

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Davi Ludvig Gonçalves

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL A PARTIR DE HIDROLIZADOS
ENZIMÁTICOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE**

Florianópolis, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Davi Ludvig Gonçalves

**PRODUÇÃO DE ÁLCOOL COMBUSTÍVEL A PARTIR DE HIDROLIZADOS
ENZIMÁTICOS DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR LEVEDURAS
INDUSTRIAIS E LEVEDURAS FERMENTADORAS DE XILOSE**

Dissertação Apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Santa Catarina, visando à obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Boris U. Stambuk

Florianópolis, Fevereiro de 2010.

Parte dos resultados desta dissertação foram apresentados nos seguintes meios:

GONÇALVES, D.L.; MOURO, A.; ROSA, C.A.; STAMBUK, B.U. Hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar e fermentação por diferentes linhagens de leveduras fermentadoras de pentose e hexose. **In: IX Simpósio de Hidrólise Enzimática de Biomassa**, 2009, Maringá, PR, Brasil. Programa e Índices. p.48, 2009.

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

AGRADECIMENTOS

Ao professor Boris Stambuk, pela orientação, paciência e amizade, mas principalmente por ter acreditado em mim e ser um exemplo para nós orientandos de um grande professor e pesquisador.

À professora Elba Bon, do Instituto de Química da UFRJ, por gentilmente disponibilizar o laboratório de Tecnologia Enzimática e pela preciosa experiência e conhecimentos adquiridos nos dois meses que lá fiquei.

Aos amigos que fiz na UFRJ, Ricardo, Rodrigo, Débora e Raul, pela grande amizade e por terem me auxiliado sempre nos experimentos que lá realizei.

Aos meus amigos do laboratório, Sérgio, Marcelo, Rafael, Augusto, Francisco, Adriane, Ludmila, Eduarda e Gabriela. Pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer e conviver.

Ao programa de pós-graduação e biotecnologia, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional que tive nesses dois anos de mestrado.

A secretaria do programa, Joice, sempre disposta a ajudar e resolver os problemas.

À minha mãe Norma, tudo que sou devo a essa mulher incrível. O amor e a gratidão que tenho por essa mulher me fazem querer ser melhor a cada dia. Ao meu pai Darci, que com seu jeito simples me ensinou o que nos livros jamais encontrei.

À FINEP e a Capes pelo auxílio financeiro.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE GERAL	6
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABELAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	14
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO ETANOL.....	15
3.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MICRORGANISMOS UTILIZADOS	17
3.2.1 Características gerais das leveduras	17
3.2.2 Características gerais dos fungos filamentosos	18
3.3 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	19
3.4 PRÉ-TRATAMENTO DA BIOMASSA	22
3.5 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DA BIOMASSA	23
3.6 HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO EM SEPARADO (SHF).....	26
3.7 SACARIFICAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA (SSF).....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 LINHAGENS DE LEVEDURAS UTILIZADAS	28
4.2 MÉTODOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS LEVEDURAS.....	28
4.3 TESTES ANALÍTICOS	29
4.4 PRODUÇÃO DE CELULASES	29
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA	31
4.5.1 Atividade de FPase (FPU)	31
4.5.2 Atividade de CMCase	32
4.5.3 Atividade de β -glicosidase (BGU).....	32
4.6 HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	33
4.7 TESTES FERMENTATIVOS EM SHF	33
4.8 TESTES FERMENTATIVOS EM SSF.....	34
4.9 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO DE CÉLULAS DE LEVEDURA	35
4.10 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE E VITALIDADE CÉLULAR	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÕES	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fermentações em batelada do hidrolisado “D” utilizando as linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1 e PE-2.....	39
Figura 2: Fermentações em batelada com ciclos de células do hidrolisado “D” utilizando a linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2..	42
Figura 3: Fermentações em batelada com ciclos de células do hidrolisado “A” utilizando a linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2..	43
Figura 4: Fermentações em batelada com ciclos de células do hidrolisado “C” utilizando a linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 ..	44
Figura 5: Fermentações em batelada com ciclos de células utilizando a linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2 em meio YPDX.....	46
Figura 6: Sacarificação e fermentação simultânea (processo SSF) utilizando a linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2:.....	50
Figura 7: Fermentação em batelada do hidrolisado “A” utilizando a levedura <i>Pichia stipitis</i> (linhagem IHM 43.2).....	53
Figura 8: Fermentação em batelada do hidrolisado “A” utilizando a levedura <i>Candida shehatae</i> (linhagem HM 43.2)....	54
Figura 9: Fermentação em batelada do hidrolisado “A” utilizando a levedura <i>Candida shehatae</i> (linhagem HM 52.2) ...	55
Figura 10: Fermentação em batelada simples do hidrolisado “A” utilizando a levedura <i>Spathaspora arborariae</i> (linhagem HM19.1a). ..	57
Figura 11: Fermentação em batelada de meio YP contendo glicose e xilose utilizando a levedura <i>Spathaspora arborariae</i> (linhagem HMA 19.1a).....	58
Figura 12: Fermentações em batelada com ciclo de células do hidrolisado “C” utilizando a levedura <i>S. arborariae</i> (linhagem HMA 19.1a) ..	59

Figura 13: Fermentações em batelada com reciclo de células do hidrolisado “C” utilizando a levedura <i>C. shehatae</i> (linhagem HM 52.2).....	60
--	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição do Meio Mandels modificado, utilizado para os crescimentos do fungo <i>Trichoderma reesei</i> RUT C 30.	30
Tabela 2: Composição do Meio Breccia, utilizado para os crescimentos do fungo <i>Aspergillus awamori</i>	31
Tabela 3: Rendimentos obtidos nas hidrólises enzimáticas do bagaço de cana-de-açúcar.....	38
Tabela 4: Velocidades específicas máximas de consumo de açúcares e produção de etanol da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> PE-2:	47
Tabela 5: Velocidades específicas máximas de consumo de açúcares e produção de etanol pelas leveduras <i>S. arborariae</i> (linhagem HMA 19.1a) e <i>C. shehatae</i> (linhagem HM 52.2)..	61

RESUMO

A demanda de etanol tem crescido ultimamente devido ao esgotamento das reservas mundiais de petróleo e à necessidade de utilização de combustíveis menos agressivos ao meio ambiente. Após o sucesso do etanol, recentemente o bioetanol vem ganhando destaque, em virtude da busca por uma maior produção deste combustível por hectare, através do aproveitamento da biomassa lignocelulósica, sendo que no caso do Brasil o bagaço da cana-de-açúcar constitui uma interessante matéria prima para este fim. Para vencer este desafio, no entanto é preciso disponibilizar os açúcares da biomassa para que possam ser fermentados. Neste sentido o presente trabalho utilizou esta biomassa lignocelulósica que foi submetida a um pré-tratamento por cozimento a vapor, este material foi então submetido à hidrólise enzimática por um consórcio de enzimas produzidas pelos fungos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamori*. Embora os hidrolisados obtidos tenham alcançado razoáveis concentrações de açúcares fermentescíveis ($\sim 18 \text{ g L}^{-1}$), o mesmo possibilitou boa produção de etanol pelas diferentes linhagens de leveduras fermentadoras de pentose e hexose aqui avaliadas. Entre as linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas a que obteve melhor desempenho foi a linhagem PE-2 com produções máximas de 10 g L^{-1} de etanol em ensaios fermentativos em batelada com ciclos de célula. Entretanto, a análise da vitalidade das células apontou para uma perda na capacidade fermentativa desta cepa, principalmente nas fermentações em batelada com ciclos, levando a hipótese, corroborada pelas fermentações em meio definido contendo glicose e xilose, de que algo presente no hidrolisado foi responsável por essa queda na capacidade fermentativa desta levedura. Entre as cepas com habilidade de fermentar pentose (xilose) *Candida shehatae* (linhagem HM 52.2) e *Spathaspora arborariae* (linhagem HM 19.1a) obtiveram os melhores resultados em produção de etanol e consumo de xilose, com produções máximas de até 11 g L^{-1} de etanol. Além das fermentações em batelada do hidrolisado, foi realizado também uma sacarificação e fermentação simultânea com a cepa PE-2, onde a produção de etanol (9 g L^{-1}) só não foi maior devido à baixa concentração inicial de glicose no meio, aliado à baixa atividade enzimática das celulasas utilizadas.

Palavras-chave: Bagaço de cana-de-açúcar; hidrólise enzimática; fermentação.

ABSTRACT

The demand for ethanol has increased lately due to the depletion of world oil reserves and the need to use fuels that are less harmful to the environment. After the success of ethanol, bioethanol has been recently gaining attention, due to the need for greater ethanol production per hectare through the use of lignocellulosic biomass. In the case of Brazil, bagasse from sugar cane is an interesting raw material for this purpose. However, it is necessary that the sugars from the biomass should be made available, so that they can be fermented. For these means, the present study used this lignocellulosic biomass subjected to a pre-treatment by steam cooking, this material was then submitted to enzymatic hydrolysis by a consortium of enzymes produced by the fungi *T. reesei* RUT C30 and *A. awamori*. Although the hydrolysates did not reach high concentrations of fermentable sugars ($\sim 18\text{ g L}^{-1}$), it allowed good ethanol production by different strains of yeast fermenting pentose and hexose studied here. Among the industrial strains of *S. cerevisiae* studied, the one that achieved the best performance was strain PE-2, with maximal production of ethanol of 10 g L^{-1} in batch fermentations with cell recycle. However, vitality assays showed a drop in the fermentation capacity of this strain, specially during batch fermentations with cell recycle, leading to the hypothesis, supported by fermentations in defined medium containing glucose and xylose, that something present in the hydrolyzate was responsible for this decrease in the fermentation capacity of this yeast. Among the strains with the ability to ferment pentose (xylose), *C. shehatae* (strain HM 52.2) and *S. arborariae* (strain HM 19.1a) were the ones that obtained the best results for ethanol production and xylose consumption, with maximal production of up to 11 g L^{-1} of ethanol. Besides the batch fermentations of the hydrolyzates, a simultaneous saccharification and fermentation with strain PE-2 was also performed, where the production of ethanol (9 g L^{-1}) was not higher due to a low initial glucose concentration in the medium, with a low enzymatic activity of the cellulases employed.

Keywords; bagasse of sugar-cane, enzymatic hydrolysis, fermentation.

1. INTRODUÇÃO

Embora a economia mundial esteja ainda muito dependente dos combustíveis fósseis, novas fontes de energia vêm se destacando como possíveis substituintes destes combustíveis altamente poluentes. Neste cenário, o etanol tem destaque como um combustível renovável e pouco poluente.

O etanol é produzido principalmente a partir da fermentação de substratos ricos em carboidratos oriundas do milho, da cana-de-açúcar, da beterraba e de outras matérias-primas fermentescíveis. O principal microrganismo produtor de etanol é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, que tem sido usada por décadas para a obtenção deste combustível em várias partes do mundo. Esta levedura é também utilizada em processos industriais para a obtenção de vários outros produtos, como pães, vinhos e cervejas (TORTORA *et al.*, 2005).

As tecnologias de obtenção de etanol a partir de cana-de-açúcar e milho, as duas principais fontes de carboidratos fermentescíveis empregadas pelas indústrias, já foram otimizadas e hoje rendem altas concentrações de etanol por hectare com custo competitivo. Entretanto, a consolidação do etanol como combustível do futuro deve passar pelo desafio de aumentar ainda mais a produtividade deste, sem aumentar o seu custo e de forma que suas culturas não avancem sobre outras culturas agrícolas, o que impactaria a produção de alimento. Neste sentido a utilização da biomassa lignocelulósica vem sendo amplamente estudada para a produção do etanol chamado de segunda geração, ou Bioetanol como é também conhecido, devido à sua grande disponibilidade, baixo custo e à grande quantidade de açúcares fermentescíveis, embora não prontamente disponíveis (MIYAFUJI *et al.*, 2003).

Estes açúcares fermentescíveis da porção celulósica e hemicelulósica da biomassa podem ser obtidos mediante um pré-tratamento sob alta pressão seguida da hidrólise enzimática, para sua posterior fermentação. No entanto esse processo pode ser otimizado via SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*) onde a hidrólise enzimática e a fermentação ocorrem juntas,

aumentando os rendimentos em etanol e diminuindo os custos operacionais (WINGREN *et al.*, 2003; ÖHGREN *et al.*, 2006).

Outros fatores corroboram a vantagem de se utilizar esta biomassa como, por exemplo, o fato de que o excedente do bagaço de cana-de-açúcar não utilizado pelas usinas tende a aumentar proporcionalmente à produção de etanol. Deve ser destacada ainda a capacidade da biomassa lignocelulósica de se adaptar à atual infra-estrutura sucro-alcooleira do Brasil, que conta atualmente com 325 plantas em operação (GOLDEMBERG, 2008), devendo haver apenas algumas adaptações nestas unidades para a fermentação de hidrolisados de biomassa.

Embora já existam cepas de *S. cerevisiae* engenheiradas capazes de fermentar pentoses (ÖHGREN *et al.*, 2006), o presente trabalho visa à otimização da fermentação das hexoses da fração celulósica deste bagaço por cepas industriais de *S. cerevisiae*, visto que seu rendimento final aliado ao custo dos diversos processos que culminam na obtenção do etanol no Brasil sugere que esta estratégia seja a mais eficiente e prontamente aplicável na indústria (STAMBUK *et al.*, 2008). No entanto será abordada também a fermentação de xilose, presente na porção hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, por leveduras isoladas no Brasil e que apresentam habilidade de fermentar este açúcar.

Com o objetivo de melhorar o aproveitamento dos açúcares presentes no bagaço, foram avaliadas também algumas linhagens de leveduras recentemente isoladas no Brasil pelo grupo do prof. Carlos Rosa (UFMG), cepas essas com habilidade de fermentar a xilose presente na porção hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

2. OBJETIVO GERAL

Estudar os parâmetros fermentativos e a resposta celular de linhagens industriais da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e de leveduras capazes de fermentar xilose, quando submetidas a processos de fermentação em batelada de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente, a fim de se estabelecer a melhor condição de fermentação e produção industrial do Bioetanol.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Produzir celulases, hemicelulases e outras enzimas necessárias à hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, a partir dos fungos filamentosos *Trichoderma reesei* RUT C30 e *Aspergillus awamori*;
2. Produzir hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando as enzimas produzidas acima;
3. Avaliar o desempenho fermentativo das linhagens industriais de *S. cerevisiae* CAT-1 e PE-2, e das leveduras fermentadoras de xilose *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* e *Spathaspora arborariae* em hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana, nos processos de fermentação em batelada com reciclo das células;
4. Avaliar o desempenho fermentativo de linhagens industriais de *S. cerevisiae* com hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana no sistema SSF;
5. Avaliar a viabilidade e vitalidade celular das linhagens de *S. cerevisiae* durante os processos fermentativos descritos acima, em particular após vários reciclos celulares;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A importância econômica do Etanol

Após a eclosão da crise do petróleo na década de 1970, com o objetivo de diminuir a dependência dos combustíveis fósseis em sua matriz energética, o Brasil implementa o programa do Proálcool. Em 1984, os carros a álcool constituíam cerca de 90% da produção das montadoras. No entanto, no final de 1985, ocorre uma forte queda no mercado internacional do petróleo, onde o preço passou de US\$ 36/barril para US\$ 15/barril; esse episódio, aliado à recuperação dos preços do açúcar no mercado externo, demonstrou a vulnerabilidade do programa Proálcool. Com a recuperação dos preços do açúcar, a atratividade do etanol foi muito ofuscada, impondo ao governo a necessidade de aumentar os subsídios aos produtores (ATALA, 2004).

Em alguns casos a Petrobrás chegou a pagar mais caro pelo litro de álcool do que o preço cobrado nos postos de abastecimento. Os preços do diesel e da gasolina foram artificialmente elevados para cobrir parte do déficit, levando o Proálcool a um processo de estagnação. Apesar dos problemas e do declínio do programa Proálcool no final da década de 80, o incentivo de sua produção durante o auge do programa geraram muitos estudos e avanços na área da produção do etanol, tanto no sentido de aumentar a quantidade como a qualidade do álcool produzido no país (ATALA, 2004).

A demanda de etanol no mundo é, atualmente, superior a 1,8 bilhões de galões por ano, e por meio de cálculos foi estimado que essa demanda tende a crescer a uma taxa anual de 1,7 por cento até o ano de 2020 (MDIC, 2008). No Brasil, a produção de álcool movimenta, anualmente, cerca de 12 bilhões de dólares e emprega, diretamente, aproximadamente um milhão de trabalhadores, e indiretamente cerca de 3,5 milhões, com a maior parte das unidades produtoras e de mercado de trabalho localizadas nos estados de São Paulo e do Paraná. O Brasil colheu na safra 2006/2007 aproximadamente 470 milhões de toneladas de cana para a fabricação de álcool combustível e açúcar, possibilitando a destilação de 18 bilhões de litros de etanol. Nos oito primeiros meses de 2005, as

exportações brasileiras de álcool alcançaram 1,6 bilhões de litros, o que representa um faturamento de US\$ 450 milhões.

O Brasil encontra-se desta forma em uma posição privilegiada em relação aos outros países no que diz respeito ao uso de energia renovável. Uma das vantagens é a perspectiva de incorporação de áreas degradadas destinadas à pecuária ao plantio de cana-de-açúcar, sem competição com a agricultura de alimentos. Outra vantagem está relacionada à possibilidade de múltiplos cultivos dentro do ano. O sistema de safra e safrinha, ou de cultivo de inverno e duplo cultivo de verão, já é uma tendência dominante na produção de grãos no país. Por situar-se, predominantemente, na faixa tropical e subtropical do planeta, o Brasil recebe intensa radiação solar durante todo o ano, o que promove uma maior densidade, por área, na produção (PEREIRA, 2006).

O agronegócio no Brasil é responsável por 20,6% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro e gera 14% dos empregos totais do país, sendo que 6% devido à cana-de-açúcar (CONAB, 2008). Outros países como Japão, Austrália e da União Européia já ensaiam programas com base na utilização do álcool, estimulados por preocupações ambientais (UNICA, 2008).

No Brasil, o álcool combustível é obtido por meio da cana-de-açúcar, que oferece grande quantidade de sacarose, um dissacarídeo formado por uma molécula de α -D-glicose e outra de β -D-frutose, ligados por meio de uma ligação glicosídica (VOET *et al.*, 2000), podendo ser produzido também a partir de inúmeras fontes de carboidratos de matérias-primas vegetais, como amido de milho, beterraba, batata, sorgo doce e outras. Todas estas fontes de açúcares contêm, em diferentes quantidades e proporções, usualmente uma mistura de mono e dissacarídeos (OLSSON; NIELSEN, 1997). A glicose está sempre presente nestas fontes de carboidratos e, sendo o monossacarídeo mais abundante no planeta, provocou a adaptação do metabolismo dos microorganismos terrestres a sua pronta detecção e rápido consumo, e no caso das leveduras, à fermentação alcoólica (JOHNSTON, 1999).

3.2 Características gerais dos microrganismos utilizados

3.2.1 Características gerais das leveduras

As leveduras são microrganismos eucariontes que vivem como saprófitos ou parasitas. Normalmente são encontradas na natureza associadas a vegetais, insetos, húmus e outros substratos. De modo geral, as leveduras preferem usar glicose, frutose ou manose, porém são capazes de crescer em uma grande variedade de fontes de carbono (CARLE-URIOSTE *et al.*, 1998). Devido a sua capacidade fermentativa a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na indústria de panificação, na produção industrial de cervejas, vinhos, aguardentes e outras bebidas fermentadas, e na produção de etanol a partir de caldo de cana ou melação, sendo o principal microrganismo utilizado na produção de álcool combustível (TORTORA *et al.*, 2005).

Além de sua aplicação na indústria de alimentos e combustíveis, *S. cerevisiae* é um organismo amplamente utilizado como modelo de organismos eucariotos em pesquisa científica, por ser visto como um organismo seguro, já que não produz toxinas e nem possui patogenicidade a humanos. Isto foi de grande vantagem, pois não seriam necessários extensos e intensos testes antes que um produto produzido com este microrganismo pudesse ser comercializado (HENSING, 1995). Os conhecimentos de biologia molecular e genética da *S. cerevisiae* são extremamente avançados (seu genoma inteiro foi elucidado em 1996), fazendo com que sua manipulação genética seja relativamente simples e rápida, visto que as leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem quase tão rápido quanto as bactérias, com uma maquinaria de tradução típica de eucariotos e com um genoma que é apenas 1/100 do de mamíferos (TORTORA *et al.*, 2005).

Boa parte do sucesso da levedura *S.cerevisiae* é devido à sua alta capacidade de fermentar quando exposta a altas concentrações de açúcar, resultando em uma produção rápida de etanol até mesmo na presença de oxigênio (HENSING, 1995). Na fermentação ela utiliza fontes ricas em carbono, como os monossacarídeos (glicose, frutose e galactose) e dissacarídeos (maltose

e sacarose) (FLORES *et al.*, 2000). Um açúcar redutor (monossacarídeo) é um hidrato de carbono, que possui um ou mais grupos cetona ou aldeído livres ou potencialmente livres, e que em meio alcalino tem a capacidade de reduzir agentes oxidantes. Açúcares não redutores (dissacarídeos como a sacarose) possuem esses grupamentos interligados e tornam-se redutores a partir do momento em que sofrem hidrólise e liberam monossacarídeos nas formas redutoras (VOET *et al.*, 2000). Células de *S. cerevisiae* podem utilizar diferentes tipos de açúcares como fontes de carbono, já que possuem em seu genótipo genes que codificam diversas enzimas para os vários tipos de açúcares utilizados (ERGUN; MUTLU, 2000).

3.2.2 Características gerais dos fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos heterotróficos com a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Neste grupo, muitas espécies são saprófitas, capazes de se desenvolver em matéria orgânica em decomposição, enquanto outras se envolvem em associações parasíticas ou simbióticas com plantas e animais. Além do solo, os principais habitats de fungos filamentosos são plantas vivas ou mortas (BURGSTALLER, 1997). Em cultivos artificiais, o crescimento de fungos filamentosos pode ocorrer na forma de pellets, com as hifas emaranhadas formando pequenas esferas, ou na forma filamentosa, com as hifas dispersas no meio de cultura.

O gênero *Trichoderma* compreende fungos saprófitos que habitam o solo. As espécies de fungos pertencentes a este gênero são tradicionalmente reconhecidas pela capacidade de produzir um grande espectro de enzimas hidrolíticas, incluindo as celulases, hemicelulases e quitinases. O fungo *T. reesei* é derivado de uma única cepa selvagem conhecida (QM6a), possui hifas septadas e polinucleadas, e se reproduz de forma assexuada pela produção de conídios (DORRY, 1997).

O sistema de celulases de *T. reesei* é provavelmente um dos mais extensivamente estudados, principalmente no que diz respeito aos mecanismos de ação das celulases (HENRISSAT, 1994), sendo que dentre os fungos, *T.*

reesei possui um dos mais completos sistemas para a hidrólise de substratos celulósicos já descritos. Este sistema extracelular é composto por 60-80% de celobiohidrolases ou exoglucanases, 20-36% de endoglucanases, e 1% de β -glicosidases, de modo que a atuação sinérgica destes três grupos de enzimas garantem a conversão da biomassa lignocelulósica em glicose e outros açúcares fermentescíveis (MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI, 2006)

O sistema de celulases de *T. reesei* é induzido por celulose (CARLE-URIOSSE *et al.*, 1998), sendo a expressão do sistema feita de forma coordenada, ou seja, o nível relativo das diferentes celulases mantém-se constante em diferentes condições de cultivo (TORIGOI *et al.*, 1996). O dissacarídeo sofrorose, constituído de dois resíduos de glicose em ligação β -1,2, é um dos mais potentes indutores da expressão de celulases em *T. reesei*, e acredita-se que seja o indutor natural do sistema. (STERBERG; MANDELS, 1979). A sofrorose seria produzida a partir de celobiose (dois resíduos de glicose em ligação β -1,4), pela atividade de transglicosilação de β -glicosidases. Esta hipótese é sustentada pela demonstração de que sofrorose e outros dissacarídeos são produzidos pelo sistema de celulases de *T. reesei* in vitro, a partir de celulose e celobiose (VAHERI *et al.*, 1979).

Já o gênero *Aspergillus* constitui um grupo de fungos de grande importância econômica, sendo utilizados há muito tempo, por exemplo, em fermentações industriais para a obtenção de ácido cítrico, utilizando *A. niger*, glicoamilase e várias outras enzimas. Este grupo de fungos se reproduz por meio de esporos, formando micélios compostos por hifas septadas e ramificadas (PELCZAR *et al.*, 1980). Nos últimos anos o fungo *A. awamori* vem ganhando destaque devido a sua grande habilidade de secretar β -glicosidases, visto que *T. reesei* é conhecido por apresentar baixa expressão desse grupo de celulases (DORRY, 1997)

3.3 Biomassa lignocelulósica

Atualmente no Brasil é utilizado o caldo extraído da cana-de-açúcar para a produção de etanol, o que gera diariamente o acúmulo de grandes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar, que geralmente é queimado para a produção de calor e energia. Esse material lignocelulósico poderia ser utilizado para a produção de etanol, caso sejam desenvolvidos processos que permitam a extração dos açúcares fermentescíveis dessa biomassa. Com a implementação deste tipo de processo a produção de etanol no Brasil poderia ter um aumento de pelo menos 30%, sem a necessidade de aumentar as áreas de cultivo da cana-de-açúcar, além de minimizar os problemas ambientais causados pelo depósito ou queima destes resíduos vegetais (PANDEY *et al.*, 2000).

Os materiais lignocelulósicos constituem um recurso renovável amplamente distribuído na natureza, e vêm sendo intensamente estudados para a obtenção de energia e bioconversão em produtos comerciais. São também os compostos orgânicos de maior abundância na biosfera, tendo uma produção anual estimada de 10 a 50×10^9 toneladas, o que corresponde a aproximadamente 60% da biomassa vegetal no mundo (KUHAD; SINGH, 1993).

Atualmente a queima deste resíduo contribuiu para o desenvolvimento do parque sucro-alcooleiro no Brasil, já que confere auto-sustentabilidade energética para as usinas e destilarias. Apesar dessa aplicação, estima-se que entre 10% e 15% do bagaço não possui uma destinação apropriada, tornando-se importante resíduo poluente (PANDEY *et al.*, 2000).

A palha e o bagaço da cana de açúcar, um dos subprodutos gerados durante a produção de açúcar e álcool, são compostos basicamente por carboidratos (70–75%) e lignina (20–24%), que juntos formam complexos rígidos na parede celular (ÖHGREN *et al.*, 2006). Podem ser encontrados ainda, em menores proporções, resinas, taninos, ácidos graxos, fenóis, compostos nitrogenados e sais minerais (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996, NEUREITER *et al.*, 2002).

Devido a esta composição, estima-se que cerca de dois terços da energia existente na cana-de-açúcar está contida no bagaço e na palha, e pode ser usada na produção de álcool combustível. Para tanto se faz necessária a hidrólise das moléculas constituintes da biomassa a fim de se obter um hidrolisado contendo carboidratos que possam ser fermentados por leveduras industriais. Esta biomassa constitui importante fonte energética, uma vez que contém pelo menos

70% de carboidratos, mas que são pouco aproveitados devido ao alto teor de lignina (ÖHGREN *et al.*, 2006).

As galactanas, mananas, arabinanas, e xilanas são homopolissacarídeos formados respectivamente por moléculas das hexoses galactose e manose, e das pentoses arabinose e xilose (ÖHGREN *et al.*, 2006), açúcares que neste trabalho não serão utilizados para a produção de etanol com linhagens industriais de *S. cerevisiae* atualmente em uso no Brasil, incapazes de fermentar pentoses (STAMBUK *et al.*, 2008). Entretanto, serão avaliadas também espécies de leveduras capazes de fermentar tanto as hexoses quanto as pentoses.

As glicanas são os principais carboidratos de interesse na fermentação visando à produção de etanol. As glicanas são homopolissacarídeos formados por moléculas da hexose glicose, o mais abundante monossacarídeo do planeta (SUN; CHEN, 2002). No caso da biomassa da cana, a principal glicana presente é a celulose. A celulose é a fonte renovável mais abundante da terra, sendo um polímero linear de unidades de glicose, unidas através de ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, com regiões altamente ordenadas ou cristalinas na sua estrutura. Esta fração é composta por unidades repetidas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose com a eliminação de água, através das hidroxilas ligadas aos carbonos 1 e 4. Este dímero se repete constantemente, apresentando o oxigênio que liga os anéis, na posição equatorial (KUHAD; SINGH, 1993; SUN *et al.*, 2004).

Outro polissacarídeo de grande importância é a hemicelulose, que pode representar até 40% do material da parede celular dos vegetais. É um polímero de baixo peso molecular em relação à celulose e é composto principalmente por pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (galactose, manose e glicose), além de apresentar pequenas quantidades dos ácidos acético e urônico (ÖHGREN *et al.*, 2006). Portanto, este grupo denominado hemicelulose designa uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo cada componente propriedades peculiares.

Por fim, a lignina é o terceiro maior componente na parede celular dos vegetais, possuindo uma estrutura polifenólica complexa constituída basicamente dos álcoois cumarílico, coniferílico e sinapílico, não sendo fermentescível (SUN *et*

al., 2004). A lignina é insolúvel em água e dificulta a degradação microbiana da celulose e da hemicelulose atuando como suporte para as fibras de celulose (KUHAD; SINGH, 1993). A concentração de lignina é, portanto um elemento importante na presunção do valor energético de uma planta, uma vez que quanto menor a quantidade de lignina maior a facilidade na hidrólise dos carboidratos (FUKUSHIMA *et al.*, 2002).

3.4 Pré-tratamento da biomassa

Um aproveitamento integral e mais eficiente dos materiais lignocelulósicos pode ser conseguido mediante a separação das principais frações lignocelulósicas em moléculas mais simples (PARAJÓ *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2004). Processos tais como hidrólise ácida (PESSOA Jr. *et al.*, 1997; IRANMAHOOB *et al.*, 2002; SUN; CHEN, 2002; MUSSATO; ROBERTO, 2004; PURWADI *et al.*, 2004; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005), enzimática (PARAJÓ *et al.*, 1997; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005), explosão a vapor (SUN *et al.*, 2004) e extração com soluções alcalinas, são métodos que permitem a hidrólise da fração celulósica e hemicelulósica em monossacarídeos.

Devido à sua natureza, a celulose é extremamente resistente ao ataque enzimático, além disso, a hemicelulose e a lignina constituem barreiras que dificultam o acesso destas enzimas à celulose. Sendo assim, o desafio técnico-econômico para a utilização de materiais lignocelulósicos reside em facilitar a atuação das enzimas sobre a celulose contida nestes materiais. Com estas características fica extremamente difícil pensar na utilização dos materiais lignocelulósicos sem um pré-tratamento, isto é evidente na maioria dos trabalhos que tratam da sacarificação de materiais lignocelulósicos (MORIYA *et al.*, 2005; KURABI *et al.*, 2005).

Entre os métodos de degradação utilizados tem-se o químico, que pode ocorrer em meio ácido (hidrólise ácida) ou alcalino, sendo que quando em meio com alta concentração de ácido, a velocidade de degradação é alta, mesmo em condições mais bradas de temperatura (temperaturas inferiores a 100 °C). Em

meio básico, essa degradação pode ocorrer em temperaturas superiores a 150 °C e concentrações elevadas de álcalis, ou em temperaturas acima de 70 °C, onde o ataque é realizado na unidade redutora final da molécula de celulose resultando na retirada de uma molécula de glicose na forma de ácido sacarínico (PESSOA Jr *et al.*, 1997)

Apesar da grande disponibilidade de matéria prima, a fermentação de hidrolisados obtidos de materiais lignocelulósicos pelo processo de hidrólise ácida apresenta problemas diferentes àqueles encontrados na fermentação de misturas de açúcares puros. Isto porque nestes hidrolisados estão presentes, além dos açúcares, compostos tóxicos à atividade microbiana como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e íons metálicos, todos oriundos da hidrólise da estrutura lignocelulósica e corrosão de equipamentos (RODRIGUES *et al.*, 1999).

Outro tipo de pré-tratamento bastante utilizado em usinas brasileiras é o pré-tratamento por explosão a vapor ou auto-hidrólise, neste processo a biomassa lignocelulósica é tratada com vapor de água saturado em alta pressão, seguido de uma rápida despressurização. Já o pré-tratamento conhecido como cozimento a vapor, bastante parecido com o método de explosão a vapor, a hidrólise ocorre em condições semelhantes, no entanto, sem a rápida despressurização. Ambos o tipos de pré-tratamento permitem a solubilização de alguns monômeros e liberação de variados polissacarídeos da fração hemicelulósica, além disso, ocorrem transformações na lignina e um aumento da susceptibilidade da celulose ao posterior ataque das celulasas.

3.5 Hidrólise Enzimática da Biomassa

Diferentes materiais lignocelulósicos vêm sendo utilizados para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, incluindo bagaço de cana (NEUREITER *et al.*, 2002), palha de arroz (LIAW *et al.*, 2008) e cavacos de eucalipto (PARAJÓ *et al.*, 1998). No entanto, apesar das diferenças intrínsecas de cada material, o que determina um maior ou menor rendimento de açúcares monoméricos, a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica ocorre pelo ataque das celulasas

inicialmente na porção amorfa da celulose. Entende-se por celulases um consórcio enzimático formado, basicamente, por endoglucanases, exoglucanases e celobiase, que juntas e de maneira sinérgica hidrolisam ligações do tipo $\beta(1,4)$ da celulose (LYND *et al.*, 2002).

A hidrólise é iniciada pelas endoglucanases (1,4- β -D-glucana-4-glucanoidrolases) referenciadas também como endo-1,4- β -D-glucanases, β -1,4-glucanases, β -1,4-endoglucana hidrolases, álcali celulases, celodextrinases e avicelases. Tais enzimas clivam randomicamente as regiões internas da estrutura amorfa da fibra celulósica, liberando como produtos, oligossacarídeos de diversos graus de polimerização e, conseqüentemente, novos terminais, sendo um redutor e um não redutor (LYND *et al.*, 2002). As endoglucanases são as enzimas responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER, 1996).

O próximo passo é dado pelo grupo de enzimas constituído pelas exoglucanases, celobiohidrolases (CBHs) e pelas glucanohidrolases (GHs). As GHs (nome sistemático 1,4- β -D-glucana-glucanohidrolases) também podem ser denominadas exo-1,4- β -glucosidases, exocelulases, exo- β -1,4-glucosidases, exo- β -1,4-glucanases, β -1,4- β -glucanases e exo-1,4- β -glucanase. Essas enzimas, embora pouco reportadas, possuem uma característica de hidrolisar as fibras celulósicas, liberando glicose diretamente dos terminais do polímero (LYND *et al.*, 2002).

As CBHs (1,4- β -D-glucana-celobiohidrolases) também conhecidas como exo-celobiohidrolases, β -1,4-glucana celobiohidrolases, β -1,4-glucana celobiosilhidrolases, 1,4- β -glucana celobiosidases, exoglucanases, avicelases, C1 celulases, exo- β -1,4-glucana celobiohidrolases e celobiosidases, são enzimas que participam da hidrólise primária da fibra ocasionando uma desestratificação dessa fibra pelo aumento das regiões intersticiais. Um fenômeno presente nesse grupo é a amorfogênese, que embora não tenha seu mecanismo completamente elucidado, promove aumentos na taxa de hidrólise da celulose, por tornar as regiões cristalinas mais expostas ao processo de hidrólise enzimática (ZHANG; LYND, 2004; LYND *et al.*, 2002). Essas enzimas geralmente sofrem inibição pelo seu produto de hidrólise (celobiose) (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005).

Finalmente as β -glucosidásicas, ou β -glucosídeo glucohidrolases, ou ainda gentiobiase, celobiase, emulsina, elaterase, aril- β -glucosidase, β -D-glucosidase, β -glicosídeo glucohidrolase, arbutinase, amigdalina, p-nitrofenil β -glucosidase, primeverosidase, amigdalase, limarase e salicilina (LYND *et al.*, 2005; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005), hidrolisam celobiose e oligossacarídeos solúveis à glicose. Assim como as celobioidrolases, as enzimas β -glucosidásicas também são reportadas por sofrerem inibição por seu produto de hidrólise.

O processo de hidrólise enzimática está sujeito a diversos fatores que podem influenciar o rendimento desta hidrólise, destacando-se a temperatura, pH, teor de sólido e relação enzima-substrato.

Temperatura e pH: É dependente do intervalo em que o complexo enzimático apresenta sua maior atividade. No caso das celulasas a temperatura fica entre 50 e 60 °C e o pH entre 5 e 6 (KURABI *et al.*, 2005; MAIS *et al.*, 2002; FERRER *et al.*, 2002).

Relação enzima-substrato: Esta relação que estabelece a proporção de enzima e a quantidade de biomassa lignocelulósica é de extrema importância, visto que o aumento na concentração de enzima aumenta a velocidade da hidrólise. Porém, o excesso na concentração de enzima pode comprometer a viabilidade do processo devido ao alto custo da enzima. Desta forma pode se encontrar na literatura uma ampla faixa para a relação enzima-substrato que oscila de 1 a 100 unidades/g de substrato (KURABI *et al.*, 2005; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005)

Embora as etapas do processo de hidrólise enzimática tenham sido aqui descritas de maneira separada, em grupos de enzimas, a ação destas enzimas no substrato ocorre de maneira sinérgica entre os diferentes grupos. Dentre os diversos sinergismos possíveis, a literatura descreve os sinergismos exo-endo pelo fato de endoglucanases promoverem a quebra da superfície da celulose em cadeias menores e livres para a ação das celobiohidrolases. Outros tipos de sinergismo são o endo-endo e exo-exo (RYU; MANDELS, 1980).

De qualquer forma, o processo de hidrólise enzimática apresenta diversas vantagens quando comparado a outros processos, tais como a hidrólise ácida,

visto que a hidrólise enzimática ocorre sob condições brandas de pressão, temperatura e pH. Além disso sua alta especificidade elimina a chance de ocorrência de furfurais que dificultem os processos subseqüentes de fermentação (LYND *et al.*, 2002). Atualmente muitos laboratórios tem trabalhado na obtenção de complexos enzimático mais eficientes técnica e economicamente, visto que o custo da produção de enzimas ainda limita o uso destas na produção de açúcares solúveis (RECZEY *et al.*, 1996; MUTHUVELAYUDHAM; VIRUTHAGIRI, 2006).

3.6 Hidrolise e Fermentação em Separado (SHF)

Neste caso a hidrólise ocorre num estágio separado da fermentação, podendo a etapa de hidrólise ser realizada química ou enzimaticamente. Quando utilizado um agente químico podem ser formados compostos inibidores da fermentação. Por isso, dependendo da severidade da hidrólise, podem ser requeridas etapas de detoxificação.

A hidrólise enzimática é conduzida, como vimos, geralmente em condições brandas de pH e temperatura. No entanto a dificuldade deste processo reside no acúmulo da glicose e polissacarídeos, provenientes da hidrólise, que atuam como inibidores enzimáticos de algumas enzimas envolvidas, decorrendo muitas vezes numa hidrólise incompleta da celulose. Ao termino da hidrólise, o resíduo sólido é então separado e o sobrenadante (hidrolisado) é empregado para fermentação por microrganismos (WINGREN *et al.*, 2003).

3.7 Sacarificação e Fermentação Simultânea (SSF)

Como visto acima, o etanol pode ser produzido da biomassa lignocelulósica usando um pré-tratamento mais brando, seguido da hidrólise enzimática e posterior fermentação (SONDEREGGER *et al.*, 2004). No entanto a hidrólise enzimática e a fermentação podem ser conduzidas simultaneamente, tal processo é referido como SSF (*Simultaneous Saccharification and Fermentation*)

ou Sacarificação e Fermentação Simultânea (TAKAGI *et al.*, 1977 apud ÖHGREN *et al.*, 2006).

O processo SSF tem sido comprovado como superior ao processo separado de hidrólise e posterior fermentação (ÖHGREN *et al.*, 2006), visto que em SSF a combinação de dois processos reduz o custo operacional (WINGREN *et al.*, 2003) e a elevada concentração de etanol reduz a contaminação com ácido láctico produzido por bactérias, além de proporcionar considerável diminuição na formação de produtos inibidores formados durante o pré-tratamento e pela hidrólise dos açúcares, uma vez que estes seriam prontamente fermentados pelas leveduras (OLOFSSON *et al.*, 2008).

Atualmente o organismo mais bem adaptado a todas estas condições é a levedura *S. cerevisiae*, que no Brasil é amplamente utilizada pelas indústrias de bebidas alcoólicas e produção de etanol (GOLDEMBERG, 2008). Na fermentação da biomassa pré-tratada pela *S. cerevisiae*, a glicose contida no meio é primeiramente transportada para o interior da célula por meio de transportadores de hexoses. A glicose é então degradada pela via Embden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica. Nessa via a glicose é quebrada a gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato é oxidado a piruvato, o qual é descarboxilado a acetaldeído. Na reação subsequente o acetaldeído é reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase às custas de NADH⁺. Os NAD⁺ formados são utilizados na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo-se assim o equilíbrio redox (redução-oxidação) na célula. O gliceraldeído-3-fosfato pode alternativamente ser reduzido a glicerol, um sub-produto da fermentação alcoólica (VOET *et al.*, 2000).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagens de leveduras utilizadas

Foram utilizadas linhagens de levedura *S. cerevisiae* industriais (CAT-1 e PE-2), selecionadas para a eficiente produção de álcool combustível no Brasil (AMORIM *et al.*, 2004; AMORIM, 2005; ANDRIETTA *et al.*, 2007; BASSO *et al.*, 2008). Estas leveduras estão disponíveis tanto na forma de células frescas, como na forma seca e liofilizada pronta para uso (ADY, “active dry yeast”), fornecidas pela empresa FERMENTEC Ltda.

Foram utilizadas também linhagens (fornecidas pelo Prof. Dr. Carlos A. Rosa, do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais) das espécies de levedura *Candida shehatae* (linhagens HM 43.2 e HM 52.2), *Pichia stipitis* (linhagem IHM 43.2) e de *Spathaspora arborariae* (linhagem HM 19.1a) (CADETE *et al.*, 2009) a fim de se estudar não apenas o consumo de hexoses, mas também o consumo de pentoses presentes no hidrolisado enzimático produzido.

4.2 Métodos de cultura e condições de cultivo das leveduras

As leveduras foram crescidas aerobicamente em meio rico YP (*Yeast extract, Peptone*) estéril, contendo (em g L⁻¹): 10 de extrato de levedura, 20 de peptona, e 20 de glicose ou xilose como fonte de carbono. Os meios sólidos continham 20 g L⁻¹ de agar bacteriológico. Os cultivos foram realizados sob agitação a 160 RPM a uma temperatura de 28,0°C (±1,0) até atingir a concentração celular desejada. O pH foi ajustado para 5,0 por meio da adição de HCl. A densidade óptica celular foi determinada em espectrofotômetro a 570 nm, e usada para determinar a concentração celular. A densidade óptica foi também correlacionada com o peso seco das células, obtido após filtração e posterior secagem em forno de microondas como será descrito adiante.

4.3 Testes analíticos

Para a determinação da glicose foi utilizado o método enzimático da glicose oxidase/peroxidase, por meio de kits comerciais, seguindo as instruções dos fabricantes. O etanol produzido foi determinado pela reação enzimática com álcool oxidase/peroxidase como previamente descrito (ALVES Jr. *et al.*, 2007). Os açúcares redutores foram determinados por método químico adaptado de Miller (1959), utilizando 50 µL de amostra e incubada com 150 µL de Reagente DNS (1% de ácido dinitrosalicílico, 2 % de NaOH; 20% de tartarato de sódio e potássio e 0,2% de fenol) a 100 °C, por 10 min, sendo em seguida adicionados 800 µL de água destilada. Através de espectrofotometria a 540 nm, foram realizadas as determinações de absorbância, correlacionando as absorbâncias apresentadas pelas amostras, com a equação de reta extraída de uma Curva Padrão, construída a partir de uma solução de glicose ou xilose 0,2% (2 g L⁻¹).

4.4 Produção de celulases

Para a produção de celulases foram utilizados dois fungos filamentosos, *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori*. Este último foi utilizado principalmente pela sua grande habilidade de secretar β-glicosidases, ao contrário de *T. reesei*. Os cultivos de ambos os fungos foram realizados no período de Setembro a Novembro de 2008 no laboratório de Tecnologia Enzimática do Instituto de Química da UFRJ, sob a supervisão da Profa. Dra Elba P. S. Bon.

A propagação dos microrganismos e a obtenção de esporos foram feitas através de cultivo em placas de *Petri* contendo meio de cultura PDA (*Potato Dextrose Agar*). As suspensões de esporos foram obtidas através da adição de solução salina 0,85% (p/v) e raspagem das placas esporuladas. As suspensões obtidas foram centrifugadas e preservadas em solução de glicerol a 10% (p/v) a -20 °C.

Para a obtenção do pré-inóculo de *T. reesei* foi inoculado 1% (v/v) da suspensão de esporos em Meio Mandels modificado (MANDELS; WEBER, 1969) (Tabela 1) e crescido em Erlenmeyers durante 24 horas, 30 °C e 200 RPM em

Shaker horizontal New Brunswick Scientific modelo Innova 4340. Os cultivos destinados a obtenção de celulases foram realizados inoculando-se 10% (v/v) do pré-inóculo em Erlenmeyers contendo o meio Mandels modificado (Tabela 1) durante 4 dias nas mesmas condições do pré-inóculo, porém com pH inicial ajustado para 4,8.

Tabela 1: Composição do Meio Mandels modificado, utilizado para os crescimentos do fungo *Trichoderma reesei* RUT C 30. Neste meio modificado, a celulose foi substituída pela lactose.

Reagentes	Pré- inóculo	Crescimento
	300 mL	300 mL
Uréia - $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	0,09g	0,09g
Sulfato de amônio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,42g	0,42g
Fosfato de Potássio monobásico - KH_2PO_4	0,6g	0,6g
Cloreto de Cálcio - CaCl_2	0,09g	0,09g
Sulfato de Magnésio heptahidratado - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,09g	0,09g
Sulfato Ferroso heptahidratado - $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução)	300 μL	300 μL
Cloreto de Cobalto hexahidratado - $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (solução)	300 μL	300 μL
Sulfato de Manganês tetrahidratado - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (solução)	300 μL	300 μL
Sulfato de Zinco heptahidratado - $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução)	300 μL	300 μL
Extrato de Levedura (0,6% p/v)	0,07g	1,8g
Milhocina (0,6% v/v)	-	1,8 mL
Fonte de Carbono (Lactose) - (3,0 % p/v)	2,25g	9g
Fosfato de sódio monobásico monohidratado	-	3,64g
Fosfato de sódio dibásico heptahidratado	-	1,44g

O pré-inóculo e os cultivos de *A. awamori*, para a obtenção de β -glicosidase foram realizados em condições semelhantes daquelas descritas para *T. reesei*, utilizando o meio Breccia (Tabela 2), e o pré-inóculo foi crescido por 48 horas e os cultivos para obtenção das enzimas foram de 7 dias.

Tabela 2: Composição do Meio Breccia, utilizado para os crescimentos do fungo *Aspergillus awamori*.

Reagentes	Pré- inóculo	Crescimento
	300 mL	300 mL
Nitrato de Sódio – NaNO ₃	0,36g	0,36g
Fosfato de Potássio monobásico - KH ₂ PO ₄	0,9g	0,9g
Fosfato de Potássio dibásico – K ₂ HPO ₄	1,8g	1,8g
Sulfato de Magnésio heptahidratado – MgSO ₄ .7H ₂ O	0,06g	0,06g
Cloreto de Cálcio - CaCl ₂	0,02g	0,02g
Sulfato Ferroso heptahidratado - FeSO ₄ .7H ₂ O (solução)	300 µL	300 µL
Cloreto de Cobalto hexahidratado - CoCl ₂ .6H ₂ O (solução)	300 µL	300 µL
Sulfato de Manganês tetra hidratado - MnSO ₄ .4H ₂ O (solução)	300 µL	300 µL
Sulfato de Zinco heptahidratado - ZnSO ₄ .7H ₂ O (solução)	300 µL	300 µL
Extrato de Levedura (0,6% p/v)	3,6g	3g
Fonte de Carbono (Farelo de Trigo)	9g	9g

Ao final do período de cultivo os meios foram centrifugados a 3000 RPM durante 15 minutos em centrífuga refrigerada Beckman Coulter Allegra 6R. Os sobrenadantes contendo as atividades enzimáticas foram então filtrados em lã de vidro (GF-2), tiveram sua atividade enzimática dosada pelos métodos de CMC_{Case}, FPase e β-glicosidase (descritas a seguir), concentrada através de um módulo Amicon Millipore® com membrana de 30 kDa e finalmente congeladas a -20 °C.

4.5 Determinação da atividade enzimática

Todos os ensaios foram determinados de acordo com a metodologia padrão pela IUPAC (GHOSE, 1987). Para todos os ensaios de dosagem enzimática ou diluição do sobrenadante (quando necessário) foi utilizado tampão citrato de sódio 50 mM, pH 4,8.

4.5.1 Atividade de FPase (FPU)

O método baseia-se na dosagem dos açúcares redutores liberados pela atividade das celulasas sobre o substrato celulósico de papel filtro. O meio reacional é formado por 0,5 mL do sobrenadante do meio de crescimento e uma tira de papel filtro Whatman nº 1 medindo 1x6 cm (aproximadamente 50 mg). A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 60 minutos, sob agitação. Após

isso a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL dessa mistura reacional em um tubo contendo 0,5 mL de DNS (MANDELS *et al.*, 1976 apud RECZEY *et al.*, 1996). O reagente DNS, além de interromper a reação enzimática, possibilita a realização da dosagem da concentração de açúcares redutores produzidos pela ação enzimática (MILLER, 1959). Uma unidade internacional (UI) de FPU (“Filter Paper Unity”) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do teste.

4.5.2 Atividade de CMCase

O método baseia-se na dosagem dos açúcares redutores liberados durante a degradação do substrato carboximetilcelulose (CMC). O meio reacional é formado por 3mL de solução de CMC 4%(p/v) em tampão citrato de sódio e 3mL do sobrenadante das fermentações. A mistura reacional foi incubada a 50 °C, durante 10 minutos, sob agitação. A cada dois minutos, alíquotas de 0,5 mL foram retiradas para a determinação da concentração de açúcares redutores. A reação enzimática foi interrompida pela adição imediata das amostras em um tubo contendo 0,5 mL de DNS. Procedendo-se em seguida a determinação dos açúcares redutores pelo método de Miller (1959). Uma unidade internacional (UI) de CMCcase (carboximetilcelulase) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto nas condições do teste.

4.5.3 Atividade de β -glicosidase (BGU)

O ensaio baseia-se na determinação da concentração de glicose liberada pela ação da celobiohidrolase sobre o dissacarídeo celobiose. O meio reacional é formado por 1 mL de sobrenadante e 1 mL de solução do substrato (celobiose 15 mM em tampão citrato de sódio). A mistura reacional foi incubada a 50 °C por 30 minutos, sob agitação. A reação foi interrompida pela imersão dos tubos em água fervente por 5 minutos e em seguida foi determinada a concentração de glicose por método enzimático comercial seguindo as instruções dos fabricantes (BADOTTI *et al.*, 2006; BATISTA *et al.*, 2004; DÁRIO, 2007). Uma unidade internacional (UI) de BGU (β -glicosidase) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de glicose por minuto nas condições do teste.

4.6 Hidrólise Enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

Para a realização da hidrólise enzimática foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar obtido após um pré-tratamento por cozimento a vapor, onde o material foi submetido à pressão média de 15 atm, elevando a temperatura a 200°C por um período de 7 minutos. Este material foi gentilmente disponibilizado pela professora Elba Bon do Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFRJ. As enzimas utilizadas neste processo foram obtidas dos fungos *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori* como descrito anteriormente. A carga enzimática utilizada foi de 10 BGU/mL (10 mmol/min.mL) e 1 FPU/mL (1 μ mol/min.mL) em tampão 50 mM. citrato de sódio, pH 4,8. As hidrólises enzimáticas foram conduzidas em Erlenmeyers pelo período de 48 horas à 50°C sob agitação constante (200 RPM) em shaker horizontal New Brunswick Scientific.

Visando principalmente a obtenção e quantificação de açúcares provenientes de biomassa lignocelulósica, é prática comum no Laboratório de Tecnologia Enzimática, onde as enzimas e hidrolisados foram obtidos, a adição de inibidores do crescimento microbiano no meio de hidrólise, principalmente azida sódica (NaN_3). A adição desse aditivo embora controle o crescimento microbiano durante a hidrólise enzimática, preservando assim os açúcares monoméricos formados, inibiria a etapa seguinte de fermentação do hidrolisado pelas linhagens de levedura produtoras de álcool.

Devido à alta carga microbiana do bagaço e a impossibilidade do uso de aditivos antimicrobianos, optou-se pela autoclavagem (120 °C por 20 minutos) do bagaço imerso em tampão citrato de sódio pH 4,8, 50 mM. O processo de esterilização do bagaço foi realizado em Erlenmeyers, e após isso se adicionou as enzimas diluídas (descontando-se o volume de tampão utilizado no processo de esterilização).

4.7 Testes Fermentativos em SHF

Foram realizados os testes de fermentação em condições que simulam o principal processo fermentativo utilizado no Brasil para a produção de álcool

combustível, isto é, processos de fermentação em batelada com reciclo de leveduras (DORFLER; AMORIM, 2007; GODOY *et al.*, 2008).

Inicialmente as células foram crescidas a 28 °C e 160 RPM em meios contendo glicose ou xilose como fonte de carbono, lavadas com água, e a concentração final de células foi ajustada em 10 g L⁻¹ de meio e/ou hidrolisado para o teste que simula a fermentação em escala industrial (DÁRIO, 2007). Ao longo das fermentações foram removidas alíquotas do meio, as células centrifugadas a 3400 g por 1 minuto (BADOTTI *et al.*, 2006), e o sobrenadante obtido foi utilizado para determinação de glicose, etanol e de açúcares redutores totais. No final da fermentação, as células foram centrifugadas e re-utilizadas em sucessivos processos fermentativos por 5 a 7 reciclos.

4.8 Testes Fermentativos em SSF

Foram realizadas também fermentações em batelada com SSF, isto é, após o início da hidrólise do bagaço, células de levedura secas foram adicionadas ao hidrolisado. As fermentações em SSF foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 1 L, utilizando-se um volume de 250 mL da mistura bagaço, tampão (citrato de sódio 50 mM, pH 4,8) e enzimas. A quantidade de bagaço utilizado foi de 6% (p/v) (KÁDÁR *et al.*, 2004) e a carga enzimática foi de 1 FPU/mL e 10 BGU/mL.

Inicialmente o meio reacional, sem a adição de levedura, foi submetido a uma pré-hidrólise (OLOFSSON *et al.*, 2008) à 50°C, sob agitação (200 RPM), visando obter uma concentração de açúcares suficientes para o início da fermentação. Após o período de pré-hidrólise, as condições de cultivo foram ajustadas para 37 °C e agitação de 160 RPM (RUDOLF *et al.*, 2005; SASSNER *et al.*, 2006; EKLUND; ZANCCHI, 1995) e adicionada então a levedura (PE-2) de modo a obter-se uma concentração final de 10g de células L⁻¹ no meio. A densidade celular foi acompanhada periodicamente durante às 27 horas em que ocorreram as fermentações em SSF. Ao longo das fermentações foram removidas alíquotas do meio, as células centrifugadas a 3400 g por 1 min (BADOTTI *et al.*, 2006), e o sobrenadante obtido armazenado a -20 °C para posterior determinação de glicose, etanol e de açúcares redutores totais.

4.9 Determinação do peso seco de células de levedura

Para a determinação do peso seco foram retiradas alíquotas de 3 mL dos meios contendo células crescendo em meio YP e glicose ou xilose como fonte de carbono. Esta alíquota foi filtrada em membranas de nitrocelulose e acetato de celulose (0,45 μm) previamente pesados, sendo as células lavadas com 5 mL de água destilada. Após a filtragem as membranas foram alocadas em placas de Petri pequenas (5 cm de diâmetro), tampadas e secas em microondas na máxima potência (900W) durante um minuto, e também em estufa a 80 °C por 12 hs, e posterior pesagem (RICE *et al.*, 1980; BADOTTI *et al.*, 2008).

4.10 Determinação da viabilidade e vitalidade celular

A viabilidade das células foi determinada utilizando-se dois métodos: O primeiro através do plaqueamento de suspensões celulares em meio YP-glicose sólido e contagem das colônias (unidades formadoras de colônias, CFU) após 2-3 dias de crescimento a 28 °C. O segundo através do método de coloração com azul de metileno como descrito por Sami *et al.* (1994). Este método consiste em dissolver 0,01% de azul de metileno em uma solução de 2% citrato de sódio. A essa solução é adicionado igual volume da suspensão celular a ser analisada e, após 5 min a 25 °C, analisa-se as células em câmara hemocitométrica. As células mortas aparecem fortemente coradas de azul.

A vitalidade das células foi determinada pelo teste de acidificação ("acidification power") após a adição de solução de glicose a uma suspensão celular (KARA *et al.*, 1988). A suspensão celular previamente lavada com água destilada a 4 °C foi ressuspensa de modo a atingir a concentração de 20 mg/mL. Em seguida 1,0 ml desta suspensão foram adicionados a 7,0 ml de água destilada. Ajustou-se o pH para 5,0 utilizando-se uma solução 0,05 N de ácido clorídrico e em seguida adicionou-se 1,0 ml de solução 3% de glicose. O pH foi monitorado constantemente, sendo que o poder acidificante é expresso pela diferença entre o pH inicial e o pH após 10 minutos da adição do açúcar ($\Delta\text{pH}/10\text{min}$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A escolha por um bagaço submetido ao método de cozimento à vapor (o bagaço cozido foi disponibilizado pelo Laboratório de Tecnologia Enzimática da UFRJ, ENZITEC) reside no fato de que este é um eficiente método de pré-tratamento empregados para a conversão de biomassas, pois além de se adequar facilmente à estrutura da usina de produção de álcool, possui relativo baixo custo de operação e bom rendimento. Este processo utiliza altas temperaturas e pressão para desestabilizar a estrutura dos materiais lignocelulósicos. Neste processo a maior parte da hemicelulose é removida, contribuindo para o aumento da susceptibilidade da celulose ao ataque hidrolítico. Porém, o processo de cozimento a vapor não gera modificações sobre a lignina contida na biomassa, pelo contrário, existe um aumento na porcentagem da lignina disponível devido à remoção da hemicelulose da biomassa. Este processo é bastante semelhante ao processo de explosão a vapor citado por outros autores (KLINKE, *et al.*, 2004; RUDOLF *et al.*, 2005; ÖHGREN, *et al.*, 2006;), no entanto no processo de cozimento a vapor, não ocorre a rápida descompressão do material, característica marcante do processo de explosão a vapor (SUN *et al.*, 2004).

A primeira etapa deste trabalho (produção de celulases e hidrolisados enzimáticos), realizada no ENZITEC, possibilitou a obtenção de aproximadamente 18 litros de sobrenadante contendo celulases, entre aquelas provenientes do fungo *T. reesei* RUT C30 e *A. awamori*, que foram preservadas em frascos estocados a -20°C. Embora o volume de sobrenadante obtido seja alto, a atividade geralmente fica abaixo do ideal para as hidrólises enzimáticas. Sendo assim a prática de concentrar o sobrenadante e desta forma aumentar o desempenho das enzimas ali contidas é comum no ENZITEC. Através do uso do sistema Amicon MILLIPORE® foi possível filtrar o sobrenadante, eliminando partículas menores que 30 kDa e água, não correndo o risco desta forma de perda significativa de celulases ou mesmo hemicelulases. Este procedimento possibilitou a obtenção de sobrenadantes com aproximadamente 2 UI/mL de atividade de FPase e 7,8 UI/mL de atividade CMCCase para a preparações enzimáticas obtidas do *T. reesei*, e 24 UI/mL de atividade de β -glicosidase e 6,4 UI/mL de atividade CMCCase para aquelas preparações obtidas de *A. awamori*.

As hidrólises enzimáticas foram conduzidas a 50°C e agitação de 200 rpm com 6% (p/v) do bagaço explodido a vapor em Erlenmeyers de 1 L. Estas hidrólises foram realizadas todas no mesmo dia e nas mesmas condições, diferindo apenas o frasco que as continha, que foram identificados como hidrolisados A, B, C, e D. Este tipo de diferenciação permitiu observar que apesar de estarem todos submetidos às mesmas condições de temperatura, agitação, carga enzimática e volume de bagaço, alguns frascos apresentaram rendimentos de glicose e/ou açúcares redutores diferentes (Tabela 3).

Como pode ser observado na Tabela 3 os hidrolisados apresentaram rendimentos modestos em termos de açúcares fermentescíveis, com conversões em torno de 25 a 30% do total de bagaço utilizado na produção do hidrolisado, e contendo ~18-19 g L⁻¹ de glicose. Este resultado pode ser consequência do não uso de inibidores do crescimento microbiano durante as hidrólises enzimáticas. Embora fosse prática comum no ENZITEC o uso de azida sódica (NaN₃), a adição desse aditivo dificultaria ou mesmo impossibilitaria a fermentação destes hidrolisados pelas linhagens de levedura produtoras de álcool. Desta forma a opção pela autoclavagem do bagaço, ao invés do uso de inibidores, permitiu a condução das hidrólises sem aparente contaminação microbiana durante as 48 horas do processo, mas com o custo de um rendimento modesto de açúcares fermentescíveis. No entanto, apesar de modestas, as concentrações de açúcares obtidos foram suficientes para a realização dos ensaios fermentativos. O hidrolisado “C” se destacou por possuir a menor quantidade de açúcares redutores, quando comparado com os outros hidrolisados.

Tabela 3: Rendimentos obtidos nas hidrólises enzimáticas do bagaço de cana-de-açúcar. Os valores foram obtidos no sobrenadante filtrado após as 48 horas de hidrólise enzimática à 50° C e 200 RPM.

Hidrolisado	pH	Glicose (g L ⁻¹)	Açúcares redutores (g L ⁻¹)*
A	5,36	18,00	12,62
B	5,20	18,30	12,93
C	5,11	19,25	7,32
D	5,15	17,96	9,12

*Excluindo a glicose

Com relação ao pH, como pode ser observado na Tabela 3, os hidrolisados tiveram pouca variação em relação ao pH inicial da hidrólise (4,8). Isto possibilitou conduzir as fermentações alcoólicas sem a necessidade de ajuste de pH, ao contrario do relatado em outros trabalhos (DU PREEZ *et al.*, 1985; MARTÍN *et al.*, 2002; ÖHGREN *et al.*, 2006)

Os primeiros ensaios fermentativos foram realizados com as cepas de *S. cerevisiae* industriais CAT-1 e PE-2. Nestes primeiros ensaios em batelada simples, as leveduras foram crescidas em YP-2% glicose até atingirem a concentração celular correspondente à 1 g L⁻¹, esta concentração celular é desejada por que as células encontram-se na fase final de crescimento exponencial da levedura, permitindo ao mesmo tempo a obtenção da biomassa necessária para realizar as fermentações em batelada com altas densidades celulares. Após atingir a densidade desejada as células foram lavadas e centrifugadas 3 vezes (afim de eliminar resíduos de nutrientes e etanol) e então reesuspendidas diretamente no meio e/ou hidrolisado de modo a ter se uma concentração celular de 10 g L⁻¹.

Como pode ser observado na Figura 1 tanto a linhagem CAT-1 quanto a PE-2 consumiram rapidamente a glicose do meio, exibindo um perfil fermentativo semelhante àquele onde se utilizam meios clássicos como YP-glicose ou sacarose. Embora os rendimentos de etanol tenham ficado um pouco abaixo do esperado (~5 g L⁻¹ de etanol obtido), este primeiro ensaio permitiu verificar que tanto CAT-1 quanto PE-2 exibiram uma alta velocidade máxima específica de consumo de glicose (respectivamente 0,9 e 0,98 g/h.[g biomassa]), sendo que após duas

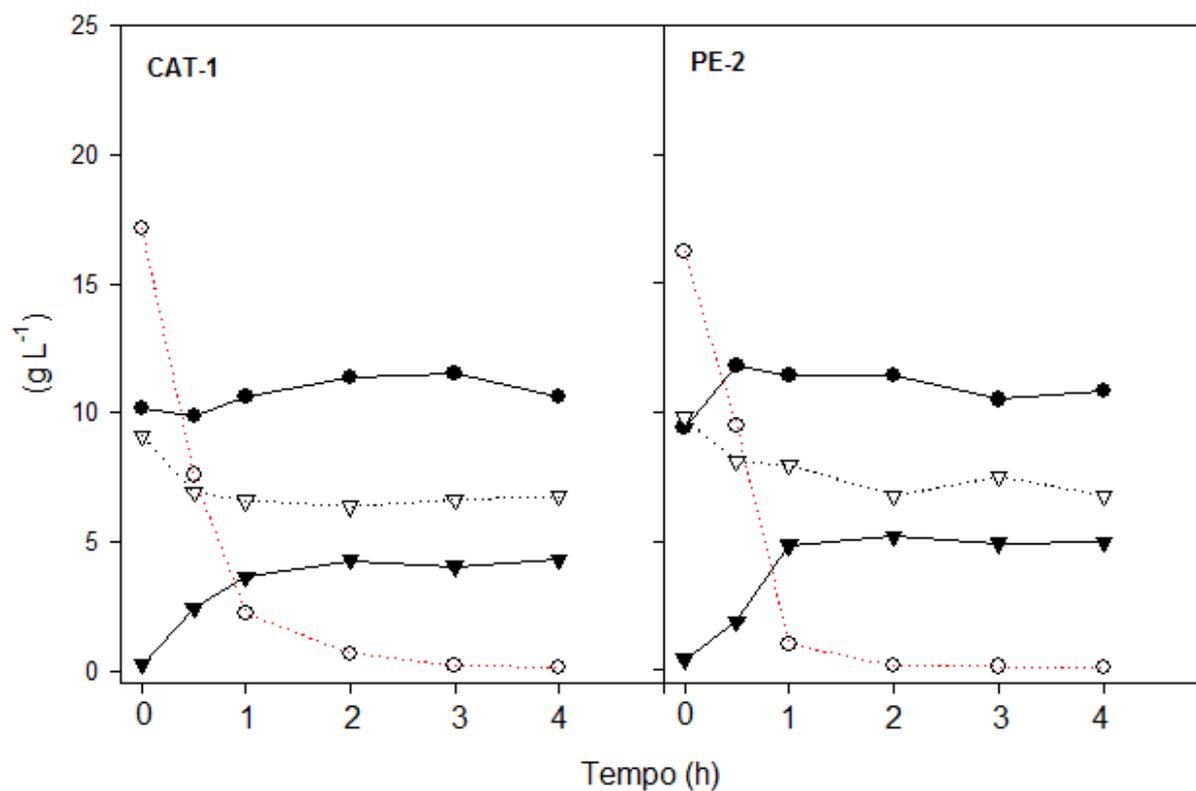


Figura 1: Fermentações em batelada do hidrolisado “D” utilizando as linhagens CAT-1 e PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. As células de *S. cerevisiae* foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% glicose até atingirem a concentração celular de 1 g L^{-1} , centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “D”. Crescimento celular ($\text{—}\bullet\text{—}$), concentração de glicose ($\text{---}\circ\text{---}$), concentração de açúcares redutores (exceto a glicose) ($\text{---}\nabla\text{---}$) e concentração de etanol ($\text{—}\blacktriangledown\text{—}$).

horas do início da fermentação já não havia mais glicose no meio. Com relação à velocidade de produção de etanol as cepas CAT-1 e PE-2 apresentaram respectivamente 0,81 e 0,95 g/h.[g biomassa]. Finalmente, cabe salientar que não ocorre queda significativa na concentração dos açúcares redutores ao longo da fermentação em batelada utilizando as linhagens de *S. cerevisiae* (Figura 1), provavelmente por se tratar de xilose (e outros açúcares) não fermentados por esta levedura.

É possível observar que dentre as duas linhagens, a PE-2 demonstrou um melhor desempenho tanto no que se refere à velocidade de consumo do açúcar, velocidade de produção de etanol, além de obter maior concentração final de etanol no meio. Desta forma optou-se pelo uso desta cepa, como representante das cepas industriais de *S. cerevisiae* nos ensaios fermentativos subsequentes.

Cabe citar que para todas as fermentações realizadas, diferente do encontrado em alguns trabalhos (MARTÍN *et al.*, 2002; ÖHGREN *et al.*, 2006) foi utilizado apenas o hidrolisado enzimático como meio, sem a adição de quaisquer sais ou nutrientes. Este aspecto é relevante a medida que a adição de nutrientes e/ou sais invariavelmente gera maiores custos de produção.

Embora o processo de hidrólise enzimática caracterize-se pela geração de poucos produtos que podem vir a dificultar ou inibir a fermentação, a presença destes compostos merece ser levada em consideração, visto que não raro estes produtos podem ser gerados já durante o processo de pré-tratamento da biomassa, sendo que estes inibidores podem causar danos a parede celular e membranas, inibir o crescimento celular, reduzir a atividade enzimática, inibir a síntese de RNA e proteínas além de reduzir a produção de etanol (KLINKE *et al.*, 2004).

Embora *S. cerevisiae* seja uma levedura tradicionalmente usada para a produção industrial de etanol, este microrganismo caracteriza-se pela sua suscetibilidade a esses inibidores (LEWIS *et al.*, 2009). Desta forma, visando simular um processo comumente utilizado em usinas de álcool e avaliar a suscetibilidade de *S. cerevisiae* frente aos hidrolisados enzimáticos, foram realizadas fermentações em batelada com altas densidades celulares e ciclos

das células. Neste tipo de fermentação as células, que foram pré-crescidas em meio YP-2% glicose até atingirem a densidade celular de 1 g L^{-1} , foram lavadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado enzimático, no entanto após duas horas (tempo necessário para o consumo da glicose do hidrolisado, vide Figura 1) o meio foi centrifugado, o sobrenadante congelado e as células ressuspensas em igual volume de hidrolisado, caracterizando um ciclo fermentativo. Foram realizados 7 ciclos de fermentações em batelada para a levedura PE-2 em diferentes hidrolisados. Inicialmente foi utilizado o mesmo hidrolisado “D” mostrado na Figura 1, onde pode se observar que a cepa PE-2 consumiu toda a glicose dentro do tempo esperado de 2 horas em todos os ciclos iniciais (Figura 2), no entanto, nos últimos ciclos (4 a 7) pode-se observar que as células levaram mais tempo para consumir esse açúcar, levando inclusive à sobra de glicose após a fermentação de 2 horas. Este maior tempo necessário para o consumo da glicose refletiu em uma queda na produção de etanol ao longo dos ciclos, não ultrapassando $7,2 \text{ g L}^{-1}$ de etanol.

Entretanto, este comportamento não foi observado quando o hidrolisado “A” foi utilizado nas fermentações em batelada com reciclo das células da linhagem PE-2 (Figura 3), uma vez que embora ocorresse uma diminuição na velocidade de consumo da glicose, este açúcar foi sempre totalmente consumido nas 2 horas de fermentação e não foi observada queda significativa na performance fermentativa ao longo dos reciclos. De fato, as fermentações deste hidrolisado “A” foram melhores das que as obtidas com o hidrolisado “D”, atingindo concentrações de 10 g L^{-1} de etanol, mesmo nas últimas fermentações em batelada após 5-7 reciclos de células (Figura 3).

Foram realizados também ensaios fermentativos utilizando o hidrolisado “C”, (Figura 4), onde observa-se que embora nos primeiros ciclos o desempenho fermentativo tenha sido bom, ocorre também com este hidrolisado o mesmo fenômeno ocorrido no hidrolisado “D”, onde a diminuição na velocidade de consumo da glicose impossibilitou que a mesma fosse totalmente consumida, o que gerou uma significativa queda na produção de etanol ao longo dos reciclos.

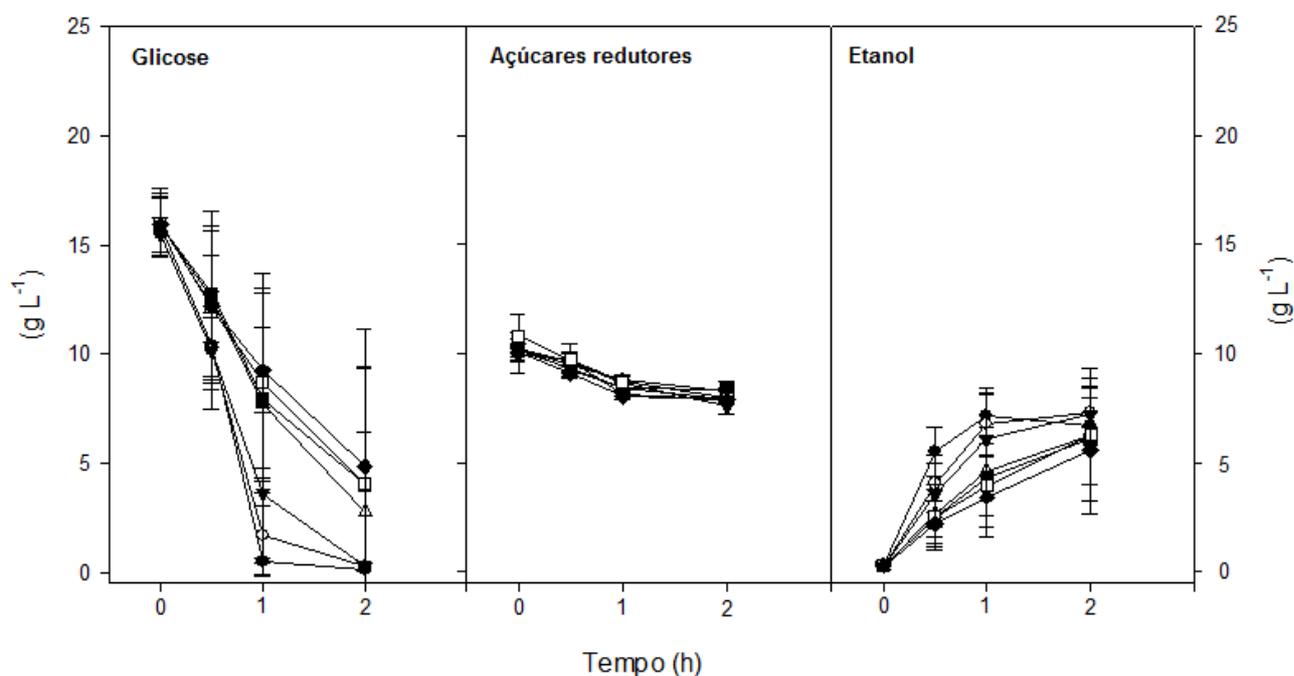


Figura 2: Fermentações em batelada com reciclos de células do hidrolisado “D” com a linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. As células foram pré-crecidas a 28° C em meio YP-2% glicose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “D”. Após um período de 2 horas a partir do início da fermentação, as células foram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume do hidrolisado enzimático, repetindo-se o procedimento por mais 6 ciclos fermentativos. Acima, pode-se observar a concentração de glicose e de açúcares redutores, bem com a produção de etanol ao longo dos ciclos, representados por: ciclo 1 (—●—); ciclo 2 (···○···); ciclo 3 (—▼—); ciclo 4 (··—△—); ciclo 5 (—■—); ciclo 6 (··—□—); ciclo 7 (—◆—).

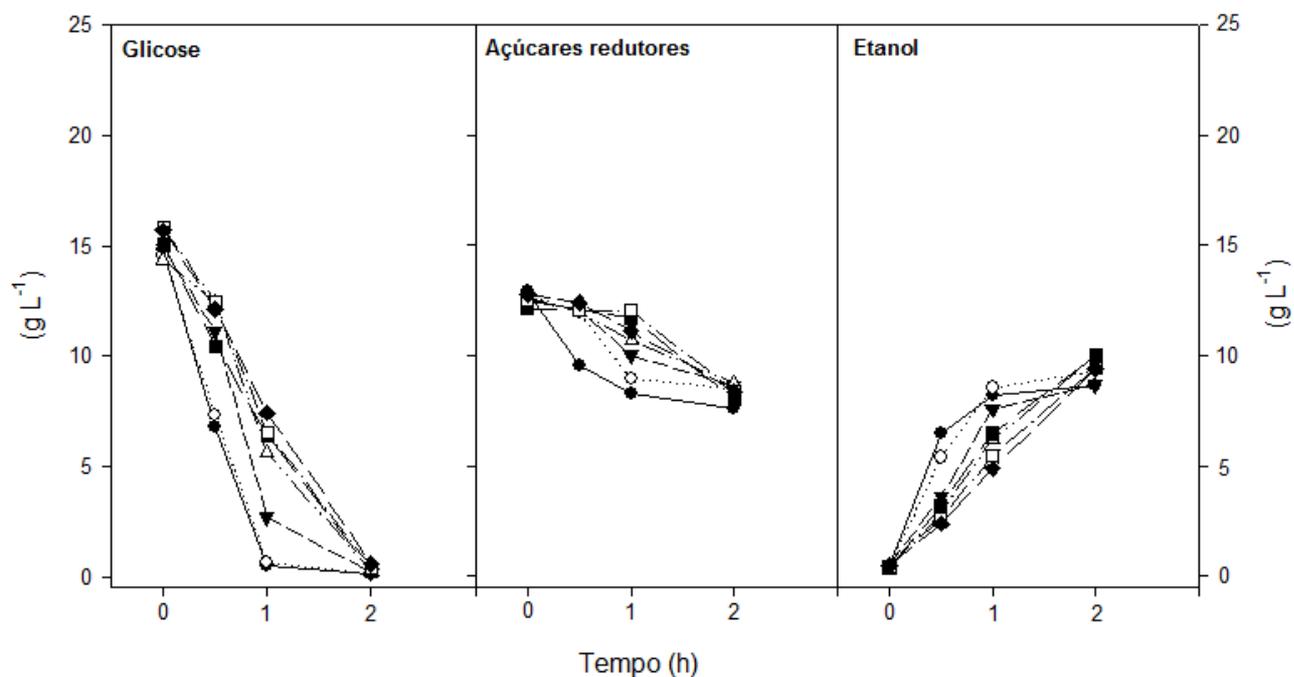


Figura 3: Fermentações em batelada com reciclos de células do hidrolisado “A” utilizando a linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. As células foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% glicose até atingirem a concentração celular de 1 g L^{-1} , centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “A”. Após um período de 2 horas a partir do início da fermentação, as células eram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume do hidrolisado enzimático, repetindo-se o procedimento por mais 6 ciclos fermentativos. Acima, pode-se observar a concentração de glicose e de açúcares redutores, bem com a produção de etanol ao longo dos ciclos, representados por: ciclo 1 (—●—); ciclo 2 (···○···); ciclo 3 (—▼—); ciclo 4 (··—△—); ciclo 5 (—■—); ciclo 6 (··—□··); ciclo 7 (—◆—).

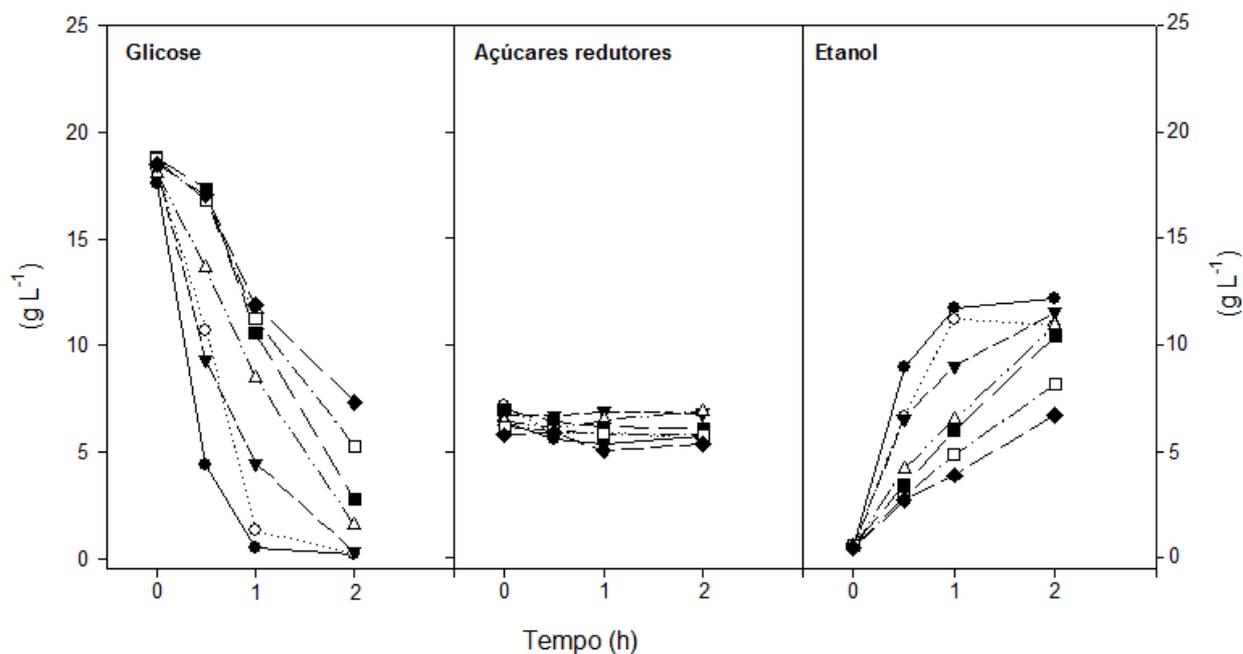


Figura 4: Fermentações em batelada com reciclos de células do hidrolisado “C” utilizando a linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*. As células foram pré-crecidas à 28° C em meio YP-2% glicose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado. Após um período de 2 horas a partir do início da fermentação, as células eram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume do hidrolisado enzimático, repetindo-se o procedimento por mais 6 ciclos fermentativos. Acima, pode-se observar a concentração de glicose e de açúcares redutores, bem com a produção de etanol ao longo dos ciclos, representados por: ciclo 1 (—●—); ciclo 2 (...○...); ciclo 3 (-▼-); ciclo 4 (···△···); ciclo 5 (-■-); ciclo 6 (-□-); ciclo 7 (—◆—).

Nos diversos ensaios fermentativos utilizando esta cepa submetida aos hidrolisados pôde se verificar uma pequena queda na concentração celular ao longo dos ciclos pela remoção das amostras, onde a concentração celular caiu em média 15%. Embora esta queda não tenha sido tão expressiva na maioria das fermentações, este fato aliado ao maior tempo requerido pela levedura para o consumo de toda a glicose nos últimos ciclos, levantou a hipótese de que algo presente no hidrolisado pudesse estar causando algum estresse celular, interferindo assim no consumo da glicose e portanto performance fermentativa. É sabido, por exemplo, que a xilose é um inibidor e inativador das hexoquinases de levedura, podendo portanto interferir diretamente no consumo da glicose pelas leveduras (FERNÁNDEZ *et. al.*, 1985).

Desta forma, a fim de avaliar melhor o comportamento da cepa PE-2 quando submetida a vários ciclos, foram realizados também ensaios fermentativos em meio rico que simulasse as concentrações dos principais açúcares encontrados no hidrolisado enzimático. Utilizou-se então meio rico YP contendo $\sim 18 \text{ g L}^{-1}$ glicose e $\sim 15 \text{ g L}^{-1}$ D-xilose (meio YPDX). Como pode ser observado na Figura 5, a presença da xilose (na concentração testada) teve pouca influência no consumo de glicose e produção de etanol pelas leveduras, mesmo após vários ciclos. Curiosamente, os hidrolisados apresentaram melhor desempenho no que diz respeito à produção de etanol, visto que a máxima concentração atingida pela cepa submetida ao meio YPDX não ultrapassou $6,8 \text{ g L}^{-1}$ de etanol. De fato, outros trabalhos utilizando hidrolisados enzimáticos concordam com os resultados apresentados aqui, onde o desempenho de *S. cerevisiae* supera os valores estequiométricos esperados para a produção de etanol (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1993).

Embora a literatura aponte que *S. cerevisiae* é susceptível ao stress ao longo de ciclos celulares, com perda da sua capacidade fermentativa principalmente após 6-8 ciclos (HEGGART *et al.*, 1999; KOBİ *et al.*, 2004), os dados obtidos apontaram para uma grande diferença no comportamento da PE-2 frente aos dois meios (hidrolisados e YPDX). Como pode ser observado na Tabela 4, as velocidades máximas específicas de consumo de glicose foram maiores no meio YPDX do que os valores obtidos com os diferentes hidrolisados, sendo que nestes últimos o ciclo das células teve maior impacto (queda de 50 a 75%) neste parâmetro, quando comparado ao meio YPDX (máximo de 50%).

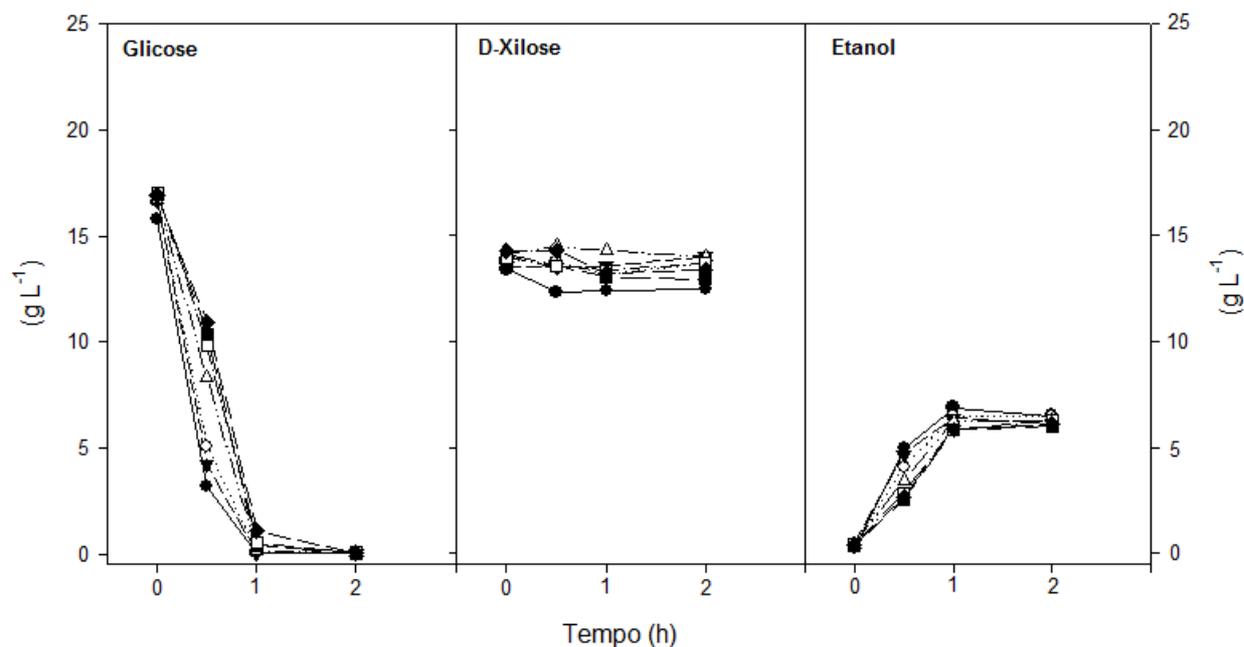


Figura 5: Fermentações em batelada com ciclos de células utilizando a linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPDX. As células foram pré-crescidas à 28^o C em meio YP-2% glicose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no meio YPDX. Após um período de 2 horas a partir do início da fermentação, as células eram centrifugadas e ressuspensas no mesmo volume do meio YPDX, repetindo-se o procedimento por mais 6 ciclos fermentativos. Acima, pode-se observar a concentração de glicose e de açúcares redutores, bem com a produção de etanol ao longo dos ciclos, representados por: ciclo 1 (—●—); ciclo 2 (···◇···); ciclo 3 (—▼—); ciclo 4 (···△···); ciclo 5 (—■—); ciclo 6 (···□···); ciclo 7 (—◆—).

Tabela 4: Velocidade específica máxima de consumo de açúcares e produção de etanol pela linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*: Velocidades específicas máximas da cepa industrial de *S. cerevisiae* PE-2 frente aos hidrolisados enzimáticos (A, C, D) e ao meio YPDX ao longo das fermentações em batelada com reciclo das leveduras. Os valores (expressos como g/h.[g biomassa]) correspondem, respectivamente, à velocidade específica máxima de consumo de glicose ($\mu S_{\text{glicose}} \text{ max}$), velocidade específica máxima de consumo de açúcares redutores (exceto glicose) ($\mu S_{\text{ac. redutores}} \text{ max}$) e velocidade específica máxima de produção de etanol ($\mu P_{\text{etanol}} \text{ max}$).

Ciclos	$\mu S_{\text{glicose}} \text{ max}$.				$\mu S_{\text{ac. redutores}} \text{ max}$.				$\mu P_{\text{etanol}} \text{ max}$.			
	A	C	D	YPDX	A	C	D	YPDX*	A	C	D	YPDX
1	1,30	1,28	1,38	2,28	0,18	0,003	0,016	0,03	1,19	1,20	1,29	1,37
2	1,30	1,28	1,27	2,27	0,14	0,007	0,012	0,01	1,27	1,19	1,33	1,15
3	0,71	1,10	0,76	2,51	0,09	0,003	0,012	0,004	1,14	0,99	1,23	1,14
4	0,39	0,84	0,52	2,13	0,06	0,007	0,016	0,01	1,12	0,96	1,17	1,12
5	0,37	0,72	0,38	1,60	0,01	0,11	0,021	0,03	1,15	0,93	1,00	1,09
6	0,42	0,70	0,37	1,52	0,01	0,03	0,008	0,01	1,02	0,74	0,91	1,08
7	0,33	0,67	0,31	1,28	0,03	0,001	0,006	0,01	0,89	0,60	0,73	0,87

Na Tabela 4 é possível também verificar o baixo consumo dos outros açúcares redutores (excluindo a glicose), enquanto que a velocidade máxima específica de produção de etanol foi afetada pelo reciclo das leveduras (queda de 30 a 50% neste parâmetro).

Visto que a viabilidade assim como a vitalidade das leveduras podem não permanecer constante durante os vários ciclos de fermentação (YAMAGUSHI *et al.*, 2001 HEGGART *et al.*, 1999; KOBI *et al.*, 2004), avaliamos estes dois parâmetros nas células da levedura PE-2 durante as fermentações em batelada do hidrolisado “C” com reciclo das células. A viabilidade foi avaliada através do uso do corante azul de metileno, e também através do plaqueamento de amostras dos meios de fermentação (apropriadamente diluídas) em placas contendo meio rico YP-2% glicose.

O uso do corante azul de metileno permite avaliar o estado fisiológico da levedura, através da capacidade que as células em bom estado fisiológico têm de expulsar ativamente este corante (SAMI *et al.*, 1994). Os resultados obtidos com esta técnica apontaram para uma alta viabilidade celular ao longo dos ciclos, com valores acima de 98% de células viáveis. Já os resultados obtidos em placas indicaram uma diminuição no número de unidades formadoras de colônias, de $15-16 \times 10^8$ células/mL no primeiro ciclo, para $12-13 \times 10^8$ células/mL no último ciclo.

Entretanto, como já comentado acima, a diminuição da densidade celular ao longo dos ciclos é consequência da retirada das amostras dos meios durante as fermentações.

Por outro lado, a vitalidade das células foi determinada pelo teste de poder acidificante (“acidification power”) após a adição de solução de glicose a uma suspensão celular (KARA *et al.*, 1988). Foi possível observar que nos dois primeiros ciclos o teste apontou para um $\Delta\text{pH}/10$ min. de $\sim 0,6$, nos ciclos intermediários (3-6) foi observado um $\Delta\text{pH}/10$ min. de 0,51 a 0,47, enquanto que no último ciclo o $\Delta\text{pH}/10$ min caiu para 0,22. Estes resultados mostram uma queda significativa da vitalidade celular ao longo dos ciclos, ao contrário da viabilidade celular, e ajuda a explicar a perda de capacidade fermentativa máxima exibida pela cepa PE-2 durante os ciclos.

Embora a natureza extremamente complexa do hidrolizado e a indisponibilidade de testes mais precisos dificultem alguma inferência sobre o real motivo desse comportamento diferenciado ao longo dos ciclos celulares, Thomsson e colaboradores (2003, 2005) demonstraram que cepas de leveduras submetidas à depleção de fonte de nitrogênio e/ou de carbono durante 24 h perdem de 70 a 95% de sua capacidade fermentativa. A depleção causa uma queda rápida nos níveis de ATP, fazendo com que as células comecem a degradar as reservas de trealose e glicogênio com o objetivo de manter os níveis de ATP. Uma vez utilizada toda a reserva de carboidratos, passariam então a degradar proteínas celulares, sendo as de membrana (transportadores) mais susceptíveis à degradação. A perda na capacidade fermentativa das células seria então explicada não só pela queda nos níveis de ATP, necessário para os primeiros passos da glicólise (conversão da glicose em glicose-6 fosfato, e de frutose-6 fosfato em frutose-1,6 bifosfato), como também pela perda de transportadores de glicose da membrana (fenômeno denominado inativação catabólica), restringindo portanto o influxo dos açúcares para o interior da célula (LAGUNAS *et al.*, 1982; ROSSEL *et al.*, 2002).

Complementar às fermentações em batelada do hidrolizado enzimático do bagaço de cana-de-açúcar, foi realizada também uma sacarificação e fermentação simultânea (processo SSF) utilizando a cepa de *S. cerevisiae* PE-2. Inicialmente, foi realizado uma pré hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar (OLOFSSON *et al.*, 2008), esta pré hidrólise teve por objetivo fornecer uma

quantidade inicial de glicose suficiente para o início da fermentação. Durante o período de pré hidrólise foram retiradas alíquotas em intervalos de uma hora a fim de acompanhar a geração de glicose no meio ao longo do tempo. Desta forma, após um período de pré hidrólise que durou 8 horas à 50°C, foi ajustada a temperatura para 37°C (RUDOLF *et al.*, 2005; SASSNER *et al.*, 2006; EKLUND; ZANCCHI, 1995), e adicionada a levedura na forma seca pronta para uso (“active dry yeast”) de forma a obter-se uma concentração celular de 10 g L⁻¹. É importante salientar que foi escolhida a temperatura de 37°C, por ser esta temperatura mais alta a recomendada para reativar leveduras secas (POIRIER *et al.*, 1999; LAROCHE; GERVAIS, 2003).

É possível observar na Figura 6 que a concentração de glicose no meio após o período de pré hidrólise atingiu 13,3 g L⁻¹, sendo que após a adição da cepa PE-2 as células inicialmente levam um maior tempo para iniciar o consumo da glicose presente no meio, sendo que somente após 1,5 horas a partir do início da fermentação é que há um consumo significativo desse açúcar e conseqüente produção de etanol. Entretanto, no processo SSF existe um momento no qual o fator limitante deixa de ser o consumo de glicose e a atividade fermentativa da levedura, mas passa a ser a taxa de liberação de glicose por parte das enzimas celulolíticas. De fato, a linhagem PE-2 levou umas 5 horas para consumir toda a glicose do meio (em contraste com as 1-2 horas verificadas nas fermentações em batelada, vide acima), mas como a produção máxima de etanol atingiu ~9 g L⁻¹, este resultado indica que as células tiveram disponível mais glicose (liberada pela hidrólise enzimática) do que a concentração inicial de ~13 g L⁻¹. Após esse período de 5 horas aparentemente não houve mais liberação de glicose no meio, o que pode ser evidenciado pelo fato das células de levedura passarem a consumir o etanol produzido (vide Figura 6). Vale ressaltar que a taxa de liberação de glicose é maior a 50°C (temperatura na qual é realizada a pré hidrólise enzimática), do que na temperatura na qual foi realizado o processo SSF (37°C). A estratégia de se manter a temperatura a 50°C não se aplica ao processo SSF, já que a produção de etanol seria afetada consideravelmente, tendo em vista que nesta temperatura a atividade microbiana ficaria comprometida (OLOFSSON *et al.*, 2008).

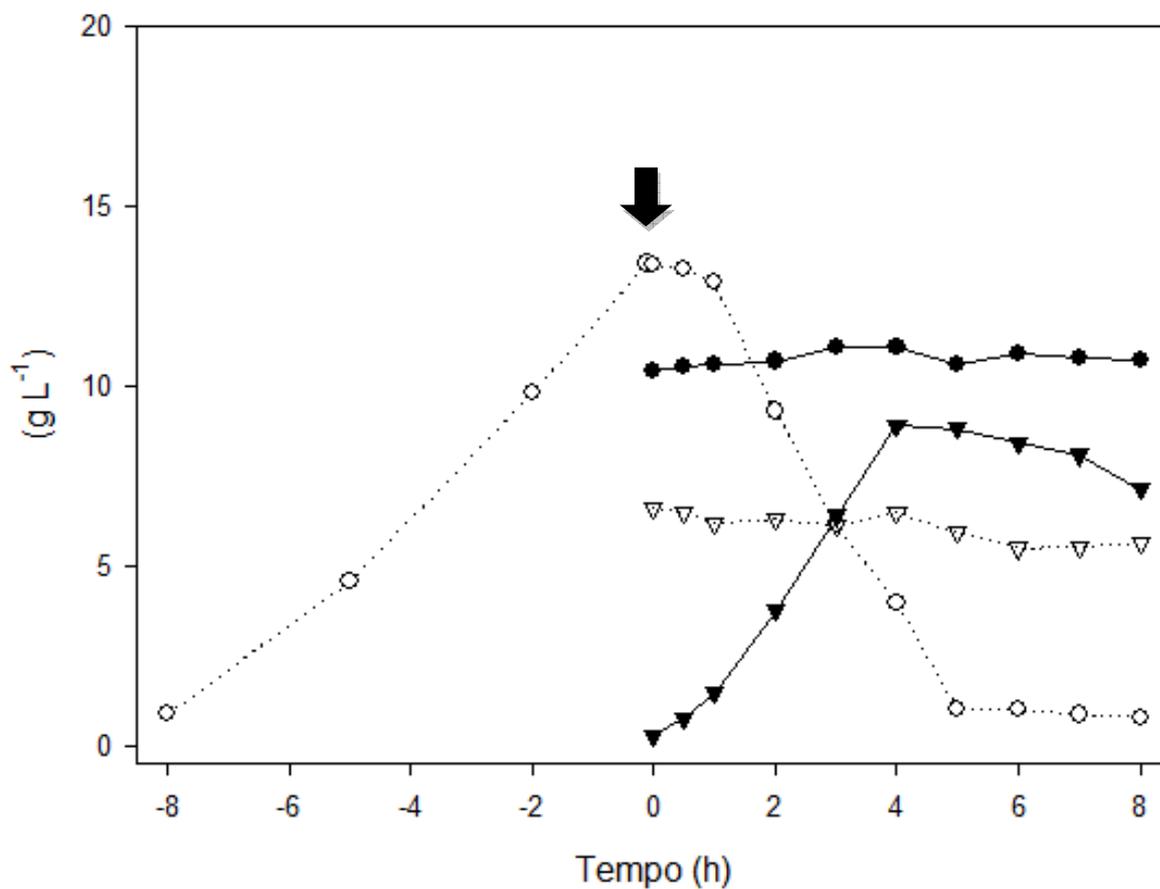


Figura 6: Sacarificação e fermentação simultânea (processo SSF) com a linhagem PE-2 de *Saccharomyces cerevisiae*: Liberação de glicose durante a pré hidrólise a 50°C do bagaço de cana-de-açúcar, sendo que no momento indicado pela seta foram adicionadas as células da linhagem PE-2 (na forma de fermento seco). Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···) e de açúcares redutores (excluindo a glicose) (···▽···), e produção de etanol (—▼—).

Com relação ao teor de sólidos (bagaço) utilizado (6% p/v), a literatura aponta que um alto teor de sólidos pode diminuir a conversão de celulose a glicose (VARGA *et al.*, 2002; FERRER *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2002). Assim, a concentração de bagaço escolhida pode não ter sido a maior responsável pela baixa liberação de glicose ao longo da fermentação. No entanto, experimentos reportados por outros autores com concentrações de bagaço semelhantes obtiveram conversões a etanol maiores, mas foram realizados com uma carga enzimática significativamente maior e em tempos de hidrólise enzimática de 72 horas (FERRER *et al.*, 2002; MARTIN *et al.*, 2002). Cabe salientar que o tempo total de fermentação reportado na Figura 6 para atingir a concentração máxima de etanol foi de apenas 13 horas (8 horas de pré hidrolise mais 5 horas até a depleção total da glicose do meio).

Ainda que *S. cerevisiae* seja uma levedura de alta performance na fermentação de diferentes hexoses, este microrganismo não é capaz de fermentar naturalmente pentoses (STAMBUK *et al.*, 2008). Em razão da alta carga de pentoses presentes no material lignocelulósico (principalmente xilose), nos últimos anos alguns trabalhos tem buscado a fermentação da xilose presente na porção hemicelulósica do material lignocelulósico através da engenharia genética de leveduras *S. cerevisiae* (KARHUMAA *et al.*, 2005; ÖHGREN *et al.*, 2006). A inserção da via de utilização da xilose em *S. cerevisiae*, com inserção dos genes que codificam as enzimas xilose-redutase (XR) e xilitol-desidrogenase (XDH) de outras leveduras, tem se mostrado uma estratégia interessante (TOIVARI *et al.*, 2001; MATSUSHIKA *et al.*, 2009), mas que no entanto ainda enfrenta problemas tais como o acúmulo de xilitol no meio, maior tempo necessário para consumo dos açúcares do meio, além do fato de que a xilose geralmente só é consumida após a depleção da glicose do meio (STAMBUK *et al.*, 2008).

Neste sentido o uso de novas cepas com habilidade de fermentar de maneira eficiente todos os açúcares presentes no hidrolisado vem se mostrando uma necessidade crescente para a consolidação do bioetanol. Assim, em parceria como o Prof. Carlos A. Rosa da UFMG, foram estudadas também algumas leveduras isoladas no Brasil e com habilidade de fermentar D-xilose. Inicialmente foram analisados diversos isolados provenientes da UFMG durante crescimentos em meio YP-2% xilose, sendo que aquelas que obtiveram os melhores

desempenhos (dados não mostrados) foram selecionadas para as fermentações em batelada do hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar.

Como pode ser observado na Figura 7 a levedura fermentadora de xilose *Pichia stipitis* (linhagem IHM 43.2) quando utilizada numa fermentação em batelada com o hidrolisado é capaz de consumir a glicose rapidamente, ao passo que a xilose tem seu consumo mais lento durante toda a fermentação. O etanol para esse isolado tem sua produção máxima alcançada logo nas primeiras horas de fermentação, atingindo valores aparentemente modestos quando se leva em consideração a disponibilidade de açúcares, no entanto muito próximos ao encontrado por Gupta e colaboradores (2009) que obteve $7,13 \text{ g L}^{-1}$ de etanol a partir de uma linhagem de *P. stipitis* partindo de um hidrolisado com 18 g L^{-1} de glicose. Para a linhagem de *P. stipitis* mostrada na Figura 7 as velocidades máximas específicas de consumo de açúcares foram de $0,72$ e $0,16 \text{ g/h} \cdot [\text{g biomassa}]$, respectivamente para glicose e açúcares redutores, e $1,17 \text{ g/h} \cdot [\text{g biomassa}]$ para a produção de etanol. Deve ser observado ainda que a produção de etanol ocorreu apenas enquanto havia glicose no meio, sendo que os demais açúcares redutores (provavelmente a xilose) foram utilizados principalmente para a produção de biomassa.

Comportamento bastante semelhante, sobretudo no que diz respeito ao tempo necessário para consumo dos açúcares e rendimento de etanol, foi observado com a levedura fermentadora de xilose *Candida shehatae* (linhagem HM 43.2) que apresentou boa velocidade de consumo de glicose e um consumo modesto dos açúcares redutores do hidrolisado, com uma produção também modesta de etanol (Figura 8). As velocidades específicas máximas de consumo de glicose e açúcares redutores foram de $0,84$ e $0,36 \text{ g/h} \cdot [\text{g biomassa}]$. Com relação a velocidade específica máxima de produção de etanol, esta foi de $1,09 \text{ g/h} \cdot [\text{g biomassa}]$. Novamente pode se observar que a glicose foi o único açúcar que contribuiu para a produção de etanol, visto que o consumo dos açúcares redutores é acompanhado apenas da produção de biomassa.

Entretanto, outro isolado da levedura *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) apresentou um desempenho fermentativo melhor (Figura 9), quando comparado à linhagem HM 43.2, sendo que diante do mesmo hidrolisado enzimático "A" a linhagem HM 52.2 produziu 10 g L^{-1} de etanol, contra $\sim 7 \text{ g L}^{-1}$ da outra linhagem ou da *P. stipitis* (Figuras 7 e 8). Esta maior produção de etanol deve-se ao fato

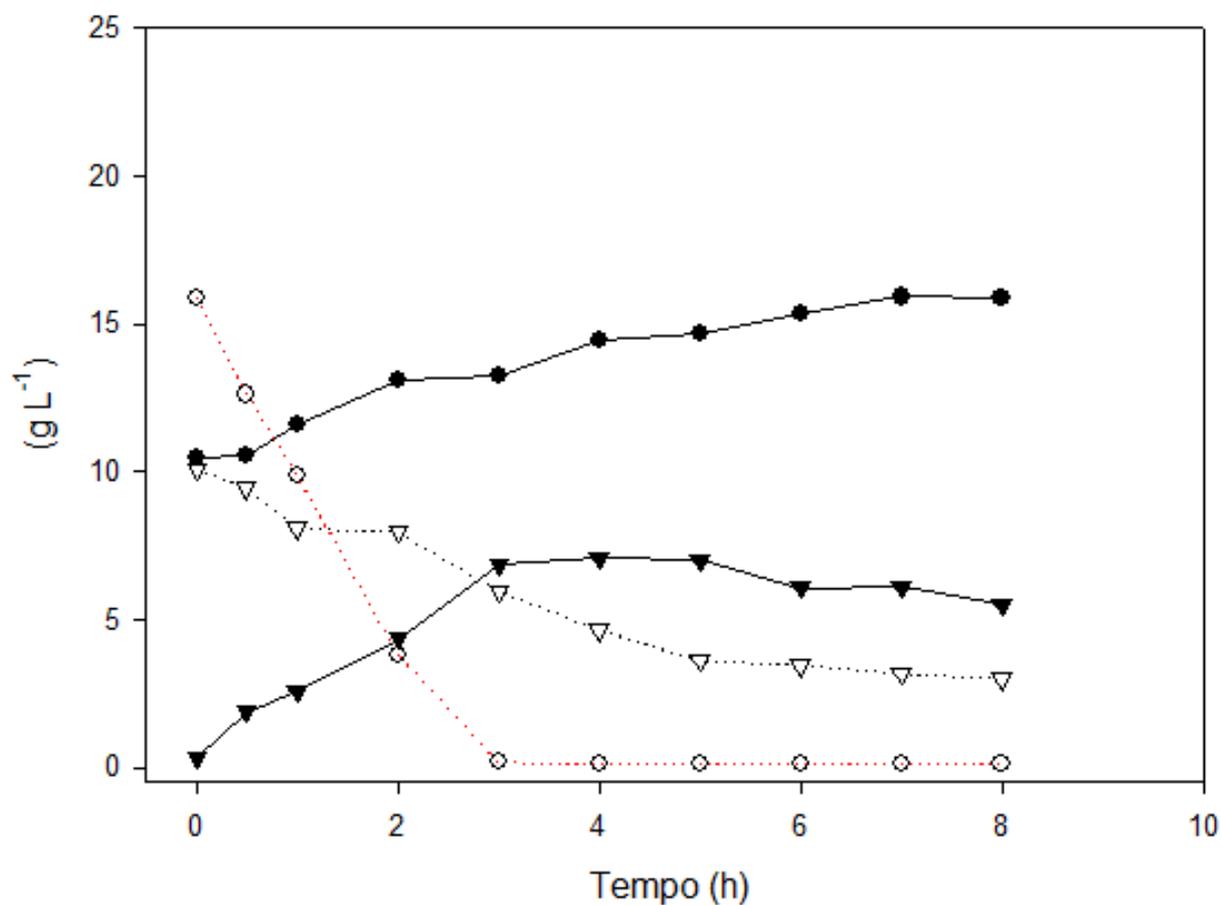


Figura 7: Fermentação em batelada do hidrolisado "A" utilizando a levedura *Pichia stipitis*. As células de *P. stipitis* (linhagem IHM 43.2) foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado "A". Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···), concentração de açúcares redutores (exceto a glicose) (···▽···) e produção de etanol.

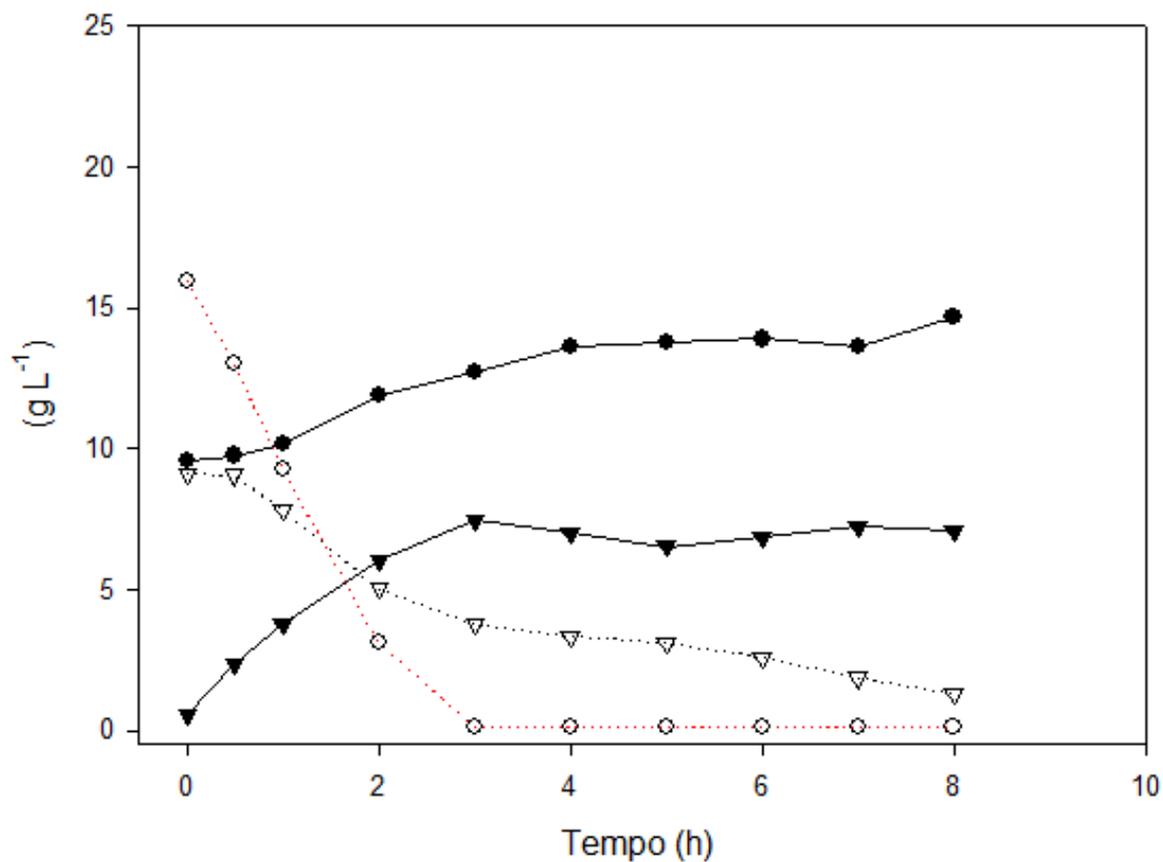


Figura 8: Fermentação em batelada do hidrolisado “A” utilizando a levedura *Candida shehatae* HM 43.2. As células de *C. shehatae* (linhagem HM 43.2) foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “A”. Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···), concentração de açúcares redutores (exceto a glicose) (···▽···), e produção de etanol (—▼—).

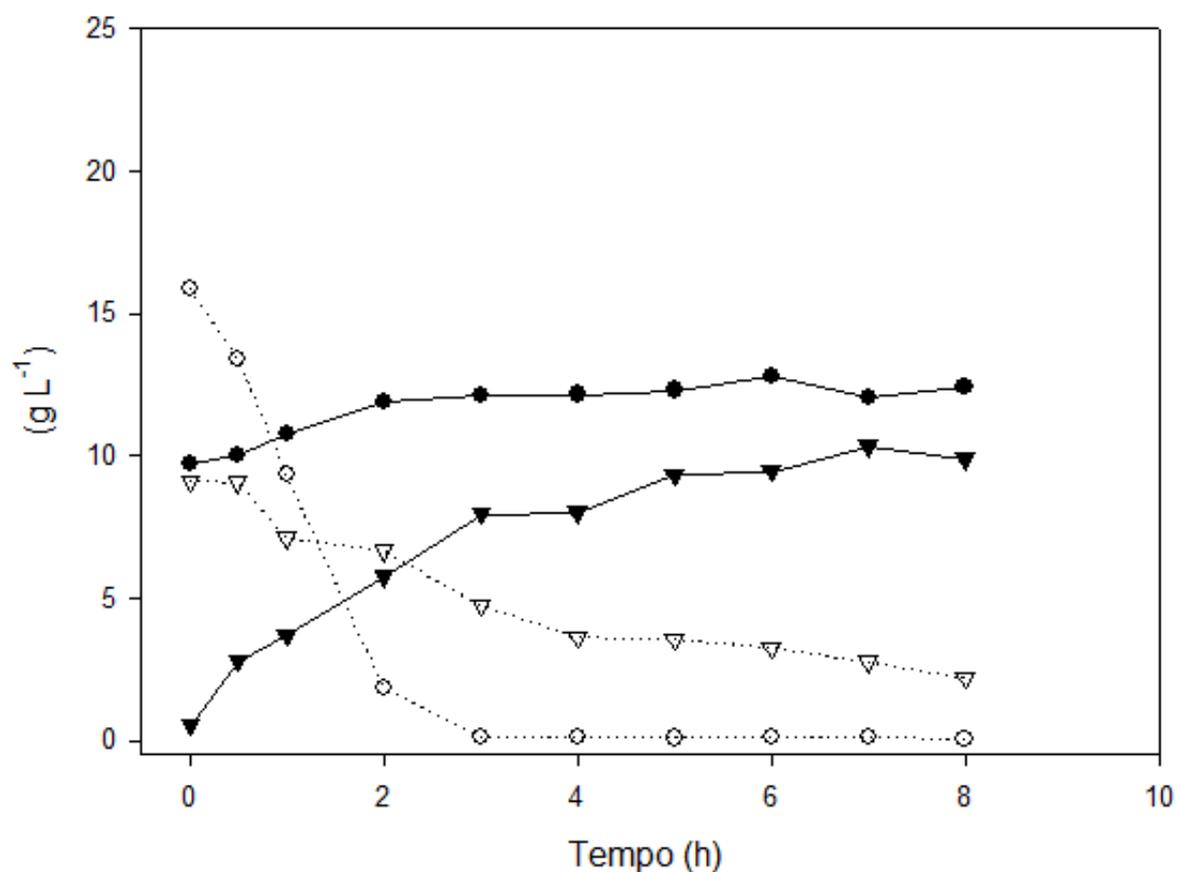


Figura 9: Fermentação em batelada do hidrolisado "A" utilizando a levedura *Candida shehatae* HM 52.2. As células de *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado "A". Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···), concentração de açúcares redutores (exceto a glicose) (···▽···), e produção de etanol (—▼—).

desta linhagem consumir os açúcares redutores do meio, com conseqüente produção de etanol, diferentemente das outras cepas que produziram biomassa durante o consumo destes açúcares.

Outra espécie de levedura avaliada foi a *Spathaspora arborariae* (linhagem HM 19.1a), uma nova espécie de levedura fermentadora de xilose recentemente isolada no Brasil (CADETE *et al.*, 2009). Como pode ser observado na Figura 10, *S. arborariae* apresentou bom desempenho fermentativo em hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar, chegando a produzir 9,5 g L⁻¹ de etanol. Devido ao seu bom desempenho e por se tratar de uma nova espécie, descrita pelo nosso grupo em colaboração com o grupo do professor Carlos A. Rosa (vide CADETE *et al.*, 2009), esta espécie foi submetida também a uma fermentação em batelada do meio rico YP contendo 20 g L⁻¹ de glicose e xilose. Como pode ser observado na Figura 11, esta levedura conseguiu fermentar eficientemente ambos os açúcares, atingindo 21 g L⁻¹ de etanol, embora as células tenham uma preferência para fermentar a glicose (velocidade máxima específica de 0,74 g/h.[g biomassa]) antes da xilose (velocidade máxima específica de 0,33 g/h.[g biomassa]), fenômeno já descrito para outras leveduras fermentadoras de xilose (SANCHES *et al.*, 2002; STAMBUK *et al.*, 2003).

A seguir foram realizadas também fermentações em batelada com reciclo de células do hidrolisado enzimático do bagaço utilizando as duas leveduras que mostraram a melhor performance: a *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) e a *S. arborariae*. No caso desta última levedura foram realizados 5 ciclos de 7 horas de duração cada (Figura 12), sendo este o intervalo de tempo requerido para o consumo dos açúcares fermentescíveis por esta cepa, enquanto que no caso da levedura *C. shehatae* foram realizados apenas 4 ciclos de 8 horas (Figura 13). Como pôde ser observado na Figura 12, *S. arborariae* obteve uma boa performance fermentativa, com produções máximas de etanol da ordem de 9 g L⁻¹ ao longo dos vários ciclos, sendo que tanto a glicose como os outros açúcares redutores (provavelmente xilose) contribuíram para a produção de etanol.

No caso da levedura *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) a produção de etanol foi modesta, com produções máximas de etanol da ordem de 6 g L⁻¹ ao longo dos ciclos. No caso desta levedura, o consumo dos açúcares redutores (exceto glicose) não representou ganho significativo na produção de etanol, ao passo que a produção de biomassa se manteve ascendente ao longo de todos os

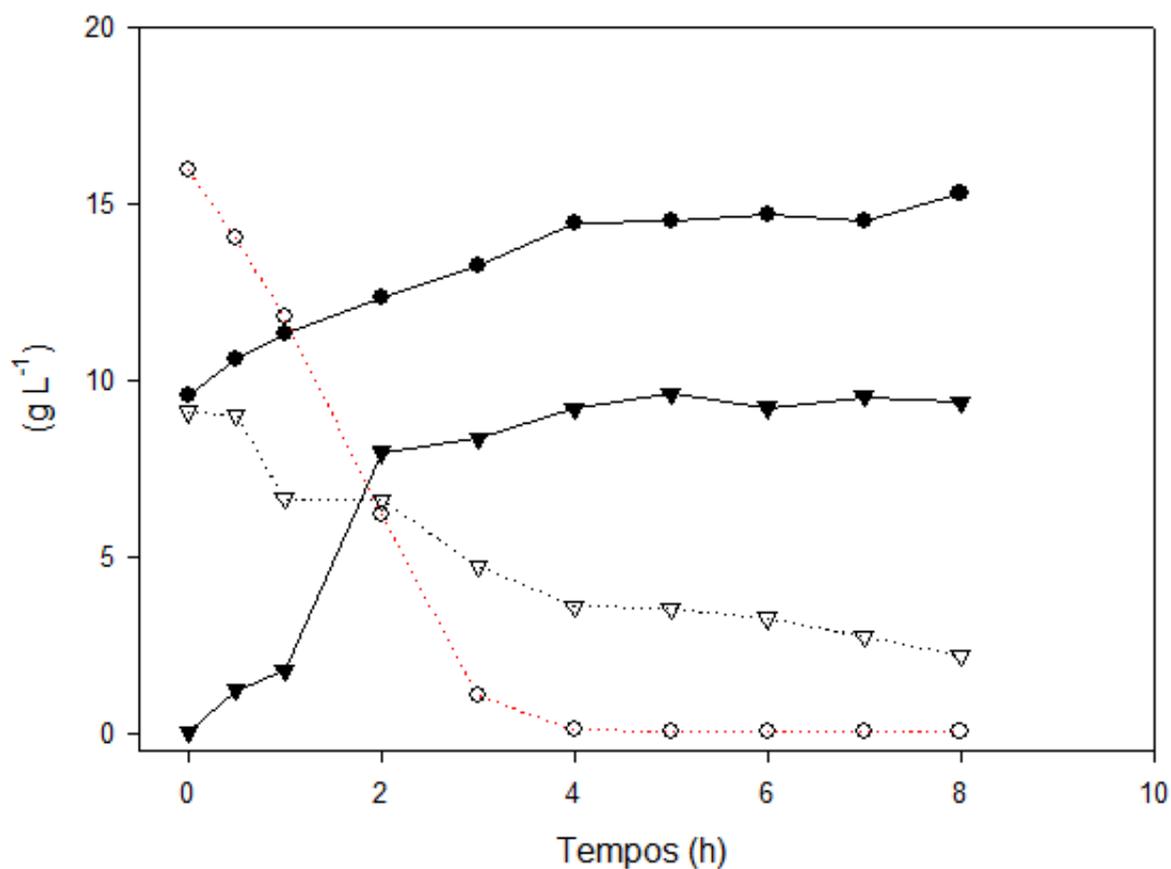


Figura 10: Fermentação em batelada simples do hidrolisado "A" utilizando a levedura *Spathaspora arborariae*. As células de *S. arborariae* (linhagem HM 19.1a) foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado "A". Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···), concentração de açúcares redutores (exceto a glicose) (···▽···), e produção de etanol (—▼—).

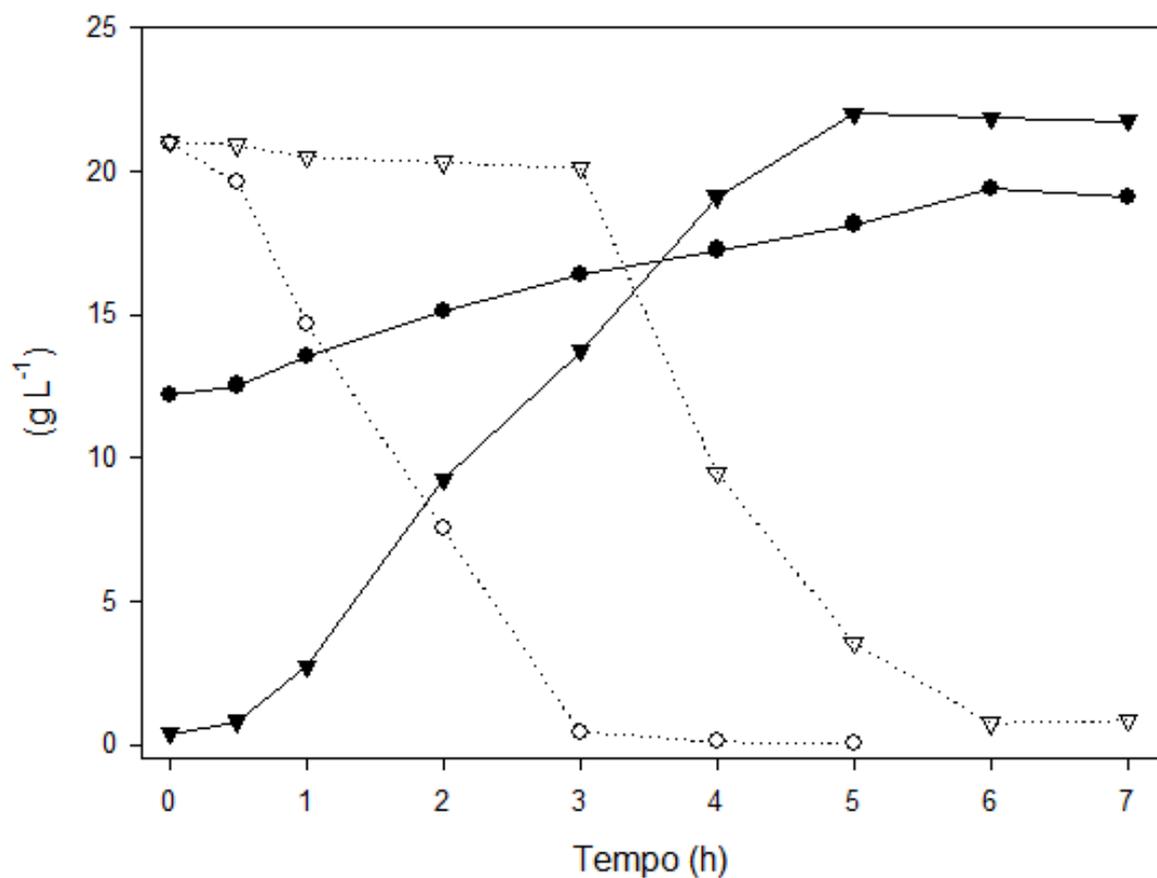


Figura 11: Fermentação em batelada de meio YP contendo glicose e xilose utilizando a levedura *Spathaspora arborariae*. Ensaios fermentativos em meio YPDX utilizando a levedura com habilidade de fermentar D-xilose. As células de *S. arborariae* foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no meio YP contendo 20 g L⁻¹ de glicose e xilose. Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (---○---), concentração de xilose (---▽---), e produção de etanol (—▼—).

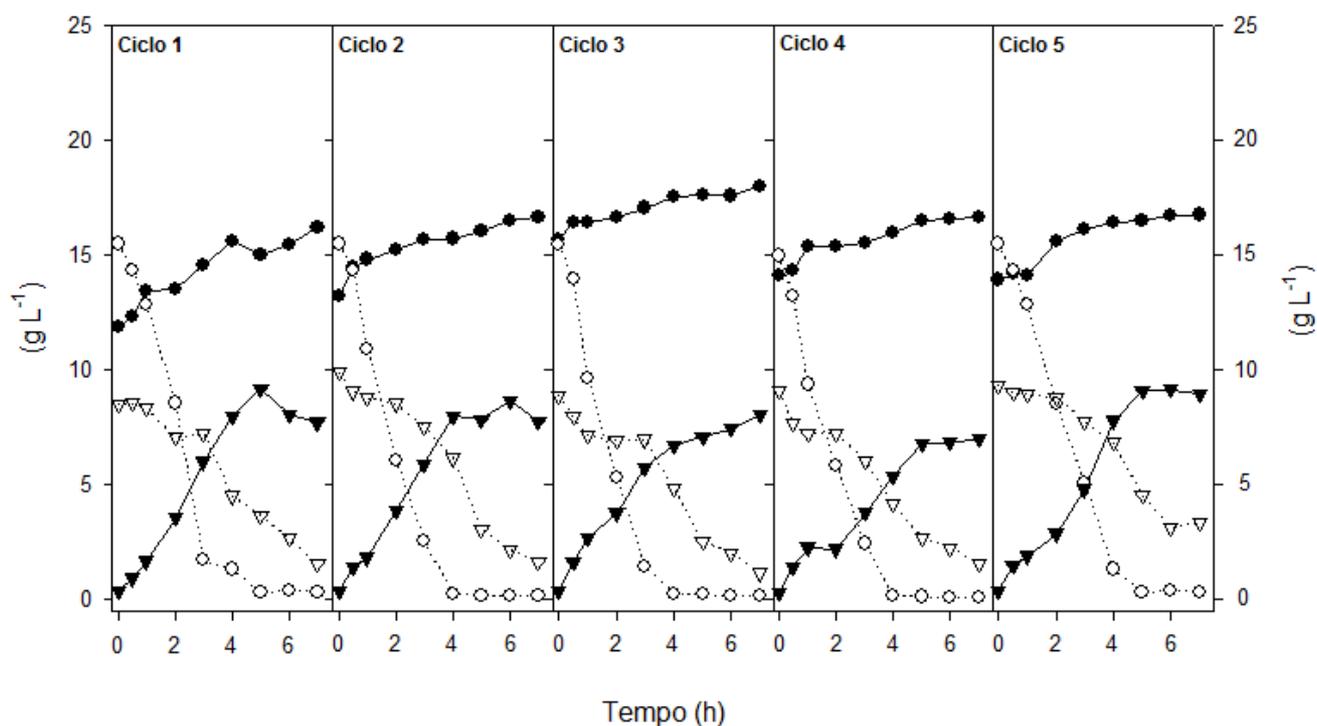


Figura 12 : Fermentações em batelada com reciclo de células do hidrolisado “C” utilizando a levedura *Spathaspora. arborariae*. As células de *S. arborariae* (linhagem HM 19.1a) foram pré-crescidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L^{-1} , centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “C”. Após um período de 7 horas a partir do início da fermentação, as células eram centrifugadas e ressuspensas em mesmo volume do hidrolisado enzimático, repetindo-se o procedimento por mais 4 ciclos fermentativos. Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (···○···), concentração de xilose (···▽···), e produção de etanol (—▼—).

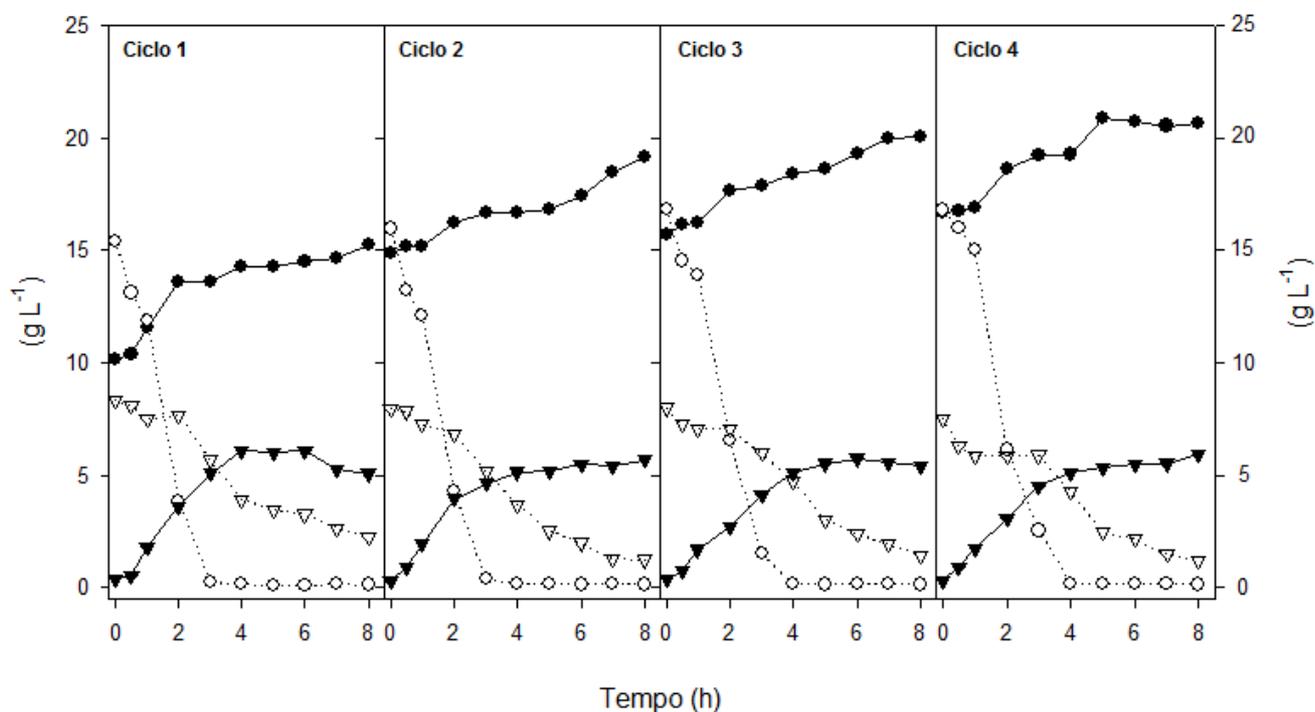


Figura 13: Fermentações em batelada com reciclo de células do hidrolisado “C” utilizando a levedura *Candida shehatae*. As células de *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) foram pré-crecidas à 28° C em meio YP-2% xilose até atingirem a concentração celular de 1 g L⁻¹, centrifugadas e ressuspensas diretamente no hidrolisado “C”. Após um período de 8 horas a partir do início da fermentação, as células eram centrifugadas e ressuspensas em mesmo volume do hidrolisado enzimático, repetindo-se o procedimento por mais 3 ciclos fermentativos. Crescimento celular (—●—), concentração de glicose (---○---), concentração de xilose (---▽---), e produção de etanol (---▲---).

reciclos, com uma velocidade específica máxima de produção de biomassa da ordem de $\sim 0,20 \text{ h}^{-1}$, enquanto que no caso da *S. arborariae* a produção de biomassa foi significativamente menor (velocidade específica máxima de produção de biomassa de $\sim 0,15 \text{ h}^{-1}$) por esta levedura estar provavelmente direcionando preferencialmente o carbono dos açúcares para a produção de etanol. Outra característica interessante observada ao longo dos ciclos é que a perda de capacidade fermentativa nestas leveduras não foi tão acentuada quanto àquela observada com *S. cerevisiae* (PE-2). Isto pode ser visualizado na Tabela 5, onde se observa uma menor oscilação das velocidades específicas máxima de consumo dos açúcares e de produção de etanol, embora o número de ciclos também tenha sido menor quando comparado aos estudos com *S. cerevisiae*.

Tabela 5: Velocidades específicas máximas de consumo de açúcares e produção de etanol pelas leveduras *Spathaspora arborariae* e *Candida shehatae*. Velocidades específicas máximas das leveduras com habilidade de fermentar D-xilose *S. arborariae* (linhagem HM 19.1a) e *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) ao longo das fermentações em batelada do hidrolisado “C” com reciclo das leveduras. Os valores (expressos como g/h.[g biomassa]) correspondem, respectivamente, à velocidade específica máxima de consumo de glicose ($\mu S_{\text{glicose max}}$), velocidade específica máxima de consumo de açúcares redutores (exceto glicose) ($\mu S_{\text{ac. redutores max.}}$) e velocidade específica máxima de produção de etanol ($\mu P_{\text{etanol max.}}$).

Ciclos	$\mu S_{\text{glicose max.}}$		$\mu S_{\text{ac. redutores max.}}$		$\mu P_{\text{etanol max.}}$	
	<i>S. arborariae</i>	<i>C. shehatae</i>	<i>S. arborariae</i>	<i>C. shehatae</i>	<i>S. arborariae</i>	<i>C. shehatae</i>
1	1,98	2,02	0,48	0,40	0,81	0,57
2	1,83	2,01	0,67	0,45	0,76	0,44
3	1,83	2,03	0,53	0,45	0,55	0,44
4	1,55	2,14	0,50	0,39	0,39	0,44
5	1,42	----	0,54	----	0,65	----

5. CONCLUSÕES

1. Os hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar mostraram-se apropriados para a fermentação alcoólica visando à produção de etanol de segunda geração.
2. As linhagens PE-2 e CAT-1 de *S. cerevisiae* demonstrou habilidade em fermentar o hidrolisado mesmo sem a adição de fontes complementares de nutrientes e sais ou mesmo ajuste de pH.
3. Embora tenha se observado uma queda na capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* ao longo dos ciclos celulares no hidrolisado enzimático, o mesmo não foi observado em meio YPD, levando a conclusão de que algo presente no hidrolisado foi responsável pela queda nas velocidades máxima específica de consumo de açúcares e produção de etanol.
4. Não foi observada uma queda significativa na viabilidade celular quando *S. cerevisiae* foi utilizada para a fermentação em batelada do hidrolisado com ciclo de células, mas os resultados de queda da vitalidade celular condizem com a perda de capacidade fermentativa exibida pela cepa PE-2 ao longo dos ciclos.
5. O resultado obtido no processo SSF indicou que este tipo de fermentação apresenta uma maior velocidade de produção de etanol, embora para isso sejam necessários novos estudos, incluindo o uso de uma carga enzimática maior.
6. Das linhagens de levedura com habilidade de fermentar xilose, a *C. shehatae* (linhagem HM 52.2) e *S. arborariae* (linhagem HM 19.1a) foram as que obtiveram os melhores resultados em consumo de açúcares e produção de etanol a partir do hidrolisado enzimático de cana-de-açúcar.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES Jr, S.L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATS, C.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B.U. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Am. Soc. Brew Chem.** v.65, p.99-104, 2007.
- AMORIM, H. V. **Fermentação alcoólica, Ciência & Tecnologia**. Fermentec Editora, Piracicaba, SP, 2005.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.; LOPES, M. L. Identification and selection of yeast strains from alcoholic fermentations in Brazil by electrophoretic karyotyping. *In* **Eleventh International Congress on Yeast**, Rio de Janeiro, RJ. 2004.
- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool, **Int. Sugar J.** v. 109, p. 195-200, 2007.
- ATALA, D. I. P. **Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol**. 172 f. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2004.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v. 49, p.115-123, 2006.
- BADOTTI, F.; DÁRIO, M.G.; ALVES-JR, S.L. CORDIOLI, M.L.; MILETTI, L.C.; DE ARAUJO, P.S.; STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact** 7: 4, 2008.
- BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L.; Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v.8, p. 1155-1163, 2008.
- BATISTA, A. S.; MILETTI, L. C.; STAMBUK, B. U. Sucrose Fermentation By *Saccharomyces cerevisiae* Lacking Hexose Transport. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol**, v. 8, p. 26–33, 2004.
- BURGSTALLER, J. Transport of small ions and molecules trough the plasma membrane of filamentous fungi. **Crit. Rev. Microbiol.**, 23. J-46, 1997.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B.U; LACHANCE, M.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.** v.9, p. 1338-1342, 2009.
- CARLE-URIESTE, J.C.; ESCOBAR-VERA, J.; EL-GOGARY, S. HENRIQUE-SILVA, F.; TORIGOI, O.; CRIVELLARO, O.; HERRERA-ESTRELLA, A.; EL

- CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 8 , p.560-564, 1998.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>> Acessado em Junho de 2008.
- DÁRIO, M.G. **Análise Molecular do Metabolismo de Sacarose por Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* Utilizadas na Produção Industrial de Álcool Combustível**. 92 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFSC, Florianópolis, SC, 2007.
- DORFLER, J.; AMORIM, H. V.; Applied bioethanol technology in Brazil. **Zuckerindustrie** v. 132, p. 694-697, 2007.
- DORRY, H. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. **J. Biol. Chem.**, 272, 10169-10174, 1997.
- DU PREEZ, J.C.; KOCK, J.L.F.; MONTEIRO, A.M.T.;PRIOR, B.A. The Vitamin Requirements of *Candida shehatae* for Xylose Fermentation. **FEMS Microbiol. Letters**, v. 28, n. 3, p. 271-275, 1985.
- EKLUND, R.; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. **Enzyme Microb. Technol.** 17(3):255-259, 1995.
- ERGUN, M.; MUTLU, S. F. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour. Technol.**, ed. 73, p. 251-255, 2000.
- FERNÁNDEZ, R.; HERRERO, P.; MORENO, F. Inhibition and Inactivation of Glucose-phosphorylating Enzymes from *Saccharomyces cerevisiae* by D Xylose. **J. Gen. Microbiol.** v.131: p.2705-2709, 1985.
- FERRER, A.; BYERS, F.M.; SULBARÁN-DE-FERRER, B.; DALE B.E.; AIELLO, C. Optimizing Ammonia Processing Conditions to Enhance Susceptibility of Legumes to Fiber Hydrolysis. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98-100, p. 123-133, 2002.
- FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. **FEMS Microbiol. Rev.**, Netherlands, v. 24, p. 507-29, 2000.
- FUKUSHIMA, R.S.; WEIMER, P.J.; KUNZ, D. Photocatalytic interaction of N-oxide resazurin with cystein optimizes preparation of anaerobic medium solutions. **Anaerobe**, v. 8, p. 29-34, 2002.
- GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Appl. Chem.**, v.59 p. 257-268, 1987.
- GODOY, A.; AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, A. J. Continuous and

- batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **Int. Sugar J.** v. 110, p. 175-181, 2008.
- GOLDEMBERG, J. The brazilian biofuels industry (a review). **Biotechnol. Biofuels.** v.1, art.1, 2008.
- GUPTA, R.; SHARMA, K.K.; KUHAD, R.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. **Bioresour. Technol.** v. 100. p.1214-1220, 2009.
- HEGGART, H.; MARGARITIS, A.; PILKINGTON, H.; STEWART, R. J.; DOWHANICK, T. M.; RUSSELL, I. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. **Techni. Quarter.**, v. 36, p. 383-406, 1999.
- HENRISSAT, B. Cellulase and their interaction with cellulose. **Cellulose.** 1. 169-196, 1994.
- HENSING, M. C. M. Physiological and technological aspects of large-scale heterologous-protein production with yeasts. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.67, p.261-279, 1995.
- IRANMANHOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimization acid-hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass Bioenergy**, v.22, p.401-404, 2002.
- JOHNSTON, M. Feasting, fasting and fermenting: glucose sensing in yeast and other cells. **Trends Genet.**, v.15, p. 29-33, 1999.
- KÁDÁR, Z.; SZENGYEL, Z.; RÁCZEY, K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. **Ind Crop Prod**, v.20 p.103-111, 2004.
- KARA, B. V.; SIMPSON, W. J.; HAMMOND, J. R. M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **J. Inst. Brew.** v. 94, p. 153-158, 1988.
- KARHUMAA K.; HAHN-HÄGERDAL B.; GORWA-GRAUSLUND MF. Investigation of limiting metabolic steps in the utilization of xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* using metabolic engineering. **Yeast.** v. 22 p.359-368, 2005.
- KLEMAN-LEYER, K.M. The Cellulases Endoglucanase I and Cellobiohydrolase II of *Trichoderma reesei* Act Sinergistically to Solubilize Native Cotton Cellulose but not to Decrease its Molecular Size. **Appl. Env. Microbiol.** v. 62, n. 8, p. 2883-2887, 1996.
- KLINKE H.B.; THOMSEN A.B.; AHRING B.K. Inhibition of ethanol producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of

- biomass. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 66, p. 10-26, 2004.
- KOBI, D.; ZUGMEYER, S.; POTIER S.; GUTFREUND, L. J. Two-dimensional protein map of an "ale"-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation. **FEMS. Yeast Res.** v. 5, p. 213-230, 2004.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Crit. Rev. Biotechnol.**, v.13, n.2, p.151-172, 1993.
- KURABI, A.; BERLIN, A.; GILKES, N.; KILBURN, D.; BURA, R.; ROBINSON, J.; MARKOV, A.; SADDLER, J. Enzymatic Hydrolysis of Steam-Exploded and Ethanol Organosolv-Pretreated Douglas-Fir by Novel and Commercial Fungal Cellulases. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121-124, p. 219-230, 2005.
- LAGUNAS, R.; DOMINGUEZ, C.; BUSTURIA, A.; SÁEZ, M. J. Mechanisms of appearance of the Pasteur effect in *Saccharomyces cerevisiae*: inactivation of sugar transport. **J. Bacteriol.** v. 152, p.19-25, 1982.
- LAROCHE C.; GERVAIS P. Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.60, p. 743-747, 2003.
- LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B.E. Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121-124, p. 1081-1099, 2005.
- LEWIS L. Z.; MENGGEN M.; MINGZHOU S. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Mol. Genet. Genomics. Versão on line.** 2009
- LIAW, W.C.; CHEN, C.S.; CHANG, W.S.; CHEN, K.P. Xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolyzate by polyacrylic hydrogel thin films with immobilized *Candida subtropicalis* WF79. **J. Biosci. Bioeng.** v.105, n.2, p.97-105, 2008.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; ZYL, W.H.V.; PRETORIUS, I.S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiol. Molec. Biol. Rev.** v. 66, n. 3, p. 506–577, 2002.
- LYND, L.R.; ZYL, W.H. V.; MCBRIDE, J.; LASER M. Consolidated Bioprocessing of Cellulosic Biomass: an Update. **Biotechnol.**, v.16, p. 577–583, 2005.
- MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A.R.; SADDLER, J.N.; MANSFIELD, D. Enhancing the Enzymatic Hydrolysis of Cellulosic Materials Using Simultaneous Ball Milling. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98-100, p. 815-831, 2002.
- MANDELS, M.; WEBER, J. Production of cellulose. **Adv. Chem. Ser.**, v.95, p.391-414, 1969.
- MARTIN, C.; GALVE, M.; FREDRIK-WAHLBOM, C; HAGERDAL, B. H;

- JÖNSSON, L. J. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xilose utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v.31, p.274-282, 2002.
- MATSUSHIKA A.; INOUE, H.; MURAKAMI, K.; TAKIMURA, O.; SAWAYAMA, S.. Bioethanol production performance of five recombinant strains of laboratory and industrial xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour. Technol.** v. 100. p. 2392-2398, 2009.
- MDCI. **Site oficial do Ministério de Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior**. Disponível em: <<http://www.desenvolvimento.gov.br>> Acessado em Junho de 2008.
- MILLER, L. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31. 426-428, 1959.
- MORIYA, R.Y.; GONÇALVES, A.R.; FARIA, F.P. Enzymatic Bleaching of Organosolv Sugarcane Bagasse Pulps with Recombinant Xylanase of the Fungus *Humicola grisea* and with Commercial Cartazyme HS Xylanase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 121-124, p. 195-203, 2005.
- MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative process: a review. **Bioresour. Technol.**, v.93, p.1-10, 2004.
- MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugar cane bagasse and rice straw, **Afr. J. Biotechnol.** v.5 p.1873–1881, 2006.
- NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAUN R. Dilute-Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse at Varying Conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98-100, p. 49-58, 2002.
- OLOFSSON, K.; BERTILSSON, M.; LIDÉN, G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biotechnol. Biofuels**, v.1, art. 7, 2008.
- OLSSON L.; HAHN-HÄGERDAL B. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochem.** v.28, p.249-257, 1993.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 18, p. 312 – 331, 1996.
- OLSSON, L.; NIELSEN, J. On-Line And In Situ Monitoring Of Biomass In Submerged Cultivations. **Trends Biotechnol.**, v.15, p.517-522, 1997.
- ÖHGREN, K.; BENGTTSSON, O.; GORWA-GRAUSLUND, F.M.; GALBE, M; HAHN-HÄGERDAL, B; ZACCHI, G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400. **J. Biotechnol.** v.126, p.

488-498, 2006.

PALMAROLA-ANDRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresour. Technol.**, v.96, p.843-850, 2005.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.E.; SOCCOL, V.T. Biotechnological Potential of Agro-industrial Residues I: Sugarcane Bagasse. **Bioresour. Technol.**, vol.74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Xylitol production from Eucalyptus wood hydrolysates extracted with organics solvents. **Process Biochem.**, v.32, n.7, p.599-604, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological Production of Xylitol. Part 3: Operation in Culture Media made from Lignocellulose Hydrolysate. **Bioresour. Technol.**, London, v.66, p.25-40, 1998.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia**, v1, McGraw-Hill, São Paulo, 1980, p. 315-344, 1980.

PEREIRA, R.E. **Avaliação do Potencial Nacional de Geração de Resíduos Agrícolas para Produção de Etanol**. Dissertação (Mestrado) Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Brasil, 2006.

PESSOA Jr; A; MANCILHA, I.M; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Braz. J. Chem. Eng.**, v.14, p.291-297, 1997.

POIRIER I.; MARÉCHAL P.A.; RICHARD S.; GERVAIS P. *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. **J Appl Microbiol.** v.86, p.87-92, 1999.

PURWADI, R.; NIKLASSON, M.; TAHERZADEH, M. J. Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolysates by Ca(OH)₂. **J. Biotechnol.**, v.114, p.187-198, 2004.

RECZEY, K.; SZENGYEL, Zs.; EKLUND, R.; ZANCCHI, G. Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresour Tech.** v.57, p. 25-30, 1996.

RICE, J. F.; SULLIVAN, T. R.; HELBERT, J. R. A rapid method for the determination of yeast dry weight concentration. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** v. 38, p. 142-145, 1980.

RODRIGUES, R.C.L.B. **Avaliação das Condições de Concentração a Vácuo do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana para a Produção do Xilitol**. Dissertação (Mestrado) 109 f. Lorena: Faenquil/Departamento de Biotecnologia e Química, São Paulo, SP, 1999.

ROSSEL, S.; WEIJDEN, C. C. V. DER.; KRUCKEBERG, A.; BAKKER, B. M.; WESTERHOFF, H. V. Loss of fermentative capacity in baker's yeast can partly

- be explained by reduced glucose uptake capacity. **Mol. Biol. Rep.** v. 29, p. 255-257, 2002.
- RUDOLF, A.; ALKASRAWI, M.; ZACCHI, G.; LIDÉN, G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. **Enzyme Microb. Technol.** v.37 p.195-205, 2005.
- RYU, D.D.Y.; MANDELS, M.; Cellulases: biosynthesis and applications, **Enzyme Microbiol. Technol.** v.2, p.91-102, 1980.
- SAMI, M.; IKEDA, M.; YABUUCHI, S. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. **J. Ferment. Bioeng.** v. 78, p. 212-216, 1994.
- SANCHEZ S.; BRAVO V.; CASTRO E.; MOYA A.J.; CAMACHO F. The fermentation of mixtures of D-glucose and D-xylose by *Candida shehatae*, *Pichia stipitis* or *Pachysolen tannophilus* to produce ethanol. **J Chem Technol Biotechnol.** v.77, p. 641-648, 2002.
- SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated Salix at high dry-matter content. **Enzyme Microb. Technol.** v.39 p.756-762, 2006.
- SONDEREGGER, M; JEPPSSON, M; LARSSON, C; GORWA-GRAUSLUND, M. F; BOLES, E; OLSSON, L; SPENCER-MARTINS, I; HAHN-HÄGERDAL, B; SAUER, U. Fermentation performance of engineered and evolved xylofermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Biotechnol. Bioeng** v.87, p.90-98, 2004.
- STAMBUK, B. U. A Simple Laboratory Exercise Illustrating Active Transport In Yeast Cells. **Biochem. Mol. Biol. Educ.**, v. 28, p. 313-317, 2000.
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHÉRIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M; BON, E. P. S. Brazilian Potential for Biomass Ethanol: The Challenge of Using Hexose and Pentose Co-fermenting Yeast Strains. **J. Sci. Ind. Res.** v. 67. p. 918-926, 2008.
- STAMBUK B.U.; FRANDEN M.A.; SINGH A.; ZHANG M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 105. p.255–263, 2003.
- STERBERG D.; MANDELS, G.R. Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. **J. Bacteriol.**, 139, 761-769, 1979.
- SUN, Y.; CHEN, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresour. Technol.**, v.83, p.1-11, 2002.
- SUN, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; WANG, Y. X.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. **Polym. Degrad. Stab.**, v.86, p.245-56, 2004.

- TAKAGI, M.; ABE, S.; SUZUKI, S.; EMERT, G.H.; YATA, N. A method for production of alcohol direct from lignocellulose using cellulose and yeast. In: **Proc. Bioconver. Symp.**, p. 55-571. 1977.
- THOMSSON, E.; LARSSON, C.; ALBERS, E.; NILSSON, A.; FRANZE, C. J.; GUSTAFSSONI, L. Carbon starvation can induce energy deprivation and loss of fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v. 69, p. 3251-3257, 2003.
- THOMSSON, E.; SVENSSON, M.; LARSSON, C. Rapamycin pre-treatment preserves viability, ATP level and catabolic capacity during carbon starvation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** v. 22, p. 615-623, 2005.
- TOIVARI M.H.; ARISTIDOU A.; RUOHONEN L.; PENTTILÄ M. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen availability. **Metab. Eng.** v.3: p.236–249, 2001.
- TORIGOI, E.; HENRIQUE-SILVA, F.; ESCOBAR-VERA, J.; CARLE URIOSTE, J. C.; CRIVELLARO, O.; E-DORRY, H.; EL-GOGARY, S. Mutants of *Trichoderma reesei* are defective in cellulose induction, but not basal expression of the cellulase-encoding genes. **Gene**, v.173, p.199-203, 1996.
- TORTORA, J.; FUNKE, B.; CASE, C. **Microbiologia**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- UNICA — **União da Agroindústria Canavieira de São Paulo** — Site oficial. <<http://www.unica.com.br>>. Acessado em Julho de 2008.
- VAHERI, M.; LEISOLA, M.; KAUPPINEN, V. Trasglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. **Biotech. Lett.** v.1, p.41-46, 1979.
- VARGA, E.; SZENGYEL Z.; RÉCZEY, K. Chemical Pretreatments of corn Stover for Enhancing Enzymatic Digestibility. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98-100, p. 73-87, 2002.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C.W. **Fundamentos de Bioquímica**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- WINGREN, A; GALBE, M; ZACCHI,G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood – a comparasion of SSF and SHF and identification of bottlenecks. **Biotechnol. Prog.** v.19,p.1109-1117, 2003.
- YAMAGISHI, H.; YUUKI, T.; KAGAMI, N. YOKOGAWA, Y.; SHIBATA, K. MINEMURA, M.; OHYA, Y. Appearance of poor-fermenting variants in Brewing yeast culture. **Biosc. Biotechnol. Biochem.** v. 65, p. 2361-2363, 2001.
- ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: Noncomplexed Cellulase Systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 88, n. 7, p. 797-824, 2004.