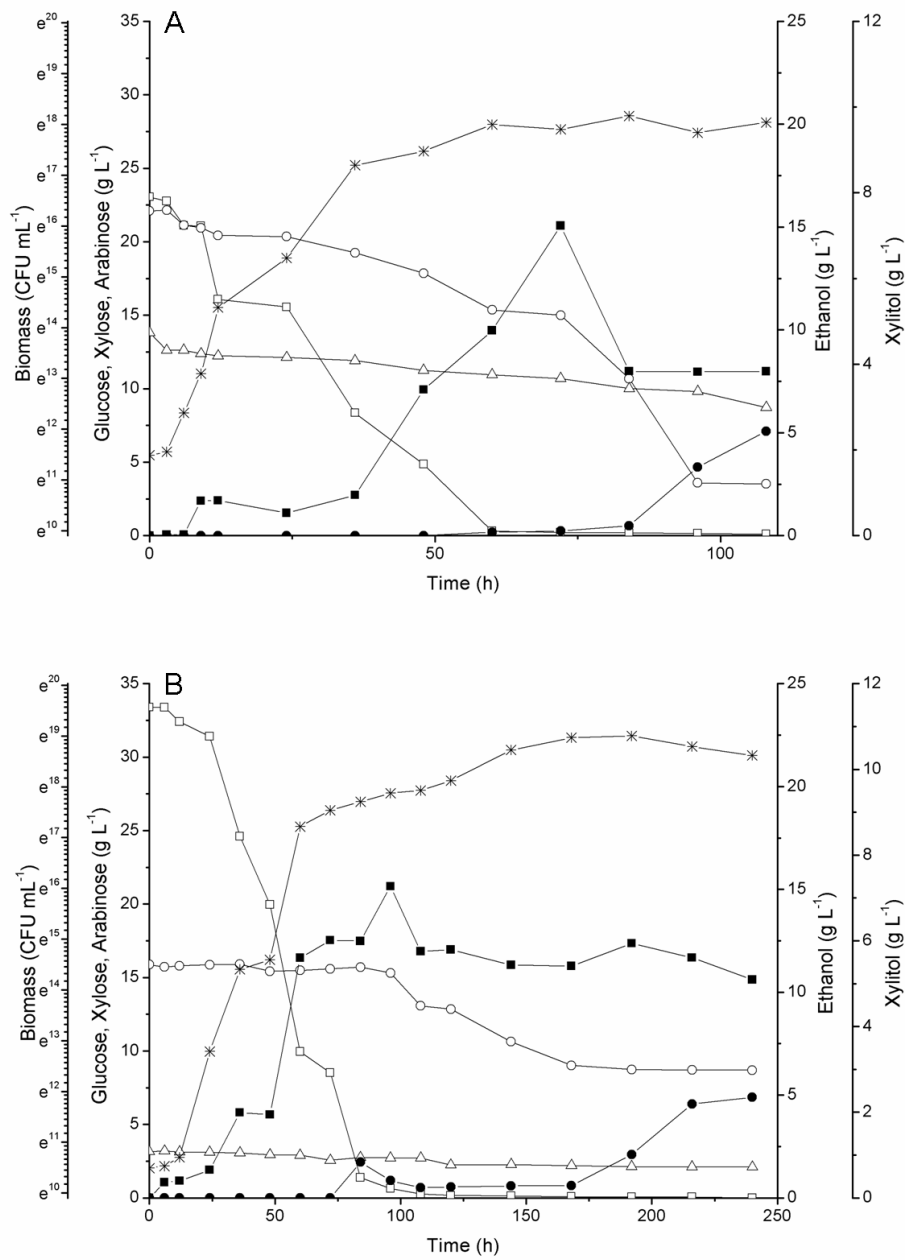


Fig. 2: Kinetics of substrate consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of *S. arborariae* strain NRRL Y-48658 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose (○) arabinose (△); ethanol (■); and xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

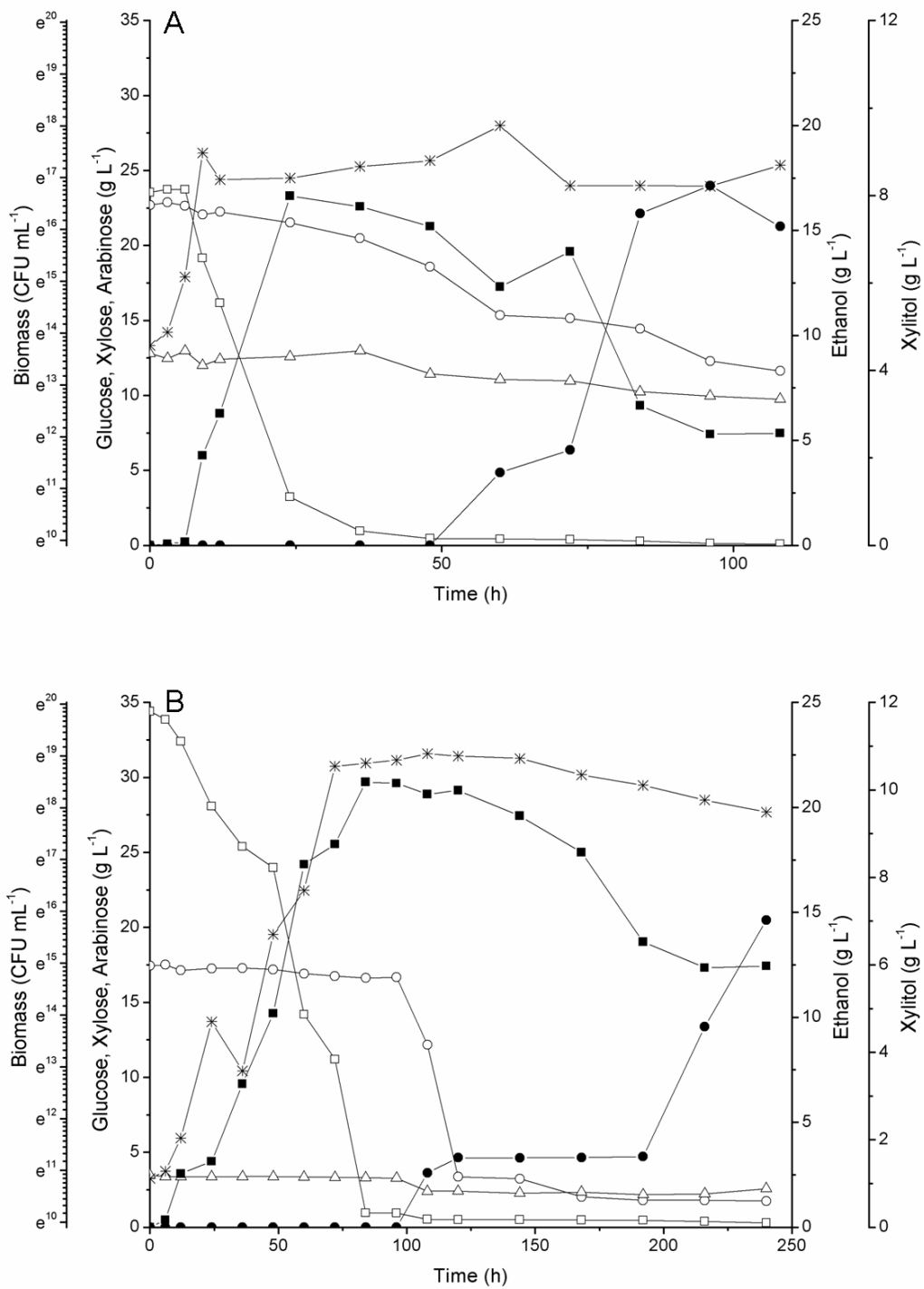


Fig. 3: Kinetics of substrates consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of co-cultures of *S. cerevisiae* ICV 254D and *S. arborariae* NRRL Y-48658 on (A) semi-synthetic medium (G<sub>20</sub>X<sub>20</sub>A<sub>10</sub>), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (\*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■); and xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

