



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

**Avaliação da Capacidade de Bioconversão de
Hexoses e Pentoses em Bioetanol por
Spathaspora arborariae.**

Aluna: Fernanda da Cunha Pereira

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub, PhD

Porto Alegre

2010



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
Programa de Pós Graduação em Engenharia Química

**Avaliação da Capacidade de Bioconversão de Hexoses e
Pentoses em Bioetanol por *Spathaspora arborariae*.**

Fernanda da Cunha Pereira

Engenheira Química - UFRGS

Dissertação de Mestrado apresentada
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.
Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Porto Alegre

2010

AGRADECIMENTOS

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

Ao Departamento de Engenharia Química pela oportunidade de realização do mestrado.

A Escola de Engenharia de Lorena/USP pela disponibilização de infraestrutura para realização de parte do trabalho.

Ao professor e orientador Marco Antônio Záchia Ayub pelos ensinamentos passados, pelo apoio e compreensão nos momentos mais angustiantes e pelos momentos de descontração.

A professora Maria do Carmo Ruaro Peralba, pela disponibilização dos cromatógrafos.

A Priscila Souza-Cruz (Pri), que apesar de não ter sido minha orientadora, agiu como se fosse. Obrigada por ter sido mais que amiga, por ter me aturado em todos os momentos, por ter me acompanhado do início ao fim do mestrado e me ajudado nas horas mais difíceis.

Aos colegas do laboratório pela amizade e companhia. Em especial, a Lilian (Lilica), pois teve de realizar parte deste trabalho na minha companhia, obrigada por me aturar e a Nicole Teixeira Sehnem por ter sempre me escutado e aconselhado. A Ana Cassales, Elis Aquino, Débora Faccin, Ângela Machado, Sabrina Gabardo, Fernanda Rech, e aos outros do BiotecLab, obrigada pelo apoio.

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

A pessoas muito especiais que fazem parte da minha vida, meu irmão, meus primos Juliana e Ricardo, minha sempre amiga Celinha e a todos meus amigos que de uma forma ou outra me apoiaram. Obrigada por me escutarem, mesmo sem entender do que falava. Obrigada pela compreensão, paciência, carinho e afeto que vocês

E finalmente aos meus amados pais, gostaria de dizer que palavras nunca seriam o suficiente para relatar toda minha admiração e amor que sinto por vocês. Obrigada por tudo que fizeram por mim, pela confiança, pela paciência, pelo afeto, pelo apoio e incentivo. Esse também é o resultado do trabalho de vocês e não existiria se não fossem vocês. Amo vocês. Muito obrigada.

RESUMO

Avaliação da Capacidade de Bioconversão de Hexoses e Pentoses em Bioetanol por *Spathaspora arborariae*.

Autor: Fernanda da Cunha Pereira

Orientador: Professor Marco Antônio Záchia Ayub

Cada vez mais a busca por fontes de energia renováveis tem se intensificado. Isto não somente pela preocupação ambiental, mas também devido aos combustíveis fósseis serem limitados. Desta forma, o etanol de segunda geração (bioetanol) tem chamado a atenção por ser uma fonte de energia pouco poluente e que pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais. Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de arroz, são fontes abundantes e de baixo custo para produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado. Esse processo biotecnológico tem o objetivo de promover o aproveitamento completo das frações celulósica (contém hexoses) e hemicelulósica (rica em pentoses) dos resíduos lignocelulósicos, para a obtenção de *commodities*. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de conversão de hexoses e pentoses pela levedura *Spathaspora arborariae*, descrita recentemente como boa conversora de pentoses a etanol. Cultivos sobre meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 28°C, foram realizados em agitador orbital utilizando frascos Erlenmeyers, utilizando leveduras fermentadoras de hexoses e pentoses, como *Saccharomyces cerevisiae*, *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 ($Y_{P/S}$) entre 0,35 e 0,46 g g⁻¹, enquanto que o rendimento dos co-cultivos variou de 0,30 e 0,77 g g⁻¹ de etanol, sobre ambos os substratos. Também foram realizados ensaios em frascos agitados em aerobiose (180 rpm) e anaerobiose (100 rpm) a 28°C utilizando como meio de cultura com diferentes açúcares individualmente (glicose, xilose ou arabinose). O cultivo realizado em anaerobiose, utilizando glicose como substrato foi o que apresentou maior índices de conversão de etanol ($Y_{P/S}$) 0,26 g g⁻¹. Cultivos foram conduzidos em biorreatores submersos utilizando *S. arborariae* sobre meio semissintético, contendo glicose e xilose, em condições anaeróbicas (150 rpm),

aeróbicas (400 rpm e 2 vvm; 150 rpm e 0,5 vvm) e microaerofilia (180 rpm e 0,33 vvm). O maior rendimento de etanol foi obtido no cultivo anaeróbico com $Y_{P/S}=0,52$ g g⁻¹.

ABSTRACT

Study of the Bioconversion of Pentoses and Hexoses into Bioethanol by *Spathaspora arborariae*.

Author: Fernanda da Cunha Pereira

Supervisor: Professor Marco Antônio Záchia Ayub

It is increasing the search for renewable energy sources due to environmental concerns and the possibility of fossil fuels shortage in the near future. Thus, the second generation ethanol (bioethanol) has drawn attention for being a renewable energy source and can be obtained from organic residues. Lignocellulosic agroindustrial residues such as rice hulls are abundant resources and have a low cost for the biotechnological production of compounds of high added value. This biotechnological process aims to promote the full exploitation of the cellulose fractions (containing hexoses) and hemicellulose (rich in pentoses) of lignocellulosic wastes to obtain commodities such as ethanol. This study aimed at studying the capability of the yeast *Spathaspora arborariae*, recently discovered, of converting hexoses and pentoses into ethanol. Cultures on semi synthetic medium and hydrolyzed rice hull at 180 rpm and 28°C, were performed in shaker, using fermenting yeast hexoses and pentoses such as *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* and *Spathaspora arborariae*, either isolated or in co-cultivations. The strains tested alone showed values of ethanol yields ($Y_{P/S}$) between 0.35 and 0.46 g g⁻¹, while the yield of co-cultures varied from 0.30 to 0.77 g g⁻¹ ethanol on both substrates. Experiments were also carried out in shake flasks under aerobic conditions (180 rpm) and anaerobic (100 rpm) at 28°C using culture medium with different sugars individually (glucose, xylose, or arabinose). The yeasts cultivated in anaerobic conditions using glucose as substrate showed the highest ethanol yields ($Y_{P/S}$) 0.26 g g⁻¹. Cultures were conducted in submerged bioreactors using *S. arborariae* on semi-synthetic medium containing glucose and xylose under anaerobic conditions (150 rpm), aerobic (400 rpm and 2 vvm, 150 rpm and 0.5 vvm)

and micro-aerobiosis (180 rpm and 0.33 vvm). The highest ethanol yield was obtained in anaerobic cultivation with $Y_{P/S} = 0.52 \text{ g g}^{-1}$.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Biocombustíveis.....	4
2.2. Resíduos lignocelulósicos agroindustriais	5
2.3. Composição dos materiais lignocelulósicos	7
2.4. Formas de pré-tratamento	8
2.4.1. Formação de compostos tóxicos a partir de hidrólise ácida diluída, efeitos e mecanismos de ação	10
2.5. Bioconversão de pentoses e hexoses a etanol.....	12
2.6. Bioconversão de xilose a xilitol	16
2.7. <i>Spathaspora arborariae</i>	17
3. OBJETIVO.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. Microrganismos, manutenção e inóculo	20
4.2. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de casca de arroz.....	21
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 meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz	21
4.4. Perfil de conversão de glicose, xilose e arabinose, isoladamente, em etanol por <i>Spathaspora arborariae</i>	22
4.5. Estudo da cinética de conversão de glicose e xilose em etanol através de cultivo de submerso de <i>Spathaspora arborariae</i> em biorreatores sob condições anaeróbicas, aeróbicas e microaeróbicas.	23
4.6. Métodos Análíticos	24
4.6.1 Determinação da composição da casca de arroz.....	24
4.6.2 Determinação da concentração celular	25
4.6.3 Determinação da concentração de substrato e produtos.....	26
4.6.4 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	26
4.6.5 Determinação dos parâmetros fermentativos.....	26
4.6.6 Determinação de pH e Pressão Osmótica.....	27
4.6.7 Determinação de proteína	28
4.6.8 Determinação do K_{ia}	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1. Composição química da casca de arroz	30
5.2. 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	32
5.2.1. <i>Cultivo em meio semissintético</i>	33
5.2.1.1 Avaliação da cinética do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol pelos microrganismos cultivados isoladamente em meio semissintético.....	33
5.2.1.2. Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por co-cultura de leveduras em meio semissintético, em agitador orbital	38

5.2.2. Avaliação do crescimento celular, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol, por leveduras sobre hidrolisado de casca de arroz em agitador orbital.....	42
5.2.2.1. Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por cultivo de leveduras isoladas, sobre hidrolisado de casca de arroz....	43
5.2.2.2. Avaliação da biomassa, consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol por co-culturas em meio hidrolisado de casca de arroz	48
5.3. Avaliação da capacidade de conversão de diferentes monossacarídeos em etanol e/ou xilitol por <i>S. arborariae</i> sobre meio semissintético.	52
5.4. Avaliação da influência da aeração na cinética de consumo do substrato e produção de co-produtos por <i>S. arborariae</i> sobre meio semissintético em biorreatores de cultivo submerso.	59
6. CONCLUSÕES	67
7.PERSPECTIVAS.....	68
8. BIBLIOGRAFIA	69
APÊNDICE 1.....	81
APÊNDICE 2.....	82
Primeiro artigo intitulado: “Conversion of toxic rice hull hydrolysates into ethanol by <i>Spathaspora arborariae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , and their co-fermentations” que foi submetido ao periódico <i>Bioresource Technology</i> .”	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos (Adaptado de OCTAVE & THOMAS, 2009)..... 11
- Figura 2: Esquema simplificado do metabolismo de xilose e arabinose em leveduras e fungos em integração com a via glicolítica até a produção de etanol (Adaptado de STAMBUCK *et al.*, 2008). Abreviações: AR, L-arabinose (aldose) redutase; LAD, L-arabinitol 4-desidrogenase; LXR, L-xilulose redutase; XR, D-xilose (aldose) redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XI, D-xilose isomerase; XK, D-xiluloquinase. 14
- Figura 3: Floração células de levedura e asco de *Spathaspora arborariae*. Barra de escala = 5 μ m (CADETE *et al.*, 2009). 18
- Figura 4: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em meio semissintético, a 180 rpm, 28°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L^{-1}) de *P. stipitis* (\blacktriangle), *S. cerevisiae* (\blacksquare), *S. arborariae* (\bullet) e *C. shehatae* (\blacktriangledown). 34
- Figura 5: 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 (\square), xilose (\circ), arabinose (\triangle), xilitol (\bullet) e etanol (\blacksquare). 35
- Figura 6: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em meio semissintético, a 180 rpm, 28°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L^{-1}) de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (\bullet); *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (\blacktriangle); *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (\blacksquare). 39
- Figura 7: 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 (\square), xilose (\circ), arabinose (\triangle), xilitol (\bullet) e etanol (\blacksquare). 40
- Figura 8: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 28°C, por 240 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L^{-1}) de *P. stipitis* (\blacktriangle); *S. cerevisiae* (\blacksquare); *S. arborariae* (\bullet) e *C. shehatae* (\blacktriangledown). 43
- Figura 9: 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 (\square), xilose (\circ), arabinose (\triangle), xilitol (\bullet) e etanol (\blacksquare). 45
- Figura 10: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 28°C, por 240 horas de cultivo.

Concentração celular (g L^{-1}) de <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> (●); <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i> (▲); <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> (■).....	48
Figura 11: Cinética do consumo de glicose (□), xilose (○), arabinose (△) e, produção de xilitol (●) e etanol (■) em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 28°C pelo consórcio das leveduras: (A) <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i> , (Sc-Sa); (B) <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i> (Sc-Cs) e (C) <i>S. cerevisiae</i> e <i>P. stipitis</i> (Sc-Ps)	49
Figura 12: Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28°C).. Biomassa (*), glicose (□) e etanol (■).	53
Figura 13: Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28°C). Biomassa (*), glicose (□) e etanol (■).	53
Figura 14: Cinética de produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28°C). Biomassa (*), xilose (○), etanol (■) e xilitol (●)..	54
Figura 15: Cinética da produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28°C). Biomassa (*), xilose (○), etanol (■) e xilitol (●).....	54
Figura 16: Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose e produção de etanol, por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28°C).. Biomassa (*), arabinose (△) e etanol (■).	55
Figura 17: Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose, e produção de etanol, por <i>S. arborariae</i> em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28°C). Biomassa (*), arabinose (△) e etanol (■).	55
Figura 18: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura <i>S. arborariae</i> em meio semissintético sob aerobiose (400 rpm e 2vvm): (*), biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.....	60
Figura 19: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura <i>S. arborariae</i> em meio semissintético sob microaerofilia 1(200 rpm e 0,5 vvm): (*), biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.	61
Figura 20: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura <i>S. arborariae</i> em meio semissintético sob microaerofilia 2 (180 rpm e 0,33 vvm): (*), biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.	62
Figura 21: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura <i>S. arborariae</i> em meio semissintético sob anaerobiose (150 rpm): (*), biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição química da casca de arroz	30
Tabela 2: Composição química de resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão em etanol.	31
Tabela 3. Composição (g L^{-1}) do hidrolisado de casca de arroz original e concentrado 2,8 vezes.	42
Tabela 4: Parâmetros da cinética de produção de etanol e xilitol em frascos agitados em hidrolisado de casca de arroz, a 180rpm e 28°C, por <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. arborariae</i> , <i>P. stipitis</i> e <i>C. shehatae</i>	45
Tabela 5: Produtividade de etanol de cepas fermentadoras de pentoses.....	47
Tabela 6: 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>	50
Tabela 7: Resultados do cultivo para <i>S. arborariae</i> sob condições aeróbicas e anaeróbicas utilizando hexose e pentoses separadamente.....	58
Tabela 8: Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em reator submerso utilizando meio semissintético	64
Tabela 9: Síntese do consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho.....	66

TABELA DE ABREVIATURAS

η	Eficiência de conversão	LAD,	L-arabinitol 4-desidrogenase
Q_p	Produtividade volumétrica	LXR,	L-xilulose redutase
Y_{P/S}	Coeficiente de produtividade	XR,	D-xilose (aldose) redutase
A_{LIG}	Absorbância de todos os compostos	XDH,	xilitol desidrogenase
G	Glicose	XI,	D-xilose isomerase
X	Xilose	XK,	D-xiluloquinase
A	Arabinose		
DO	Densidade óptica	AR	L-arabinose (aldose) redutase
CLAE	Cromatografia Líquida de alta eficiência	YM	meio extrato levedura e extrato de malte (Yeast Malt)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia	AEM	Meio ágar extrato de malte
rpm	Rotações por minuto	EM	Meio extrato de malte
g	Aceleração da gravidade	HCA	Hidrolisado de casca de arroz
vvm	Volume de ar/ volume de meio/minuto	kLa	Coeficiente de transferência de oxigênio
Hac	Ácido acético	RID	Detector de infravermelho
Fur	Furfural		
HMF	Hidroximetilfurfural		
Sc-Ps	Consórcio <i>P. stipitis</i> e <i>S. cerevisiae</i>		
Sc-Sa	Consórcio <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. arborariae</i>		
Sc-Cs	Consórcio <i>S. cerevisiae</i> e <i>C. shehatae</i>		

1. INTRODUÇÃO

Cerca de 80% do consumo energético mundial provém dos combustíveis fósseis (gás natural, carvão mineral e petróleo). Entretanto, estas fontes de energia não vão durar mais do que algumas décadas, já que suas reservas são finitas. Sendo que, a utilização destes combustíveis é a principal fonte dos gases que estão provocando mudanças climáticas e o aquecimento global. Desta forma, cada vez mais estudos estão sendo realizados a fim de descobrir novas fontes de energia renováveis e menos poluentes. O fornecimento da energia sustentável é fundamental não apenas para o desenvolvimento econômico das nações, mas também para assegurar o bem estar do cidadão. Neste contexto, a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais (RLAs) tem se mostrado uma alternativa bastante promissora, já que aumenta a disponibilidade de recursos energéticos além de diminuir a poluição e o acúmulo de CO₂ no ar.

Estes resíduos possuem baixo valor econômico e a transformação destes resíduos em material energeticamente aproveitável deverá diminuir a competição entre a área plantada destinada para alimentos e a destinada a combustíveis, além de agregar valor a estes materiais.

Uma visão geral das publicações envolvendo RLAs aponta um aproveitamento regional de produtos verificando-se produções científicas empregando subprodutos do processamento do arroz por grupos de pesquisadores da China; do milho, por grupos norte-americanos; e do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil. Entretanto, o Rio Grande do Sul não participa do mercado alcooleiro ativamente, porém este estado é considerado o maior produtor de arroz e o terceiro

de soja do Brasil e, conseqüentemente, produz uma alta quantidade de resíduos provenientes do processamento desses grãos. O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de arroz, com cerca de 7 milhões de toneladas por ano (63%) fato este que reflete nas grandes quantidades de casca e palha geradas desse grão. Tanto a casca quanto a palha do arroz, que são RLAs, têm sido objeto de estudos da conversão de biomassa destes materiais lignocelulósicos a etanol.

Para que os resíduos lignocelulósicos sejam bioconvertidos, se faz necessária a utilização de pré-tratamentos, que liberem os açúcares fermentescíveis existentes na estrutura 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 e outros) constituintes da celulose e hemicelulose.

Através do processo fermentativo dos açúcares oriundos dos materiais lignocelulósicos, tanto etanol quanto xilitol (composto amplamente usado na indústria alimentícia e farmacêutica), podem ser formados. No entanto a fermentação de hidrolisados oriundos de materiais lignocelulósicos a etanol seria mais eficiente e viável economicamente, se apenas um microrganismo tivesse capacidade de converter tanto as hexoses quanto às pentoses (que somam em torno de 60% da composição dos RLAs). Atualmente diversas pesquisas têm direcionado esforços para solucionar este gargalo biotecnológico da produção de etanol de segunda geração. Para isso, o desenvolvimento de cepas geneticamente modificadas de *Saccharomyces cerevisiae* para a fermentação de pentoses, e o emprego de sistemas de co-fermentação (que empregam mais de uma espécie de

microrganismos capazes de converter pentoses ou hexoses) vem sendo amplamente estudados.

A conversão de RLAs 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: seleção de leveduras produtoras de etanol, estudo da conversão do hidrolisado lignocelulósico por co-culturas e avaliação do perfil produtivo da levedura selecionada frente à diferentes condições de cultivo em meio semissintético.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Biocombustíveis*

A população global deverá aumentar em cerca de 3 bilhões de pessoas até 2050. Com este crescimento da população e da indústria, o consumo de combustíveis fósseis também irá crescer drasticamente (SIVAKUMAR *et al.*, 2010). Este aumento do consumo irá trazer um impacto ambiental negativo, já que a queima de combustíveis fósseis gera CO₂. Embora ainda haja alguma controvérsia sobre as mudanças no clima devido ao aumento dos níveis de CO₂ na atmosfera, muitos cientistas acreditam que ele contribui para o efeito estufa e conseqüente, em longo prazo, a temperatura da superfície terrestre deverá aumentar em nível mundial (SEARCHINGER *et al.*, 2008). Assim, um aumento na demanda por etanol, como um substituto para a gasolina, é esperado devido a preocupações relacionadas a estabilidade econômica, impacto ambiental e o aquecimento global (DIEN *et al.*, 1998).

A produção industrial de etanol combustível é predominantemente de culturas agrícolas. Na América do Norte, o bioetanol é produzido a partir de milho, enquanto no Brasil, utiliza-se a cana (WHEALS *et al.*, 1999; BOTHAST e SCHLICHER, 2005). A crescente demanda por etanol pode levar ao aumento de áreas plantadas destas culturas, ao conflito direto com a produção de alimentos, e também repercutir negativamente no manejo da terra devido ao uso crescente de pesticidas e herbicidas (PIMENTEL, 2003; PIMENTEL e PATZEK, 2007). Para atender à crescente demanda de biocombustíveis alternativos, fontes de biomassa, com

exceção dos que são utilizados como alimento ou que exijam grandes mudanças no manejo da terra, precisam ser exploradas. Resíduos de biomassa lignocelulósica (resíduos agroindustriais), de processamento alimentar e florestal representam fontes renováveis de açúcares fermentescíveis, que possam ser matéria-prima para produção de bioetanol por microrganismos.

As principais características de um biocombustível renovável adequado são as seguintes (JOHNSON *et al.*, 2007):

(i) ter o potencial para substituir os combustíveis fósseis, mas não deve afetar o abastecimento global de alimentos,

(ii) deve ter um balanço de energia líquida positiva,

(iii) deve ter um mínimo de impacto ambiental negativo.

Nos últimos anos, o tipo de biomassa mais estudado é a biomassa vegetal, sendo que, para que ocorra a substituição das moléculas fósseis utilizadas hoje seria necessária a conversão de toda a planta em fonte de energia, especialmente as partes não utilizadas para alimentação. A biomassa vegetal é composta por duas classes de carboidratos, a primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose que são amplamente utilizadas 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).

2.2. Resíduos lignocelulósicos agroindustriais

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. Porém, estados como o Rio Grande do Sul, que não participam do mercado alcooleiro, não produzem bagaço de cana com grande expressão, em compensação é um dos maiores produtores de arroz e soja do Brasil e, conseqüentemente, de resíduos provenientes do processamento desses grãos.

O Rio Grande do Sul é o maior produtor brasileiro de arroz, com cerca de 7 milhões de toneladas por ano (63%) fato este que reflete nas grandes quantidades de casca e palha geradas desse grão (CONAB, 2010). Tanto a casca quanto a palha do arroz, que são resíduos lignocelulósicos agroindustriais, têm sido objeto de estudos da conversão de biomassa a etanol. A casca representa 20% do peso seco do arroz, e pode servir como um substrato de baixo custo para a produção de álcool combustível nos EUA e em outros países produtores de arroz como o Brasil (SAHA, 2005). Hoje em dia, mais de 660 milhões de toneladas de arroz são produzidas a cada ano (DOMÍNGUEZ-ESCRIBÁ e PORCAR, 2009). Desta forma, aproximadamente 132 milhões de toneladas de casca são gerados em todo o

mundo, o que torna esse resíduo lignocelulósico um dos mais expressivos em volume e uma alternativa interessante para bioconversão do seu hidrolisado a produtos de alto valor agregado.

2.3. Composição dos materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos compreendem resíduos provenientes de agroindústrias, florestas, tratamento de resíduos sólidos municipais, gramas perenes, entre outros (ADEN *et al.*, 2002). A lignocelulose é o principal componente da biomassa, que compreende cerca de metade da matéria da planta que é produzida por fotossíntese e representa a mais abundante fonte de energia orgânica renovável no solo. A lignocelulose é constituída por três tipos de polímeros: celulose, hemicelulose e lignina que estão fortemente entrelaçados e quimicamente ligados por forças não covalentes e ligações covalentes cruzadas (PÉREZ *et al.*, 2002). 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 polímero linear, que é composto por subunidades de D-glicose, ligadas através de ligações glicosídicas β -1, 4, formando o dímero de celobiose. Estes formam longas cadeias (ou fibrilas elementares), ligadas entre si por pontes de hidrogênio e forças de van der Waals. Celulose geralmente está presente na forma cristalina e uma pequena quantidade não-organizado que se encontra na forma amorfa. A parte amorfa da celulose é mais suscetível à degradação enzimática (PÉREZ *et al.*, 2002). Hemicelulose é um polissacarídeo com menor peso molecular do que a celulose. Esta é formada a partir de D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, 4-O-metil-glucurônico, D-

galacturônico e ácidos D-glucurônico. Os açúcares são unidos por ligações glicosídicas β -1,4 e, por vezes, β -1,3.

A principal diferença entre celulose e hemicelulose é que a hemicelulose tem ramos com pequenas cadeias laterais que são constituídas de diferentes açúcares e a celulose consiste de oligômeros facilmente hidrolisáveis. A lignina está ligada a hemicelulose e celulose, formando um selo físico que é uma barreira impenetrável na parede celular das plantas. Ela está presente na parede celular para dar apoio estrutural, impermeabilidade e resistência contra o ataque microbiano e estresse oxidativo. Constitui um macromolécula amorfa, não solúvel em água e opticamente inativa que é formado a partir de unidades de fenil-propano unidas por ligações não-hidrolisáveis. Este polímero é formado através da geração de radicais livres, que são liberados na desidrogenação mediados pela peroxidase de três diferentes álcoois fenil propanóico: guaiacil, siringil e p -hidroxifenil. (SÁNCHEZ, 2009). A lignocelulose foi sendo selecionada durante a evolução para ser o elemento chave da estrutura da planta e conseqüentemente ser resistente aos estresses bióticos e abióticos. Porém, essa característica acaba sendo um problema na indústria processadora dessa biomassa (OCTAVE e THOMAS, 2009).

2.4. Formas de pré-tratamento

Processos de bioconversão da biomassa lignocelulósica através de fermentação requerem um pré-tratamento, cuja finalidade é disponibilizar os açúcares fermentescíveis. A cristalinidade natural da lignocelulose e a sua resistência à hidrólise são os maiores obstáculos na produção de açúcares

fermentescíveis, de forma economicamente viável (KUMAR *et al.*, 2008). Os materiais lignocelulósicos podem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos provocando efeitos como o aumento na porosidade dos materiais, redução na cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização da hemicelulose e/ou lignina e a modificação da estrutura da lignina, de forma a aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática ou liberar os açúcares fermentescíveis (LEE, 1997; MARGEOT *et al.*, 2009).

Muitas tecnologias têm sido propostas, geralmente combinando processos físicos e químicos. Os tratamentos físicos incluem diversos tipos de moagem, já os tratamentos químicos e físicos incluem explosão a vapor, extração por água quente, explosão de fibra com amônia, hidrólise alcalina, 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; mas que por outro lado visam à minimização da desidratação de açúcares como glicose e xilose e formação de inibidores (furaldeídos), assim como a limitação de consumo de produtos químicos, energia, água e a produção de resíduos (SUN e CHENG, 2002; MARGEOT *et al.*, 2009). Atualmente dentre os diversos processos de hidrólise empregados, a hidrólise ácida configura como o mais antigo e mais bem estabelecido processo, juntamente com a explosão a vapor, que é hoje utilizada em escala piloto (projeto *New Improvements for Ligno-cellulosic Ethanol* – NILE, Agência Eurec) (TORGET *et al.*, 1996).

2.4.1. Formação de compostos tóxicos a partir de hidrólise ácida diluída, efeitos e mecanismos de ação

Um fator importante a ser considerado é que durante a hidrólise ácida diluída, dependendo das condições empregadas, são gerados compostos tóxicos produto de degradação dos açúcares e da lignina, que inibem o metabolismo dos microrganismos que serão empregados na fermentação (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, que podem ser desidratados a ácidos fracos como fórmico e levulínico (Figura 1). O ácido acético também pode ser encontrado nos hidrolisados produto da desacetilação da hemicelulose (ALMEIDA *et al.*, 2007). 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. As concentrações desses inibidores no meio de fermentação merecem atenção, pois podem influenciar negativamente o rendimento fermentativo pela inativação das células de levedura ou pela interferência nas vias metabólicas.

Os compostos tóxicos formados durante o pré-tratamento de hidrólise ácida diluída podem reduzir a formação de biomassa e o rendimento de etanol. Os furaldeídos, ácidos fracos e os compostos fenólicos promovem diversos efeitos sobre o metabolismo celular microbiano tanto individualmente como simultaneamente (efeito sinérgico). Estes efeitos também dependem das concentrações e da cepa de levedura utilizadas (KEATING *et al.*, 2006; BELLISSIMI

et al., 2009). Apesar do efeito tóxico, baixas concentrações de ácido acético, levulínico e fórmico podem aumentar a produção de etanol (ALMEIDA *et al.*, 2007).

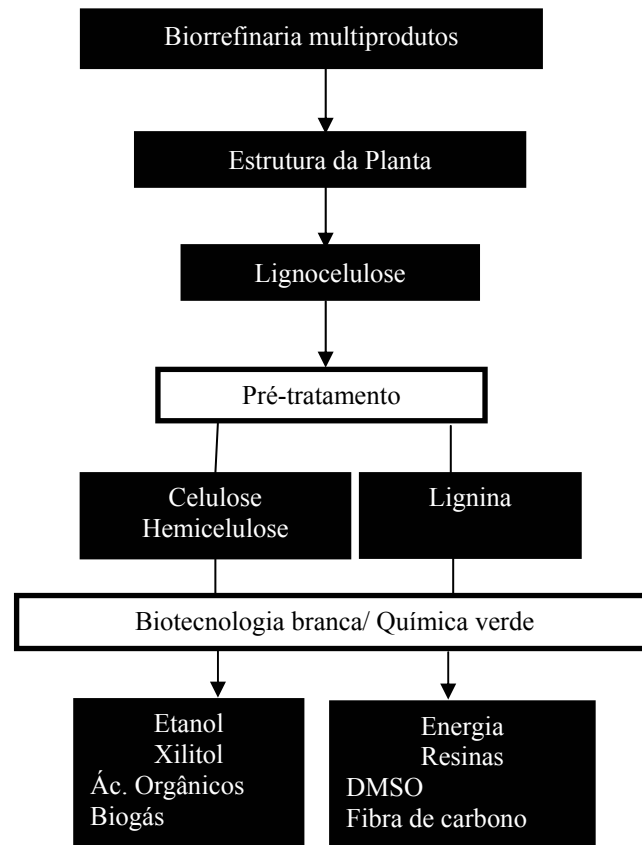


Figura 1:Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos (Adaptado de OCTAVE & THOMAS, 2009).

Dependendo das concentrações de tóxicos, o hidrolisado pode necessitar de algum tipo de tratamento de destoxificação, como por exemplo, o emprego de resinas de troca iônica, carvão ativado, enzimas lignolíticas, pré-fermentação com fungos filamentosos, tratamentos com álcalis ou sulfitos, entre outros (MUSSATO e ROBERTO, 2004).

A presença de inibidores nos hidrolisados e os custos adicionais gerados no processo de destoxificação ou condicionamento de hidrolisados com o objetivo de

umentar as taxas de fermentabilidade são os maiores impedimentos no desenvolvimento de um processo econômico para a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos (PIENKOS e ZHANG, 2009).

2.5. Bioconversão de pentoses e hexoses a etanol

A principal via metabólica envolvida na fermentação a etanol é a glicólise, através da qual uma molécula de glicose é metabolizada, e duas moléculas de piruvato são produzidas; sob condições limitadas de oxigênio, o piruvato é reduzido a etanol com a liberação de CO₂. Teoricamente, o rendimento de etanol e CO₂ é de 0,511 e 0,489, respectivamente, para uma base de massa de glicose metabolizada (BAI *et al.*, 2008).

A conversão das hexoses presentes no caldo de cana-de-açúcar e melaços a etanol no Brasil é um processo bem consolidado industrialmente, que emprega a levedura *S. cerevisiae*, microrganismo que possui aplicação bem sucedida, pois é capaz de fermentar glicose de forma rápida e eficiente (MERICCO *et al.*, 2007). Porém a sua utilização na produção de etanol de segunda geração, sobre hidrolisados que contém pentoses e hexoses não é eficiente, já que essa levedura não consegue converter pentoses a etanol. Atualmente várias pesquisas objetivam o desenvolvimento de cepas modificadas de *S. cerevisiae* que consigam utilizar as pentoses presentes nos hidrolisados, mas estas cepas tem-se apresentado demasiadamente sensíveis aos hidrolisados (HAHN – HAGERDAL *et al.*, 2007).

Zymomonas mobilis, bactéria gram-negativa, é outro exemplo de microrganismo com enorme potencial industrial para conversão a etanol. No entanto,

assim como *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* não é capaz de fermentar pentoses a etanol. Sua gama de substratos é limitada, utilizando apenas três fontes de carbono: frutose, glicose e sacarose (SAHA e WOODWARD, 1997). Sendo assim, diversas pesquisas têm desenvolvido sistemas de co-fermentação, utilizando microrganismos que convertam simultaneamente glicose e xilose a etanol. Estudo feito por FU e colaboradores (2009) utilizando co-cultura de células de *Z. mobilis* imobilizadas e células de *P. stipitis* livres em fermentador modificado, preenchido com uma mistura de xilose e glicose (20 e 30 g L⁻¹, respectivamente), obtiveram produtividade volumétrica de etanol de aproximadamente 1,3 g L⁻¹ h⁻¹ e rendimentos de etanol de 0,49-0,50 g g⁻¹, em 19 horas. Quando utilizado o mesmo co-cultivo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar os resultados para o rendimento de etanol foram de 0,49 g g⁻¹ em 40 horas de cultivo.

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. Se a xilose for convertida a xilulose (Figura 2), um isômero da mesma, muitas leveduras serão capazes de fermentar a xilose diretamente a etanol (JEFFRIES e SHI, 1999).

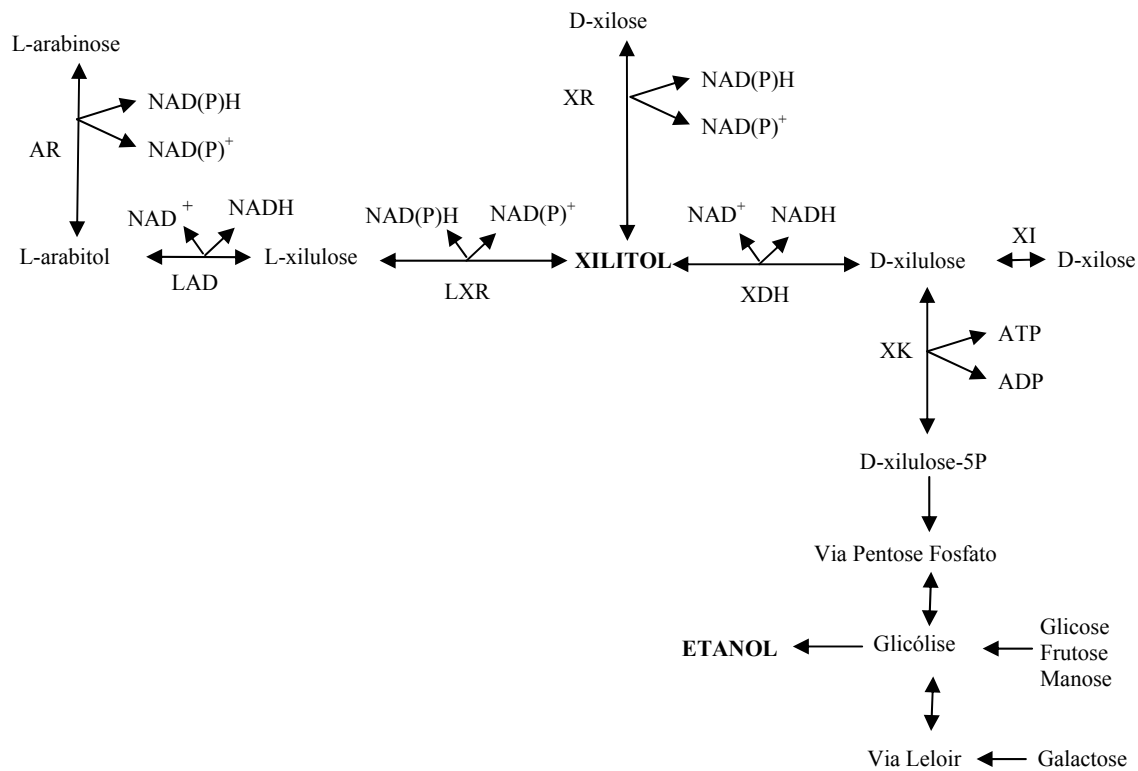


Figura 2: Esquema simplificado do metabolismo de xilose e arabinose em leveduras e fungos em integração com a via glicolítica até a produção de etanol (Adaptado de STAMBUCK *et al.*, 2008). Abreviações: AR, L-arabinose (aldose) redutase; LAD, L-arabinitol 4-desidrogenase; LXR, L-xilulose redutase; XR, D-xilose (aldose) redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XI, D-xilose isomerase; XK, D-xiluloquinase.

As concentrações de etanol são geralmente maiores quando o substrato é a D-xilulose e o acúmulo de xilitol é geralmente menor do que quando o substrato é a própria xilose (SAHA e WOODWARD, 1997). GONG e colaboradores (1983) avaliaram 20 espécies de *Candida* quanto à habilidade de fermentar D-xilose. Todas as espécies cresceram bem no meio. Etanol foi o maior produto formado entre a maioria das espécies testadas e arabitol o segundo produto com maior formação, sendo que, cerca de 10-50% de xilitol foi produzido pelas mesmas. Porém as espécies de leveduras reconhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Candida shehatae*. Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para

aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de 0,3 – 0,44 g g⁻¹ de substrato (STAMBUCK *et al.*, 2008).

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).

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.

2.6. Bioconversão de xilose a xilitol

Uma alternativa de formação de produtos de alto valor agregado através da bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos dentro do conceito de biorrefinaria é a produção de xilitol. Este álcool pentahidroxiado possui grande importância econômica, pois pode ser utilizado como substituto de açúcares convencionais. Isso devido seu elevado poder adoçante, comparável ao da sacarose (PEPPER e OLINGER, 1988), sua propriedade anticariogênica, uma vez que não é fermentado por microrganismos da flora bucal e sua propriedade cariostática, pois reduz cáries já existentes (MAEKINEN, 1979). Esse adoçante é indicado para pacientes com diabetes devido sua lenta absorção e participação das rotas metabólicas independentemente de insulina, podendo, portanto, ser utilizado como substituto de glicose (YLIKAHRI, 1979). Essas características fazem do xilitol um insumo de grande importância nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.

O xilitol é produzido em escala comercial por um processo químico, a hidrogenação catalítica de xilose pura presente em hidrolisados hemicelulósicos. Devido seu alto custo de produção, dificuldades de purificação e o impacto no meio

ambiente, o uso do xilitol como adoçante ainda é muito limitado (HYVÖNEN *et al.*, 1982). Fato que encoraja o desenvolvimento de tecnologias alternativas, como é o caso da produção biotecnológica do mesmo.

Embora os microrganismos assimilem e fermentem mais prontamente glicose do que xilose existem em menor número, bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de assimilar e fermentar xilose a xilitol e outros metabólitos como etanol, dependendo basicamente do microrganismo e das condições de cultivo empregadas (JEFFRIES, 1983). Em geral, dentre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol. Sendo que, as leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras (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.*, 1997).

2.7. *Spathaspora arborariae*

Spathaspora arborariae (Figura 3) foi isolada de madeira apodrecida coletados no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque estadual do Rio Doce localizados em Minas Gerais. Ensaio em frascos agitados (28°C, 160 rpm e pH 5) foram realizados a fim de verificar o crescimento celular e fermentação utilizando xilose e/ou glicose como substrato. A cepa apresentou uma curva de crescimento típica em que o açúcar é eficientemente fermentada e depois que o açúcar é exaurido do meio, etanol produzido passa a ser consumido e utilizado como fonte de carbono. A produtividade de etanol para glicose foi 0,35 g etanol g⁻¹ glicose e quando foi

utilizada glicose e xilose no meio de cultura foi obtido $Y_{P/S}$ de 0,50 g etanol g^{-1} de açúcar (CADETE *et al*, 2009).

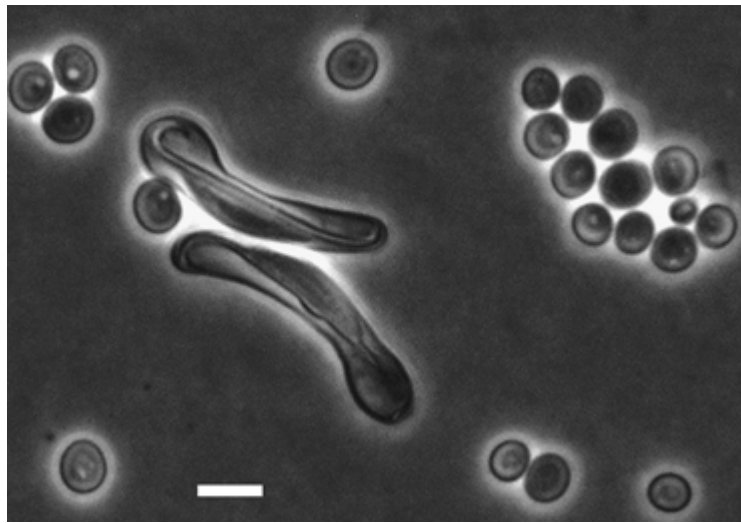


Figura 3: Floração células de levedura e asco de *Spathaspora arborariae*. Barra de escala = 5 μ m (CADETE *et al*, 2009).

3. OBJETIVO

Este trabalho tem por objetivo avaliar a capacidade da conversão de diferentes fontes de carbono (glicose, xilose e arabinose) em etanol e xilitos por leveduras.

Desta forma, este estudo foi dividido em algumas etapas:

- Determinação da composição da casca de arroz e produção do hidrolisado.
- Avaliação da produção dos alcoóis sobre meio semissintético e hidrolisado de casca de arroz por leveduras em agitador orbital.
- Avaliação da capacidade de conversão de diferentes monossacarídeos em alcoóis por *S. arborariae* sobre meio semissintético.
- Avaliação da influência da aeração nos parâmetros fermentativos em cultivos sobre meio semissintético em biorreatores de cultivo submerso por *S. arborariae*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Microrganismos, manutenção e inóculo*

As leveduras utilizadas nos experimentos foram *Saccharomyces cerevisiae* (ICV d953), *Candida shehatae* (HM 52.2), *Spathaspora arborariae* (HM 19.1a) e *Pichia stipitis* (IMH43.2), cepas pertencentes à coleção do BiotecLab. Os estoques de cultura destes microrganismos foram mantidos em placas de Petri e tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar extrato de malte (AEM) composto em g L⁻¹: extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 10 e ágar, 20; e em microtubos contendo 20% de glicerol e 80% de meio de cultura EM composto em g L⁻¹: extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5 e glicose, 10. As culturas crescidas em meio sólido foram mantidas a 4°C e as culturas líquidas contendo glicerol em freezer (-18°C).

Os pré-inóculos foram preparados através do cultivo de cada espécie em meio EM, separadamente, em frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL de meio. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 30°C por 24 horas. Em seguida as células foram recolhidas por centrifugação a 3000 xg por 20 minutos. O *pellet* formado foi lavado com solução salina e ressuspensão diretamente no mesmo meio que será utilizado na fermentação. Os inóculos dos cultivos isolados e dos consórcios foram padronizados para que a concentração celular da suspensão atingisse densidade óptica (DO₆₀₀) igual a 1. O volume de inóculo perfazia 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados nos experimentos.

4.2. Obtenção do hidrolisado hemicelulósico de casca de arroz

A casca de soja foi hidrolisada em autoclave utilizando frascos de vidro Pyrex de 20L. A relação sólido:líquido (casca de arroz moída:ácido sulfúrico 1%) foi de 1:10. A hidrólise foi conduzida a 121°C durante 95 minutos (rampa de aquecimento: 15 minutos, tempo de reação: 60 minutos e rampa de resfriamento: 20 minutos). O hidrolisado resultante foi resfriado em banho-maria e filtrado em sacos de algodão. O sobrenadante foi estocado em refrigerador a 4°C para posterior concentração e tratamento. O hidrolisado foi concentrado 2,8 vezes em concentrador a 70 °C, sob vácuo.

4.3. Avaliação da produção de etanol por leveduras do gênero 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, agitação e aeração) 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-cultivo).

A fim de selecionar o microrganismo e/ou consórcio com maior potencial de produção de etanol a partir da conversão de glicose, xilose e arabinose foram realizados ensaios utilizando meio semi-sintético e hidrolisado de casca de arroz

(HCA, concentrado 2,8 vezes). O meio semissintético ($G_{20}X_{20}A_{10}$) era composto por ($g L^{-1}$): extrato de levedura, 3; peptona, 5; xilose, 20; glicose, 20 e arabinose, 10.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 2L contendo 450 mL de meio semi-sintético $G_{20}X_{20}A_{10}$, em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 28°C por 108 horas. Os mesmos parâmetros de cultivo foram empregados no ensaio utilizando HCA como meio de cultivo, no entanto o período de incubação chegou a 240 horas. Alíquotas de 10 mL de amostra foram coletadas para determinação da concentração celular (peso seco e UFC – unidades formadoras de colônia) e quantificação de glicose, xilose, arabinose, xilitol e etanol, através de análise cromatográfica em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Todos os experimentos foram conduzidos em duplicata.

4.4. Perfil de conversão de glicose, xilose e arabinose, isoladamente, em etanol por Spathaspora arborariae.

Cultivos anaeróbicos e microaeróbicos de *Spathaspora arborariae* foram conduzidos em meios de cultura contendo glicose ou xilose ou arabinose, com o objetivo de avaliar a capacidade desta levedura em converter cada um destes açúcares em etanol. Estes experimentos foram realizados em Frascos Duran (500 mL) contendo 100 mL dos meios semissintéticos G_{30} ou X_{30} ou A_{30} , em agitador orbital (Marconi, MA 830), sob microaerofilia (180 rpm) e anaerobiose (100 rpm), 28 °C por 55 horas. As composições dos meios utilizados foram em ($g L^{-1}$): G_{30} - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e glicose, 30; X_{30} - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e xilose, 30; e A_{30} - extrato de levedura, 3; peptona, 5 e arabinose, 30. Amostras de 10 mL foram retiradas em 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 55 horas para

determinação da concentração celular (peso seco) e quantificação de glicose, xilose, arabinose, etanol e xilitol, através de CLAE. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

4.5. *Estudo da cinética de conversão de glicose e xilose em etanol através de cultivo de submerso de Spathaspora arborariae em biorreatores sob condições anaeróbicas, aeróbicas e microaeróbicas.*

Os ensaios foram conduzidos em biorreatores de cultivo submerso com capacidade total para 2L (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha), contendo 1,5 L de meio semissintético sob condições anaeróbicas (150 rpm), aeróbicas (400 rpm e 2 vvm) e microaerófilas (200 rpm e 0,5 vvm ; 180 rpm e 0,33 vvm) a temperatura de 28°C e pH 5. Os biorreatores foram equipados com eletrodo de oxigênio dissolvido, eletrodo de pH, termopar e agitador (turbina do tipo Rushton). O meio de cultivo era composto em (g L⁻¹) por: extrato de levedura, 3; peptona, 5, xilose, 30; glicose, 30 e 0,2% (v/v) de tween 80. O tempo de cultivo foi de 120 horas e amostras de 10 mL foram retiradas em 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicata. Foram determinadas as concentrações de glicose, xilose, etanol e xilitol através de análise cromatográfica em CLAE e a concentração celular através de UFC e biomassa seca. As análises cromatográficas foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.6. Métodos Analíticos

4.6.1 Determinação da composição da casca de arroz

A casca de arroz utilizada nos experimentos foi cedida pela Nelson Wendt & Cia Ltda, localizada no município 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.

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. Aproximadamente 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, 1g 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; 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. A análise de minerais foi feita utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP –AES). Foram determinados o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, zinco, ferro, manganês, sódio, cromo, alumínio e bário.

4.6.2 Determinação da concentração celular

As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro) no comprimento de onda de 600 nm, por gravimetria através da determinação de biomassa seca, utilizando estufa (Fanem 315 SE) a 75 °C até obtenção de peso constante.

4.6.3 Determinação da concentração de substrato e produtos

Os teores de glicose, xilose, arabinose, etanol e xilitol foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência CLAE, em equipamento Shimadzu, com auxílio de detector de índice de refração (RID), empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45°C, utilizando como fase móvel H₂SO₄ (5mM) a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. As amostras foram filtradas em filtro “Sep-Pack” C18 (Millipore) ou em membrana de acetato de celulose (0,2 µm). A concentração das substâncias foi determinada através de curvas padrão de calibração preparadas com padrões de grau analítico, previamente seco sob sílica e vácuo.

4.6.4 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⁻¹. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ME25 com 0,45 µm e D13 mm. A concentração das substâncias foi determinada através de curvas padrão de calibração preparadas com padrões de grau analítico, previamente seco sob sílica e vácuo.

4.6.5 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para avaliar a cinética dos cultivos alguns parâmetros foram adotados.

$$Y_{P/S} = \frac{(P - P_0)}{(S_0 - S)} \quad (1)$$

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{0,51} \quad (2)$$

$$Q_p = \frac{(P - P_0)}{\text{tempo}} \quad (3)$$

Onde:

$Y_{P/S}$: coeficiente de produtividade de etanol (g etanol por g açúcar total consumido)

P : quantidade de produto final (g L⁻¹)

P_0 : quantidade de produto inicial (g L⁻¹)

S : quantidade de substrato final (g L⁻¹)

S_0 : quantidade de substrato inicial (g L⁻¹)

η : eficiência teórica de conversão (%)

Q : coeficiente de produtividade volumétrica (g h⁻¹ L⁻¹)

Tempo : tempo na máxima conversão (h)

4.6.6 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).

4.6.7 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 sulfo-cúprica. 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 Taschiro. 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 4 foi utilizada para calcular a percentagem de proteína da amostra. O resultado é a média de 3 experimentos.

$$\% \text{proteína} = \frac{KxVxFator}{P} \quad (4)$$

Em que: K = FC x 0,0014 x 100

P = peso da amostra

FC = fator de correção da solução de ácido sulfúrico a 0,1 N
(0,20868)

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

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

4.6.8 Determinação do K_La

Neste trabalho a determinação experimental do K_La foi realizada através do método dinâmico, em que a concentração de oxigênio dissolvido é monitorada durante o crescimento celular. Este monitoramento foi possível com a utilização de um eletrodo Polarográfico. A equação para utilizada para o cálculo do K_La esta demonstrada abaixo.

$$K_La = \frac{\ln\left(\frac{C_i - C_0}{C_i - C}\right)}{t - t_0} \quad (5)$$

Em que:

C_i : concentração de oxigênio em condições de saturação;

C : concentração de oxigênio no meio de cultura;

C_0 : concentração de oxigênio o tempo $t = 0$;

t_0 : tempo inicial

t : tempo final

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Composição química da casca de arroz

A Tabela 1 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 1: Composição química da casca de arroz

Componentes	Concentração (%)
Celobiose	0,40
Glicose	34,1
Xilose	12,7
Arabinose	1,25
Ácido acético	1,27
HMF	0,32
Furfural	0,89
Lignina insolúvel	22,94
Lignina solúvel	6,13
Extrativos	3,06
Cinzas	16,91
Insolúveis	9,7
Proteína	2,03

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 2.

Tabela 2: Composição química de resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão em etanol.

Resíduo Lignocelulósico	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina Total (%)	Referência Bibliográfica
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 2, 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 na diferenças das 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).

5.2. 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).

5.2.1. 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 para produzir xilitol e/ou etanol já descrito na literatura, ensaios utilizando meio semissintético G₂₀X₂₀A₁₀, 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⁻¹), foram realizados em agitador orbital, a 180 rpm e 28°C.

5.2.1.1 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⁻¹ e 4 g L⁻¹ respectivamente, *S. cerevisiae* obteve um máximo de crescimento após 96

horas de cultivo $3,8 \text{ g L}^{-1}$ e *S. arborariae* em 84 horas de crescimento ($4,7 \text{ g L}^{-1}$) (Figura 4).

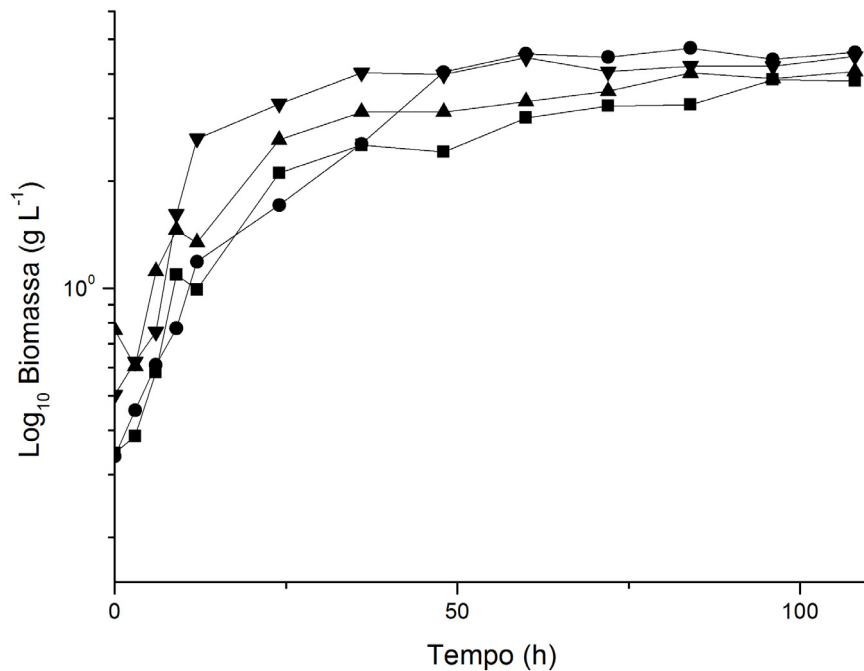


Figura 4: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em meio semissintético, a 180 rpm, 28°C , por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L^{-1}) de *P. stipitis* (▲), *S. cerevisiae* (■), *S. arborariae* (●) e *C. shehatae* (▼).

A cinética de consumo dos açúcares e 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 5.

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 (MERICO *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.

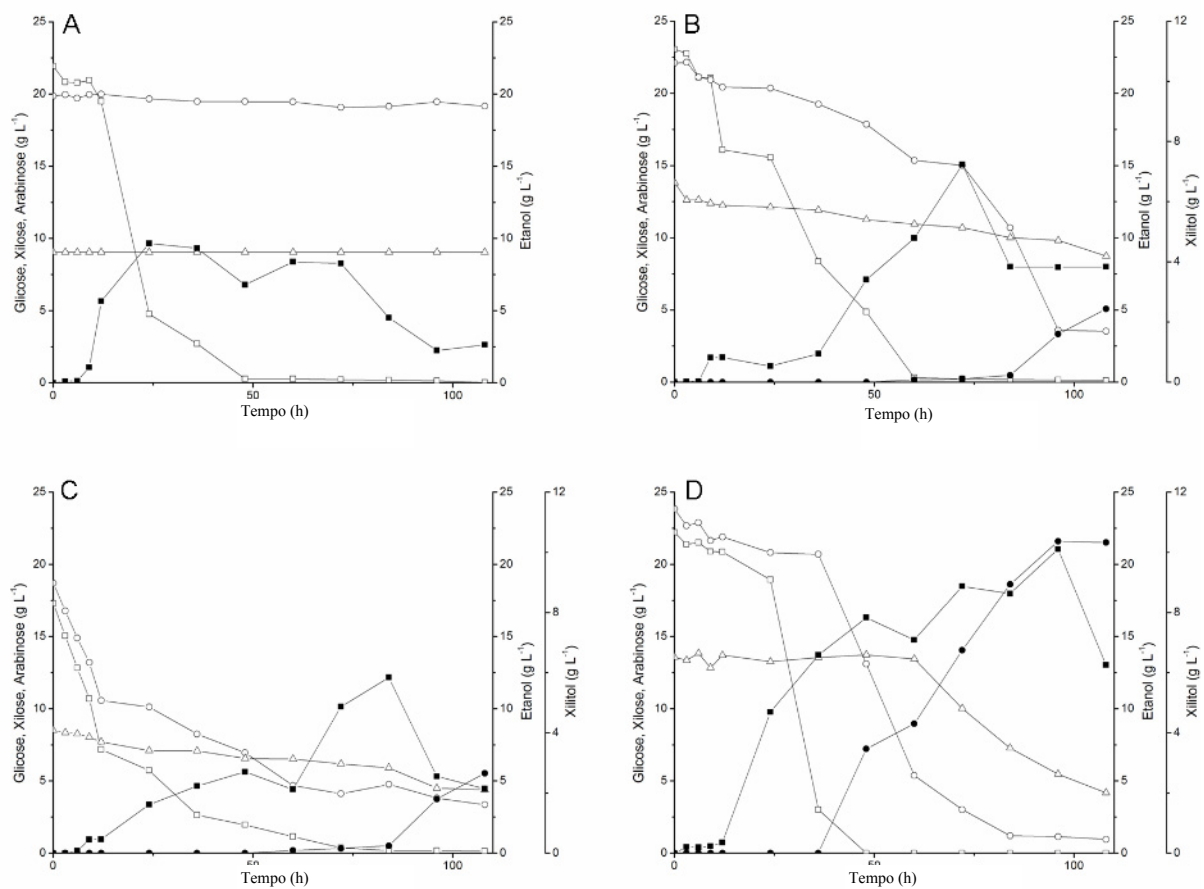


Figura 5: Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae*, (B) *S. arborariae*, (C) *P. stipitis* e (D) *C. shehatae* sobre meio semissintético. glicose (□), xilose (○), arabinose (△), xilitol (●) e etanol (■).

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 $0,45 \text{ g h}^{-1}$, enquanto que a de xilose foi $0,08 \text{ g h}^{-1}$, 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 rpm) onde *S. cerevisiae* e *P. stipitis* apresentaram a mesma produtividade de etanol (0,4 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 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⁻¹ 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⁻¹ de açúcar (Y_{P/S}).

A maior produtividade de xilitol foi obtida no cultivo que empregou *C. shehatae*, Y_{P/S} = 0,45 g de xilitol g⁻¹ de xilose, seguida por *P. stipitis* e *S. arborariae* (Y_{P/S} = 0,17 e 0,13 g de xilitol g⁻¹ 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⁻¹ 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.

5.2.1.2. 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 6) foi avaliado com base no peso seco.

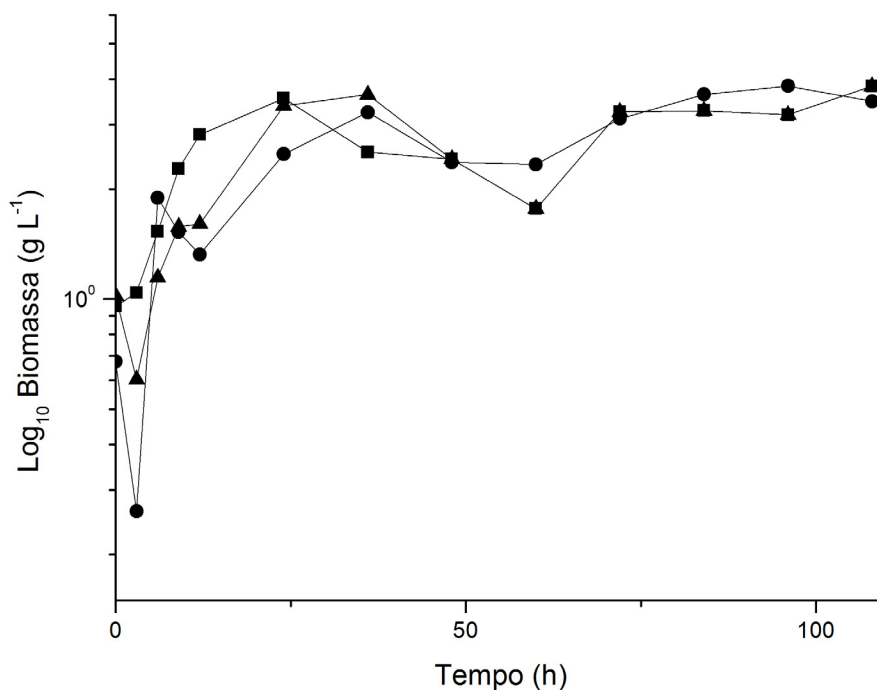


Figura 6: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em meio semissintético, a 180 rpm, 28°C, por 120 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L⁻¹) de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (●); *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (▲); *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (■).

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⁻¹ 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⁻¹).

Na Figura 7 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.

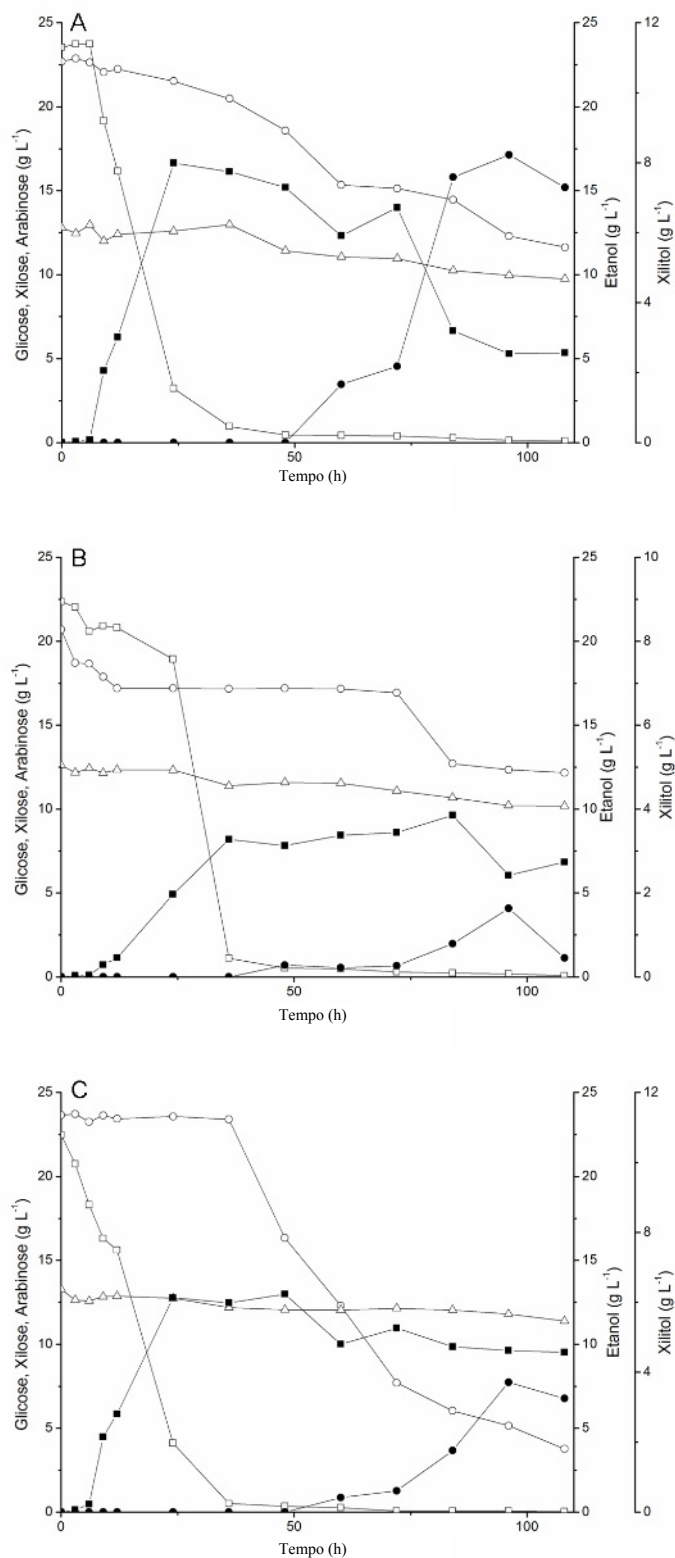


Figura 7: Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol, em consórcio, pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (Sc-Sa); (B)

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⁻¹ de açúcar, enquanto que os outros consórcios mantiveram valores muito próximos aos mostrados em cultivo isoladamente (*P. stipitis* e *C. shehatae*, $Y_{P/S}$ de 0,30 e 0,42 g g⁻¹). Se o rendimento máximo de etanol ($Y_{P/S}$) for calculado considerando apenas a glicose como fonte potencial para a produção de bioetanol, o valor encontrado para *S. arborariae* ($Y_{P/S} = 0,77$) 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⁻¹) e xilose (40 g L⁻¹),

FU e PERIS (2008) obtiveram 26 g L⁻¹ 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* ($Y_{P/S}$ 0,79 g g⁻¹) do que o mostrado em cultivo isoladamente ($Y_{P/S}$ 0,13 g g⁻¹). 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.

5.2.2. 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 3.

Tabela 3. Composição (g L⁻¹) do hidrolisado de casca de arroz original e concentrado 2,8 vezes.

Hidrolisado	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. Acético
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.

5.2.2.1. 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 28°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 em base 10 (Figura 8).

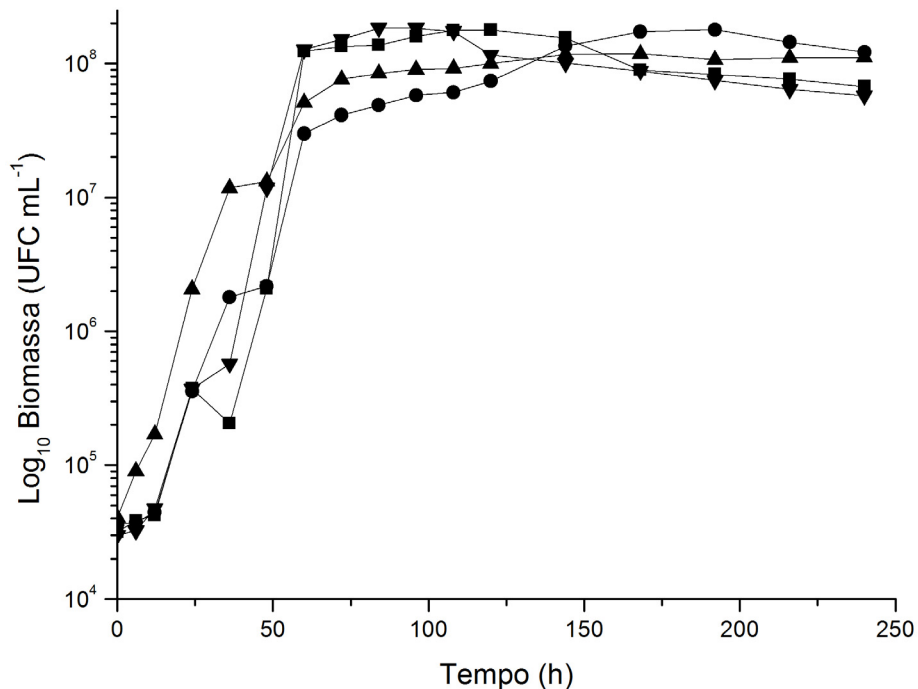


Figura 8: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras isoladas em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 28°C, por 240 horas de cultivo (agitador orbital). Concentração celular (g L⁻¹) de *P. stipitis* (▲); *S. cerevisiae* (■); *S. arborariae* (●) e *C. shehatae* (▼).

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 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 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 9.

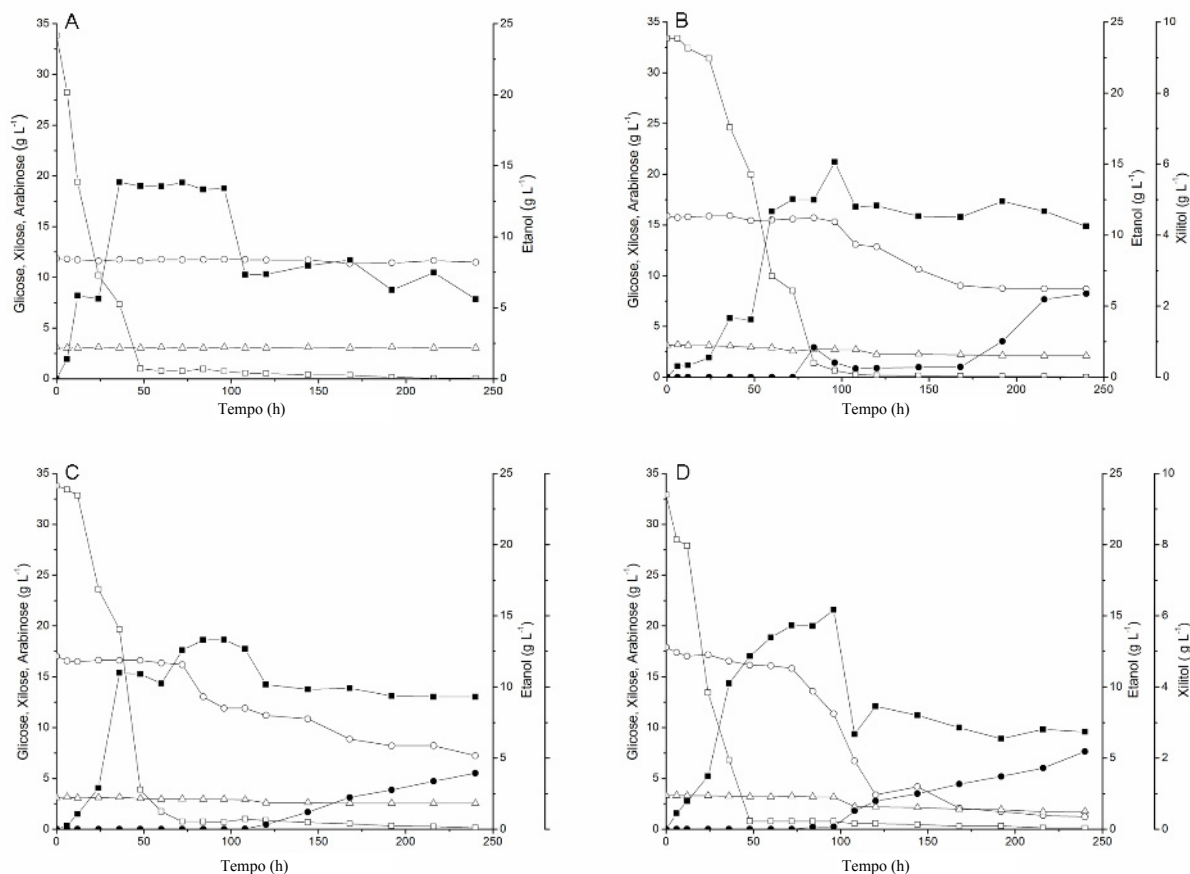


Figura 9: Cinética de consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol pelas leveduras: (A) *S. cerevisiae*, (B) *S. arborariae*, (C) *P. stipitis* e (D) *C. shehatae* sobre meio semissintético. glicose (□), xilose (○), arabinose (△), xilitol (●) e etanol (■).

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 4.

Tabela 4: Parâmetros da cinética de produção de etanol e xilitol em frascos agitados em hidrolisado de casca de arroz, a 180rpm e 28°C, por *S. cerevisiae*, *S. arborariae*, *P. stipitis* e *C. shehatae*.

	$Y_{P/S} ET (g g^{-1})$	$\eta_{ET} (\%)$	$Q (g L^{-1}h^{-1})$	$Y_{P/S} XIL (g g^{-1})$
<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⁻¹), seguida por *S. arborariae* ($Y_{P/S}$ 0,45 g g⁻¹), *C. shehatae* ($Y_{P/S}$ 0,40 g g⁻¹) e *P. stipitis* ($Y_{P/S}$ 0,35 g g⁻¹), 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⁻¹h⁻¹, maior que o encontrado neste trabalho (0,16 g L⁻¹h⁻¹), 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 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 $Y_{P/S} = 0,37$ g g⁻¹, para *P. stipitis*, semelhante ao encontrado neste trabalho ($Y_{P/S}$ 0,35 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 5). Nas horas finais do

cultivo, foi observado que as leveduras utilizadas neste estudo metabolizaram etanol.

Tabela 5: Produtividade de etanol de cepas fermentadoras de pentoses.

Cepa	Resíduo Lignocelulósico	$Y_{P/S}$ (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 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).

5.2.2.2. 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 10.

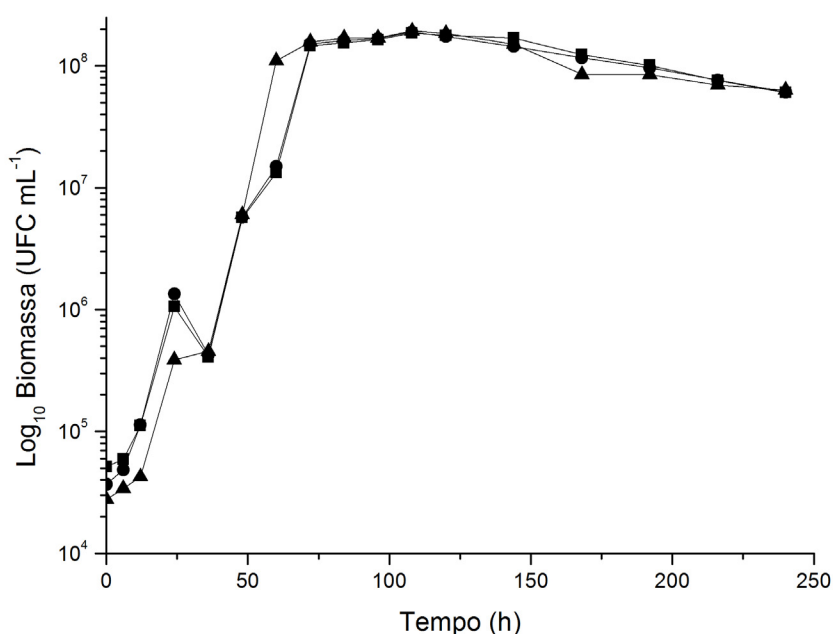


Figura 10: Cinética de crescimento de cultivos das leveduras em consórcio em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm, 28°C, por 240 horas de cultivo. Concentração celular (g L⁻¹) de *S. cerevisiae* e *P. stipitis* (●); *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (▲); *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (■).

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 11).

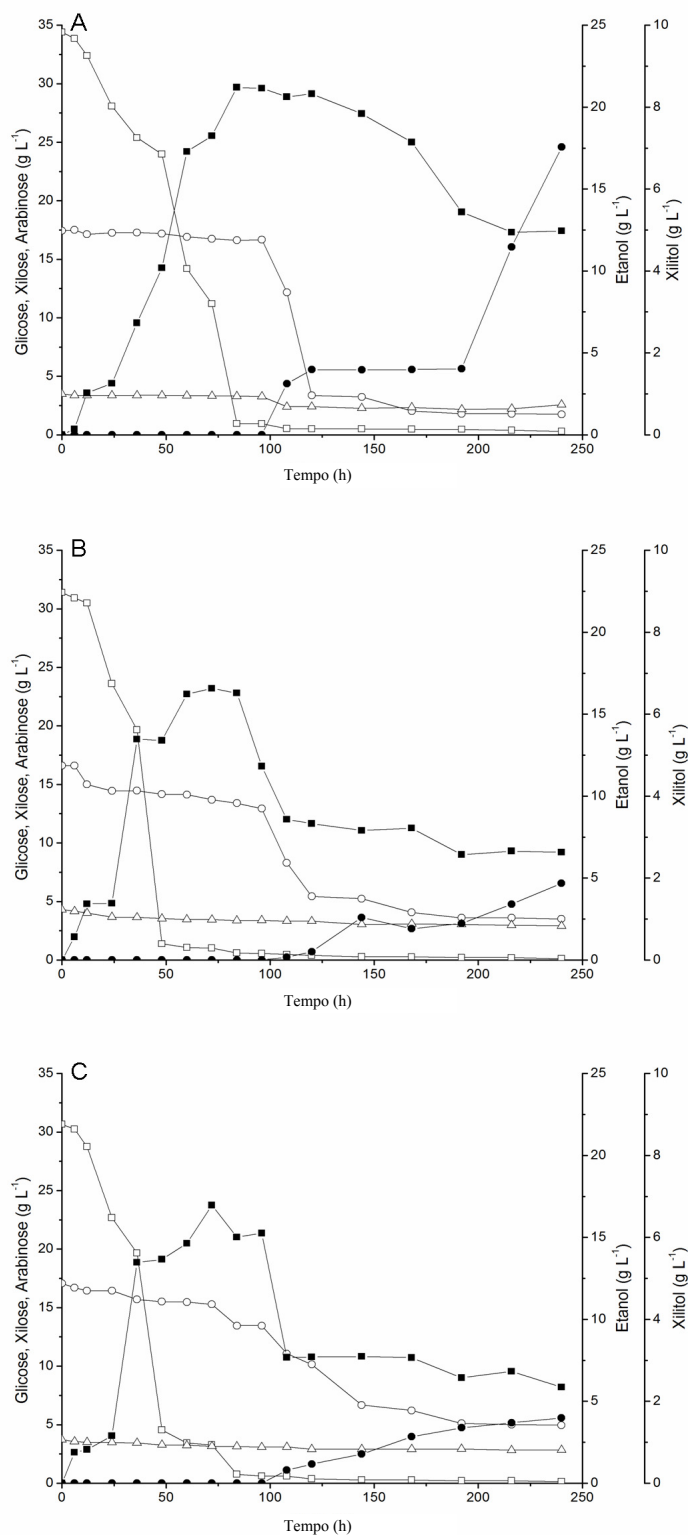


Figura 11: Cinética do consumo de glicose (□), xilose (○), arabinose (△) e, produção de xilitol (●) e etanol (■) em hidrolisado de casca de arroz, a 180 rpm e 28°C pelo consórcio das leveduras: (A) *S. cerevisiae* e *S. arborariae* (Sc-Sa); (B) *S. cerevisiae* e *C. shehatae* (Sc-Cs) e (C) *S. cerevisiae* 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 6: 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 ⁻¹)	η ET (%)	$Q(g.L^{-1}.h^{-1})$	$Y_{P/S}$ XIL (g g ⁻¹)
Sc-Sa	0,62	120,79	0,25	0,45
Sc-Ps	0,49	95,15	0,23	0,14
Sc-Cs	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⁻¹ como pode ser observado na Tabela 6. 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⁻¹ e 0,15 g g⁻¹, 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⁻¹ e 0,24 g L⁻¹h⁻¹, 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⁻¹ de etanol. A produtividade encontrada pelos 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 $0,45 \text{ g g}^{-1}$, seguida pelos consórcios *Sc-Cs* e *Sc-Ps*, com $0,14$ e $0,13 \text{ g g}^{-1}$. 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 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 agitador horizontal (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.

5.3. Avaliação da capacidade de conversão de diferentes monossacarídeos em etanol e/ou xilitol por *S. arborariae* sobre meio semissintético.

S. arborariae é uma levedura recentemente isolada cujo perfil fisiológico ainda não está totalmente estudado, sendo assim foram realizados experimentos avaliando a cinética de consumo de diferentes açúcares isoladamente (glicose, xilose e arabinose) e produção de etanol e xilitol. A cinética de consumo de substrato e produção de co-produtos foi avaliada em condições aeróbicas (180 rpm e 28°C) e anaeróbicas (100 rpm e 28°C).

A cinética de produção de biomassa, consumo de consumo do substrato e produção de co-produtos por *S. arborariae* em anaerobiose e aerobiose estão apresentadas nas Figuras 12, 13, 14, 15, 16 e 17, respectivamente.

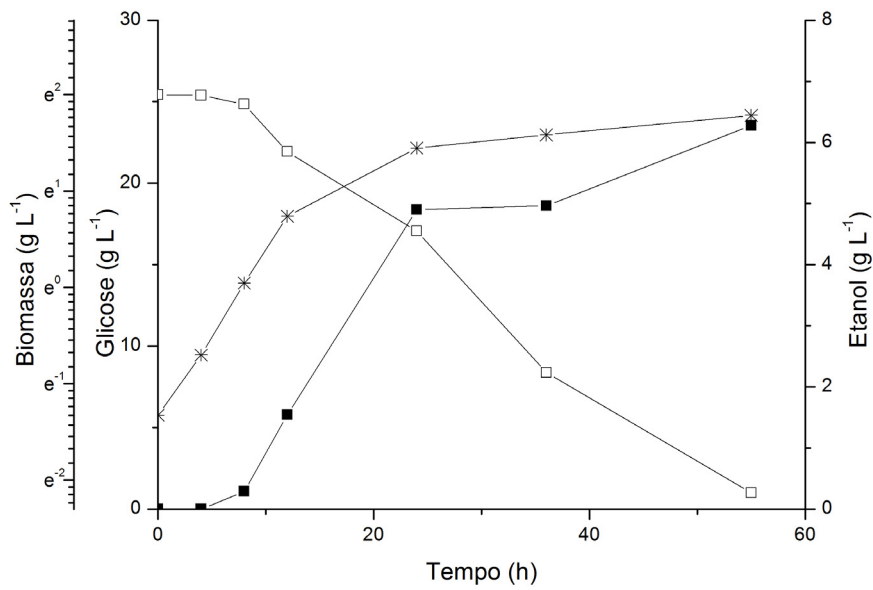


Figura 12: Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28^oC).. Biomassa (*), glicose (□) e etanol (■).

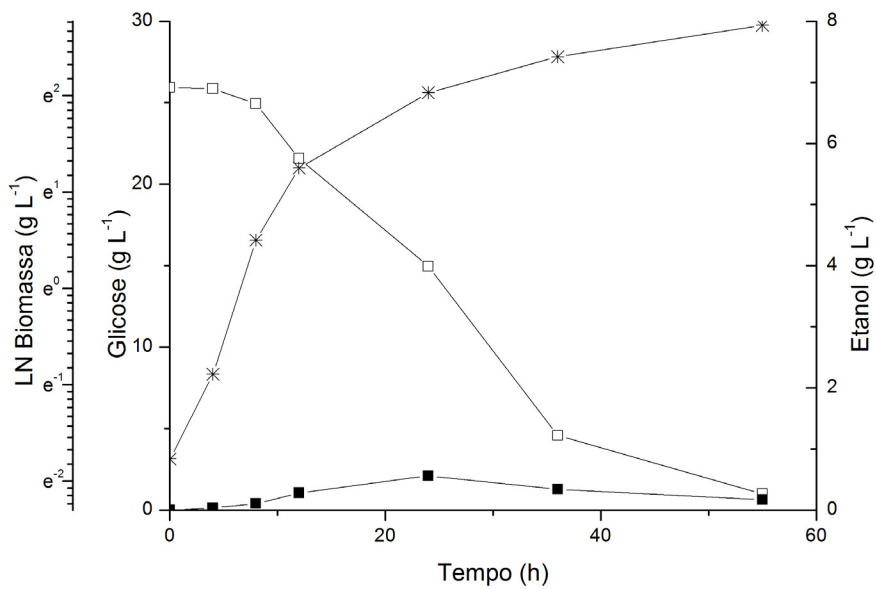


Figura 13: Cinética da produção de biomassa, consumo de glicose e produção de etanol, por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28^oC). Biomassa (*), glicose (□) e etanol (■).

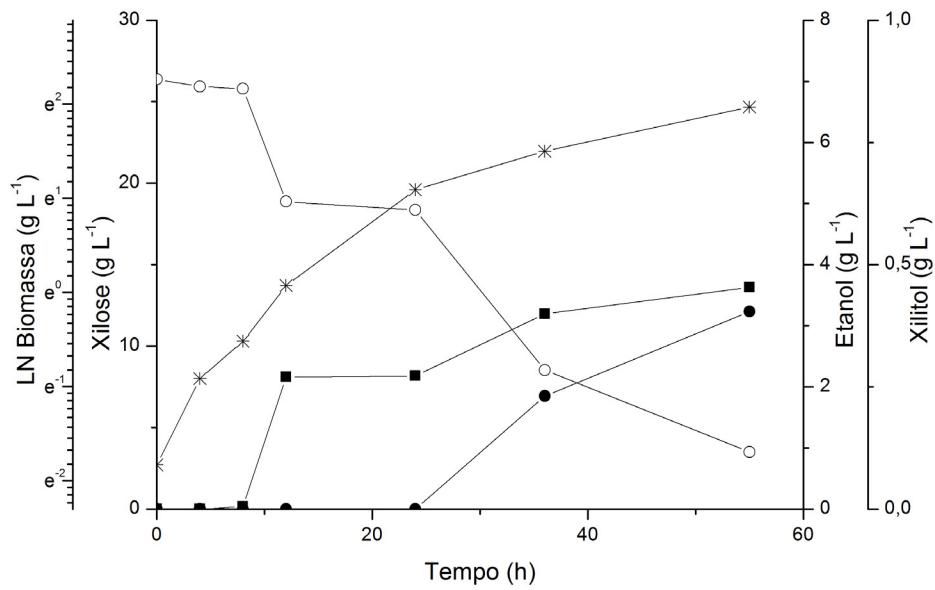


Figura 14: Cinética de produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28^oC). Biomassa (*), xilose (O), etanol (■) e xilitol (●).

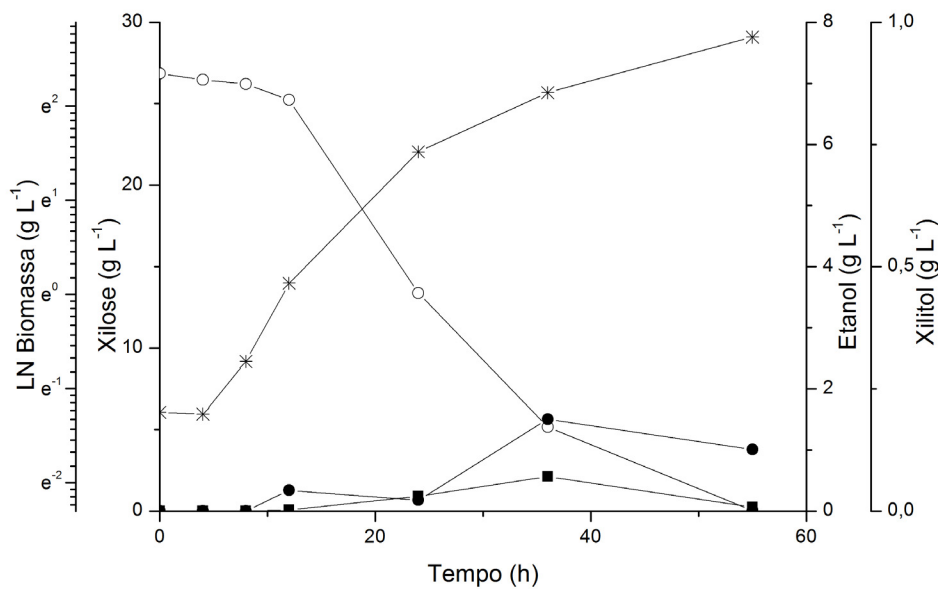


Figura 15: Cinética da produção de biomassa, consumo de xilose e produção de etanol e xilitol, por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28^oC). Biomassa (*), xilose (O), etanol (■) e xilitol (●).

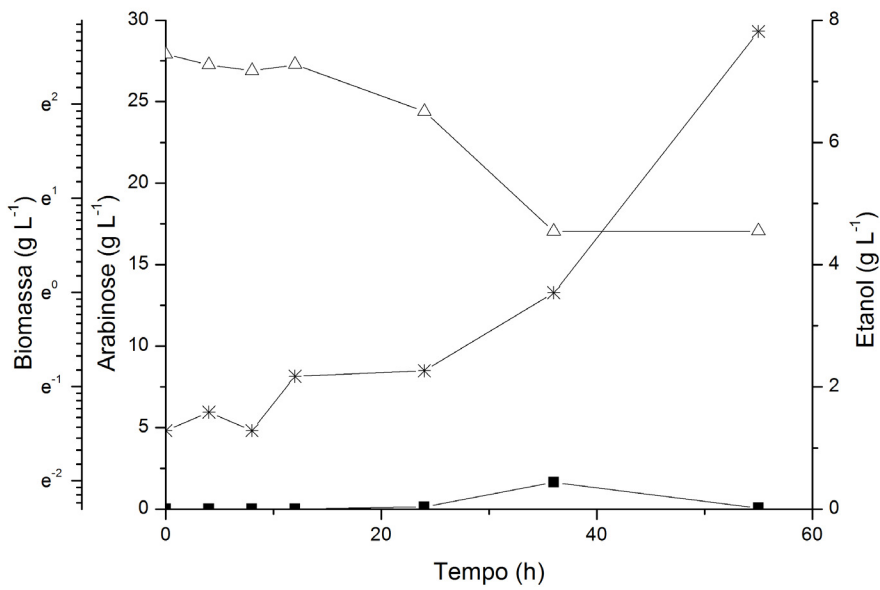


Figura 16: Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose e produção de etanol, por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob anaerobiose (100 rpm a 28⁰C).. Biomassa (*), arabinose (△) e etanol (■).

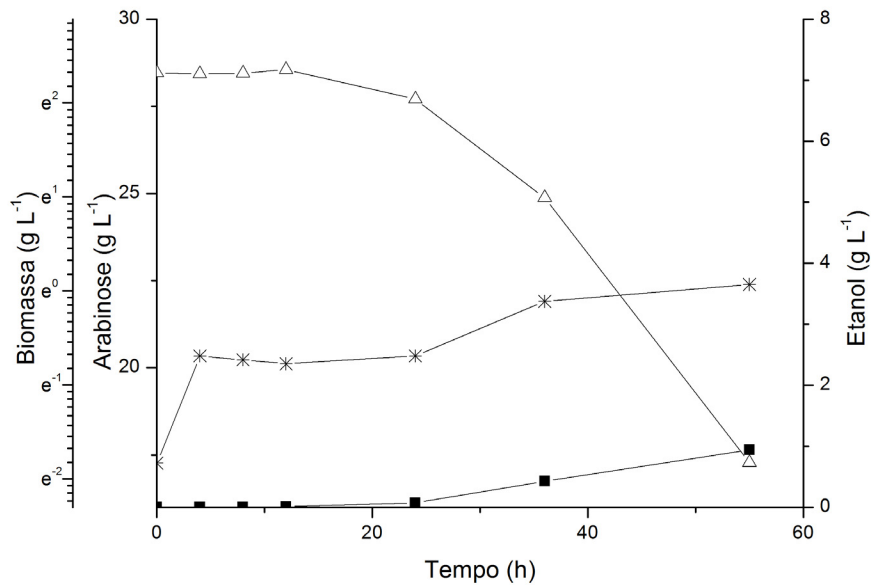


Figura 17: Cinética da produção de biomassa, consumo de arabinose, e produção de etanol, por *S. arborariae* em cultivos em frascos Duran agitados sob aerobiose (180 rpm a 28⁰C). Biomassa (*), arabinose (△) e etanol (■).

No ensaio em que se utilizou glicose como substrato foi possível observar que 96% deste açúcar foi consumido sob condições anaeróbicas, em 55 horas de cultivo

(Figura 12), com um coeficiente de rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) igual a $0,27 \text{ g g}^{-1}$. No entanto, em condições aeróbias (Figura 13), pouco etanol foi produzido, resultando em um baixo $Y_{P/S} = 0,09 \text{ g g}^{-1}$. Neste cultivo observou-se que a quantidade de biomassa foi maior que no cultivo anaeróbico, mostrando que em aerobiose ocorre um desvio na rota metabólica para a multiplicação celular (RETTORI e VOLPE 2006). ROUHOLLAH e colaboradores (2007) avaliaram a conversão de glicose em etanol em cultivos com *S. cerevisiae*, *P. stipitis* e *Kluyveromyces marxianus*, a 100 rpm em agitador orbital, obtendo coeficientes de rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) de 0,40, 0,41 e 0,42 g g^{-1} , respectivamente. Esta diferença de rendimento pode ser explicada pela diferença da relação volume de meio/volume do frasco, já que esta foi de 20% neste trabalho enquanto que para ROUHOLLAH e colaboradores (2007) foi de 40%. Esta modificação altera a oxigenação do meio e interfere no metabolismo celular, ou seja, com um maior volume de meio dentro do frasco a quantidade de oxigênio disponível para o cultivo é menor, diminuindo a difusão de O_2 no meio, favorecendo a formação de etanol. Em único estudo publicado sobre *S. arborariae* CADETE e colaboradores (2009) relataram que esta levedura produziu etanol com um rendimento específico para bioconversão de glicose ($Y_{E/G}$) de $0,35 \text{ g g}^{-1}$, em agitador orbital a 160 rpm (28°C e pH 5). O maior rendimento obtido por CADETE e colaboradores (2009) quando comparado ao rendimento apresentado nesse trabalho (aerobiose) pode também ser explicado pela diferença de oxigenação, pois apesar da rotação utilizada por este autor ser 20 rpm menor que a aplicada nestes experimentos, não se pode garantir que a transferência de oxigênio seja semelhante uma vez que o agitador orbital empregado nesses experimentos são diferentes e existe uma diferença de diâmetro de agitação.

Quando xilose foi utilizada como fonte de carbono sob condições anaeróbicas (Figura 14), foi consumido 87% da concentração inicial deste açúcar tendo como produtos etanol e xilitol com coeficientes de rendimento ($Y_{P/S}$) de $0,16 \text{ g g}^{-1}$ e $0,02 \text{ g g}^{-1}$. Em condições aeróbicas (Figura 15), a xilose foi exaurida em 55 horas, no entanto a produção de etanol e xilitol foram baixas com $Y_{P/S}$ $0,03 \text{ g g}^{-1}$ e $0,01 \text{ g g}^{-1}$. Verificando os resultados observa-se que em anaerobiose *S. arborariae* tem preferência para a conversão de xilose a etanol, isso provavelmente se deve ao fato de que a redução da xilose a xilitol promovida por esta levedura depende de NADH ou NADPH, já que o co-fator NAD^+ pode ser recuperado em uma etapa seguinte, seja em condições anaeróbicas ou de limitação de O_2 . Sendo assim, na ausência de oxigênio o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol. Em estudo realizado com *Pachysolen tannophilus*, fermentações foram conduzidas utilizando meio semissintético, em frascos Erlenmeyer, incubados em um agitador a 30°C e 100 rpm apresentou um rendimento de conversão de xilose em etanol $0,13 \text{ g g}^{-1}$ (ZHAO *et al.*, 2008). Este resultado foi semelhante ao encontrado neste trabalho, mostrando que a *S. arborariae* é uma promissora fermentadora de xilose a etanol em condições anaeróbicas, assim como *P. tannophilus* que é reconhecida como excelente produtora de etanol a partir de xilose (STAMBUCK *et al.*, 2008). CADETE e colaboradores (2009) mostraram que *S. arborariae* produziu etanol a partir de xilose com um coeficiente de rendimento de bioconversão específico de $0,37 \text{ g g}^{-1}$ ($Y_{E/X}$). Comparando todos os resultados descritos acima com os do experimento realizados, os resultados sugerem que existe uma faixa ótima de agitação para oxigenação do meio para gerar um a maior conversão de xilose a etanol.

Arabinose (Figuras 16 e 17) foi o açúcar menos consumido por *S. arborariae* em ambas as condições de cultivo (38% em média), tendo como consequência

baixa produtividade de etanol, apresentando coeficientes de rendimento de etanol de 0,04 g g⁻¹ e 0,09 g g⁻¹, para anaerobiose e aerobiose, respectivamente (Figuras 5 e 6, respectivamente). DIEN *et al.*, (1996), realizou uma seleção de leveduras capazes de converter L-arabinose em etanol utilizando agitador em condições de microaerofilia e obteve um coeficiente de rendimento de bioconversão específico de 0.13g g⁻¹ (Y_{P/S}) em 14 dias e consumo de 33 ± 5% do substrato por *Candida sp.* (YB-2248). Assim, observa-se que os valores encontrados neste estudo foram semelhantes ao descrito acima, porém em um tempo menor de cultivo. A Tabela 7 apresenta a consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho.

Tabela 7: Resultados do cultivo para *S. arborariae* sob condições aeróbicas e anaeróbicas utilizando hexose e pentoses separadamente.

Tipo de Cultivo	S.	Consumo (%)	Etanol (g L ⁻¹)	Y _{P/S} ET (g g ⁻¹)	ηET (%)	Q (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Xilitol (g L ⁻¹)	Y _{P/S} XIL (g g ⁻¹)	Biomassa (g L ⁻¹)
Cultivo Aeróbio	G	96	0,56	0,05	10	0,02	-	-	0,15
	X	100	0,57	0,03	5	0	0,19	0,01	1,54
	A	37	0,94	0,09	18	0,02	-	-	0,11
Cultivo Anaeróbio	G	96	6,27	0,26	50	0,11	-	-	0,06
	X	87	3,62	0,16	31	0,07	0,4	0,02	0,72
	A	39	0,43	0,04	8	0,01	-	-	1,6

Analisando os dados da Tabela acima foi possível verificar que sob condições aeróbicas, o cultivo utilizando com substrato arabinose, apresentou maior produtividade de etanol (Y_{P/S} de 0,09 g g⁻¹), enquanto que o que utilizou xilose apresentou maior quantidade de biomassa (1,54 g L⁻¹). Já para a condição em anaerobiose, quando utilizado glicose foi o que apresentou maior Y_{P/S} de 0,09 g g⁻¹ e a maior quantidade de biomassa (1,6 g L⁻¹) foi obtida quando foi empregado arabinose como substrato. Segundo SKOOG e HAHN-HÄGERDAL (1988), a

produção de etanol a partir de pentoses por leveduras está estritamente ligada à presença de oxigênio em baixas concentrações. O crescimento em anaerobiose é raro, sendo *Saccharomyces cerevisiae* uma das poucas leveduras capazes de crescer em completa anaerobiose (VISSER et al., 1990).

5.4. Avaliação da influência da aeração na cinética de consumo do substrato e produção de co-produtos por *S. arborariae* sobre meio semissintético em biorreatores de cultivo submerso.

Avaliando o perfil de consumo de açúcares e produção de etanol e xilitol dos experimentos realizados sobre cada açúcar individualmente foi possível verificar que a levedura *S. arborariae* teve preferência pelo consumo de glicose e xilose, portanto a arabinose não foi mais adicionada ao meio de cultura nos próximos experimentos. Observou-se também que esta levedura apresentou diferente comportamento frente a presença e ausência de oxigênio nos cultivos. Sendo assim, novos experimentos foram realizados em biorreator a fim de avaliar a conversão de glicose e xilose em co-produtos sob diferentes condições de aeração (aeróbico - 400 rpm e 2 vvm, microaeróbico 1 - 200 rpm e 0,5 vvm, microaeróbico 2 - 180 rpm e 0,33vvm e anaeróbico - 150 rpm, sem adição de ar comprimido) em meio semissintético a 28°C e pH 5.

Os resultados referentes à produção de biomassa, alcoóis e consumo de açúcares no cultivo com *S. arborariae* sobre meio semissintético, em biorreatores submersos sob condições aeróbicas, microaeróbicas 1 e 2 e anaeróbicas

encontram-se nas Figuras 18, 19, 20 e 21, respectivamente. A Tabela 8 apresenta a consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho.

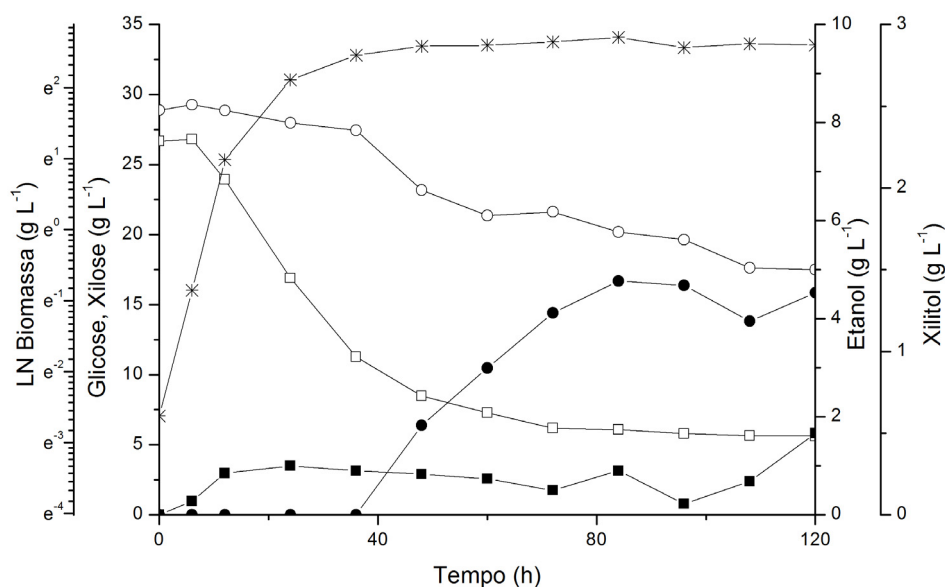


Figura 18: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura *S. arborariae* em meio semissintético sob aerobiose (400 rpm e 2vvm): (*) biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.

No cultivo aeróbico (Figura 18), *S. arborariae* metabolizou 79% e 39% de glicose e xilose disponíveis no meio de cultura, respectivamente. Nesta condição, a produção de etanol ficou abaixo de 2 g L⁻¹ e a de xilitol chegou a 1,35 g L⁻¹, obtendo $Y_{P/S}$ de 0,08 g g⁻¹ para etanol e 0,16 g g⁻¹ para xilose. A produção de biomassa foi 15 g L⁻¹ em 84 horas. TOIVARI e colaboradores (2001) obtiveram uma melhor produtividade de etanol e xilitol do que a realizada neste experimento. Estes pesquisadores utilizaram *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada contendo genes de *Pichia stipitis*, xilose como substrato, agitação de 300 rpm e aeração de 20% e obtiveram aproximadamente um produtividade de etanol e xilitol de 0,08 e 0,01 g g⁻¹, respectivamente.

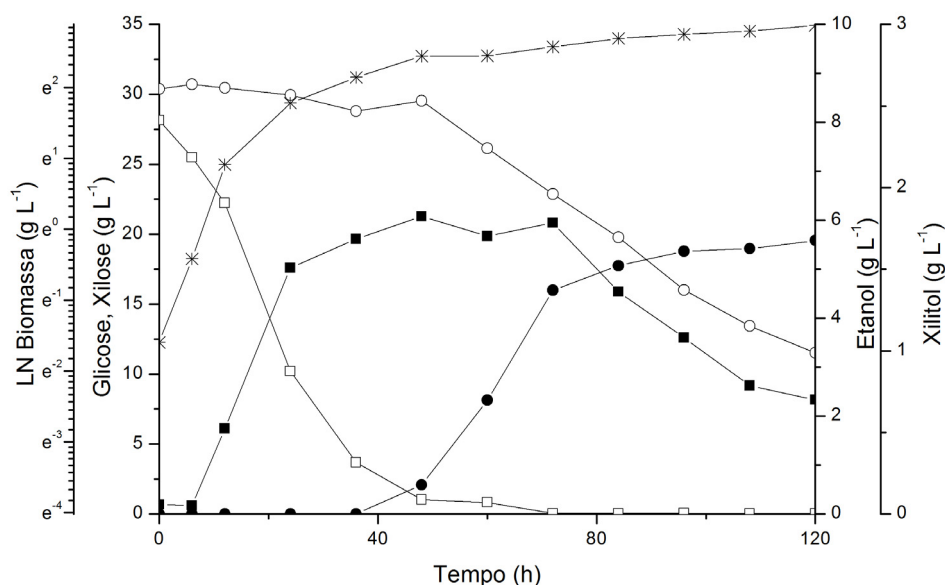


Figura 19: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura *S. arborariae* em meio semissintético sob microaerofilia 1 (200 rpm e 0,5 vvm): (*) biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.

Sob condições de microaerofilia 1 (Figura 19) toda glicose foi consumida e o consumo de xilose foi de 62%. O crescimento celular foi de $17,74 \text{ g L}^{-1}$ obtendo uma taxa de bioconversão para etanol e xilitol de $0,22$ e $0,09 \text{ g g}^{-1}$, respectivamente. Após 72 horas de cultivo, etanol começou a ser metabolizado pela *S. arborariae* como fonte de carbono. Apesar de toda a glicose ter sido metabolizada apenas 55% da xilose foi consumida na condição de microaerofilia 2 (Figura 20), obtendo 13 g L^{-1} de biomassa e uma taxa de bioconversão para etanol de $0,35 \text{ g g}^{-1}$ e para xilitol de $0,14 \text{ g g}^{-1}$. Experimentos semelhantes a este estudo realizados por ZHANG e colaboradores (2010), apresentaram valores semelhantes na produtividade de etanol e maiores para xilitol. Foi utilizada uma *Saccharomyces cerevisiae* (cepa NAN-127) modificada que contém xilose redutase-xilitol desidrogenase (XR-XDH) em meio contendo glicose e xilose a 200 rpm e com taxas de aeração de 0,02, 0,03, 0,04 e 0,05 vvm obtendo valores de $Y_{P/S}$ para etanol de 0,41, 0,39, 0,39 e 0,37 e

para xilitol de 0,47, 0,48, 0,45 e 0,39, respectivamente. Em experimento realizado por FROMANGER e colaboradores (2010), foi verificada uma produtividade de etanol semelhante e de xilitol inferior a este trabalho. *Candida shehatae* foi utilizada em condições microaeróbicas (0,6 vvm e 400 rpm), utilizando como substrato xilose e obtiveram uma produtividade de etanol de 0,32 g g⁻¹ e de xilitol de 0,04 g g⁻¹,

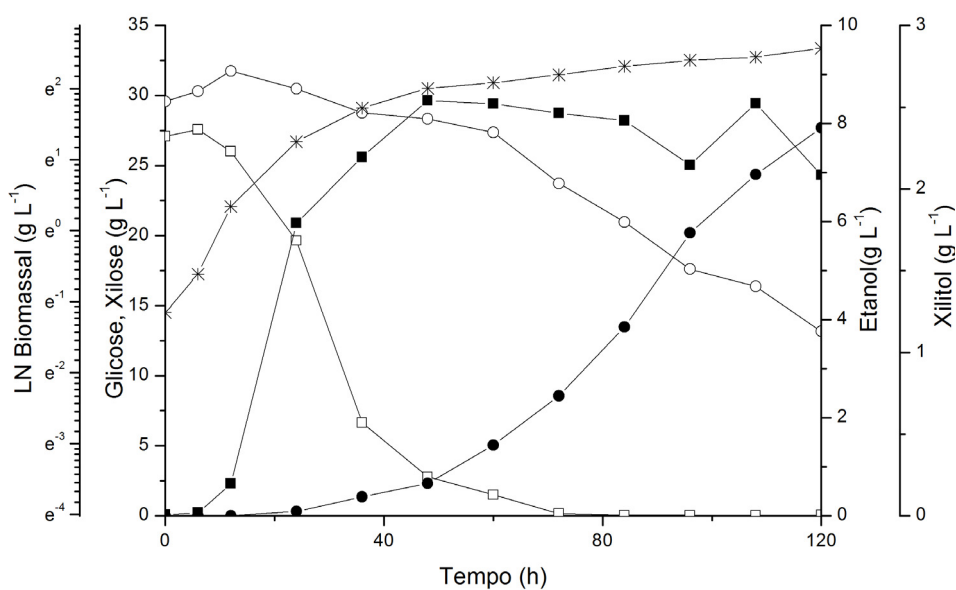


Figura 20: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura *S. arborariae* em meio semissintético sob microaerofilia 2 (180 rpm e 0,33 vvm): (*) biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.

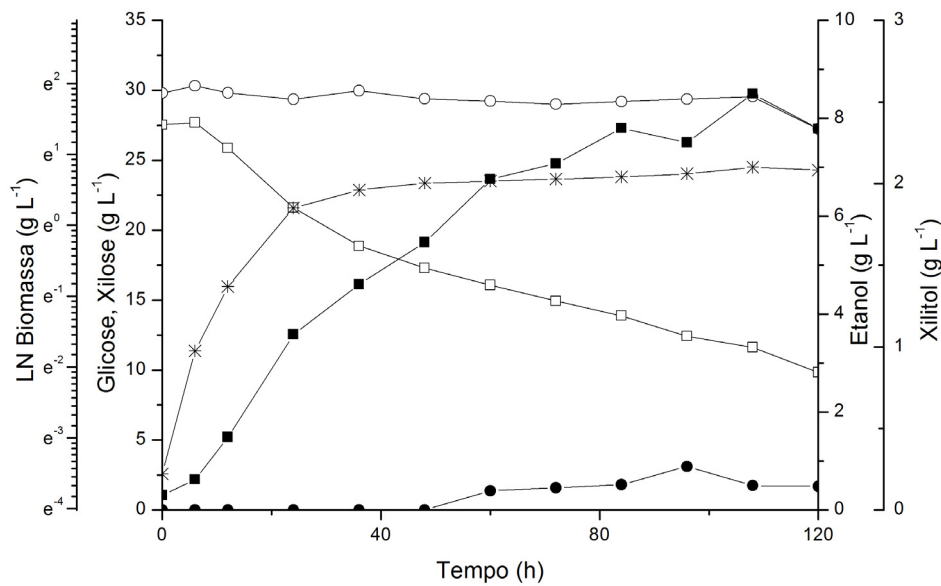


Figura 21: Cinética de consumo de glicose e xilose e produção de biomassa, etanol e xilitol, pela levedura *S. arborariae* em meio semissintético sob anaerobiose (150 rpm): (*) biomassa, (□) glicose, (○) xilose, (■) etanol e (●) xilitol.

O crescimento celular da levedura *S. arborariae* sob anaerobiose atingiu o máximo em 108 horas de cultivo com $2,26 \text{ g L}^{-1}$. Esta consumiu 64% da glicose e 9% da xilose disponível no meio, obtendo uma taxa de bioconversão ($Y_{P/S}$) de $0,52 \text{ g g}^{-1}$ para etanol e $0,62 \text{ g g}^{-1}$ para xilitol (Figura 21). No final do cultivo podemos observar que a *S. arborariae* começou a consumir etanol como fonte de carbono. Estes resultados foram melhores do que os apresentados por JOACHIMSTHAL e colaboradores (1999), que obtiveram em cultivo utilizando *Zymomonas mobilis* recombinante contendo genes de *Escherichia coli* para a assimilação de xilose. em meio contendo glicose e xilose com uma agitação de 200 rpm um coeficiente de produtividade de etanol ($Y_{P/S}$) de $0,46 \text{ g g}^{-1}$. Já ELIASSON e colaboradores (2000), em outro estudo realizado por utilizando *S. cerevisiae* recombinante contendo genes de *Pichia stipitis* para metabolizar xilose, neste foi utilizado meio de cultivo composto por glicose e xilose a 200 rpm uma produtividade de $0,38 \text{ g g}^{-1}$ de etanol foi obtida.

O mesmo padrão de consumo dos açúcares nos ensaios realizados em frascos agitados (Item 4.2) foi observado no experimento realizado em biorreator de cultivo submerso em que *S. arborariae* consome a maior parte da xilose apenas após o consumo da glicose. Comparando as taxas de consumo de glicose e xilose nos cultivos de microaerofilia este fato pode ser verificado. Nas primeiras 48 horas de cultivo a taxa de consumo de glicose para *S. arborariae* foi de 0,57 g h⁻¹, enquanto que a de xilose foi 0,02 g h⁻¹ para a primeira condição de microaerofilia e para a segunda a taxa de consumo de glicose e xilose foram de 0,51 e 0,03 g h⁻¹, respectivamente. Desta forma, fica evidente a preferência pela glicose por esta levedura. Após o esgotamento da glicose a taxa de consumo de xilose aumentou para 0,24 g h⁻¹ em ambas as condições.

Tabela 8: Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em reator submerso utilizando meio semissintético

Condição de cultivo	Consumo (%)		Etanol (g L ⁻¹)	Y _{P/S} ET (g g ⁻¹)	Q _p máx (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Xilitol (g L ⁻¹)	Y _{P/S} XIL (g g ⁻¹)	K _{La} (h ⁻¹)
	G	X						
Aeróbico	79	39	1,67	0,08	0,01	1,35	0,16	51
Microaerófilo 1	100	62	6,07	0,22	0,12	1,67	0,09	26
Microaerófilo 2	100	55	8,47	0,35	0,18	2,37	0,14	2,5
Anaeróbico	64	9	8,5	0,52	0,08	0,27	0,62	

Após analisarmos a Tabela 8, verificamos que o maior consumo dos açúcares (glicose e xilose) foi em condições de microaerofilia. Apesar da condição de anaerobiose formar uma maior concentração de etanol o tempo para esta produção é maior e, assim, apresentou um baixo coeficiente de produtividade

volumétrica ($Q=0,08 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). A melhor relação concentração de etanol/tempo de produção foi em microaerofilia 2 em que foi obtido $Q=0,18 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e também obteve a maior concentração de xilitol ($2,37 \text{ g L}^{-1}$).

O coeficiente de transferência de oxigênio ($K_L a$) é importante, pois descreve a capacidade de aeração do sistema de fermentação e fornece informações para o *scale-up* do processo. Ele também determina a quantidade média de oxigênio que pode ser fornecido para a fermentação (SILVA et al, 1996). No experimento realizado observamos que quanto menor é o $K_L a$ maior é a concentração de etanol formado indicando assim uma preferência pela condição anaeróbica pela *S. arborariae*. Segundo ROSEIRO e colaboradores (1991), em experimento realizado com *Debaryomyces hansenii* uma grande variação na produção de etanol foi obtido ao longo da evolução do experimento, e verificou uma estreita ligação entre o etanol taxa de produção e $K_L a$. Já para a produção de xilitol, através dos resultados descritos na Tabela 8, *S. arborariae* tem preferência por níveis baixos de oxigenação, pois na condição de menor microaerofilia (2) foi obtido a maior concentração de xilitol. De acordo com AGUIAR e colaboradores (2001), uma maior produtividade de xilitol é obtida quanto o fornecimento de oxigênio é limitado. Em estudo realizado com *Candida guilliermondii*, para $K_L a$ de 20, 45 e 100 h^{-1} foram obtidos coeficientes de produtividade volumétrica igual a 0,67, 0,23 e 0,06, respectivamente. Desta forma, fica evidente que a concentração de xilitol produzido aumenta com a diminuição do $K_L a$.

A Tabela 9 apresenta a síntese do consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho. Foram conduzidas fermentações em biorreatores submersos sobre meio semissintético empregando *S. arborariae*.

Tabela 9: Síntese do consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho.

Ensaio	$Y_{P/S}$ ET (g g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ XIL (g g ⁻¹)
Frascos Agitados (glicose, xilose e arabinose)	0,45	0,33
	Glicose	0,26
Frascos Agitados em anaerobiose	Xilose	0,16
	Arabinose	0,04
Biorreator em anaerobiose (glicose e xilose)	0,52	0,14

Comparando os resultados obtidos neste experimento com o que foram realizados em frascos agitados, observou-se que a produtividade de etanol e xilitol foi maior quando realizada em Biorreator e em anaerobiose (Tabela 9). Segundo SKOOG e HAHN-HÄGERDAL (1988), a produção de etanol a partir de pentoses por leveduras está diretamente ligada a baixas concentrações de oxigênio. Desta forma, podemos observar que esta levedura tem preferência por condições anaeróbicas. Uma alternativa para aumentar a produtividade de etanol, seria utilizar co-cultivos de *S. cerevisiae* (fermentadora de hexoses) e *S. arborariae* (promissora fermentadora de pentoses), já que ambas possuem capacidade de converter açúcares em etanol em anaerobiose.

6. 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 já que apresentou altos níveis de açúcares fermentescíveis (hexoses e pentoses) no seu hidrolisado.

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⁻¹). A levedura *S. arborariae* apresentou-se promissora para a fermentação de pentoses.

O cultivo em biorreatores submersos necessita ser otimizado para aumentar a eficiência na conversão dos açúcares fermentescíveis a etanol e/ou xilitol utilizando *S. arborariae*, pois esta apresentou resultados satisfatórios para a produtividade de etanol ($Y_{P/S}$ 0,52 g g⁻¹) em meio semissintético, mas o tempo para atingir este coeficiente de produtividade foi longo (108 h).

Desta forma, é possível verificar que este estudo é de grande importância já que foi possível utilizar um resíduo agroindustrial na produção de etanol. Outro fato importante deste trabalho é utilização de uma levedura recentemente isolada (*S. arborariae*) na fermentação de pentoses já que fermentar este açúcar é umas das dificuldades deste processo.

7.PERSPECTIVAS

Considerando os investimentos em novas tecnologias para produção de biocombustíveis através de resíduos lignocelulósicos, um dos objetivos deste projeto é encontrar um microrganismo capaz de converter pentose e hexoses a etanol e/ou xilitol de maneira eficiente. 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 que utilizem co-culturas de microrganismos e 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.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADEN, A.; RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEEHAN, J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Technical report, NREL/TP-510-32438. **National Renewable Energy Laboratory**, 2002.
- AGUIAR, W.B.JR.; FARIA, L.F.F.; COUTO, M.A.P.G.; ARAUJO, O.Q.F.; PEREIRA N.JR. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from d-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 49–59, 2002
- ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p.:340–349, 2007.
- BADER, J.; MAST-GERLACH, E.; POPOVIC, M.K.; BAJPAI, R.; STAHL. U.Relevance of microbial coculture fermentations in biotechnology. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, p. 371 – 387, 2009.
- BAI, F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89–105, 2008.

- BELLISSIMI, E.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T.; VAN MARIS, A.J.A. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Yeast Res**, v. 9, p. 358–364, 2009.
- BOTHAST, R.J.; SCHLICHER, M.A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 67, p. 19–25, 2005.
- 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. **FEMS Yeast Research**, v. 9, p. 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**, v. 86, p. 1371 – 1376. 2006.
- CONAB. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, outubro 2010 / **Companhia Nacional de Abastecimento** – Brasília, 2010..
- CHANDEL, A.; KAPOOR, R.; RAMESH, A.; KUHAD, C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947–1950. 2007.
- CHENG, K-K.; GE, J-P.; ZHANG, J-A.; LING, H-Z.; ZHOU, Y-J.; YANG, M-D'; XU, J-M. Fermentation of pretreated sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**, v. 29, p. 1007-1055, 2007
- D'AMORE T., PANCHAL C.J., STEWART G.G. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 110-114, 1988.

- DIEN, B.S.; KURTZMAN, C.P.; SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Screening for L-arabinose fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57, p. 233-242,1996.
- DIEN, B.S.; HESPELL, R.B.; WYCKOFF, H.A.; BOTHAST, R.J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. **Enzyme and Microbial Technology**, v 23, p. 366-371, 1998
- DOMÍNGUEZ-ESCRIBÁ, L.; PORCAR, M. Rice straw management: the big waste. **Biofuels. Bioproducts and Biorefining**, v. 4, p. 154–159, 2010.
- 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**, Berlin, v.152, p.143-147, 1989.
- DUNNING, J.W., DALLAS, D. E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Anal. Chem. Washington**, v.21, n.6, p. 727-729, 1949.
- ELIASSON, A.; CHRISTENSSON, C.; WAHLBOM, C.F.; HAHN-HAGERDAL, B. Anaerobic Xylose Fermentation by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Carrying XYL1, XYL2, and XKS1 in Mineral Medium Chemostat Cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3381–3386, 2000.
- 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. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 37, p. 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**, v.45, p. 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**, v. 24, p. 1091-1097. 2008.
- GONG, C.S.; CLAYPOOL, T.A.; McCRACKEN, L.D.; MANN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85-102, 1983.
- 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**, v.100, p. 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**, v. 74; p. 937-953, 2007.
- 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**, v. 2, p. 1291-1302, 1995.
- HOHMANN, S. Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 66, p. 300–372, 2002.
- HORWIITZ, W. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington: AOAC, 1975. cap.2.

- HOWARD, R.L.; ABOTSI, E.; JANSEN van RENSBURG, E.L.; HOWARD, S.
Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production.
African Journal of Biotechnology, v. 2, p. 602 - 619. 2003.
- HYVÖNEN, L.; KOIVISOINEN, P.; VOIROL, F. Food Technological evaluation of
xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373 – 403, 1982.
- JOACHIMSTHAL, E.; HAGGETT, K.D.; ROGERS, P.L. Evaluation of Recombinant
Strains of *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production from Glucose/Xylose
Media. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p.147-157, 1999
- JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in
Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 27, p.1-32, 1983.
- JEFFRIES, T.W.; SHI, N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by
yeasts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 65, p. 117-
161, 1999.
- JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of
pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, n.5,
p.495-509, 2000.
- JOHNSON, J. M-F.; Coleman, M.D.; Gesch, R.; Jaradat, A.; Mitchell, R.; Reicosky,
D.; Wilhelm, W.W. .Biomass-bioenergy crops in the United States: a changing
paradigm. **The American Journal of Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p.
1-28, 2007.
- KAMM, B.; KAMM, M. Mini-review: principles of biorefineries. **Applied Microbiology
and Biotechnology**, v. 63, p. 137-145, 2004
- KAPARAJU, P.; SERRANO, M.; THOMSEN, A.B.; KONGJAN, P.; ANGELIDAKI, I.
Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery
concept, **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 2562–2568, 2009.

- KEATING, J.D.; PANGANIBAN, C.; MANSFIELD, S.D.;. Tolerance and Adaptation of Ethanologenic Yeasts to Lignocellulosic Inhibitory Compounds, **Biotechnology and Bioengineering**, v.93, p.1196-1206, 2006.
- KIM, J.; YUN, S. Discovery of Cellulose as a Smart Material. **Macromolecules**, v.39, p.4202-4206, 2006.
- KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.35, p. 377-391, 2008.
- LASER, M.; JIN, H.; JAYAWARDHANA, K.; LYND, L.R. Coproduction of ethanol and power from switchgrass, **Biofuels Bioprod. Biorefin.**v. 3, p. 195–218, 2009.
- LATIF, F.; RAJOKA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v.77, p. 57-63, 2001.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.56, p.1 – 24, 1997.
- LYND, L.R.; LARSON, E.; GREENE, N.; LASER, M.; SHEEHAN, J.; DALE, B.E.; MCLAUGHLIN S.; WANG, M. The role of biomass in America's energy future: framing the analysis, **Biofuels Bioprod. Biorefin.** v. 3, p. 113–123, 2009
- LIU, H-J.; LI Q.; LIU, D-H.; ZHONG, J-J. Impact of hyperosmotic condition on cell physiology and metabolic flux distribution of *Candida krusei*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 92-98, 2006
- MAEKINEN, K.K. Xylitol and oral health. **Advances in Food Research**, v.25, p.137-158, 1979.
- MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 360-363, 1982.

- MANSILLA, H.D.; BAEZA, J.; URZÚA, S.; MATURANA, G.; VILLASEÑOR, J.; DURAN, N. Acid-catalysed hydrolysis of rice hull: Evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 189-193, 1998
- MAPA/CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Anuário Estatístico da agroenergia 2009**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 161p.
- MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372–380, 2009.
- MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, p. 656-666, 2007.
- MIELLENZ, J.R.; BARDSLEY, J.S.; WYMAN, C.E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532 – 3539. 2009.
- MONIRUZZAMAN, M. Ethanol production from AFEX pretreated corn fiber by recombinant bacteria. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 985±990, 1996.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.93, p.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**, v. 81, p. 268 – 274, 2006.
- OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v.91, p. 659–664, 2009.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.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**. v. 118, p. 1 – 7, 2007.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 21, p. 18-24, 1997.
- PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, Essex, v.65, p.191 – 201, 1998a.
- PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confection. **Food Technology**, Chicago, v.10, p.98 – 106, 1988.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE LA RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int Microbiol**, v. 5, p. 53-63, 2002.
- PIENKOS, P.T.; ZHANG, M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. **Cellulose**, v. 16, p. 743-762, 2009.
- PIMENTEL, D. Ethanol fuels: energy balance, economics, and environmental impacts are negative. **Nat Resour Res** , v. 12, p. 127–134,2003.
- PIMENTEL, D.; PATZEK, T. Ethanol production: energy and economic issues related to U.S. and Brazilian sugarcane. **Nat Resour Res**, v. 16, p. 235–242, 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**, v. 134, p. 273 – 283. 2006.
- RETTORI, D.E; VOLPE, P.L.O. Microcalorimetria: uma técnica aplicável ao estudo do diauxismo da *saccharomyces cerevisiae*. **Química Nova**, 2006
- ROSEIRO, J.C.; PEITO, M.A.; GIRIO, F.M.; AMARALCOLLACO, M.T. the effects of the oxygen-transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces-hansenii*. **Archives of Microbiology**, v. 156, p. 484-490, 1991.
- ROUHOLLAH, H.; IRAJ, N.; GITI, E.; SORAH, A. Mixed sugar fermentation by *Pichia stipitis*, *Sacharomyces cerevisiaea*, and an isolated xylose fermenting *Kluyveromyces marxianus* and their cocultures. **African Journal of Biotechnology**. 2007.
- SAHA, B.C.; WOODWARD, J. Fuels and Chemicals from Biomass. **Ed. American Chemical Society**, Washington, DC, 1997.
- SAHA, B.C.; ITEN, L.B.; COTTA, M.A.; WU, Y.V.I. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 816-822, 2005.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p 185-194, 2009
- SEARCHINGER, R.; HEIMLICH, R.A.; HOUGHTON, F.D. Use of U.S. croplands for biofuels increases greenhouse gases through emissions from land-use change. **Science**, v. 319, p. 1238–1240, 2008.
- 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**, v. 99, p. 2898–2904, 2008.
- SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 31, p. 549-553, 1996
- 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**, v. 162, p. 1306 – 1315, 2010.
- SILVA D.J.; QUEIROZ, A.C. *Análise dos Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos*. UFV. 2005.
- SIVAKUMAR, G.; DANIEL R.V.; JIANFENG, X.U.; DAVID, M.B.; JACKSON, O.L.; XUMENG, G.E.; PAMELA, J.W.- Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations. **Eng. Life Sci.**,v. 10, p. 8–18, 2010.
- SKOOG K.; HAHN-HÄGERDAL B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 66–80, 1988.
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.; BOM, E.P.S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008
- SUGAI, J.K.; DELGENES, J.P. Catabolite repression of inductin fo aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. **Current Microbiol**, v. 31, p. 239–244,1995
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.83, p.1 – 11, 2002.

- SUN J.X., SUN X.F., SUN R.C., SU Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 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**, v. 88, p. 521 – 531, 2005.
- TOIVARI, M.H.; ARISTIDOU, A.; RUOHONEN, L.; PENTTILA, M.; Conversion of Xylose to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of Xylulokinase (XKS1) and Oxygen Availability. **Metabolic Engineering**, v. 3, p. 236-249, 2001.
- TORGET, R. Optimization of reverse-flow, 2-temperature, dilute-acid pre-treatment to enhance biomass conversion to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.58, p.85-101, 1996.
- 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.
- VISSER, W.; SCHEFFERS, W.A.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W.H.; VAN DIJKEN, J.P. Oxygen requirements of yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3785–3792, 1990
- WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILÄ, M.; KERÄNEN, S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the TKL1 and TAL1 genes encoding the pentose phosphate

- pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied Environmental Microbiology**, v.61, p.4184-4190, 1995.
- WHEALS, A.E.; BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G; AMORIM, H.V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotech**, v. 17, p. 482–487, 1999.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1 – 14, 1998
- YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v.25, p.159-180, 1979.
- ZHAO, L.; ZHANG, X.; TAN, TW. Influence of various glucose/xylose mixtures on ethanol production by *Pachysolen tannophilus*. **Biomass & Bioenergy**, v. 12, p. 1156-1161, 2008
- ZHANG, X.R.; SHEN, Y; SHI WL; BAO XM. Ethanol cofermentation with glucose and xylose by the recombinant industrial strain *Saccharomyces cerevisiae* NAN-127 and the effect of furfural on xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7093-7099, 2010
- ZHONG, C.; LAU, M.; BALAN, V.; DALE, B.; YUAN, Y. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. **Appl Microbiol Biotechno**, 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 _{P/S} ET (g g ⁻¹)	ηET (%)	Q (gL ⁻¹ h ⁻¹)	Y _{P/S} XIL (g g ⁻¹)
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” que 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^{1,#}, Lilian Raquel Hickert^{1,#}, Nicole Teixeira Sehnem¹, Priscila Brasil de Souza-Cruz¹, Carlos Augusto Rosa², and Marco Antônio Záchia Ayub^{1,*}

¹Biotechnology & 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; ²Biological 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⁻¹ sugars. The highest ethanol yield was achieved in the co-cultures, with $Y_{P/S}$ of 0.77 and 0.62 g ethanol g⁻¹ sugars on semi-synthetic medium and on rice hull hydrolysate, respectively. When the toxic compounds were added to the semi-

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

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

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

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 the simultaneous conversion of pentoses and hexoses, the combination of them and the construction of genetically modified cells have been reported as special fermentation strategies (FU and PEIRIS, 2008). Co-cultures of yeasts appear to be advantageous because of the potential for synergistic utilization of the metabolic pathways of different 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 be formed during the chemical hydrolyses of lignocellulosic materials (PALMQVIST and HÄHN-

HAGERDAL, 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, *Saccharomyces cerevisiae*, and in the combined co-cultures of these strains. Micro-aerobic conditions were compared against anaerobiosis 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 resistance. *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⁻¹): 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 (G₂₀X₂₀A₁₀) was composed of (in g L⁻¹): 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⁻¹): 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 G₂₀X₂₀A₁₀ 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⁻¹) glucose, 20; xylose, 15; arabinose, 3; yeast extract, 3; peptone, 5, added with varying concentrations of the toxic compounds (in g L⁻¹): 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⁻¹ 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⁻¹ acetic acid as eluent, flow rate of 1.1 mL min⁻¹ 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⁻¹) 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⁻¹) was defined as the ratio of the concentration of ethanol produced and total sugars consumed, while xylitol conversion yield ($Y_{X/X}$, g g⁻¹) was calculated as the ratio of the concentration of xylitol produced and xylose consumed.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Culture kinetics of *S. cerevisiae* and *S. arborariae* on G₂₀X₂₀A₁₀ and RHH

The kinetics of *S. cerevisiae* ICV D254 cultivation on G₂₀X₂₀A₁₀ 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 G₂₀X₂₀A₁₀ 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 G₂₀X₂₀A₁₀ 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 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).

4.2. 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 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 g L^{-1} ($Y_{X/X} = 0.79$) in $G_{20}X_{20}A_{10}$ and 7 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.

4.3. 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 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^{-1} 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 furfural 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 ethanogenic microorganisms, specially on lignocellulosic hydrolysates.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for their financial support for the project and scholarships.

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.

Dien B. S., Hespel R. B., Wyckoff H. A., Bothast R. J. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain. *Enzyme and Microbial Technology*, V. 23, Pages 366-371, 1998

Fromanger, R., Guillouet, S.E., Uribelarrea, 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-bishydroxymethylfuran. *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-Hägerdal, B., 2000a. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.* 74, 17-24.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, 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*, *Saccharomyces 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 (G₂₀X₂₀A₁₀) or rice hull hydrolysate (RHH)

Medium	Microorganism	For Ethanol			Y _{X/X} (g g ⁻¹)
		Y _{E/G} (g g ⁻¹)	Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Time (h)	
G ₂₀ X ₂₀ A ₁₀	<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_{E/G}: ethanol coefficient yield (g ethanol per g glucose consumed);

Y_{P/S}: ethanol coefficient yield (g ethanol per g total sugar consumed);

Y_{X/X}: 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 ⁻¹)	Ethanol Y _{P/S} (g g ⁻¹)	Time (h) for Y _{P/S}
CONTROL	100	99	0	-	-	-	6.87	0.48	24
HMF									
2.5 g L ⁻¹	100	98	0	-	-	100	6.60	0.0	48
5 g L ⁻¹	100	29	0	-	-	100	5.39	0.18	96
FURFURAL									
2 g L ⁻¹	100	60	0	-	99	-	5.70	0.16	72
3 g L ⁻¹	2	4	0	-	65	-	0.02	0.00	72
ACETIC ACID									
1.6 g L ⁻¹	100	67	0	88	-	-	7.70	0.03	24
3.2 g L ⁻¹	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:

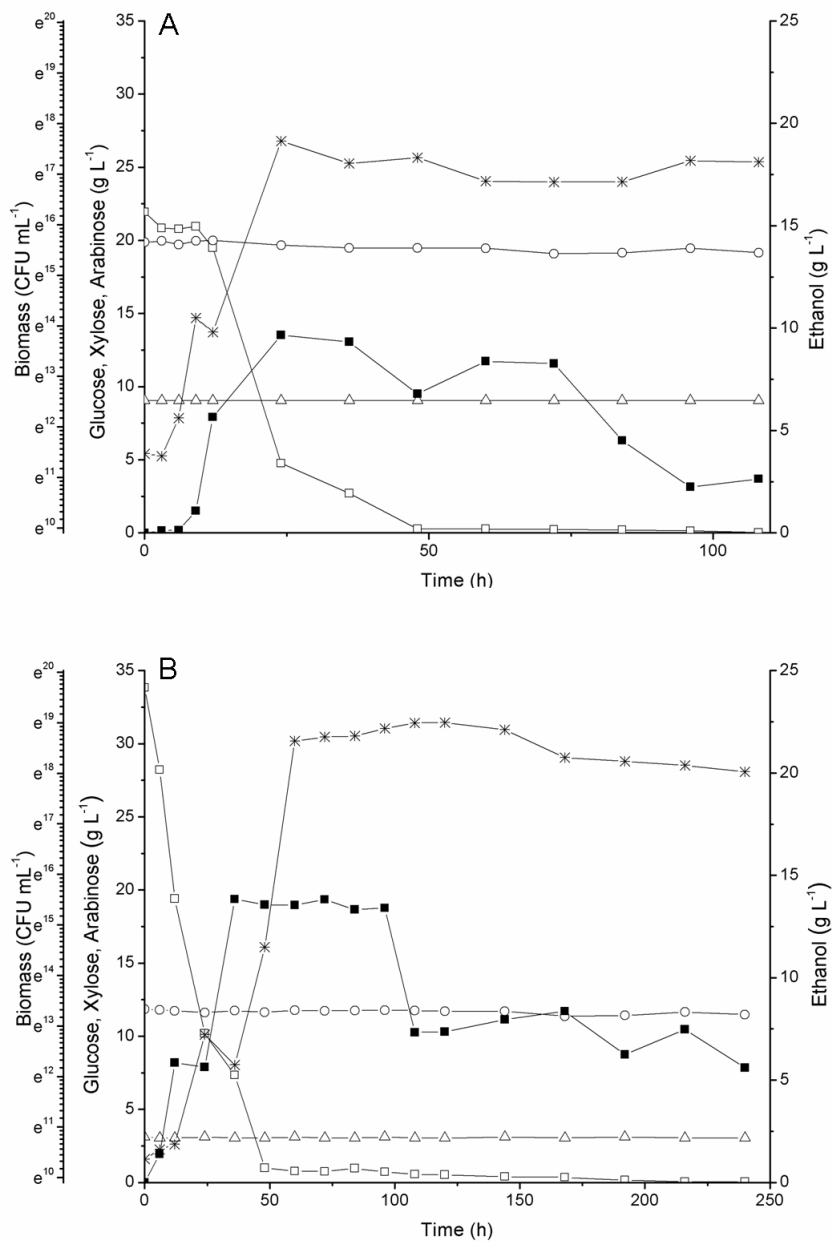


Fig. 1: Kinetics of substrate consumption, ethanol and biomass production of *S. cerevisiae* strain ICV D254 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G₂₀X₂₀A₁₀), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■). Results are the mean of duplicates.

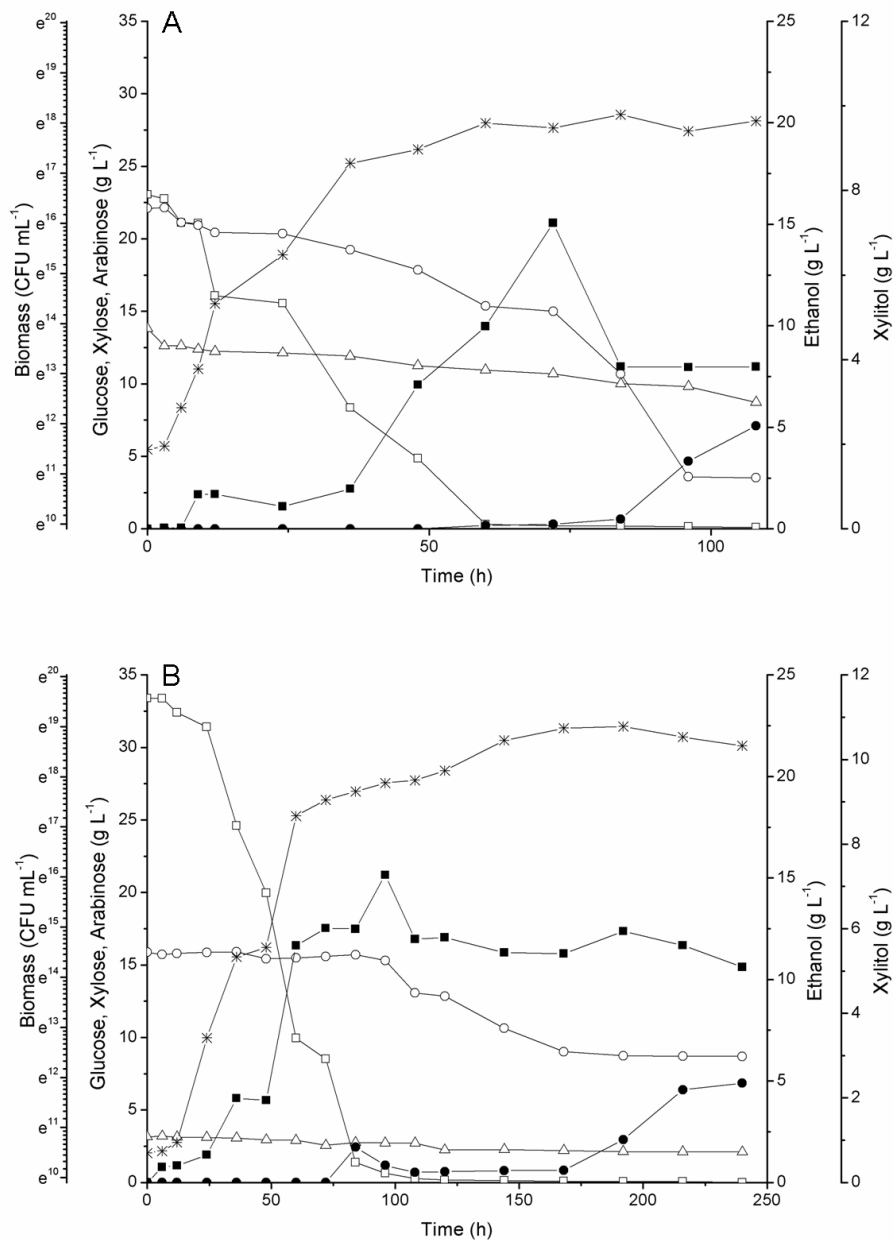


Fig. 2: Kinetics of substrate consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of *S. arborariae* strain NRRL Y-48658 cultivated on (A) semi-synthetic medium (G₂₀X₂₀A₁₀), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■); xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

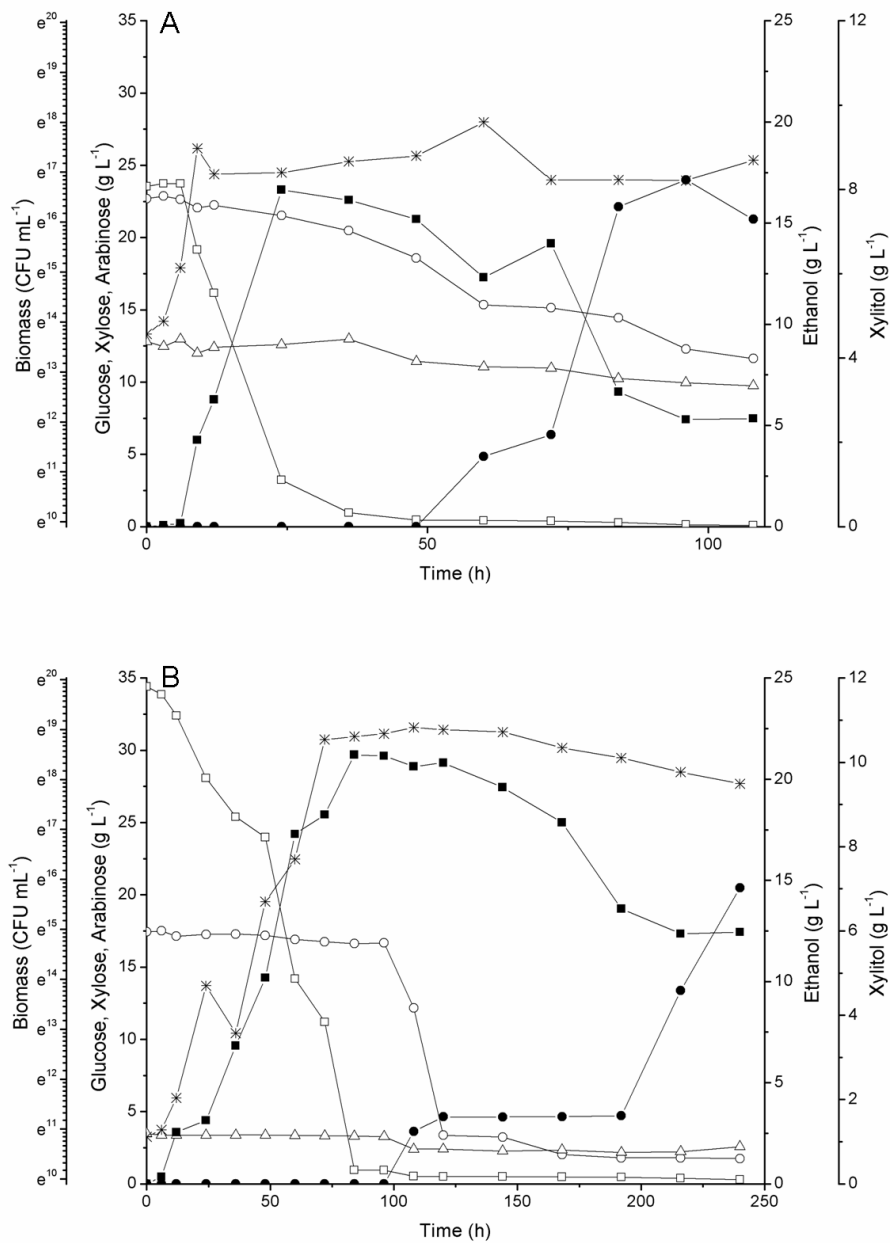


Fig. 3: Kinetics of substrates consumption, ethanol, xylitol, and biomass production of co-cultures of *S. cerevisiae* ICV 254D and *S. arborariae* NRRL Y-48658 on (A) semi-synthetic medium (G₂₀X₂₀A₁₀), and (B) rice hull hydrolysate (RHH). Biomass (*); glucose (□); xylose; (○) arabinose (△); ethanol (■); xylitol (●). Results are the mean of duplicates.

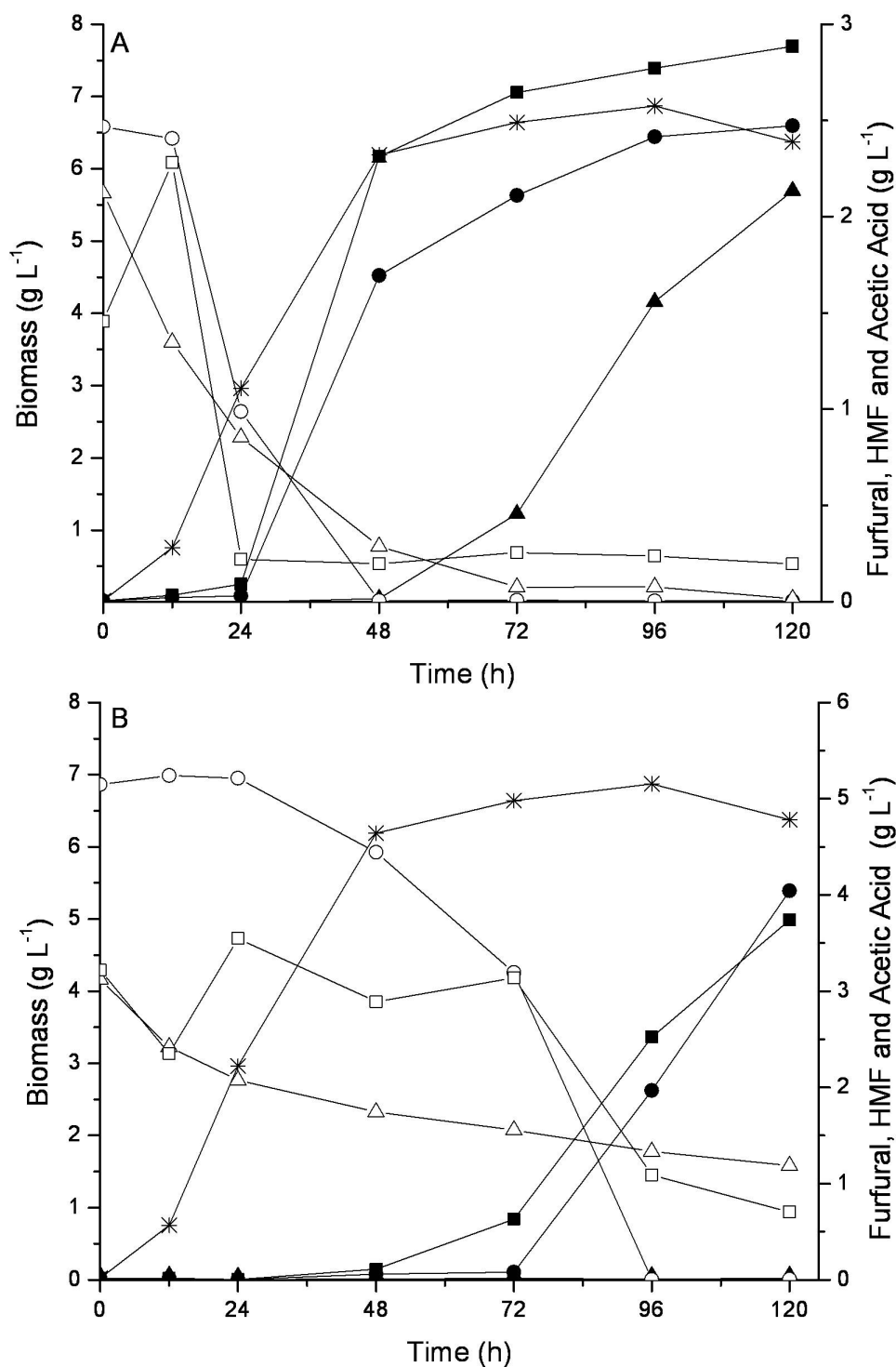


Fig. 4: Effects of toxic compounds over cultures of *S. arborariae* NRRL Y-48658. (A) Concentrations of (in g L⁻¹): furfural 2, HMF 2.5, acetic acid 1.6; (B) Concentrations of (in g L⁻¹): furfural 3, HMF 5, acetic acid 3.2. Biomass production in condition control (*); biomass production in culture with of acetic acid (■); biomass production in culture with of HMF (●); biomass production in culture with of furfural (▲); acetic acid concentration (□); HMF concentration (○); furfural concentration (△).

