

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Trabalho de Conclusão de Curso

**ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *Spathaspora arborariae*
NRRL Y-48658 AO HIDROLISADO DE CASCA DE SOJA E
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE ETANOL**

ALUNA:

Ilana Hendira Neumann Boeira

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Priscila Brasil de Souza Cruz

CO-ORIENTADOR:

PhD. Marco Antonio Záchia Ayub

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Gertrudes Corção

Profa. Sueli Terezinha Van Der Sand

Porto Alegre
2010

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Priscila Brasil de Souza Cruz, que esteve sempre presente me motivando e orientando, incluindo fins de semana e feriados, com muita paciência e bom humor.

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub, pela oportunidade da realização deste trabalho.

À Nicole Teixeira Sehnem, pelos inúmeros auxílios e correções, assim como na luta com o HPLC.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos (BiotecLab) do Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Em especial a Lílian Raquel Hickert e Ana Cassales, pelo apoio e auxílio na realização das atividades.

Aos meus amigos e colegas, pelos momentos de descontração, em especial à Patrícia Neves, que tem me acompanhado desde o ensino médio, me presenteando com a sua honestidade implacável e espontaneidade, sempre oferecendo um sofá quando preciso.

Ao colega André Duarte, pelo incentivo e inspiração para nunca desistir.

Ao meu instrutor João Guedes, pela amizade e ensinamentos. A doutrina que me proporcionou veio no momento certo e me ajudou a seguir firme em uma época crítica.

À todos os professores, que contribuíram para o meu aprendizado.

À minha família, que acreditou em mim e me apoiou em todos os momentos. Agradeço ao meu pai pelas palavras de sabedoria, principalmente quanto à crise da metade do curso. À minha mãe, pela compreensão durante os finais de semestre. À minha irmã, pelo exemplo de dedicação e conselhos.

Muito obrigada!

RESUMO

Os materiais lignocelulósicos são uma grande fonte de polissacarídeos que podem ser bioconvertidos a produtos de alto valor agregado, como etanol, a partir do emprego de pré-tratamentos e fermentação. O pré-tratamento de hidrólise ácida diluída produz um hidrolisado rico em pentoses e hexoses, mas muitas vezes pode conter subprodutos tóxicos aos microrganismos, que podem inibir o metabolismo e a multiplicação celular. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi promover a adaptação gradativa de *Spathaspora arborariae* ao hidrolisado de casca de soja (HCS) com o intuito de avaliar o efeito do processo adaptativo na produção de etanol e xilitol. O hidrolisado (concentrado 4 vezes, pH 5,0) foi obtido através de hidrólise ácida diluída. A levedura *S. arborariae* foi repicada por 10 vezes consecutivas (a cada 48 h) em meio misto contendo inicialmente 25% de HCS, após o décimo repique o teor de hidrolisado no meio foi elevado para 50%, repetindo o processo até se obter o cultivo em meio contendo 90% de hidrolisado. As leveduras resultantes do crescimento do décimo repique de cada concentração foram cultivadas sobre HCS puro por 108 horas a 30°C e 180 rpm, assim como a cepa não adaptada (controle). As cepas adaptadas apresentaram um aumento na velocidade de produção e produtividade volumétrica de etanol e glicerol, de 0,060 g.L⁻¹.h⁻¹ de etanol e 0,008 g.L⁻¹.h⁻¹ de glicerol pela cepa controle, para 0,085 g.L⁻¹.h⁻¹ de etanol e 0,012 g.L⁻¹.h⁻¹ de glicerol pela cepa adaptada a 90% de hidrolisado. Houve o consumo máximo de glicose em 12 horas e de xilose em 24 horas pelas cepas adaptadas, enquanto que na cepa controle o consumo máximo foi observado apenas em 24 horas para glicose e 72 horas para xilose. Ao fim do cultivo o rendimento da conversão de xilose a xilitol pela cepa adaptada a 50% de hidrolisado foi de $Y_{p/s} = 0,42$, enquanto que para a cepa adaptada a 25% de hidrolisado obteve rendimento de apenas $Y_{p/s} = 0,07$. Esses resultados demonstram a esperada melhoria do rendimento da fermentação devido à adaptação progressiva dessa espécie ao HCS.

ABSTRACT

The lignocellulosic materials are a great source of polysaccharides that can be bioconverted into high value-added products, such as ethanol, from the use of pretreatments and fermentation. Diluted acid hydrolysis pretreatment produces an hydrolyzate rich in pentoses and hexoses, but can often contain toxic byproducts to microorganisms, which can inhibit the metabolism and cell multiplication. In this context, the objective was to promote the gradual adaptation of *Spathaspora arborariae* to the hydrolyzate of soybean hulls (HSH) in order to evaluate the effect of the adaptive process in the production of ethanol and xylitol. The hydrolyzate (concentrated 4 times, pH 5.0) was obtained through dilute acid hydrolysis. The yeast *S. arborariae* was serially inoculated by 10 times (every 48 h) in a mixed medium containing initially 25% of HSH, after the 10th inoculation the content of hydrolyzate in the medium was raised to 50%, repeating the process until the obtention of a medium containing 90% of hydrolyzate. The yeast resulting from the growth of the 10th inoculation of each concentration were grown on pure HSH for 108 hours at 30 ° C and 180 rpm, so as the unadapted strain (control). The adapted strains showed an increased production rate and volumetric productivity of ethanol and glycerol, from 0.060 g.L⁻¹.h⁻¹ of ethanol and 0.008 g.L⁻¹.h⁻¹ of glycerol by control strain, to 0.085 g.L⁻¹.h⁻¹ of ethanol and 0.012 g.L⁻¹.h⁻¹ of glycerol by the strain adapted to 90% hydrolyzed. There was a maximal consumption of glucose in 12 hours and of xylose in 24 hours by the adapted strains, while in the control strain the maximum consumption was observed in only 24 hours to glucose and 72 hours for xylose. At the end of the growth the efficiency of the xylose to xylitol conversion by the strain adapted to 50% of hydrolyzate was of $Y_{p/s} = 0.42$, whereas the strain adapted to 25% of hydrolyzate obtained only $Y_{p/s} = 0,07$. These results demonstrated the expected improvement in fermentation efficiency due to the gradual adaptation of this species to HSH.

SUMÁRIO

RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1. Local de realização da pesquisa	5
2.2. Preparação do hidrolisado de casca de soja	5
2.2.1. Composição do hidrolisado	5
2.3. Microrganismo e pré-inóculo	5
2.4. Cultivo em meio contendo diferentes concentrações de hidrolisado	6
2.5. Meio e condições de fermentação.....	6
2.6. Métodos analíticos	7
2.7. Determinação dos parâmetros fermentativos	7
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
3.1. Perfil de crescimento.....	9
3.2. Consumo de açúcares	10
3.3. Produção de etanol.....	13
3.4. Produção de glicerol	16
3.5. Conversão de xilose a xilitol	18
4. CONCLUSÕES.....	20
5. PERSPECTIVAS	21
6. REFERÊNCIAS	22

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil de crescimento de *S. arborariae* das cepas controle, adaptada a 25, 50, 60, 70, 80 e 90% de hidrolisado, através da contagem da concentração celular (UFC.mL^{-1}) durante a fermentação em frascos Erlenmeyer em meio composto por hidrolisado de casa de soja por 108 horas. 9
- Figura 2. Consumo de glicose e xilose durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo meio composto por hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle e das cepas adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado... 11
- Figura 3. Cromatograma do cultivo em hidrolisado puro de *S. arborariae* adaptada a 50% de hidrolisado de casca de soja, obtido em 24 horas de cultivo..... 12
- Figura 4. Produção de etanol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle e das cepas adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado..... 13
- Figura 5. Consumo de glicose e xilose e produção de etanol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas das cepas adaptadas a 25% e 60% de hidrolisado... 15
- Figura 6. Produção de glicerol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle e das cepas adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado..... 16
- Figura 7. Consumo de xilose e produção de xilitol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer coontendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa adaptada a 25% e 50% de hidrolisado..... 18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição química casca de soja.....	2
Tabela 2. Produtividade volumétrica (Q_P g.L ⁻¹ .h ⁻¹) de etanol por <i>S. arborariae</i> em frascos Erlenmeyer em 24 h de cultivo em hidrolisado de casa de soja puro.....	14
Tabela 3. Produtividade volumétrica (Q_P g.L ⁻¹ .h ⁻¹) e rendimento ($Y_{P/S}$ g g ⁻¹) da conversão de glicose a glicerol por <i>S. arborariae</i> em frascos Erlenmeyer em 24 horas de cultivo em hidrolisado de casa de soja puro.	17
Tabela 4. Produtividade volumétrica (Q_P g.L ⁻¹ .h ⁻¹) em 24 horas e rendimento ($Y_{P/S}$ g g ⁻¹) final da conversão de xilose a xilitol por <i>S. arborariae</i> em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro.	19

1. INTRODUÇÃO

A crescente expansão da atividade agroindustrial ao longo dos últimos 40 anos tem levado ao acúmulo de uma grande quantidade de resíduos lignocelulósicos em todo o mundo (VILLAS-BÔAS; ESPOSITO; MITCHELL, 2002). A fim de evitar a perda do potencial energético e o acúmulo no solo destes materiais, vem-se avaliando processos biotecnológicos que sejam capazes de converter esses resíduos lignocelulósicos agroindustriais em bioetanol, utilizado como biocombustível.

A substituição da gasolina, por exemplo, por biocombustíveis é em geral uma forma de preservar o meio ambiente, pois diminui as emissões de gases causadores do efeito estufa. Biocombustíveis oriundos de materiais lignocelulósicos diminuem a geração de gases poluentes, reduzem os impactos ambientais e geram menor alteração no clima (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

A soja (*Glycine max*) é a planta mais amplamente cultivada no mundo, atingindo 96,2 milhões de hectares, resultando em 216,3 milhões de toneladas de grãos em 2006 e ainda crescendo (FAO, 2007). O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, ficando atrás apenas dos EUA, sendo que as projeções segundo a USDA (United States Department of Agriculture) (2008) são de que o Brasil assumirá a primeira posição a partir das próximas safras. Na safra 2008/2009 a produção do Brasil atingiu aproximadamente 58 milhões de toneladas em 21 milhões de hectares de área plantada (MAPA/CONAB, 2009). A produtividade média da soja brasileira é de 2823 kg por hectares, chegando a alcançar cerca de 3000 kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja (EMBRAPA, 2010). O Rio Grande do Sul é o terceiro maior estado produtor de soja no Brasil, responsável por 20% da produção (MAPA/CONAB, 2009).

A casca de soja é o principal subproduto da indústria de soja e constitui cerca de 8% de toda a semente (GNANASAMBANDAN; PROCTOR, 1999), representando aproximadamente 17,3 milhões de toneladas de casca de soja produzidas a cada ano.

A parede celular da casca de soja é constituída por aproximadamente 44% de celulose, 27% de hemicelulose e 9 % de lignina (CASSALES, 2010) e, portanto, sua hidrólise pode gerar monossacarídeos que são substratos com

potencial para serem bioconvertidos a produtos químicos de valor agregado, como o etanol (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química casca de soja (CASSALES, 2010).

Componentes	Concentração (%)
Celulose	43,7
Hemicelulose	26,9
Lignina	9,1
Extrativos	3,2
Cinzas	0,6
Proteína	13,1

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

Dentre os diversos processos de hidrólise empregados, a hidrólise ácida configura como o mais antigo e mais bem estabelecido processo (TORGET; HATZIS; HAYWARD, 1996), sendo a hidrólise ácida diluída a mais empregada para a liberação de açúcares monoméricos (SAHA; HAYASHI, 2004). Esse pré-tratamento é necessário para expor as fibras da celulose permitindo que esta se torne mais acessível para as enzimas (celulasas). Um eficiente pré-tratamento pode substancialmente reduzir os requisitos enzimáticos reduzindo os custos de produção (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

A fase líquida obtida por tal reação de hidrólise contém compostos considerados inibidores do processo fermentativo, ou seja, tóxicos aos microrganismos empregados (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998c). Esses compostos incluem produtos de degradação de pentoses e hexoses como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente; ácido fórmico oriundo da degradação do furfural e HMF; os ácidos acético, vanílico,

siríngico e palmítico e compostos fenólicos decorrentes da degradação da lignina (SAHA; HAYASHI, 2004). Assim, vários métodos de destoxificação têm sido desenvolvidos e os efeitos sobre a composição química dos hidrolisados lignocelulósicos têm sido investigados (LARSSON et al., 1999).

Apesar da destoxificação melhorar a fermentação, é desejável por razões econômicas limitar as exigências para a destoxificação a um mínimo (VON SIVERS et al., 1994). A adaptação de microrganismos fermentativos a hidrolisados inibitórios é uma das várias estratégias possíveis para lidar com esse problema. A adaptação pode ajudar a encurtar o tempo de fermentação, bem como aumentar a tolerância das células aos inibidores (YAMANO; YORK; INGRAM, 1998; LAWFORD; ROUSSEAU; MOHAGHEGHI, 1999).

Considerando-se que a hemicelulose é o segundo polímero mais abundante nos materiais lignocelulósicos, a conversão de biomassa à energia útil somente torna-se economicamente viável, se tanto a xilose quanto a celulose forem convertidas a etanol. Esta conversão dependerá da habilidade dos microrganismos em fermentar os diferentes tipos de açúcares resultantes da hidrólise (glicose, xilose, manose, arabinose e etc). Matérias-primas ricas em lignocelulose, em especial madeira e matérias-primas agrícolas, podem conter 5-20% das pentoses como os açúcares xilose e arabinose, que não são fermentados a etanol pelos microrganismos mais comumente usados para a fermentação industrial, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

O clado *Spathaspora* contém várias espécies de leveduras fermentadoras de D-xilose isolados de madeira podre ou insetos xilófagos. Uma nova espécie de levedura, descrita como *Spathaspora arborariae*, foi isolada de madeira em decomposição nos ecossistemas da Mata Atlântica e do Cerrado no Brasil (CADETE et al., 2009). A linhagem cresce bem utilizando como fonte de carbono tanto com glicose como xilose, produzindo praticamente a mesma quantidade de biomassa e etanol. No entanto, como típico de outras leveduras fermentadoras de xilose (PANCHAL et al., 1988; SANCHEZ et al., 2002; STAMBUK et al., 2003), essa espécie tem uma clara preferência para a fermentação de glicose (CADETE et al., 2009).

Em curto prazo, apenas co-produtos (ex. bagaço de cana, palha de arroz e etc.) são susceptíveis a serem utilizados para a produção de calor e

eletricidade, pois é a forma mais eficaz e econômica; no entanto, em longo prazo, a tecnologia do bioetanol irá formar a base para a sustentabilidade. (HAHN-HÄGERDAL et al., 2006).

O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a adaptação da levedura *S. arborariae* ao hidrolisado de casca de soja, derivado da hidrólise ácida diluída, com o intuito de aumentar a produtividade de bioetanol da mesma, através da fermentação alcoólica do hidrolisado proveniente do resíduo lignocelulósico agroindustrial de soja. Os objetivos específicos foram promover hidrólise ácida diluída da casca da soja, realizar a adaptação da levedura *S. arborariae* NRRL Y-4865 a crescentes concentrações de hidrolisado através de repicagens sucessivas, manter em coleção as cepas adaptadas a cada concentração e avaliar a adaptação através da fermentação do hidrolisado puro, através da produção de etanol e outros produtos de alto valor agregado e consumo de substrato.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada nos Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos (BiotechLab) localizados no ICTA – Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. As análises em CLAE foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química da UFRGS.

2.2. Preparação do hidrolisado de casca de soja

O resíduo lignocelulósico agroindustrial utilizado foi a casca de soja, fornecida pela Companhia Solae (Esteio, RS). Para a liberação dos açúcares fermentescíveis a casca de soja sofreu hidrólise ácida diluída (1% de ácido sulfúrico) em autoclave (PHOENIX) a 1,1 atm utilizando frascos Erlenmeyers de 2L, contendo 1L de solução (978 mL de água destilada e 11 mL de ácido sulfúrico concentrado) e 125g de casca de soja moída. A hidrólise foi realizada na temperatura de 122°C a 1,1 atm e tempo de reação 40 minutos. O hidrolisado resultante foi resfriado em banho de gelo e centrifugado a 11.000 g por 20 minutos (HITACHI, HIMAC CR 21E). O sobrenadante foi filtrado e estocado em refrigerador a 4 °C para posterior concentração e tratamento.

O hidrolisado foi concentrado quatro vezes em rota-evaporador (Heidolph, Laborota 4000), conectado a bomba de vácuo (Nova técnica) e a um banho refrigerado (B. Braun Biotech International, Thermomix® BM). A temperatura de trabalho do rota-evaporador foi de 70 °C. Após a concentração, o pH do hidrolisado foi ajustado a 5,0 com NaOH sólido e em seguida esterilizado em autoclave por 30 minutos a 0,5 atm.

2.2.1. Composição do hidrolisado

O hidrolisado de casca de soja utilizado no presente trabalho contém 8,4 g.L⁻¹ de glicose, 14,4 g.L⁻¹ de xilose e 12,9 g.L⁻¹ de arabinose, podendo variar conforme o procedimento da hidrólise.

2.3. Microrganismo e pré-inóculo

A levedura utilizada para a fermentação da casca de soja a bioetanol foi *S. arborariae* UFMG-HM19.1A (NRRL Y-48658), isolada de madeira em

decomposição no Parque Nacional da Serra do Cipó e no Parque Estadual do Rio Doce, em Minas Gerais. A cepa foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Carlos Rosa da UFMG. O pré-inóculo foi preparado através do cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50mL de meio YM (g.L^{-1}): glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 30 ° C por 24 h.

2.4. Cultivo em meio contendo diferentes concentrações de hidrolisado

O inóculo foi preparado transferindo-se 2,4 mL (10% do volume total) do pré-inóculo, padronizado para que a concentração celular atingisse densidade óptica igual a 1 ($\text{DO} = 1$) em absorvância de 600 nm, para frascos tipo Erlenmeyer de 125 mL.

A cultura foi repicada sucessivamente a cada 48h em meio contendo inicialmente 25% de hidrolisado de casca de soja e completado com meio sintético contendo (g.L^{-1}): xilose, 20; glicose, 20; arabinose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3. As condições para incubação do meio foram de 30°C em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm.

O teor de hidrolisado foi gradativamente elevado após 10 repiques consecutivos, passando pelas concentrações de 25, 50, 60, 70, 80 e 90% de hidrolisado. Os inóculos para concentrações maiores de hidrolisado foram realizados transferindo 2,4mL do cultivo obtido do décimo repique para o novo meio, pela impossibilidade de medir a densidade óptica devido à turbidez do hidrolisado.

Após a finalização do processo de adaptação para cada concentração de hidrolisado as leveduras adaptadas foram estocadas a -18°C em 20% glicerol e 80% de meio de cultura, com hidrolisado na respectiva concentração.

2.5. Meio e condições de fermentação

Após o crescimento do décimo repique de cada concentração avaliada, foram realizados cultivos sobre hidrolisado integral a fim de avaliar o desempenho da levedura adaptada às diferentes concentrações de hidrolisado e sua eficiência na conversão dos açúcares fermentescíveis em etanol. Como controle foi avaliada a fermentação do hidrolisado integral pela levedura não

adaptada. O cultivo foi executado em Erlenmeyer de 500 ml contendo 130 ml de hidrolisado, 15 ml de inóculo (obtido do crescimento resultante do 10º repique de cada concentração) e 5 mL de meio sintético contendo (g.L⁻¹): xilose, 20; glicose, 20; arabinose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3. Os ensaios foram conduzidos em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm, 30 °C por 108 horas. As amostras foram retiradas no ponto zero e a cada 12 horas para determinação da biomassa e concentração de açúcares, xilitol, etanol e glicerol no meio. O experimento foi realizado em duplicata.

A biomassa foi determinada por Unidades Formadoras de Colônia (UFC) através de diluição seriada, seguida por plaqueamento em duplicata em meio YMA, composto por (g.L⁻¹): ágar, 20; glicose, 10; peptona, 5; extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3. As culturas foram incubadas durante 48 horas a 28°C.

2.6. Métodos analíticos

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, etanol, glicerol e xilitol foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu) utilizando coluna Bio-Rad Aminex HPX 87H, a 45 °C, com H₂SO₄ 0,05 M como fase móvel, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e detector de índice de refração (IR).

As moléculas analisadas em CLAE apresentaram pico de detecção em: glicose, 9 minutos; xilose, 9,6 minutos; arabinose, 10,6 minutos; glicerol, 13,2 minutos; xilitol, 11 minutos; e etanol, 21,1 minutos.

2.7. Determinação dos parâmetros fermentativos

A produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) dos produtos da fermentação e rendimento ($Y_{P/S}$ g g⁻¹) da conversão de xilose a xilitol e de glicerol a partir de glicose foram calculados pelas seguintes equações:

$$Q_P = (C_{Pf} - C_{Pi}) / T$$

$$Y_{P/S} = (C_{Pf} - C_{Pi}) / (C_{Si} - C_{Sf})$$

Em que:

C_{Pf} = concentração final de produto

C_{Pi} = concentração inicial de produto

C_{Si} = concentração inicial de substrato

C_{Sf} = concentração final de substrato

T = tempo em horas

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Perfil de crescimento

Nos cultivos comparativos em hidrolisado de casca de soja concentrado quatro vezes, o crescimento celular foi determinado para *S. arborariae* controle e adaptadas (Figura 1). A concentração celular de *S. arborariae* aumentou, em média, de $6,84 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ no início do cultivo para $2,72 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ ao longo das 108 horas de cultivo. Segundo Cassales (2010), que determinou a pressão osmótica e concentração dos inibidores fermentativos no hidrolisado de casca de soja, as concentrações de compostos inibitórios ao processo fermentativos estão abaixo dos limites tóxicos aos microrganismos e a pressão osmótica ($2149 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$) é em torno de 7 vezes maior do que a determinada para o meio semi-sintético (316 mOsm.Kg^{-1}). De acordo com Liu et al. (2006), a pressão osmótica de $2108 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$ foi suficiente para inibir o crescimento de leveduras, inclusive para espécies osmofílicas como *Candida krusei*. Os resultados sugerem que *S. arborariae* parece ser osmotolerante já que seu crescimento não foi inibido pela alta pressão osmótica deste meio.

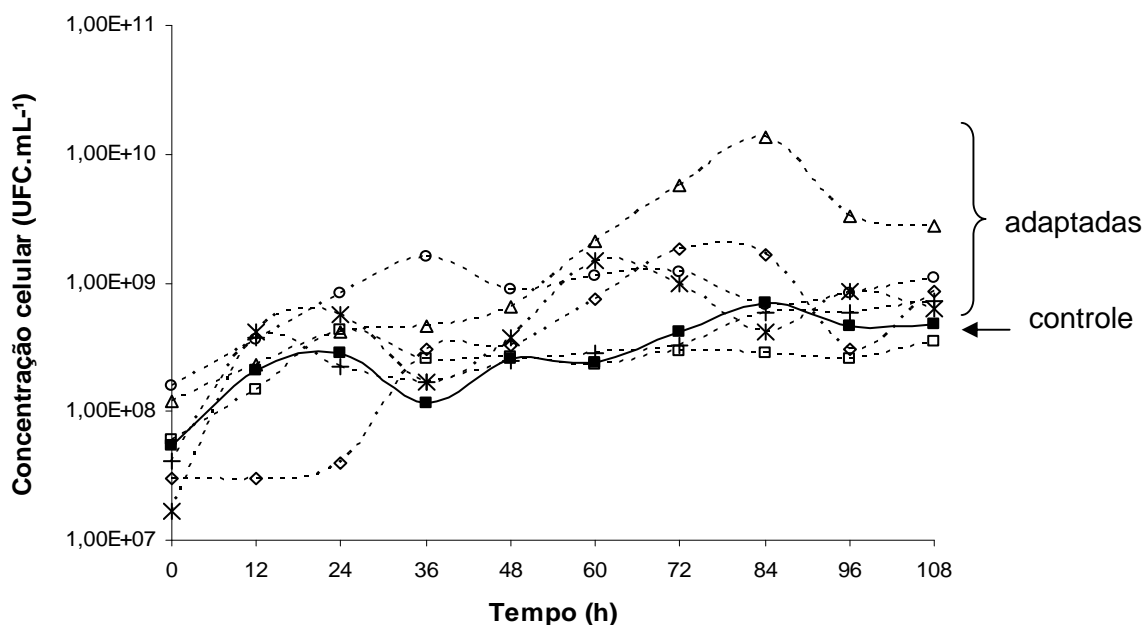


Figura 1. Perfil de crescimento de *S. arborariae* das cepas controle (—■—), adaptada a 25% (---◇---), 50% (---△---), 60% (---◇---), 70% (---*---), 80% (---+---) e 90% (---□---) de hidrolisado, através da contagem da concentração celular (UFC.mL⁻¹) durante a fermentação em frascos Erlenmeyer em meio composto por hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas.

As diferentes concentrações celulares não influenciaram claramente no consumo de açúcares e na formação de produtos, sugerindo que as diferentes eficiências de conversão provavelmente são devidas a alterações no metabolismo celular e não à concentração de células do cultivo.

3.2. Consumo de açúcares

Foram avaliados os perfis de consumo de glicose e xilose no cultivo de *S. arborariae* em hidrolisado de casca de soja concentrado quatro vezes. A Figura 2 apresenta os valores obtidos do consumo desses açúcares pela cepa controle e as adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado. O hidrolisado apresentou maior concentração inicial de xilose no meio, quantificada em aproximadamente 14 g.L⁻¹, (Figura 2B), em contraste com a glicose (Figura 2A), quantificada em 9 g.L⁻¹.

Segundo Cadete et al. (2009), *S. arborariae* cresce bem em ambas fontes de carbono, consumindo-as totalmente, porém possui uma preferência clara pelo consumo e fermentação da glicose. Porém os resultados obtidos nesse trabalho e em outros realizados pelo Laboratório de Tecnologia em Bioprocessos (BiotecLab) não condizem com o comportamento fermentativo descrito, pois a cepa demonstrou preferência pela fermentação de xilose, utilizando aproximadamente 78% desse açúcar, enquanto que o consumo de glicose chegou apenas a 33% da concentração total.

Em comparação com a pesquisa realizada por Cadete et al. (2009), que utilizou meio sintético rico em nutrientes para analisar a eficiência de fermentação, a levedura consumiu totalmente os açúcares do meio, enquanto que no presente trabalho os açúcares presentes no hidrolisado de casca de soja não foram completamente fermentados. A levedura poderia estar alterando seu comportamento quando submetida ao hidrolisado devido o estresse ambiental, limitando assim o consumo total dos açúcares. Levando em consideração que as concentrações dos inibidores fermentativos no hidrolisado de casca de soja quantificados por Cassales (2010), como furfural, HMF e ácido acético, permaneceram abaixo dos limites tóxicos aos microrganismos, essa alteração no comportamento fermentativo deve ser resultante da alta pressão osmótica no hidrolisado.

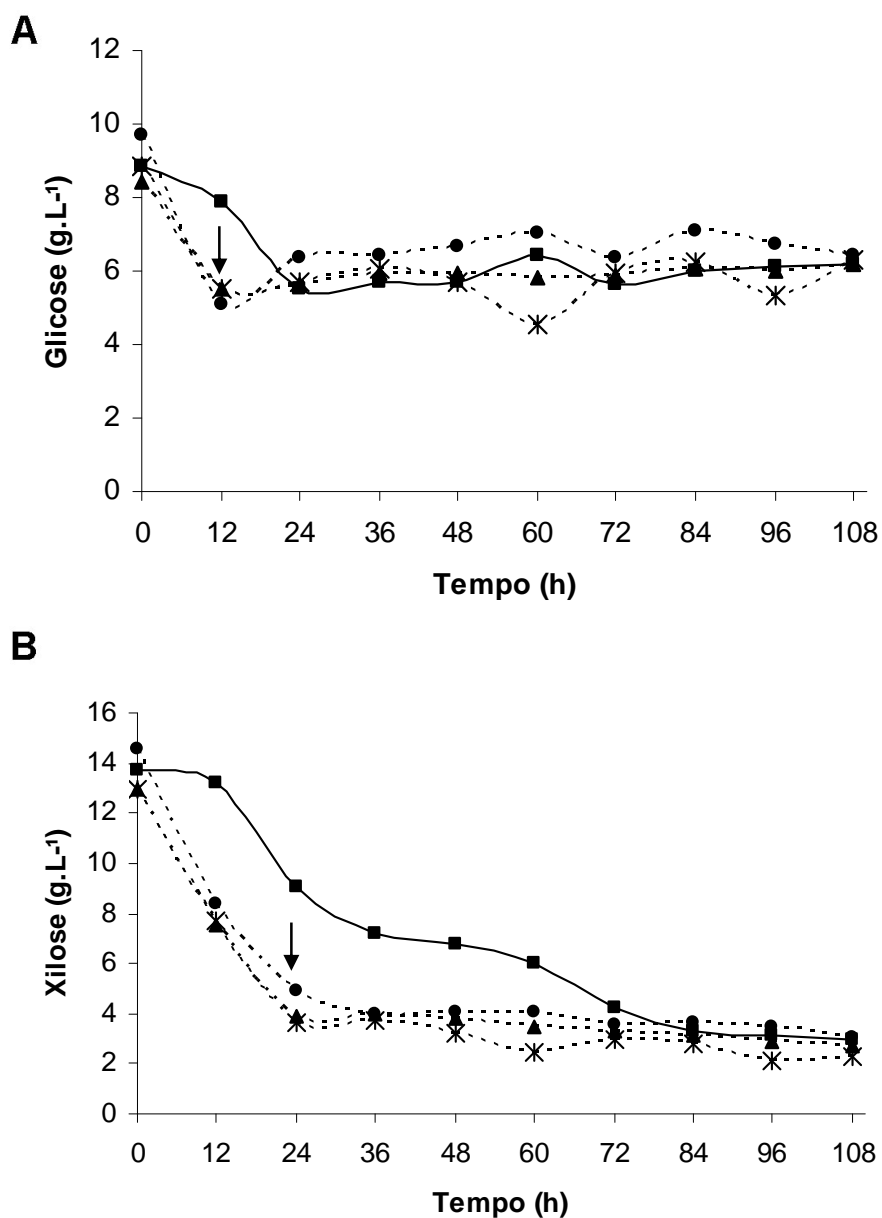


Figura 2. Consumo de glicose (A) e xilose (B) durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo meio composto por hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle (—■—) e das cepas adaptadas a 70% (--▲--), 80% (--*--) e 90% (--◆--) de hidrolisado.

As cepas adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado apresentaram um aumento na velocidade de fermentação dos açúcares em comparação à cepa controle. Em 12 horas houve o consumo máximo de glicose para as cepas adaptadas (destacado pela seta – Figura 2A), enquanto que na cepa não adaptada o consumo máximo foi observado apenas em 24 horas, permanecendo constante após esse período. A xilose apresentou seu pico de consumo em 24 horas (destacado pela seta – Figura 2B) para as cepas

adaptadas, contrastando com a cepa controle, que atingiu a mesma concentração de xilose obtida pelas adaptadas somente após 72 horas de cultivo.

Por limitação da técnica de cromatografia (CLAE), o tempo de retenção de arabinose e do xilitol são muito próximos, o que faz com que o xilitol quando detectado em baixas concentrações apareça como um ombro do pico de arabinose impedindo por vezes a sua quantificação. Para não subestimar ou superestimar a concentração desses componentes os cromatogramas obtidos para os cultivos nos hidrolisados puros não foram manipulados e os resultados para o consumo de arabinose não serão apresentados. A Figura 3 apresenta o cromatograma do cultivo em hidrolisado puro de *S. arborariae* adaptada a 50% de hidrolisado de casca de soja, obtido em 24 horas de cultivo, onde é possível constatar que o pico de xilitol aparece como um ombro da arabinose. Os tempos de retenção para cada composto analisado estão marcados na figura.

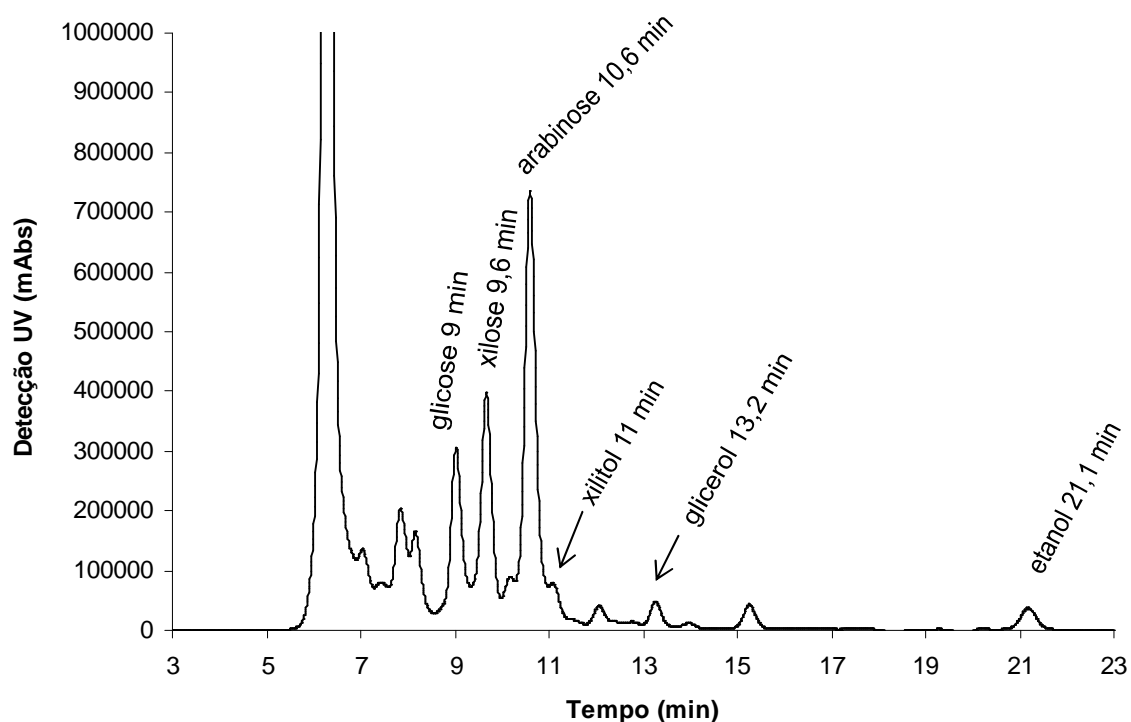


Figura 3. Cromatograma do cultivo em hidrolisado puro de *S. arborariae* adaptada a 50% de hidrolisado de casca de soja, obtido em 24 horas de cultivo.

3.3. Produção de etanol

A produção máxima de etanol foi atingida em 24 horas de cultivo sobre hidrolisado puro, sendo que em 12 horas a cepa controle não produziu etanol, enquanto que as cepas adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado apresentaram um aumento na produção de etanol (Figura 4 – seta). O mesmo resultado foi obtido por Sene et al. (2001), que estudou a adaptação de *Candida guilliermondii* no hidrolisado de bagaço de cana, obtendo uma aceleração da produção de etanol conforme o aumento do número de adaptações (em aproximadamente 40%). Este fato é relevante para a indústria, uma vez que se objetiva a fermentação dos açúcares a etanol de forma rápida e eficiente.

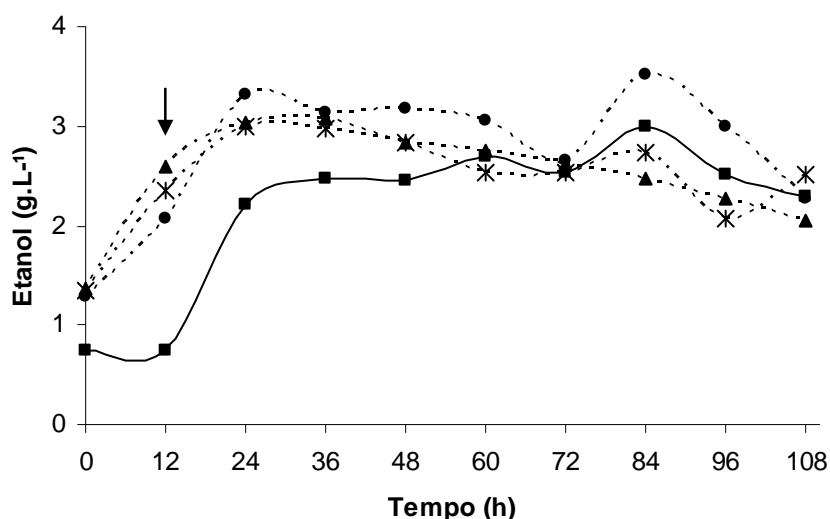


Figura 4. Produção de etanol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle (—■—) e das cepas adaptadas a 70% (--▲--), 80% (--*--*) e 90% (--●--●) de hidrolisado.

Segundo Sene et al. (2001) a formação de etanol por *C. guilliermondii* foi inicialmente muito rápida por causa da fermentação da glicose e, como a assimilação de glicose foi semelhante para todos os níveis de adaptação, a diferença na concentração final de etanol foi devido às contribuições de xilose. O mesmo pode ter acontecido neste trabalho, em que a glicose foi rapidamente consumida pelas cepas adaptadas nas primeiras 12 horas, gerando um pico na produção de etanol, o que não ocorreu com a cepa controle. Comparando-se as figuras 2 e 4, pode-se observar que a partir da contínua fermentação de xilose pela cepa controle, a produção de etanol manteve-se constante, enquanto que para as cepas adaptadas assim que a fermentação de xilose

cessou o etanol passou a ser esgotado do meio. Este fato nos leva a acreditar que as cepas adaptadas de *S. arborariae* apresentaram uma maior propensão a consumir xilose e a converter este açúcar a etanol.

A produtividade volumétrica de etanol é superior nas cepas adaptadas nas 12 horas iniciais de cultivo, devido à aceleração na fermentação. Após esse período a cepa controle produz etanol, atingindo o equilíbrio em 24 horas, porém em quantidade inferior em comparação às cepas adaptadas, como é possível de se observar na Tabela 2 pelos valores de produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) em 24 horas de cultivo. Esses resultados demonstram a esperada melhoria na fermentação à adaptação progressiva da biomassa ao meio.

Tabela 2. Produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) de etanol por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro em 24 horas de cultivo.

Cepa	Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
controle	0,0604
70%	0,0692
80%	0,0684
90%	0,0849

Para os cultivos em HCS puro, foram realizadas quatro hidrólises separadamente: para a cepa adaptada a 25% de hidrolisado; para a cepa cultivada em 50%; para a cepa em 60%; e a última para a cepa controle e as adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado. Devido às variações intrínsecas do processo de hidrólise, os hidrolisados obtidos para avaliar a fermentação das cepas cultivadas em meio contendo 25 e 60% de hidrolisado, apresentaram uma constituição de açúcares semelhantes, porém em concentrações maiores do que a última hidrólise realizada. Dessa forma, os resultados obtidos da fermentação desses dois conjuntos de cepas foram analisados separadamente. O hidrolisado puro utilizado para a fermentação da cepa adaptada a 50% de hidrolisado apresentou concentrações iniciais de açúcares incompatíveis aos demais hidrolisados, sendo assim inapropriado comparar a sua produção de etanol com as outras cepas.

Como demonstra a Figura 5, a cepa adaptada a 60% de hidrolisado obteve um aumento na quantidade e velocidade de consumo de xilose e maior produção de etanol quando cultivado em HCS puro, em comparação a cepa

adaptada a somente 25% de hidrolisado. Esses resultados estão de acordo com os obtidos pelas demais cepas adaptadas comparadas ao controle, em que a adaptação ao hidrolisado de casca de soja resultou no aumento da produtividade de etanol.

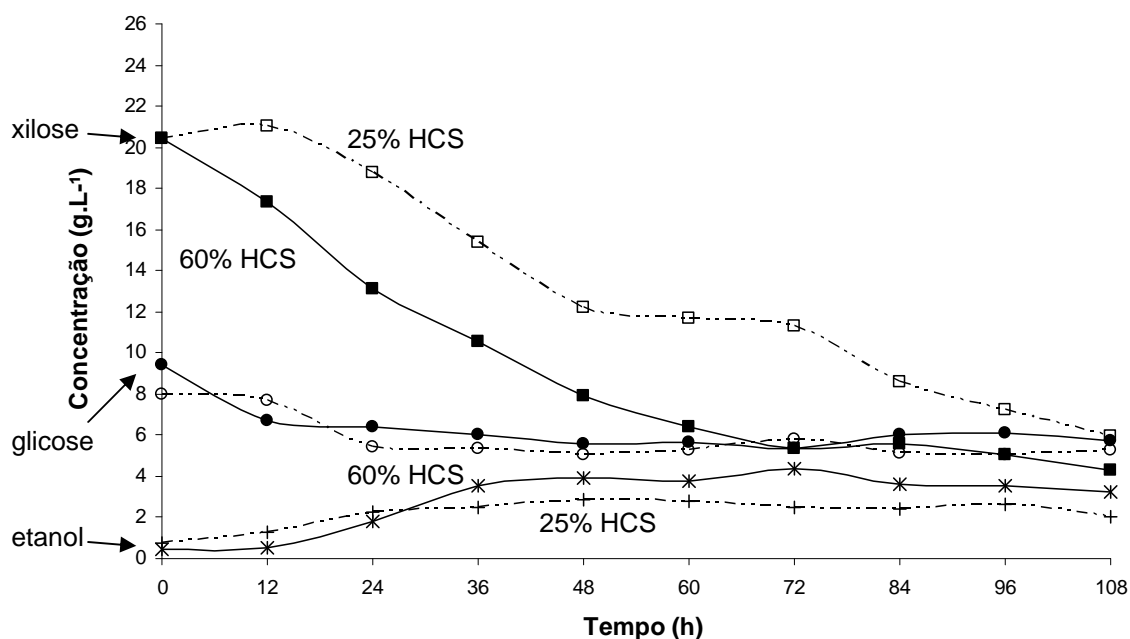


Figura 5. Consumo de glicose (círculos) e xilose (quadrados) e produção de etanol (asteriscos) durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas das cepas adaptadas a 25% (- -) e 60% (-) de hidrolisado.

Quanto à conversão das hexoses a etanol, a levedura *S. cerevisiae* é um microrganismo que possui aplicação bem sucedida na produção industrial de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar e melaço no Brasil, pois é capaz de fermentar hexoses de forma rápida e eficiente (MERICCO et al., 2007). Porém a sua utilização na produção de etanol de segunda geração sobre hidrolisados que contém pentoses e hexoses não é eficiente, já que essa levedura não consegue converter pentoses a etanol. *S. arborariae* representa uma levedura promissora para o processo fermentativo, pois converte tanto hexoses como pentoses a etanol.

3.4. Produção de glicerol

Além da produção de etanol, há formação de glicerol por *S. arborariae*. A Figura 6 apresenta o perfil de produção de glicerol pelas cepas controle e adaptadas a 70, 80 e 90% de hidrolisado de casca de soja.

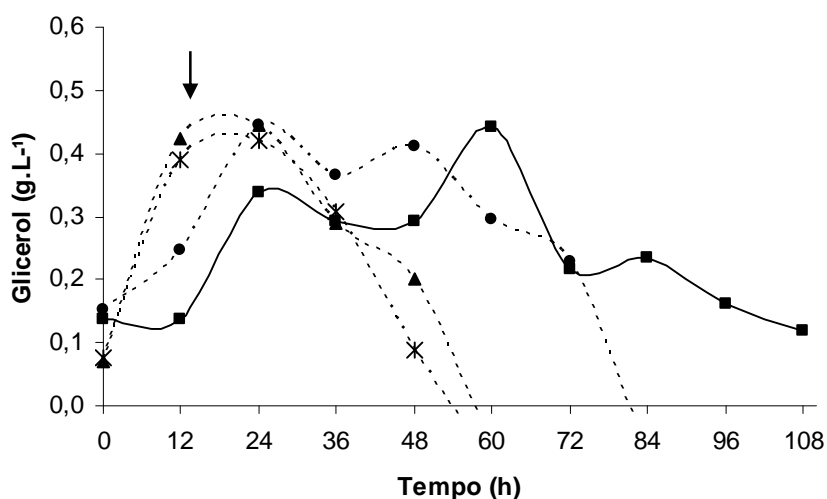


Figura 6. Produção de glicerol durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa controle (—■—) e das cepas adaptadas a 70% (--▲--), 80% (--*--*) e 90% (--●--●) de hidrolisado.

De acordo com Yablochkova et al. (2004), que estudaram as interações entre volume da cultura e velocidade de agitação e mediram as taxas de transferência de oxigênio nesses sistemas, a condição utilizada no experimento pode ser classificada como microaeróbica (125 mL em frascos Erlenmeyer contendo 24 mL de meio, sob agitação de 180 rpm). Ou seja, havia limitações de oxigênio durante o cultivo, resultando na fermentação dos açúcares e o acúmulo de NADH. Entretanto, a célula possui apenas uma pequena quantidade de NAD⁺, e, se todo NAD⁺ for convertido a NADH, a oxidação da glicose cessará. Essa “barreira” é transposta na fermentação pela oxidação de NADH por meio de reações envolvendo a redução do piruvato (originado da glicólise) a algum dos vários produtos de fermentação. Nas leveduras, o piruvato é reduzido a etanol, com a liberação de CO₂ (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Porém, quando um microrganismo cresce em um meio com baixa atividade de água (alta pressão osmótica), esta pode ser obtida pelo aumento da concentração de solutos internos pela síntese e concentração de um

determinado soluto orgânico. Por exemplo, as leveduras xerofílicas produzem glicerol como o principal soluto para o equilíbrio osmótico (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). No presente trabalho foi observada a produção de glicerol, possivelmente devido à alta pressão osmótica do hidrolisado. O glicerol é produzido a partir da fermentação da glicose, possível de ser observado pela comparação das concentrações de açúcares e glicerol no período de 24 horas. Nesse ponto todas as cepas atingiram o pico de formação de glicerol e o máximo de fermentação da glicose, enquanto que o consumo de xilose prosseguiu.

Em comparação a cepa controle, as cepas adaptadas a concentrações acima de 70% de hidrolisado apresentaram uma maior velocidade na produção de glicerol, tendo o pico de formação entre 12 e 24 horas (Figura 6 - seta), enquanto que a cepa controle adquiriu os mesmos valores apenas após 60 horas de cultivo em hidrolisado puro. A Tabela 3 apresenta a produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento ($Y_{P/S}$ g g⁻¹) da conversão de glicose a glicerol entre as cepas avaliadas. As cepas adaptadas obtiveram maior rendimento e maior produtividade em comparação a controle.

Tabela 3. Produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) e rendimento ($Y_{P/S}$ g g⁻¹) da conversão de glicose a glicerol por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro em 24 horas de cultivo.

Cepa	Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
controle	0,0083	0,0604
60%	0,0119	0,0965
70%	0,0155	0,1326
80%	0,0144	0,1087
90%	0,0122	0,0879

Segundo Cadete et al. (2009), *S. arborariae* exibe uma típica curva de crescimento onde os açúcares são eficientemente fermentados e, após os açúcares serem esgotados do meio, o etanol produzido começa a ser consumido e usado como fonte de carbono. O mesmo resultado pode ser observado neste trabalho, em que os álcoois produzidos passaram a ser consumidos como fonte de carbono a partir do momento em que as cepas atingiram o limite de fermentação dos açúcares, exceto na cepa controle, que continuou a fermentar xilose e manteve a concentração de etanol estável.

3.5. Conversão de xilose a xilitol

A formação de xilitol foi analisada somente para as cepas adaptadas a 25 e 50% de hidrolisado de casca de soja, pois não foi possível quantificar esses açúcares nos demais experimentos devido às limitações da técnica de cromatografia (CLAE) citados no item 3.2.

Em baixas taxas de transferência de O_2 , a cadeia respiratória do microrganismo não consegue oxidar o excesso de NADH, evitando a oxidação do xilitol a xilulose e assim levando ao acúmulo de xilitol. Os resultados obtidos da produção de xilitol a partir de xilose pelas cepas adaptadas a 25 e 50% de hidrolisado são apresentados na Figura 7.

Observou-se um aumento no consumo de xilose e produtividade de xilitol para a cepa adaptada a 50% de hidrolisado quando comparado ao desempenho da levedura adaptada a 25% de hidrolisado, apesar da concentração inicial de xilose ter sido menor no hidrolisado puro em que a levedura adaptada a 50% de hidrolisado foi cultivada.

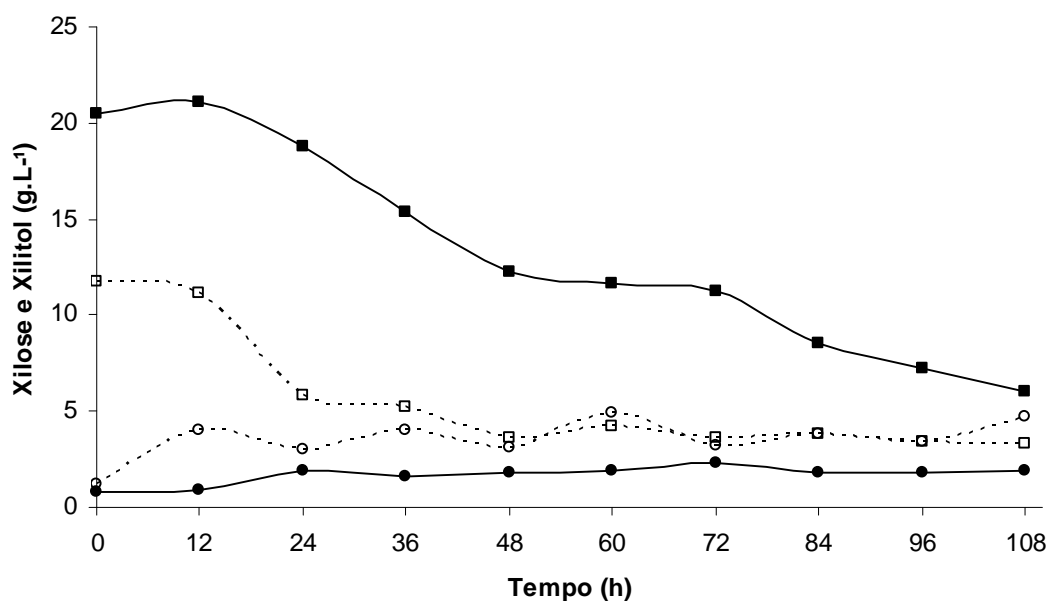


Figura 7. Consumo de xilose (quadrados) e produção de xilitol (círculos) durante a fermentação por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro por 108 horas da cepa adaptada a 25% (—) e 50% (- -) de hidrolisado.

Segundo estudo realizado por Sene et al. (2001), o nível mais elevado de xilitol foi obtido com as células mais adaptadas de *C. guilliermondii* ao hidrolisado de bagaço de cana, o que correspondeu a um aumento de 34% quando comparado com o inóculo menos adaptado. Tanto o rendimento em

xilitol (valor máximo de $Y_{P/S} = 0.59$ obtida pela cepa mais adaptada) quanto a produtividade volumétrica (Q_P) aumentaram progressivamente com o grau de adaptação celular, assim como encontrado no presente estudo com *S. arborariae*. Ao final do cultivo o rendimento da conversão de xilose a xilitol pela cepa adaptada a 50% de hidrolisado foi de $Y_{p/s} = 0,42$, enquanto que para a cepa adaptada a 25% de hidrolisado obteve rendimento de apenas $Y_{p/s} = 0,07$, como pode ser observado na Tabela 4. Esses resultados demonstram a esperada melhoria do rendimento da fermentação à adaptação progressiva da biomassa ao meio.

Tabela 4. Produtividade volumétrica (Q_P g.L⁻¹.h⁻¹) em 24 horas e rendimento ($Y_{P/S}$ g g⁻¹) final da conversão de xilose a xilitol por *S. arborariae* em frascos Erlenmeyer contendo hidrolisado de casa de soja puro.

Cepa	Q_P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)
25%	0,043	0,071
50%	0,074	0,424

4. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que o processo de adaptação de *S. arborariae* ao hidrolisado de casca de soja aumentou a velocidade e o volume de produção de etanol e glicerol, quando comparada à cepa não adaptada.

O fato de *S. arborariae* ser capaz de crescer no hidrolisado de casca de soja concentrado 4 vezes, sugere que essa levedura é osmotolerante e a sua adaptação progressiva neste meio resultou no aumento da capacidade das células de metabolizar os compostos presentes no hidrolisado.

A maior adaptação ao hidrolisado de casca de soja propiciou um aumento no rendimento de conversão de xilose a xilitol.

Este trabalho comprovou a possibilidade de melhorar a produtividade de bioetanol durante o processo fermentativo de *S. arborariae*, a partir do processo de adaptação progressiva ao hidrolisado de casca de soja. Todavia o processo necessita ser otimizado, uma vez que uma grande quantidade de açúcar residual foi detectada no hidrolisado após o término do período de fermentação.

5. PERSPECTIVAS

Avaliar a produção de etanol e xilitol da cepa adaptada de *S. arborariae* que apresentou melhor eficiência de conversão dos açúcares fermentescíveis presentes nos hidrolisados provenientes de resíduos lignocelulósicos agroindustriais (como casca de soja e arroz) em biorreatores de cultivo submerso, através de planejamento experimental, levando em consideração parâmetros como temperatura, agitação e aeração.

6. REFERÊNCIAS

- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GONÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; GOMES, F. C. O.; LACHANCE, M. A.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. *FEMS Yeast Research*, v. 9, p. 1338–1342. 2009.
- CASSALES, A. R. Dissertação: Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado. Porto Alegre, 2010, 138 p.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Embrapa Soja. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br>. Acesso em: 14 de ago. 2010.
- FAO, Food outlook: Global market analysis. *Oilseeds and Oilmeals*, p. 17–19, 2007.
- GNANASAMBANDAN R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. *Food Chemistry*, v. 65, p. 461–467, 1999.
- HAHN-HÄNGERDAL, B.; GALBE, M. GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDEN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol - the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n.12, p. 549–556, 2006.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 74, p. 937–953, 2007.
- LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.-O.; JÖNSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77–79, p. 91–103, 1999.
- LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D.; MOHAGHEGHI, A. Fermentation performance characteristics of a prehydrolyzate-adapted xylose-fermenting recombinant *Zymomonas* in batch and continuous fermentations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 77, p. 191–204, 1999.
- LIU, H. J.; LIU, D. H.; ZHONG, J. J. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. *Process Biochemistry*, v. 41, p. 473–476, 2006.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock. 10ª edição. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.
- MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS Journal*, v. 274, p. 656-666, 2007.

- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.
- OLIVEIRA, F. P.; SOUZA, L. B. R.; BETANCUR, G. J. V.; JR, N. P. Avaliação da evolução direcionada no desempenho da linhagem *pichia stipitis* na fermentação alcoólica de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana. In: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 9., 2009, Maringá. *Anais...* Maringá, 2009. p. 38.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p.17–24, 2000a.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. *Bioresource Technology*, Essex, v. 74, p. 25–33, 2000b.
- PANCHAL, C. J.; BAST, C. J.; RUSSELL, I.; STEWART, G.G. Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermenting yeasts. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 34, p. 1316–1320, 1988.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. *Bioresource Technology*, Essex, v. 66, p. 25–40, 1998c.
- SAHA, B. C.; HAYASHI, K. Lignocellulose biodegradation. *American Chemical Society*, New Orleans, p. 315p, 2004.
- 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. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 77, p. 641–648, 2002.
- SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial pentose utilization. *Current applications in biotechnology process in industrial microbiology*. 1995.
- SNYDER, H. E.; KWON, T.W. *Soybean Utilization*. Van Nostrand Reinhold, New York, 1987.
- STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 255–263, 2003.

- STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BON, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. *Journal of Scientific & Industrial Research*, v. 67, p. 918–926, 2008.
- STEPHANOPOULOS, G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science*, v. 315, p. 801–804, 2007.
- TAHERZADEN, M. J.; MILLATI, R.; NIKLASSON, C. Continuous cultivation of dilute-acid hydrolysates to ethanol by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 95, n. 1, p. 45–57, 2001.
- TORGET, R.; HATZIS, C.; HAYWARD, T. K. Optimization of reverse-flow, 2-temperature, dilute-acid pre-treatment to enhance biomass conversion to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Clifton, v. 58, p. 85-101, 1996.
- VILLAS-BÔAS, S.G.; ESPOSITO, E.; MITCHELL, D. A. Microbial conversion of lignocellulosic residues for production of animal feeds. *Animal Feed Science and Technology*, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2002.
- VON SIVERS, M.; ZACCHI, G.; OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, v. 10, p. 556–560, 1994.
- YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the cultivation medium. *Microbiology*, v. 73, n. 2, p. 129–133, 2004.
- YAMANO, L. P.; YORK, S. W.; INGRAM, L. O. Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 20, n. 2, p. 132–138, 1998.
- ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of selected aldehydes on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 65, n. 1, p. 24–32, 1999.