



RUTH VERÓNICA SIERRA ARISTIZÁBAL

**“PRODUÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS EM MEIO
DE CULTURA CONTENDO HIDROLISADO DE BAGAÇO
DE CANA-DE-AÇÚCAR”**

**CAMPINAS
2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA

RUTH VERÓNICA SIERRA ARISTIZÁBAL

**“PRODUÇÃO DE LEVEDURAS OLEAGINOSAS EM MEIO DE
CULTURA CONTENDO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR”**

Orientador(a): Profa. Dra. Telma Teixeira Franco

Co-Orientador(a) Dra Cecilia Sulzbacher Caruso

Tese de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA RUTH VERONICA SIERRA ARISTIZABAL
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. TELMA TEIXEIRA FRANCO**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2013**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

Si17p Sierra Aristizábal, Ruth Verónica, 1983-
Produção de leveduras oleaginosas em meio de cultura contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar / Ruth Verónica Sierra Aristizábal. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Telma Teixeira Franco.
Coorientador: Cecília Sulzbacher Caruso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Leveduras. 2. bagaço de cana. 3. Hemicelulose. 4. Adaptação. 5. Inibidores. I. Franco, Telma Teixeira, 1957-. II. Caruso, Cecília Sulzbacher. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Oleaginous yeast production in culture medium containing sugarcane bagasse hydrolysate

Palavras-chave em inglês:

Yeasts
Sugarcane bagasse
Hemicellulose
Adaptation
Inhibitors

Área de concentração: Engenharia de Processos

Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora:

Telma Teixeira Franco [Orientador]
Everson Alves Miranda
Jaciane Lutz Ienczak

Data de defesa: 10-04-2013

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Ruth Verónica Sierra Aristizábal e aprovada em 10 de abril de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores (as)



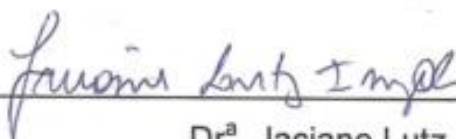
Prof.ª. Dr.ª. Telma Teixeira Franco (Orientadora)

UNICAMP



Prof. Dr. Everson Alves Miranda

UNICAMP



Dr.ª. Jaciane Lutz Ienczak

CTBE

Dedico este trabajo a los guías de mi camino... mis padres Omar y Alejandra... por el amor, el optimismo y el apoyo que me brindaron cada día para alcanzar este logro... Esta victoria también es de ustedes!!!

A mi más grande fan en la tierra... Juan Pablo

A mi ángel en el cielo... José Camilo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Omar e Alejandra, que mesmo à distância me apoiaram incondicionalmente e me encorajaram para a realização deste projeto de vida. Aos meus irmãos pela ternura e alegria. Agradeço também a minha grande família pelo incentivo e por sempre acreditar que este logro seria possível.

Ao meu noivo e amor da minha vida, Karol Gurniak, você é o sol que aquece o meu mundo, é a estrela que ilumina as minhas noites. Agradeço por me fortalecer a cada minuto para alcançar esta vitória.

À minha querida Orientadora, Prof^a. Dr^a. Telma Franco, por me acolher e permitir ser parte desta família de pesquisadores, por sua orientação e confiança.

À minha “consultora” Lucy Mara, pela colaboração e sugestões na resolução de cada problema apresentado, pelos “quebra-cabeças” e especialmente pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório, Michelle, Andreia, Alessandro, Erika e Eulalia, pela amizade, paciência e por permitir tornar o nosso laboratório um ambiente agradável, atestado de logros e alegrias. Agradeço a Vinicius, Bianca, Anna, Renato e toda a equipe do LEBBPOR, pelo apoio no trabalho e pelas boas experiências cotidianas.

Aos meus amigos Colombianos e Brasileiros, agradeço pela amizade, as alegrias e a companhia, com vocês me senti em casa.

A FAPESP e UNICAMP pelo apoio financeiro e que fizeram possível o desenvolvimento deste mestrado no Brasil.

A todos os que contribuíram para a realização deste projeto e torceram pela minha vitória.

E acima de tudo, agradeço a Deus, quem faz que tudo seja possível.

*Encomiéndate a **DIOS** de todo
corazón, que muchas veces
suele llover sus misericordias
en el tiempo que están más
secas las esperanzas.*

Miguel de Cervantes

*Ninguno ama a su **PATRIA**
porque es grande, sino
porque es suya.*

Séneca

*Aquel que encuentra la
paz en su **HOGAR**, ya
sea rey o aldeano, es
de todos los seres
humanos el más feliz*

Johann Wolfgang Von Goethe

SUMARIO

RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 OBJETIVOS	4
1.2.1 Objetivo geral	4
1.2.2 Objetivos específicos.....	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 Materiais lignocelulósicos	5
2.2 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA).....	7
2.3 Pré-tratamento de BCA para produção de H-H	8
2.4 Impacto do uso de H-H em cultivo de leveduras	12
2.5 Leveduras oleaginosas.....	15
2.6 Engenharia evolutiva	19
2.7 Biodiesel	21
3 OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO (H-H) DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR MEDIANTE EXTRAÇÃO MECÂNICA.....	23
3.1 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1.1 Determinação de umidade no BCA	23
3.1.2 Extração do H-H	23
3.1.2.1 Estudo do efeito da temperatura e concentração de bagaço através de planejamento experimental.....	23
3.1.2.2 Determinação do tempo de extração.....	26
3.1.2.3 Produção de H-H para fermentação	26
3.1.3 Metodologias analíticas	28
3.1.3.1 Determinação de xilose e glicose	28
3.1.3.2 Determinação de ácido acético	29
3.1.3.3 Determinação de furfural e HMF	29

3.1.4	Análise estatística.....	29
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
3.2.1	Determinação de umidade no BCA	30
3.2.2	Extração do H-H	31
3.2.2.1	Estudo do efeito da temperatura e concentração de BCA por planejamento experimental	31
3.2.2.2	Determinação do tempo de extração.....	35
3.2.2.3	Produção de H-H para fermentação	36
3.3	CONCLUSÕES	39
4	ADAPTAÇÃO DE <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 POR ENGENHARIA EVOLUTIVA AO H-H OBTIDO DE BCA	40
4.1	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.1	Microrganismo	40
4.1.2	Meios de cultivo	40
4.1.2.1	Preparo do inóculo	40
4.1.2.2	Fermentação em meio sintético.....	41
4.1.2.3	Preparo do H-H para meio de cultivo	41
4.1.3	Adaptação da <i>L. starkeyi</i> por engenharia evolutiva	41
4.1.4	Cinética fermentativa em meio de cultivo sintético e contendo 30 % de H-H em regime de batelada.....	43
4.1.4.1	Fermentação em meio sintético.....	44
4.1.4.2	Fermentação em meio contendo 30% de H-H.....	44
4.1.5	Metodologia analítica.....	45
4.1.5.1	Crescimento celular	45
4.1.5.2	Determinação de lipídeos	45
4.1.5.3	Determinação de lignina solúvel no H-H	46
4.1.5.4	Determinação de xilose e glicose	47
4.1.5.5	Determinação de ácido acético	47
4.1.5.6	Determinação de furfural e HMF	47
4.1.6	Cálculo dos parâmetros cinéticos.....	48
4.1.7	Modelos matemáticos.....	49
4.1.8	Análise estatística.....	50
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.2.1	Adaptação da <i>L. starkeyi</i> por engenharia evolutiva	50

4.2.2	Cinética fermentativa em meio de cultivo sintético e contendo 30 % de H-H em regime de batelada	59
4.3	CONCLUSÕES	63
5	ESTUDO DE INIBIÇÃO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E NO CRESCIMENTO DE <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296	65
5.1	MATERIAL E MÉTODOS	65
5.1.1	Microrganismo	65
5.1.2	Meios de cultivo	65
5.1.2.1	Preparo do inóculo	65
5.1.2.2	Fermentação em meio sintético.....	66
5.1.3	Planejamento fatorial completo 2 ³	66
5.1.4	Metodologia analítica.....	68
5.1.4.1	Crescimento celular	68
5.1.4.2	Determinação de lipídeos	68
5.1.4.3	Determinação de xilose e glicose	69
5.1.4.4	Determinação de ácido acético	69
5.1.4.5	Determinação de furfural e HMF	69
5.1.5	Cálculo dos parâmetros cinéticos	70
5.1.6	Modelos matemáticos.....	71
5.1.7	Análise estatística.....	72
5.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.2.1	Comparativo dos resultados adaptação e estudo de inibição.....	81
5.3	CONCLUSÕES	83
6	SUGESTÕES PARATRABALHOS FUTUROS.....	84
7	REFERENCIAS	85

RESUMO

Aristizabal, R. V. S. *Produção de leveduras oleaginosas em meio de cultura contendo hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar*. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2013. 106 p. Dissertação (Mestrado).

Material lignocelulósico, como bagaço de cana de açúcar, é matéria prima potencial para produção de biocombustíveis de segunda geração. Hidrolisado hemicelulósico (H-H) rico em xilose pode ser fermentado por leveduras oleaginosas para a produção de lipídeos. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi adaptar a *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 em meios de cultivo contendo H-H de bagaço de cana-de-açúcar. O H-H com 12 g/L de xilose, 2 g/L de glicose, 10 g/L de ácido acético, 0,7 g/L de furfural e 1,3 g/L de HMF foi obtido após sete etapas de sequenciais de extração de bagaço previamente explodido a vapor. A levedura foi adaptada por engenharia evolutiva em meio de cultivo contendo concentrações crescentes de H-H. Como resultado, obteve-se a levedura adaptada ao meio de cultivo contendo 30% de H-H, a qual apresentou maior produtividade celular (113,90 mg/L/h) e concentração celular (9,79 g/L) em relação à cepa não adaptada (73,54 mg/L/h e 5,21 g/L, respectivamente). Fermentações em biorreator em meio sintético e contendo 30% de H-H apresentaram velocidades específicas máximas de crescimento ($\mu_{\max}$) de 0,117 e 0,122 h⁻¹, respectivamente. Através de planejamento experimental 2³ foram determinados os efeitos do ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) no crescimento e produção de lipídeos da levedura. Resultados indicaram que o ácido acético apresentou efeito significativo sobre os parâmetros cinéticos aumentando a duração da fase lag até em 34 horas, além da redução da produtividade celular (P_x) e da velocidade de consumo de substrato (r_s). Adicionalmente foram verificados efeitos sinérgicos positivos entre ácido acético conjuntamente com furfural e HMF. Testes indicaram a possibilidade de altos níveis de inibição dos produtos gerados pela degradação da lignina em concentrações acima de 7,32 g/L.

Palavras chave: Leveduras, Bagaço de cana, Hemicelulose, Adaptação, Inibidores.

ABSTRACT

Aristizabal, R. V. S. *Oleaginous yeast production in culturing media containing sugar cane bagasse hydrolyzate*. Campinas: Department of Chemical Engineering, University of Campinas, 2013. 106 p. Thesis (Master).

Lignocellulosic materials, such sugar cane bagasse, as reported as potential feedstocks for production of second generation biofuels, through hemicellulose hydrolysates (H-H) extraction rich in xylose and the subsequent fermentation with oleaginous yeast for lipids production. In this regard, the objective of this study was to adapt the *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 in culture media containing H-H of sugar cane bagasse. The H-H with 12 g/L of xylose, 2 g/L of glucose, 10 g/L acetic acid, 0.7 g/L of furfural and 1.3 g/L of HMF was obtained after seven sequential extraction steps of bagasse previously pretreated by steam explosion. The yeast was adapted by evolutionary engineering in culture medium containing increasing concentrations of H-H. As result, there was obtained the yeast adapted to culture medium containing 30% of H-H, which showed higher cell productivity (113.90 mg/L/h) and cell concentration (9.79 g/L) compared to not adapted strain (73.54 mg/L/h and 5.21 g/L, respectively). Fermentation in Bioreactor in synthetic medium and containing 30% of H-H medium showed maximum specific growth rate (μ_{max}) of 0.117 and 0.122 h⁻¹, respectively. Through experimental design 2³ was determined the effects of acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural (HMF) on growth and yield lipid yeast. As result, there was obtained that acetic acid had significant effect on kinetic parameters by increasing the duration of lag phase up to 34 hours, besides reduction of cell productivity (Px) and rate of substrate consumption (rs). Additionally positive synergistic effects were observed when acetic acid is found in culture media with furfural and HMF. Preliminary tests indicate the possibility of high levels of inhibition of products generated by lignin degradation at concentrations above 7.32 g/L.

Keywords: Yeast, Sugarcane bagasse, Hemicellulose, Adaptation, inhibitors.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 -	Principais componentes do material lignocelulósico.....	5
Figura 2 -	Estrutura da celulose.....	6
Figura 3 -	Estrutura mais comum da hemicelulose: unidades de D-xilose na cadeia principal e L-arabinose nas cadeias laterais.....	6
Figura 4 -	Alcoois precursores formadores da lignina.....	7
Figura 5 -	Sequencia de formação de produtos dos degradação gerados durante explosão a vapor de materiais lignocelulósicos.....	10
Figura 6 -	Esquema da dissociação do ácido acético no interior da célula.....	13
Figura 7 -	Esquema do procedimento no estudo de extração de carboidratos de BCA.....	25
Figura 8 -	Esquema do procedimento na produção de H-H para fermentação.....	27
Figura 9 -	Etapas de extração do H-H. A: agitação mecânica; B: recuperação da fração líquida por filtração.....	27
Figura 10 -	Bagaço de cana-de-açúcar explodido à vapor, fornecido pelo CTC.....	30
Figura 11 -	Efeitos das variáveis temperatura e concentração de BCA na concentração de xilose extraída.....	32
Figura 12 -	Efeitos das variáveis temperatura e concentração de BCA na concentração de glicose extraída.....	32
Figura 13 -	Superfícies de resposta para a concentração de carboidratos em função da temperatura e a concentração de bagaço (A: xilose; B: glicose).....	34
Figura 14 -	Concentrações de açúcares e inibidores obtidos em cada etapa de extração no preparo do H-H: (□) xilose; (■) ácido acético; (■) glicose; (■) HMF; (■) furfural.....	37
Figura 15 -	Esquema da estratégia de engenharia evolutiva aplicada em <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296.....	42

Figura 16 - Fermentações em meio sintético e contendo H-H durante o processo de adaptação.....	50
Figura 17 - Perfis de crescimento e consumo de substratos durante a adaptação.....	52
Figura 18 - Perfis de ácido acético, HMF e furfural das fermentações de adaptação.....	54
Figura 19 - Fermentação em batelada A: meio sintético; B: meio contendo 30% de H-H.....	59
Figura 20 - Perfis de crescimento celular, concentração de substratos e de inibidores de cultivo em biorreator. (●) N° células/mL experimental; (—) N° células/mL predita; (o) xilose; (●) glicose; (▲) ácido acético; (▲) furfural; (Δ) HMF.....	60
Figura 21 - Perfis de crescimento celular, concentração de substratos de inibidores de cultivo em frascos agitados. (●) Biomassa experimental; (—) Biomassa predita; (o) xilose; (●) glicose; (▲) ácido acético; (▲) furfural; (Δ) HMF.....	73
Figura 22 - Efeitos dos inibidores sobre os parâmetros cinéticos.....	76
Figura 23 - Superfícies de resposta dos parâmetros cinéticos.....	79

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 -	Condições de tratamento e concentrações de inibidores obtidas em H-H de diferentes materiais lignocelulósicos explodidos a vapor.....	11
Tabela 2 -	Conteúdo de lipídeos de algumas leveduras oleaginosas.....	16
Tabela 3 -	Composição dos ácidos graxos produzidos por <i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296.....	17
Tabela 4 -	Substratos utilizados na fermentação de leveduras oleaginosas....	18
Tabela 5 -	Codificação das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2 ² para estudo de extração de carboidratos de BCA.....	24
Tabela 6 -	Valores reais e codificados (entre parêntesis) das condições usadas no planejamento fatorial 2 ²	25
Tabela 7 -	Quantidades de H-H obtido e bagaço úmido utilizados de cada etapa sequencial.....	28
Tabela 8 -	Resultados dos testes do planejamento.....	31
Tabela 9 -	ANOVA para a concentração de xilose extraída do bagaço.....	33
Tabela 10 -	ANOVA para a concentração de glicose extraída do bagaço.....	34
Tabela 11 -	Concentração dos carboidratos glicose e xilose na cinética de extração de H-H por 3 horas.....	36
Tabela 12 -	Etapas de adaptação por pressão seletiva.....	43
Tabela 13 -	Parâmetros cinéticos obtidos durante as fermentações de adaptação de <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	48
Tabela 14 -	Concentrações de inibidores em cada etapa de adaptação.....	51
Tabela 15 -	Concentrações de lignina solúvel nas etapas de adaptação.....	55
Tabela 16 -	Nível de inibição em leveduras de compostos liberados pela degradação da lignina.....	56
Tabela 17 -	Parâmetros cinéticos de crescimento celular para fermentações em meio sintético e nas adaptações.....	57

Tabela 18 -	Parâmetros cinéticos em biorreator de crescimento celular da fermentação em meio sintético e contendo H-H.....	62
Tabela 19 -	Codificação das variáveis do planejamento experimental 2 ³	66
Tabela 20 -	Concentrações dos inibidores nas 3 ^a e 5 ^a etapas de adaptação....	67
Tabela 21 -	Parâmetros cinéticos obtidos durante as fermentações do estúdio de inibição em <i>L. starkeyi</i> DSM 70296.....	70
Tabela 22 -	Valores reais das variáveis e parâmetros cinéticos de cada fermentação do planejamento 2 ³	75
Tabela 23 -	ANOVA para as respostas densidade celular, produtividade celular, velocidade de consumo de substrato e duração da fase lag.....	77
Tabela 24 -	Preditividade e significância dos modelos matemáticos de P_x , r_s e fase lag.....	78

NOMENCLATURA

Símbolo	Nome	Unidades
% Umidade	Porcentagem de umidade em bagaço de cana-de-açúcar	%
[G]	Concentração de glicose	g/L
[X]	Concentração de xilose	g/L
AD-n	Etapa n de adaptação (n = 1, 2, 3, 4, 5)	-
A_{lig}	Valor da absorbância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm	-
A_{pd}	Valor da absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e HMF), em 280 nm	-
bag	Concentração de bagaço	%
C	$\ln X_t/X_0$	-
C_1	Concentração de furfural	g/L
C_2	Concentração de HMF	g/L
C_{lig}	Concentração de lignina solúvel	g/L
P_x	Produtividade celular	mg/Lh
R^2	Coeficiente de determinação	-
r_s	Velocidade de consumo de substrato	mg/Lh
S	Concentração de substrato	g/L
$S_{x,máx}$	Concentração de substrato quando atingido a máxima concentração célula	g/L
S_0	Concentração de substrato inicial	g/L
S(%)	Conversão global de substrato	%
$t_{x,máx}$	Tempo para atingir a máxima concentração celular	h

t_0	Tempo inicial	h
X	Concentração de células	(N° células/mL) ou (g/L)
$X_{\text{máx}}$	Concentração celular máxima	(N° células/mL) ou (g/L)
X_0	Concentração celular inicial	(N° células/mL) ou (g/L)
$Y_{x/s}$	Fator de conversão de substrato em células	g/g

Abreviaturas	Nome
aa	Ácido acético
BCA	Bagaço de cana-de-açúcar explodido
C/N	Razão carbono/nitrogênio
H-H	Hidrolisado hemicelulósico
HMF	5-hidroximetilfurfural
lag	Fase lag ou latência
N°	Número
m/m	Relação massa/massa
RPM	Rotações por minuto
v/v	Relação volume/volume
VVM	Volume de ar por volume de meio por minuto

Letras gregas	Nome	Unidades
$\mu_{\max}$	Velocidade específica máxima de crescimento	h^{-1}
ε_1	Coeficiente de extinção do furfural	L/g/cm
ε_2	Coeficiente de extinção do HMF	L/g/cm
λ	Duração da fase lag	H

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

O esgotamento das reservas petrolíferas, o aumento do preço do petróleo e os efeitos relacionados ao aquecimento global tornaram a redução do uso de recursos fósseis uma meta para vários países. Os biocombustíveis constituem uma alternativa importante para a demanda atual energética a nível mundial. Atualmente, a maior parte do biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais, porém, o aumento do consumo de biocombustíveis de primeira geração tem causado aumento nos preços dos alimentos (OPEC, 2008). Portanto os resíduos lignocelulósicos se tornaram matérias-primas atrativas para a produção de lipídeos por via fermentativa e a posterior produção de biodiesel de segunda geração.

A biomassa lignocelulósica é considerada a matéria-prima do futuro para a produção de biocombustíveis de segunda geração devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade e benefícios econômicos e ambientais. O bagaço de cana-de-açúcar (BCA) é um importante subproduto lignocelulósico agroindustrial, disponível em abundância no Brasil (UNICA, 2011). O mesmo é composto por celulose, hemicelulose e lignina (PANDEY *et al.*, 2000; DAHLMAN *et al.*, 2003; SAHA, 2003).

A fração hemicelulósica é composta de aproximadamente 80% de xilose (AGUILAR *et al.*, 2002; LASER *et al.*, 2002). O consumo deste carboidrato por *Lipomyces starkeyi*, pode levar ao aproveitamento integral da biomassa lignocelulósica para a produção de lipídeos (ZHAO, X. *et al.*, 2008). Deste modo, hidrolisados hemicelulósicos (H-H) procedentes de resíduos lignocelulósicos se convertem em fontes de carbono de grande interesse.

Entre os pré-tratamentos utilizados para a obtenção de (H-H) do bagaço, encontra-se a explosão a vapor (KUMAR *et al.*, 2009). Este pré-tratamento oferece características atrativas como baixo impacto ambiental e a utilização de reagentes não

perigosos (MOSIER *et al.*, 2005). Deste pré-tratamento resulta uma fração líquida constituída principalmente por xilose, glicose e produtos de degradação como furfural, hidroxitilfurfural (HMF), ácido acético (BALLESTEROS *et al.*, 2002) e compostos fenólicos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Dependendo da concentração, estes compostos podem inibir o crescimento da levedura (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b), provocar prolongada fase de latência (KLINKE *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007), além de reduzir a velocidade de conversão de açúcar e, conseqüentemente, diminuir a velocidade de fermentação (PANAGIOTOU e OLSSON, 2007).

As leveduras oleaginosas podem acumular mais de 20% de lipídeos (MENG *et al.*, 2009) e são capazes de produzir ácidos graxos similares aos dos óleos vegetais, com potencial aplicação para a produção de biodiesel (ZHAO, X. *et al.*, 2008). A levedura oleaginosa *Lipomyces starkeyi* destaca-se pelo acúmulo de lipídeos acima de 20% (MENG *et al.*, 2009), a capacidade de consumir simultaneamente glicose e xilose (ZHAO, X. *et al.*, 2008) além da resistência à presença de inibidores em fermentações contendo H-H (YU *et al.*, 2011).

A adaptação por engenharia evolutiva aplicada à *L. starkeyi* permite a obtenção de cepas com maior tolerância aos inibidores presentes no H-H. A concentração crescente de inibidores nos meios de cultivo exerce a pressão de seleção na levedura resultando na reprodução de células adaptadas aos meios com H-H. A capacidade de adaptação das leveduras sugere uma base genética para o desenvolvimento de cepas altamente tolerantes aos inibidores, permitindo, assim, a fermentação em H-H e a obtenção de lipídeos de características similares aos óleos vegetais usados para a produção de biodiesel (LIU *et al.*, 2004; ANTONI *et al.*, 2007).

Este projeto tem por objetivo a adaptação da levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 em meio de cultivo contendo H-H de bagaço de cana-de-açúcar. As melhores condições de extração do hidrolisado, a cinética de fermentação em meio sintético e a análise do efeito dos principais inibidores presentes nos H-H de bagaço de cana foram estudadas neste projeto de mestrado.

Com esta justificativa e objetivo, a dissertação de mestrado foi dividida em capítulos abordando os seguintes aspectos:

O capítulo 2 apresenta a “Revisão Bibliográfica”, onde são abordados a composição química do material lignocelulósico mais abundante no Brasil: o bagaço de cana-de-açúcar e os tipos de pré-tratamentos para a obtenção da fração hemicelulósica do mesmo, dando ênfase à explosão a vapor. Apresentam-se também neste capítulo, os principais conceitos relacionados à fermentação de leveduras oleaginosas em meios contendo H-H e a aplicação de estratégias adaptativas mediante engenharia evolutiva para aumentar a tolerância destas aos inibidores presentes. Finalmente uma revisão relacionada aos biocombustíveis de primeira e segunda geração foi apresentada.

No capítulo 3, “Obtenção de hidrolisado hemicelulósico (H-H) de bagaço de cana-de-açúcar mediante extração mecânica”, foi apresentada toda a metodologia empregada na extração e caracterização do H-H, além dos resultados de carboidratos e inibidores obtidos no H-H.

No capítulo 4, “Adaptação de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 por engenharia evolutiva ao H-H obtido de BCA”, foi apresentada a estratégia adaptativa por seleção através de transferências sequenciais da linhagem em culturas com concentrações crescentes de H-H. Apresentam-se também neste capítulo os perfis cinéticos com os respectivos modelos e parâmetros cinéticos obtidos para cada etapa de adaptação.

No capítulo 5, “Estudo de inibição na produção de lipídeos e no crescimento de *Lipomyces starkeyi* DSM 70296”, foi apresentado um planejamento fatorial completo 2^3 visando estudar os efeitos de ácido acético, furfural e HMF sobre o crescimento e produção de lipídeos. Adicionalmente foi apresentado um comparativo dos resultados das cinéticas de adaptação com as cinéticas do planejamento.

Nos capítulos 6 e 7, são apresentadas as sugestões para trabalhos futuros e referências bibliográficas, respectivamente.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o desempenho da levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 na obtenção de lipídeos microbianos a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, como fonte alternativa de lipídeos que atenda as especificações de um combustível (C12 a C16).

1.2.2 Objetivos específicos

- Preparar e caracterizar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar;
- Adaptar a *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 por engenharia evolutiva em meio de cultivo contendo H-H de BCA e determinar os parâmetros cinéticos;
- Obter os parâmetros cinéticos em biorreator da *L. starkeyi* DSM 70296 em meio sintético e em meio contendo H-H de BCA;
- Determinar o efeito inibitório do ácido acético, furfural e HMF sobre o crescimento e produção de lipídeos da *L. starkeyi* DSM 70296;
- Comparar os parâmetros de cultivo sem inibidores, com inibidores e meio real (contendo hidrolisado de bagaço) possibilitando delinear as condições de cultivo ideais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica é o material mais abundante de nosso planeta (LEE, 1997) composto por resíduos vegetais, florestais e alguns industriais, os quais são atrativos para a produção de biocombustíveis de segunda geração. Ela é composta em termos médios por celulose (50%), hemicelulose (25%) e lignina (25%) (PANDEY *et al.*, 2000), além de pequenas quantidades de outros componentes. Esta composição, porém, varia em função do tipo de material lignocelulósico. Na Figura 1 estão detalhadas as frações dos materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina).

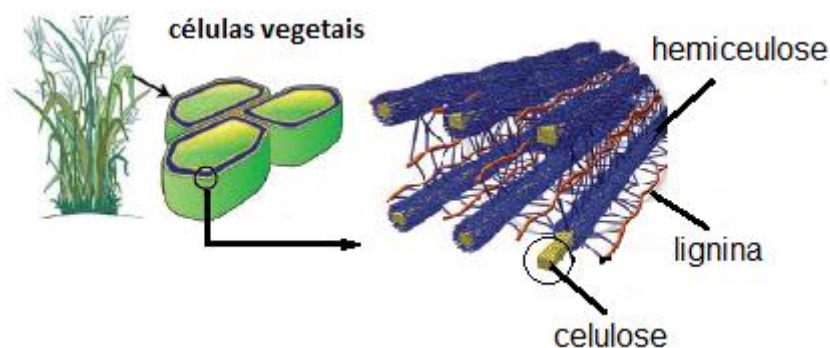


Figura 1 - Principais componentes do material lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina).

Fonte: Adaptado de Wyman *et al.*, (2009).

A celulose (Figura 2), homopolissacarídeo linear de alta massa molar, de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, é o principal componente da parede celular vegetal, formada por moléculas de D-glicose unidas por ligações do tipo $\beta(1 \rightarrow 4)$ glicosídicas. Possui elevado grau de polimerização (da ordem de 25.000 unidades) e, sob condições naturais, é dificilmente dissolvida ou hidrolisada devido à sua estrutura microcristalina (FERREIRA-FILHO, 1994).

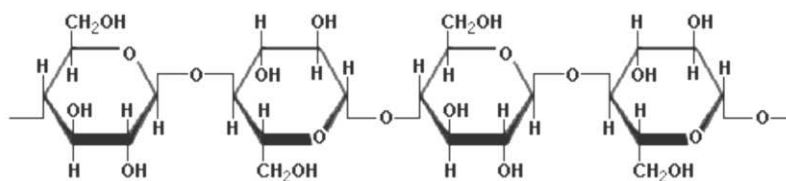


Figura 2 - Estrutura da celulose.

Fonte: Adaptado de Tapia (2004)

A hemicelulose (Figura 3), heteropolímero com cadeias menores que as da celulose e com uma estrutura linear ramificada, é formada por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose), D-galactose e ácidos urônicos e apresenta grau de polimerização inferior a 200 unidades. A composição da hemicelulose depende amplamente do tipo de vegetal considerado. As ligações entre componentes da hemicelulose e da lignina proporcionam barreira protetora contra a umidade e o ataque microbiano (FENGEL e WEGENER, 1984).

A hemicelulose é geralmente formada por uma cadeia principal que pode consistir em uma única unidade (homopolímero), por exemplo, xilanas ou ser formada por duas ou mais unidades (heteropolímero), por exemplo, arabinoxilanos. Estas cadeias a diferenciam da celulose, pois podem apresentar ramificações e substituições mediante ligações covalentes (FENGEL e WEGENER, 1984).

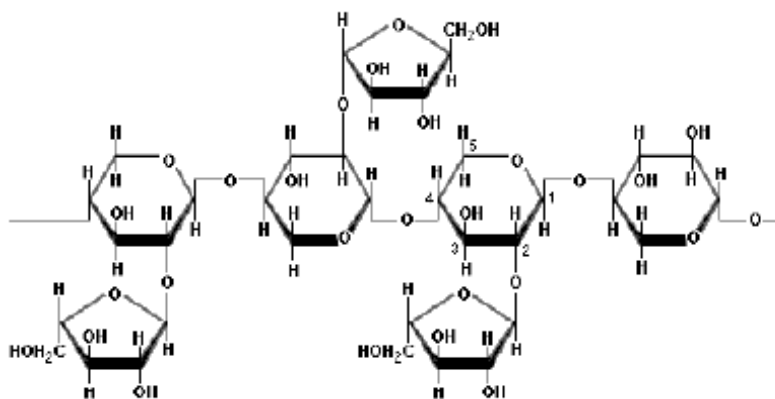


Figura 3 - Estrutura mais comum da hemicelulose: unidades de D-xilose na cadeia principal e L-arabinose nas cadeias laterais.

Fonte: Adaptado de Togores (2003)

A lignina, macromolécula vegetal abundante na parede celular, é responsável pela rigidez, impermeabilidade e proteção contra ataque de microrganismos. Ela é constituída, principalmente, por polímeros de fenil-propano: álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool *p*-cumarílico (Figura 4). Esse heteropolímero amorfo não é solúvel em água, portanto, sua degradação é difícil (KNAUF e MONIRUZZAMAN, 2004).

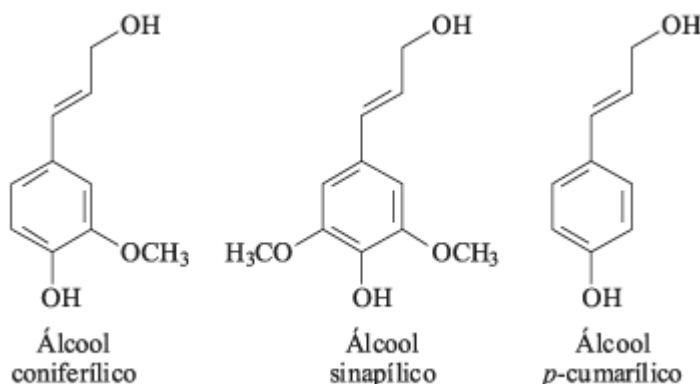


Figura 4 - Alcoois precursores formadores da lignina.
Fonte: Adaptado de Fengel e Wegner (1984).

2.2 Bagaço de cana-de-açúcar (BCA)

BCA é um resíduo lignocelulósico obtido após a extração do caldo de cana. Em base seca, este material fibroso é composto de aproximadamente 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina, descontando as impurezas minerais (PANDEY *et al.*, 2000; DAHLMAN *et al.*, 2003; SAHA, 2003). A xilana (polímero de xilose) é o componente hemicelulósico principal dos resíduos agrícolas (KOVACS *et al.*, 2009). A xilose constitui aproximadamente 80 a 90% dos carboidratos presentes na fração hemicelulósica (AGUILAR *et al.*, 2002; LASER *et al.*, 2002).

No Brasil, o BCA é atualmente um dos subprodutos lignocelulósicos mais abundantes, por ser o país o maior produtor de cana-de-açúcar para a indústria

sucroalcooleira na América latina (UNICA, 2011). Segundo relatos da UNICA (União da Indústria de Cana-de-açúcar), o volume de cana de açúcar processado pelas unidades produtoras da região Centro-Sul do país alcançou 531,35 milhões de toneladas no acumulado desde o início da safra 2012/2013 até 31 de dezembro de 2012, o que poderia proporcionar aproximadamente 135 milhões de toneladas de bagaço (UNICA, 2013).

A UNICA assinou um protocolo com seus associados para eliminar a prática da queima de bagaço até 2014 em áreas mecanizáveis e até 2017 em áreas não mecanizáveis. Como consequência disso, maior quantidade do bagaço poderá estar disponível para diversos usos (MACEDO *et al.*, 2008). Nas usinas que produzem açúcar e álcool, parte do bagaço é utilizada como combustível primário na geração de vapor e energia elétrica (TEIXEIRA *et al.*, 2007), porém uma parte poderia ser usada como fonte de carbono em processos para a produção de biocombustíveis de segunda geração (etanol ou biodiesel).

2.3 Pré-tratamento de BCA para produção de H-H

Para utilização do BCA na produção de biocombustíveis, é preciso transformar as cadeias poliméricas de carboidratos em açúcares monoméricos, que são essencialmente glicose e xilose. Estes são posteriormente fermentados e convertidos em moléculas de interesse.

Vários métodos de pré-tratamento já foram desenvolvidos para a transformação do material lignocelulósico em H-H. Estes podem ser classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos, dependendo do agente que atua na alteração da estrutura. (SCHLITTLER e PEREIRA JR, 2008). São atualmente aplicados pré-tratamentos como a hidrólise ácida ou enzimática, hidrotermólise e explosão a vapor com impregnação ou não de catalizadores como amônia, dióxido de carbono e soluções alcalinas (MOSIER *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2005; ZHAO, X. B. *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012). Este

processo deve ser o mais simples possível para obtenção de um produto com viabilidade comercial.

Para ser econômico, o pré-tratamento deve utilizar reagentes químicos de baixo custo, além de equipamentos e procedimentos simples (MARTIN *et al.*, 2007). Com estas características, destaca-se o tratamento de explosão a vapor (KUMAR *et al.*, 2009). Neste pré-tratamento o material lignocelulósico é submetido a temperaturas habituais entre 180 e 220°C (correspondendo a uma pressão de 1,0 – 2,3 MPa) por injeção direta de vapor saturado durante intervalo regular de tempo entre 2 e 10 minutos, depois do tempo de tratamento, o material é sujeito a rápida despressurização (CHIARAMONTI *et al.*, 2012)

O pré-tratamento por explosão a vapor combina efeito químico ou *auto-hidrólise* com efeito mecânico. Este último é causado por despressurização rápida do reator, provocando a evaporação de água que impregna a biomassa e assim criando forças de cisalhamento que levam à separação das fibras (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; ZHENG *et al.*, 2009). A auto-hidrólise consiste na hidrólise da hemicelulose catalisada pelo ácido acético e demais ácidos orgânicos liberados durante a explosão a vapor (LASER *et al.*, 2002). Esse tipo de pré-tratamento é considerado um dos mais efetivos, sendo ambientalmente menos nocivo em relação a outras tecnologias (LI *et al.*, 2006).

Kaar e colaboradores (1998) realizaram experimentos com intuito de determinar a cinética de reação da explosão a vapor em bagaço de cana. Os resultados indicaram que as condições de tratamento são dependentes da matéria prima usada. Matérias primas com altos teores de xilose requerem condições mais suaves e tempos de reação mais curtos em comparação com as matérias primas com menor teor de xilose e maior de glicose.

O pré-tratamento por explosão a vapor resulta em um material sólido rico em celulose e um filtrado rico em hemicelulose total ou parcialmente solúvel. No entanto, devido às condições de temperatura e pressão elevadas, o filtrado também é composto por lignina e substâncias formadas durante o pré-tratamento (ZHANG *et al.*, 2012), as quais são normalmente tóxicas aos microrganismos. O H-H é constituída principalmente

pelos açúcares solubilizados procedentes da fração hemicelulósica e pelos produtos de degradação originados durante o pré-tratamento (BALLESTEROS *et al.*, 2002).

Os produtos de degradação podem ser agrupados em derivados do furano, ácidos alifáticos de baixa massa molecular e derivados fenólicos (ZHANG *et al.*, 2012). A Figura 5 esquematiza a sequencia de formação dos produtos de degradação gerados durante a explosão a vapor de materiais lignocelulósicos (LARSSON *et al.*, 2000).

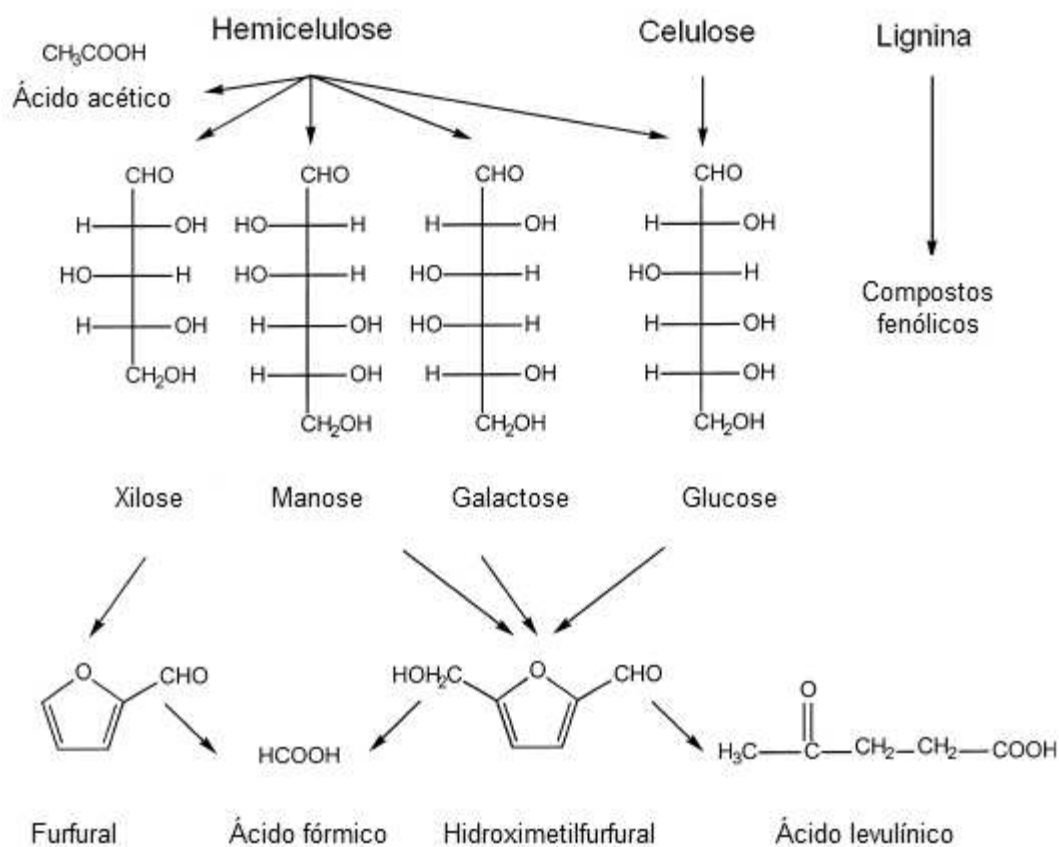


Figura 5 - Sequencia de formação de produtos dos degradação gerados durante explosão a vapor de materiais lignocelulósicos.

Fonte: Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b)

No H-H de bagaço de cana-de-açúcar obtido por explosão a vapor, os compostos encontrados em maior quantidade são furfural, HMF e ácido acético

(AGUILAR *et al.*, 2002). Furfural e HMF são formados pela degradação das pentoses e hexoses, respectivamente (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Os ácidos orgânicos gerados são principalmente o ácido acético (produzido pela hidrólise dos grupos acetil da fração hemicelulósica) e em quantidades menores o ácido fórmico e o ácido levulínico (procedentes da degradação do furfural e HMF) (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b; ALMEIDA *et al.*, 2007; PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). Compostos fenólicos como o ácido 4-hidroxibenzóico, vanilina, catecol, fenol e siringaldeído podem ser formados pela decomposição química parcial da lignina (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a; ZHANG *et al.*, 2012).

A composição do H-H depende da matéria prima, do tipo de pré-tratamento aplicado e das condições do mesmo (LARSSON *et al.*, 2000). Na Tabela 1 são apresentadas as concentrações de inibidores (ácido acético, furfural e HMF) obtidas em H-H de diferentes materiais lignocelulósicos explodidos a vapor sob diferentes condições de tratamento: tempo, temperatura e a impregnação ou não de agentes catalizadores.

Tabela 1 - Condições de tratamento e concentrações de inibidores obtidas em H-H de diferentes materiais lignocelulósicos explodidos a vapor .

Biomassa	Condições do tratamento			Concentração de inibidores			Referência
	Agente impregnado	Tempo (min)	Temperatura (°C)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	
Bagaço de cana	—	10	205	6,1	1,6	0,7	(MARTIN <i>et al.</i> , 2002)
Bagaço de cana	SO ₂	10	205	6,3	1,6	0,7	(MARTIN <i>et al.</i> , 2002)
Bagaço de cana	H ₂ SO ₄	10	205	6,5	4,4	1,8	(MARTIN <i>et al.</i> , 2002)
Palha de milho	SO ₂	5	200	1,6	1,1	0,06	(ÖHGREN <i>et al.</i> , 2006)

2.4 Impacto do uso de H-H em cultivo de leveduras

Quando o BCA é explodido a vapor, a lignina e os açúcares, como já foi discutido, podem ser degradados, gerando produtos tóxicos para as leveduras nas etapas de fermentação. A concentração elevada de inibidores presentes no H-H é basicamente devida à severidade do tratamento (maiores tempos e temperatura e pressões altas). Tem se encontrado relação direta entre a severidade do pré-tratamento e o nível de inibição do hidrolisado para as leveduras (LARSSON *et al.*, 1999; PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). A extensão dos efeitos inibitórios na fermentação depende das características das substâncias, dificultando o seu aproveitamento para produção de combustíveis por processos fermentativos.

O ácido acético em solução está em equilíbrio, dependendo do pH, entre as moléculas do ácido e seu ânion correspondente. O pKa do ácido acético é de 4,75 a 25°C (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Neste valor de pH a concentração da forma dissociada e não dissociada são iguais e a capacidade tampão é maior. O ácido acético não dissociado é lipossolúvel e se difunde através da membrana plasmática (Figura 6). A inibição do crescimento dos microrganismos é devida à dissociação do ácido acético dentro do citoplasma pelo pH neutro intracelular, diminuindo assim o pH citoplasmático. (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b)

Dois mecanismos foram propostos para explicar o efeito inibitório do ácido acético nas células. Um deles é a teoria do desacoplamento, a qual sugere que a diminuição do pH intracelular causada pela difusão da forma não dissociada do ácido, deve ser compensada pelo bombardeio de prótons para fora da células pela enzima ATPase de membrana. Quando a concentração do ácido é alta superando a capacidade de bombardeamento de prótons, acidificação do citoplasma e posterior morte celular ocorrem. Outro mecanismo proposto para explicar o efeito inibitório do ácido acético é o acúmulo intracelular de ânions. Esta teoria relaciona a inibição com a toxicidade dos ânions. Enquanto os prótons são excretados ao exterior da célula, os

ânions são capturados pela mesma e se acumulam no interior da célula (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

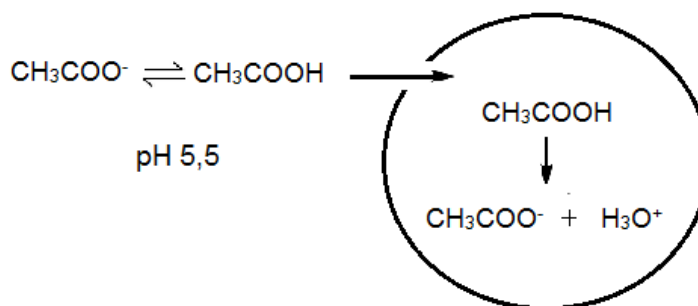


Figura 6 - Esquema da dissociação do ácido acético no interior da célula.

Furfural e HMF inibem as células, afetando a velocidade específica de crescimento e a densidade celular máxima dependendo da concentração no meio de fermentação (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). A inibição é devida à interferência com as enzimas metabólicas e a geração de prolongadas fases de latências (KLINKE *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2007). Algumas cepas de leveduras podem ser mais sensíveis aos efeitos inibitórios do furfural do que ao HMF, ambos nas mesmas concentrações (LIU *et al.*, 2004). Furfural e HMF são metabolizados por *Saccharomyces cerevisiae* sob condições aeróbicas, anaeróbicas e limitações de oxigênio. Durante a fermentação esta levedura reduz os furanos aos respectivos álcoois (furfurílico e 5-hidroximetil furfurílico) (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b), de toxicidade menor (OLIVA *et al.*, 2003)

Ampla variedade de compostos é liberada pela lignina durante a hidrólise de material lignocelulósico. Os compostos fenólicos têm considerável efeito inibitório sobre as leveduras durante a fermentação de H-H (MUSSATTO e ROBERTO, 2004), principalmente os de menor massa molar que são de maior toxicidade que os produtos de degradação de carboidratos (LARSSON *et al.*, 2000). Os compostos fenólicos causam perda da integridade das membranas biológicas, afetando a capacidade de

servir como barreira seletiva, causando diminuição da assimilação dos carboidratos e do crescimento celular (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Os mecanismos de inibição destes compostos sobre as leveduras ainda não foram completamente elucidados, em parte devido à heterogeneidade do grupo de inibidores liberados pela degradação da lignina (ZHANG *et al.*, 2012).

A concentração máxima de cada inibidor que um determinado microrganismo suporta não pode ser facilmente estabelecida, pois a inibição depende do tipo de microrganismo e de sua interação com o meio de cultivo (MUSSATTO e ROBERTO, 2004). Além dos efeitos individuais dos inibidores, a sinergia entre eles durante a fermentação pode ocorrer (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b). Segundo Parajó *et al* (1998), o efeito sinérgico observado ocorreu pela combinação de fenóis, compostos aromáticos e ácidos na fermentação de leveduras para a produção de xilitol.

Devido ao efeito individual e sinérgico dos diversos compostos inibidores presentes em H-H, é necessário o desenvolvimento de tratamentos, que permitam a utilização efetiva do hidrolisado em processos fermentativos. Assim, a detoxificação do H-H ou a utilização de leveduras tolerantes são geralmente necessárias para uma fermentação bem sucedida com o hidrolisado (HUANG, C.-F. *et al.*, 2009). A literatura reporta diferentes tipos de tratamento para a remoção de inibidores do H-H, entre eles se encontram tratamento com óxido de cálcio (CaO), carvão ativo, hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), resinas de troca iônica, extração com solventes, enzimas lacasses, além de ter sido reportado a utilização de cepas recombinantes ou adaptadas (RAO *et al.*, 2006). Assim, do ponto de vista econômico, o desenvolvimento de microrganismos robustos com capacidade de fermentar sem detoxificação do H-H é altamente importante e útil (HU *et al.*, 2009; HUANG, C.-F. *et al.*, 2009).

Tendo em vista que a xilose está presente no BCA, representando até 30% da massa seca deste (DAHLMAN *et al.*, 2003) e podendo ser liberada durante o tratamento de explosão a vapor (LASER *et al.*, 2002), seu consumo pelas leveduras durante a fermentação tem dupla consequência: a eliminação deste resíduo e a fabricação de produtos com valor agregado (RODRÍGUEZ-CHONG *et al.*, 2004).

2.5 Leveduras oleaginosas

Uma grande diversidade de microrganismos tem sido estudada para a produção de óleos e gorduras por fermentação, dentre eles bactérias, fungos, microalgas e leveduras (MENG *et al.*, 2009). Os lipídeos produzidos por microrganismos são compostos principalmente por triacilglicerídeos de ácidos graxos de cadeia longa e em menor composição de outros lipídeos como fosfolipídeos, hidrocarbonetos, carotenoides e esteróis (MORETON, 1988; SUBRAMANIAM *et al.*, 2010)

Tanto algas quanto leveduras são capazes de armazenar grandes quantidades de lipídeos, contendo ácidos graxos de cadeias saturadas (SUBRAMANIAM *et al.*, 2010). Alguns destes lipídios são de importância nutricional e dietética (RATLEDGE, 2002). Adicionalmente, os lipídeos produzidos por leveduras, devido à alta similaridade de seus ácidos graxos com os óleos vegetais, poderiam ser empregados para a produção de biodiesel (ZHAO, X. *et al.*, 2008).

Diversas espécies de leveduras são classificadas como oleaginosas, pela capacidade de acumular mais do que 20% de ácidos graxos (RATLEDGE e WYNN, 2002; MENG *et al.*, 2009), armazenados em inclusões lipídicas intracelulares. As leveduras possuem uma parede celular relativamente mais fina do que as algas, tornando a recuperação dos lipídeos relativamente mais fácil (MORETON, 1988; PILLAI *et al.*, 1998; ZHAO, X. *et al.*, 2008; MENG *et al.*, 2009).

Entre as leveduras oleaginosas, destacam-se a *Cryptococcus curvatus* (conhecido também como *Candida curvata* ou *Apiotrichum curvatum*), *Rhodotorula gracilis* (também conhecida como *Rhodotorula glutinis*), *Rhodosporidium toruloides*, *Lipomyces starkeyi* e *Yarrowia lipolytica* (AGEITOS *et al.*, 2011; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). A Tabela 2 apresenta o conteúdo de lipídeos encontrado em algumas leveduras oleaginosas.

Tabela 2 - Conteúdo de lipídeos de algumas leveduras oleaginosas.

Levedura	Lipídeos (%)	Referência
<i>Candida curvata</i>	58	(MENG <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lipomyces starkeyi</i>	61	(ZHAO, X. <i>et al.</i> , 2008)
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	76	(ZHAO <i>et al.</i> , 2011)
<i>Rhodotorula glutinis</i>	72	(MENG <i>et al.</i> , 2009)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	36	(BEOPOULOS <i>et al.</i> , 2009)

Esses microrganismos apresentam características metabólicas comuns, o que se traduz em condições de operação similares, em particular, no que se refere ao teor limitante de nitrogênio no meio de cultivo para produção de lipídeos (AGEITOS *et al.*, 2011). Nessa condição, o crescimento celular é reprimido e o carbono consumido é transformado e armazenado em inclusões lipídicas (HASSAN *et al.*, 1996; BEOPOULOS *et al.*, 2009). Assim sendo, que a produção de lipídeos não está associada ao crescimento. Tem sido reportado que as diferentes fontes de nitrogênio influenciam o crescimento ou a produção de lipídeos segundo a linhagem de levedura cultivada. A produção de lipídeos de *Cryptococcus albidus* é favorecida pela adição de nitrogênio inorgânico em comparação com as fontes orgânicas (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). Entretanto, em outros casos a adição de nitrogênio orgânico incrementa a produção de lipídeos (LI *et al.*, 2008; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011).

Apesar do mecanismo de biossíntese de lipídeos ser aparentemente similar entre as leveduras, a quantidade e tipo de óleos produzido é dependente da linhagem utilizada e das condições de cultivo (relação carbono:nitrogênio, temperatura, pH, oxigênio e a concentração de microelementos e sais inorgânicos no meio de cultivo) (GRANGER *et al.*, 1993; LI *et al.*, 2008). Concentrações adequadas de íons de Mg, Zn, Mn, Cu, e Ca melhoram consideravelmente a produção de biomassa celular e de lipídeos (LI *et al.*, 2008; AGEITOS *et al.*, 2011).

A levedura *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi escolhida de acordo com estudos anteriores (GARZÓN, 2009). Neste trabalho foram testadas 25 leveduras oleaginosas quanto sua capacidade de assimilação de xilose e produção de lipídeos, a produtividade de produção de lipídeos e elevado rendimento energético desta levedura permitiram a sua escolha para estudos posteriores. A Tabela 3 apresenta o perfil de lipídeos da *L. starkeyi* DSM 70296 com xilose como fonte de carbono e relação C/N =50 (GARZÓN, 2009)

Tabela 3 - Composição dos ácidos graxos produzidos por *Lipomyces starkeyi* DSM 70296.

Ácido graxo	<i>Lipomyces starkeyi</i> DSM 70296 (% peso)
Mirístico (C14:0)	0.83
Palmítico (C16:0)	20.38
Palmitoleico (Δ^9 C16:1)	n.d.
Esteárico (C18:0)	10.77
Oléico (Δ^9 C18:1, <i>cis</i>)	56.06
Linoléico ($\Delta^{9,12}$ C18:2, <i>cis</i>)	11.96
Linolênico ($\Delta^{6,9,12}$ C18:3)	n.d.

n.d. – não detectado

Grande variedade de substratos foi relatada pela literatura como fontes de carbono na fermentação de leveduras oleaginosas em diferentes modos de operação: frascos agitados, bateladas, bateladas alimentadas e processo contínuo (PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2011). Os dois últimos são os mais apropriados para maximizar a produção, já que é possível ajustar e controlar certas condições de fermentação e assim obter altas concentrações celulares e de lipídeos (AGEITOS *et al.*, 2011).

Entre os substratos usados encontram-se carboidratos de grau analítico (HASSAN *et al.*, 1993; LI *et al.*, 2007; ZHAO, X. *et al.*, 2008; PAPANIKOLAOU *et al.*, 2009), glicerol (MEESTERS *et al.*, 1996; PAPANIKOLAOU e AGGELIS, 2002), hidrolisado de amido (LI *et al.*, 2010), hidrolisado de palha de arroz (HUANG, C. *et al.*, 2009), hidrolisados de caroço de milho (CHANG *et al.*, 2013), hidrolisados de palha de trigo (YU *et al.*, 2011), hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (TSIGIE *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012) e efluentes domésticos (ANGERBAUER *et al.*, 2008).

Tabela 4 - Substratos utilizados na fermentação de leveduras oleaginosas.

Levedura	Substrato	Lipídeos (%)	Referência
<i>L. starkeyi</i> AS 2.1560	Glicose e xilose em meios sintéticos	61	(ZHAO, X. <i>et al.</i> , 2008)
<i>T. cutaneum</i> AS 2.571	Glicose e xilose em meios sintéticos	59	(HU <i>et al.</i> , 2011)
<i>T. cutaneum</i> AS 2.571	H-H de bagaço de milho	39	(HU <i>et al.</i> , 2011)
<i>R. graminis</i> DBVPG 7021	H-H de bagaço de milho	34	(GALAFASSI <i>et al.</i> , 2012)
<i>L. starkeyi</i> ATCC 12659	H-H detoxificados e não detoxificados de palha de trigo pré-tratados com ácido sulfúrico	30	(YU <i>et al.</i> , 2011)
<i>L. starkeyi</i> DSM 70295	Efluentes domésticos preparados mediante tratamentos térmicos, ultrassônicos e hidrólise ácida e básica	34	(ANGERBAUER <i>et al.</i> , 2008)

A xilose e a glicose são os principais carboidratos presentes nos H-H. Por isso o interesse no consumo desses carboidratos por parte das leveduras oleaginosas para a produção de lipídeos, especialmente por serem substratos de baixo custo. A literatura reporta consumo simultâneo de glicose e xilose em meios de cultivo sintéticos ou contendo H-H na fermentação de leveduras, adicionalmente indica a resistência destas á presença de inibidores nos H-H (Tabela 4). Contudo, a presença de compostos tóxicos nos H-H leva em alguns casos à diminuição na produção de lipídeos (YU *et al.*, 2011).

2.6 Engenharia evolutiva

A adaptação por engenharia evolutiva aplicada a leveduras oleaginosas permite a obtenção de cepas com maior tolerância aos inibidores presentes no H-H e com maior eficiência no consumo de carboidratos. As cepas adaptadas, cultivadas em meios líquidos, podem crescer em determinadas condições, evoluir ao longo do tempo e deslocar a população original como resultado do processo de seleção natural (SAUER, 2001). A adaptação por seleção natural está relacionada com a reprodução de células que possuem características vantajosas sobre as demais quando usada pressão de seleção adequada (CAKAR *et al.*, 2005). A concentração crescente de inibidores nos meios de cultivo exerce a pressão de seleção nas leveduras resultando na reprodução de células adaptadas aos meios com H-H. O processo de adaptação de um microrganismo sob determinadas condições, pode ser atribuída à síntese de novas enzimas ou co-fatores que permitem o metabolismo mais eficiente dos açúcares e a redução dos efeitos de quaisquer inibidor presente no meio de cultivo (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

A levedura *Candida tropicalis* foi testada para a produção de xilitol a partir de H-H de bagaço de cana, obtendo-se um rendimento de 0,45 g/g (gramas de xilitol produzidas por gramas de xilose utilizada). Após 25 ciclos de adaptação ao médio

contendo hidrolisado, o rendimento de xilitol foi aumentado para 0,65 g/g de xilose. (RAO *et al.*, 2006).

Uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante modificada para consumir xilose como fonte de carbono foi adaptada em H-H de palha de trigo pré-tratados por explosão á vapor. Como resultado, a cepa adaptada aumentou o consumo de xilose e produção de etanol em 65 e 20%, respectivamente, em relação à cepa sem adaptação (TOMAS-PEJO *et al.*, 2010).

A capacidade de leveduras para se adaptar e transformar furfural e HMF oferece o potencial para a desintoxicação *in situ* destes inibidores e sugere uma base genética para o desenvolvimento de cepas altamente tolerantes para produção de biocombustíveis (LIU *et al.*, 2004). Huang e colaboradores (2011) durante a fermentação para a produção de lipídeos da levedura *Trichosporon fermentans* em meio sintético adicionado com inibidores, encontraram que no final da fermentação não foi possível detectar furfural, o que sugere que este foi metabolizado pela levedura.

A utilização de leveduras com maior tolerância aos inibidores permite a fermentação em H-H e a obtenção de lipídeos de características similares aos óleos vegetais usados para a produção de biodiesel. Há vários estudos sobre a conversão de H-H em lipídeos por leveduras oleaginosas (CHEN *et al.*, 2009; HUANG, C. *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2011; GALAFASSI *et al.*, 2012). Estes trabalhos relatam o aproveitamento de materiais lignocelulósicos para uma potencial aplicação na produção de biodiesel de segunda geração em meios de cultivo contendo hidrolisados detoxificados ou com baixa concentração de inibidores. Nesse sentido, a adaptação de leveduras permite a utilização de hidrolisados com maiores conteúdos de inibidores para a produção de lipídeos microbianos.

2.7 Biodiesel

Nas últimas décadas a redução do uso de recursos fósseis tornou-se uma meta para vários países, devido ao esgotamento das reservas do petróleo e o aumento nos preços do mesmo (OPEC, 2006; 2011). Paralelamente, o aquecimento global relacionado ao acúmulo de gases liberados na atmosfera pela queima do petróleo afeta a população mundial. O IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change) revelou nas publicações recentes graves mudanças climáticas, incluindo alterações nas temperaturas dos polos, nas quantidades de precipitação e extremos climáticos como secas, chuvas intensas, ondas de calor e intensidade de ciclones tropicais (IPCC, 2011).

Os biocombustíveis constituem uma alternativa importante para a demanda atual energética a nível mundial. Atualmente, os biocombustíveis mais comuns são o biodiesel (feito a partir de óleos vegetais) e o bioetanol (obtido a partir de sacarose e amido) (MACEDO *et al.*, 2008). A principal vantagem do biodiesel é que ele pode ser usado em motores comuns, na forma de misturas em baixas proporções de biodiesel, ou com modificações relativamente baratas para aceitar altos percentuais do biodiesel no diesel (MACEDO *et al.*, 2008).

De modo geral, os estudos indicam que as emissões de hidrocarbonetos podem ser reduzidas pelo uso de misturas de biodiesel (IPCC, 2011). Pesquisas realizadas pela EPA (Environmental Protection Agency) nos EUA mostraram que o biodiesel reduz a maioria das emissões de gases e que a redução depende do nível de mistura. (USDOE, 2005).

A maior parte do biodiesel, no Brasil e no mundo, tem sido produzida a partir da transesterificação de óleos e gorduras com metanol ou etanol; o Programa Nacional de Uso e Produção de Biodiesel (PNPB) mostra que o mesmo pode ser obtido por diversas fontes oleaginosas, tais como os óleos vegetais de soja, mamona, girassol, palma (dendê), algodão, babaçu, amendoim, canola e também gordura animal e óleos residuais.

A inclusão do biodiesel no mercado dos combustíveis possibilita diminuir a dependência do diesel. A partir de 1 de janeiro de 2010, o biodiesel passou a ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 5% em volume, conforme Resolução nº 6 de 16/09/2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). Segundo reporte da ANP a produção nacional de biodiesel puro (B100) atingiu 2.672.760 m³ para o ano de 2011 (ANP, 2012).

Atualmente a empresa Amyris comercializa diesel de origem renovável nas zonas metropolitanas de Brasil. A produção industrial é baseada em processos de fermentação utilizando linhagens de leveduras modificadas, para converter o açúcar extraído da cana-de-açúcar na molécula-alvo: BiofeneTM. Este composto, marca de Amyris, é uma molécula de cadeia longa de hidrocarboneto ramificado chamado farneceno, utilizado para a produção de diesel e combustível de aviação (AMYRIS, 2013). A planta de produção está localizada em Piracicaba no estado de São Paulo.

Porém, segundo o relatório da OPEC de 2008, o aumento do consumo de biocombustíveis de primeira geração tem causado aumento nos preços dos alimentos. Durante o ano de 2007, só nos EUA os preços dos alimentos aumentaram mais de 7% (OPEC, 2008). Diante desse cenário, para escapar de competição com fontes alimentícias, os resíduos lignocelulósicos se convertem em matérias-primas atrativas, visto sua abundância e baixo preço, para a produção de lipídeos por via fermentativa e a posterior produção de biodiesel de segunda geração. Um dos principais desafios para a produção de biodiesel de segunda geração é o de melhorar o uso de materiais não alimentares como fontes de carbono para a produção de lipídeos microbianos (GALAFASSI *et al.*, 2012).

3 OBTENÇÃO DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO (H-H) DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR MEDIANTE EXTRAÇÃO MECÂNICA

3.1 MATERIAL E MÉTODOS

BCA foi fornecido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) (Piracicaba, Brasil), já previamente explodido a vapor e armazenado em freezer. Amostras foram descongeladas 12 horas antes do uso e separadas em quantidades suficientes para cada experimento.

3.1.1 Determinação de umidade no BCA

Amostras de bagaço, de aproximadamente 2 g foram secas a 60 °C em placas de Petri previamente taradas até alcançarem massa constante. Após esse período, a umidade foi calculada subtraindo a massa inicial do peso final conforme equação (1). As análises foram feitas em triplicata.

$$\% \text{ Umidade} = \frac{\text{massa de bagaço úmido} - \text{massa de bagaço seco}}{\text{massa de bagaço úmido}} \quad (1)$$

3.1.2 Extração do H-H

3.1.2.1 Estudo do efeito da temperatura e concentração de bagaço através de planejamento experimental

Um planejamento fatorial completo 2² foi utilizado para estudar os efeitos de temperatura e concentração de bagaço na extração dos carboidratos no H-H (Tabela

5). A matriz do planejamento, com três repetições no ponto central, totalizou sete ensaios.

Tabela 5 - Codificação das variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2² para estudo de extração de carboidratos de BCA.

Variáveis	-1	0	+1
Bagaço seco (%)	4	8	12
Temperatura (°C)	25	50	75

Cada um dos testes foi realizado em béquer plástico de 1L contendo a respectiva quantidade de BCA e água destilada pré-aquecida, até a temperatura necessária, totalizando 500 g de solução heterogênea. Cada solução foi levada a banho termostático e agitada mecanicamente por 2 horas a 300 RPM com agitador mecânico (IKA modelo eurostar pcv P1, Alemanha) arranjado com hélice tipo caule. Após a etapa de agitação a solução foi duplamente filtrada para separação das frações, a primeira foi realizada por peneiramento para a remoção das partículas maiores de bagaço e a segunda por filtração a vácuo para remoção das partículas finas. A fração líquida obtida (H-H) em cada teste foi reservada para posterior quantificação dos açúcares extraídos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O procedimento é esquematizado na Figura 7.

A Tabela 6 apresenta as condições de temperatura, bagaço e água utilizadas para cada teste. As massas de bagaço e água foram calculadas em função das condições do planejamento (4, 8 e 12%) e o de teor de umidade (45%) do bagaço.

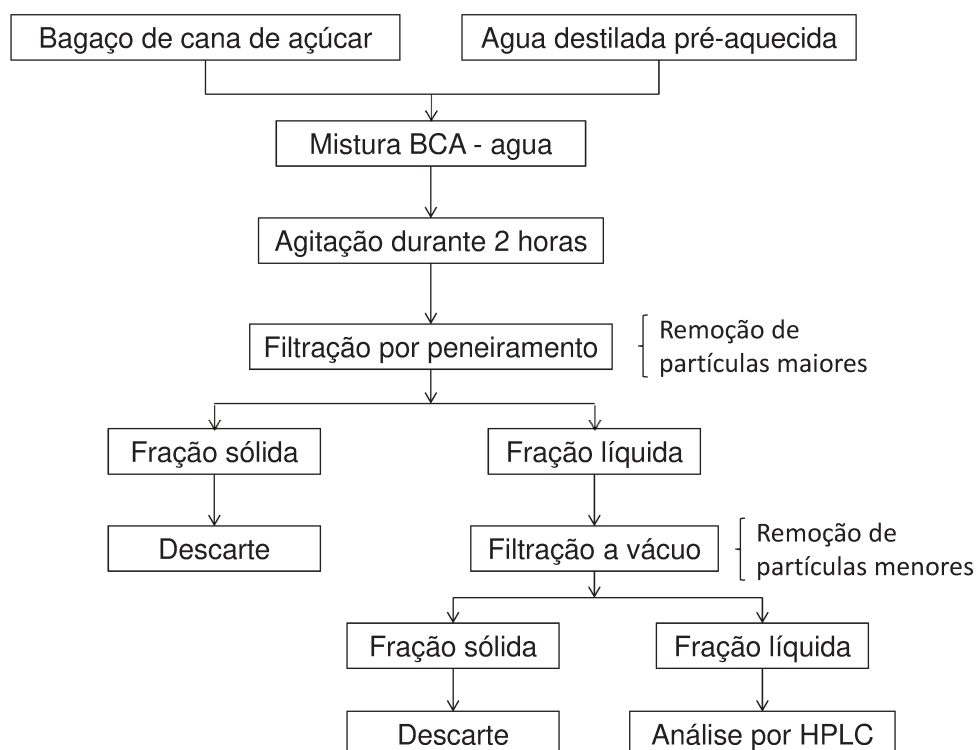


Figura 7 - Esquema do procedimento no estudo de extração de carboidratos de BCA

Tabela 6 - Valores reais e codificados (entre parêntesis) das condições usadas no planejamento fatorial 2^2 .

Teste	Água (g)	Bagaço úmido (g)	Temperatura (°C)
1	463,75	36,25 (-1)	25 (-1)
2	463,75	36,25 (-1)	75 (+1)
3	391,25	108,75 (+1)	25 (-1)
4	391,25	108,75 (+1)	75 (+1)
5	427,50	72,50 (0)	50 (0)
6	427,50	72,50 (0)	50 (0)
7	427,50	72,50 (0)	50 (0)

3.1.2.2 Determinação do tempo de extração

A determinação do tempo necessário para obtenção da máxima concentração de carboidratos no H-H foi realizado mediante estudo cinético e posterior análise estatística (Teste de tukey) dos resultados obtidos. Foram transferidos 91 g de bagaço (umidade de 45%) em béquer de 500 mL e adicionados 409 g de água. A solução (resultando em 10%, em base seca) foi agitada a 300 RPM com agitador mecânico (IKA modelo eurostar pcv P1, Alemanha) arranjado com hélice tipo caule, durante 3 horas a 25°C. A cada 30 minutos, amostras foram coletadas (em triplicata) e centrifugadas a 4500 RPM e 25°C durante 15 minutos (HETTICH modelo 420R, Alemanha) para recuperação da fase líquida. O conteúdo de xilose e glicose nessas amostras foi avaliado por HPLC.

3.1.2.3 Produção de H-H para fermentação

O H-H foi obtido após sete extrações sequenciais de BCA nas condições definidas nos itens 3.1.2.1 e 3.1.2.2. Foram transferidos 555,54 g de bagaço (45% de umidade) para um béquer de 5000 mL e adicionados 2500 g de água destilada (resultando em 10%, em base seca). Essa solução foi agitada mecanicamente a 300 RPM, 25 °C, por 30 minutos (Figura 9). Após esse período, as duas frações foram separadas por filtração a vácuo usando filtro de Büchner (Figura 9) e todo o líquido reutilizado em posterior extração com nova fração de bagaço (mantendo a relação 10%, em base seca). Este processo foi repetido por sete vezes. Amostras de 5 mL foram retiradas em cada etapa de extração para análise dos açúcares e inibidores presentes na fração líquida (H-H). A Tabela 7 apresenta o resumo das quantidades de água e bagaço utilizados em cada etapa de extração. O procedimento é esquematizado na Figura 8.

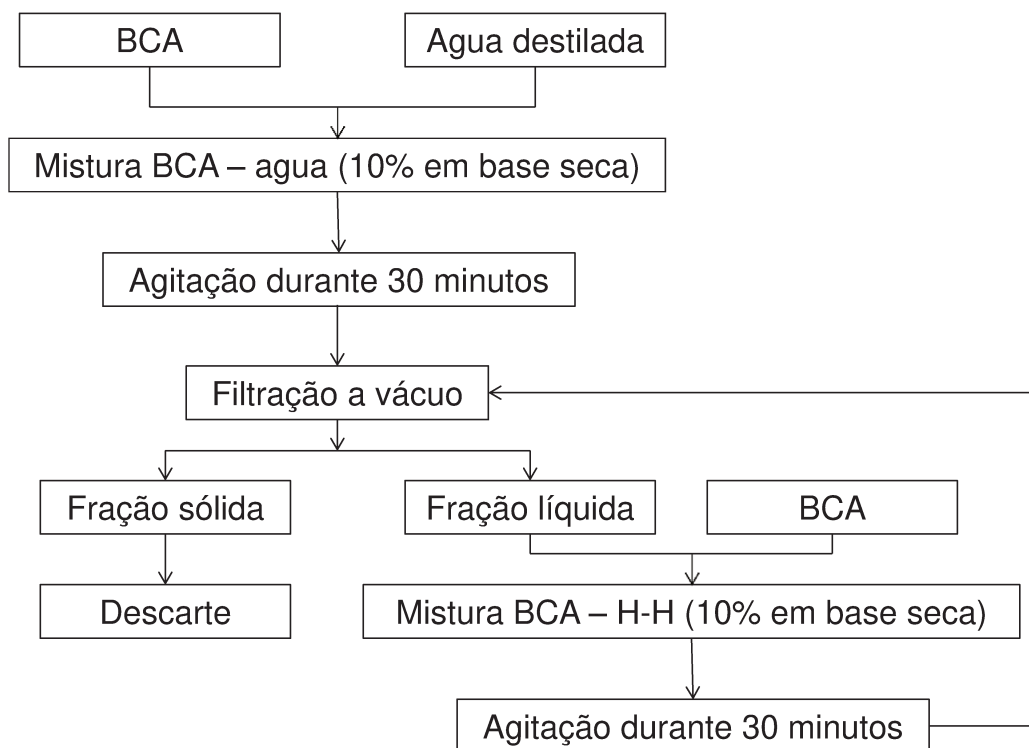


Figura 8 - Esquema do procedimento na produção de H-H para fermentação.

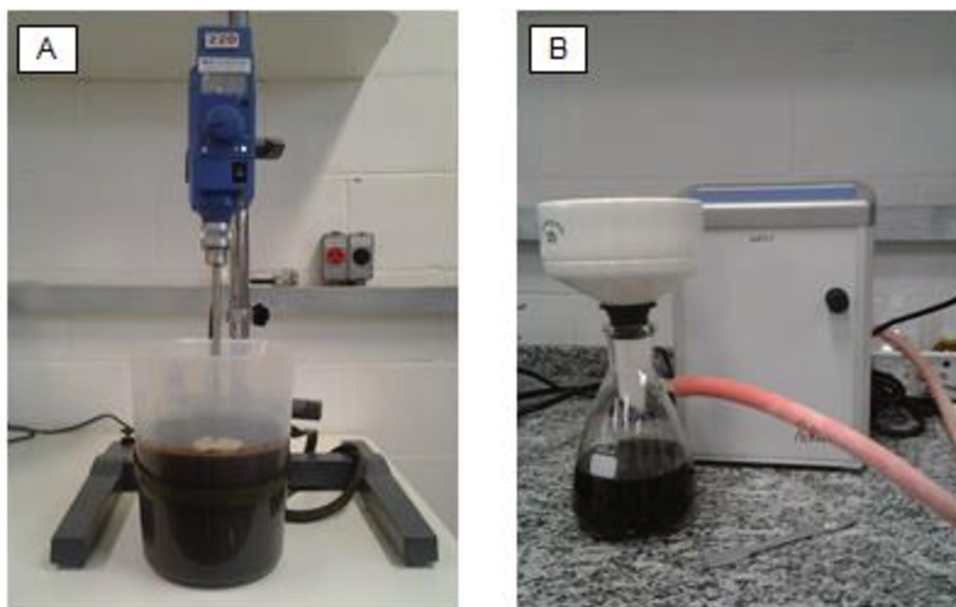


Figura 9 - Etapas de extração do H-H.
A: agitação mecânica; B: recuperação da fração líquida por filtração.

Tabela 7 - Quantidades de H-H obtido e bagaço úmido utilizados de cada etapa sequencial.

Etapa	H-H (g)	Bagaço úmido (g)
1	2500 ± 0*	555,54 ± 0
2	2247,09 ± 27,82	499,29 ± 5,05
3	2016,51 ± 17,12	448,06 ± 3,11
4	1840,09 ± 8,65	408,86 ± 1,57
5	1644,64 ± 39,36	365,40 ± 7,11
6	1506,61 ± 40,34	334,76 ± 7,31
7	1352,79 ± 49,74	300,58 ± 9,02

* Na primeira etapa de extração foi utilizada água destilada e nas etapas seguintes o H-H extraído e recuperado da etapa anterior.

3.1.3 Metodologias analíticas

3.1.3.1 Determinação de xilose e glicose

As concentrações de xilose e glicose foram determinadas usando sistema de cromatografia líquida HPLC Waters (EUA) com detector de índice de refração e coluna Shodex KS-801. A fase móvel usada foi água deionizada com vazão de 1 mL/min e injeção de 10 µL. As temperaturas da coluna e do detector foram 80 °C e 40°C, respectivamente.

3.1.3.2 Determinação de ácido acético

A concentração de ácido acético foi analisada por cromatografia de troca iônica em sistema Metrohm, composto detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan; aparelho de interface 771 IC Compact e coluna Metrosep Organic Acid (250 x 7,8 mm Metrohm AG CH 9101) O eluente usado foi H₂SO₄ 0,5 mmol/L : Acetona (85:15) e LiCl 50 mmol/L com fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna e do detector foi 28,3°C.

3.1.3.3 Determinação de furfural e HMF

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas usando um sistema de cromatografia líquida HPLC Waters acoplado a detector UV (280nm) e coluna Delta Pak C18 (150 x 3.9mm) 5 µm, 300 Å (Waters, EUA) com pré-coluna. Como fase móvel foi utilizada solução de acetonitrila 2,5% em ácido fosfórico 2 mM a uma vazão de 0,5 mL/min e injeção de 10 µL. A temperatura da coluna e do detector foram de 25°C.

3.1.4 Análise estatística

O software comercial Statistica 7.0 foi utilizado para a análise estatística dos resultados.

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

É importante salientar que as concentrações de carboidratos e inibidores obtidas no H-H são dependentes do tipo de material lignocelulósico utilizado e do pré-tratamento aplicado (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000b; PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). Neste estudo, o material utilizado foi o BCA pré-tratado por explosão a vapor.

O pré-tratamento por explosão a vapor ataca principalmente as ligações entre os componentes da hemicelulose, assim, condições mais severas do pré-tratamento levam a maior solubilização destes (MOSIER *et al.*, 2005). Estudos indicam que o aumento da severidade das condições acarreta maior degradação dos açúcares hemicelulósicos solubilizados na fração líquida, inclusive despolimerização da celulose (BALLESTEROS *et al.*, 2002; LASER *et al.*, 2002).

3.2.1 Determinação de umidade no BCA

O BCA (Figura 10) apresentou $45,49 \pm 0,29$ % de umidade. As massas das amostras foram corrigidas em todos os experimentos considerando este valor.



Figura 10 - Bagaço de cana-de-açúcar explodido à vapor, fornecido pelo CTC.

3.2.2 Extração do H-H

3.2.2.1 Estudo do efeito da temperatura e concentração de BCA por planejamento experimental

Com o intuito de estabelecer as condições de preparo do H-H, foram determinados os efeitos da temperatura e concentração de BCA sobre a concentração de glicose e xilose extraída. As concentrações dos açúcares nas diferentes condições propostas pelo planejamento experimental estão apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados dos testes do planejamento

Teste	Temperatura (°C)	Bagaço (%)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)
1	25	4	0,83	0,00
2	75	4	0,17	0,03
3	25	12	4,48	1,22
4	75	12	4,78	1,31
5	50	8	2,65	0,56
6	50	8	2,87	0,62
7	50	8	2,82	0,61

A Figura 11 e a Figura 12 apresentam os efeitos exercidos pela temperatura, a concentração de BCA e a interação entre as duas variáveis sobre a concentração de xilose e glicose extraídas.

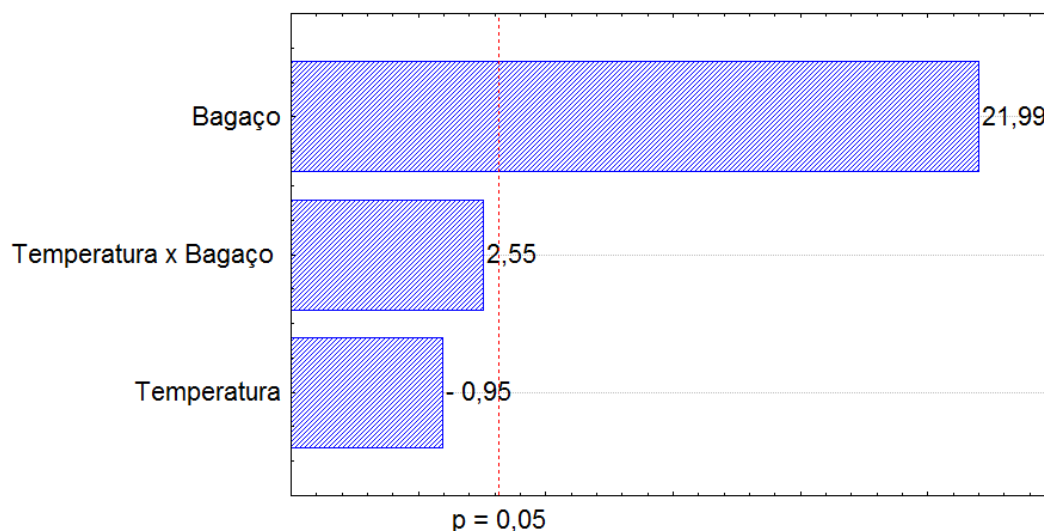


Figura 11 - Efeitos das variáveis temperatura e concentração de BCA na concentração de xilose extraída.

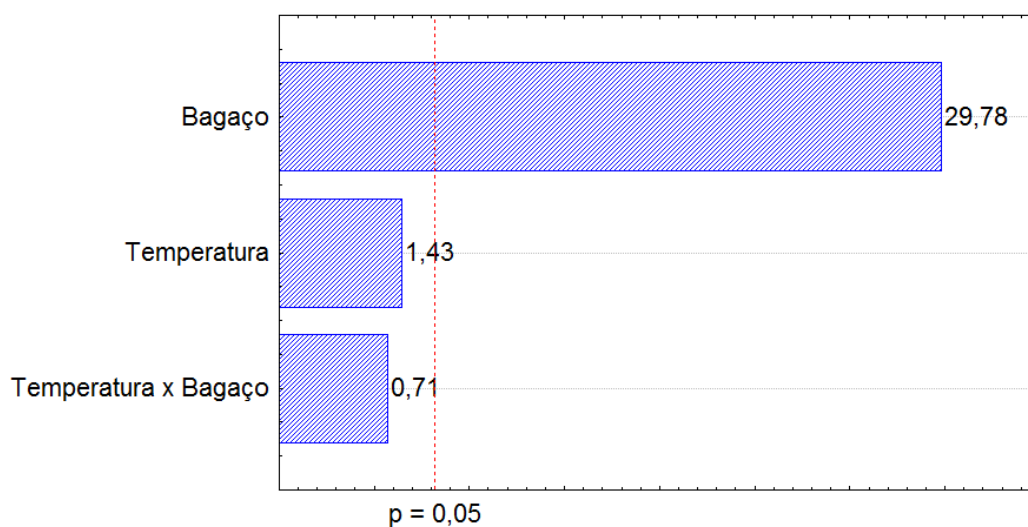


Figura 12 - Efeitos das variáveis temperatura e concentração de BCA na concentração de glicose extraída.

Ao nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$) foi observado que o aumento da concentração de bagaço de 4% para 12%, apresentou efeito significativo e positivo sobre as concentrações de xilose e glicose. As equações (2) e (3) correspondem aos modelos matemáticos construídos para cada açúcar extraído.

$$[X] = 2,66 + 2,06 * bag \quad (2)$$

$$[G] = 0,62 + 0,62 * bag \quad (3)$$

Onde:

$[X]$ = concentração de xilose (g/L)

$[G]$ = concentração de glicose (g/L)

bag = concentração de bagaço (%)

Não foram significativos os termos linear da temperatura e a interação da temperatura com a concentração de bagaço para a extração de xilose, tendo sido incorporados aos resíduos para o cálculo da ANOVA apresentada na Tabela 9. Como o F_{calc} para a regressão (231,35) é altamente significativo, sendo 35 vezes maior que o F_{tab} (6,61), e a porcentagem de variação explicada (R^2) pelo modelo foi de 97,88%, pode-se concluir que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 9 - ANOVA para a concentração de xilose extraída do bagaço.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F_{cal}	F_{tab}	R^2
Regressão	17,0569	1	17,0569	231,35	6,61	97,88
Resíduos	0,3686	5	0,0737			
TOTAL	17,4255	6				

O modelo matemático construído para a concentração de glicose extraída também foi preditivo e significativo, com R^2 de 0,9938 e o F_{cal} de 798,33, ou seja 120 vezes maior que o F_{tab} (Tabela 10).

Tabela 10 - ANOVA para a concentração de glicose extraída do bagaço

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F _{cal}	F _{tab}	R ²
Regressão	1,5625	1	1,5625	798,33	6,61	99,38
Resíduos	0,0098	5	0,0020			
TOTAL	1,5723	6				

As superfícies de resposta (Figura 13) geradas pelos modelos descrevem o efeito da concentração de bagaço e a temperatura na extração de xilose e glicose. Em ambos os casos, em qualquer temperatura, dentro do intervalo estudado, o aumento da porcentagem de bagaço resultou em um aumento da concentração dos açúcares (sendo a de xilose superior a de glicose). Porém, o aumento na temperatura não apresentou efeito significativo sobre a concentração de carboidratos na faixa estudada.

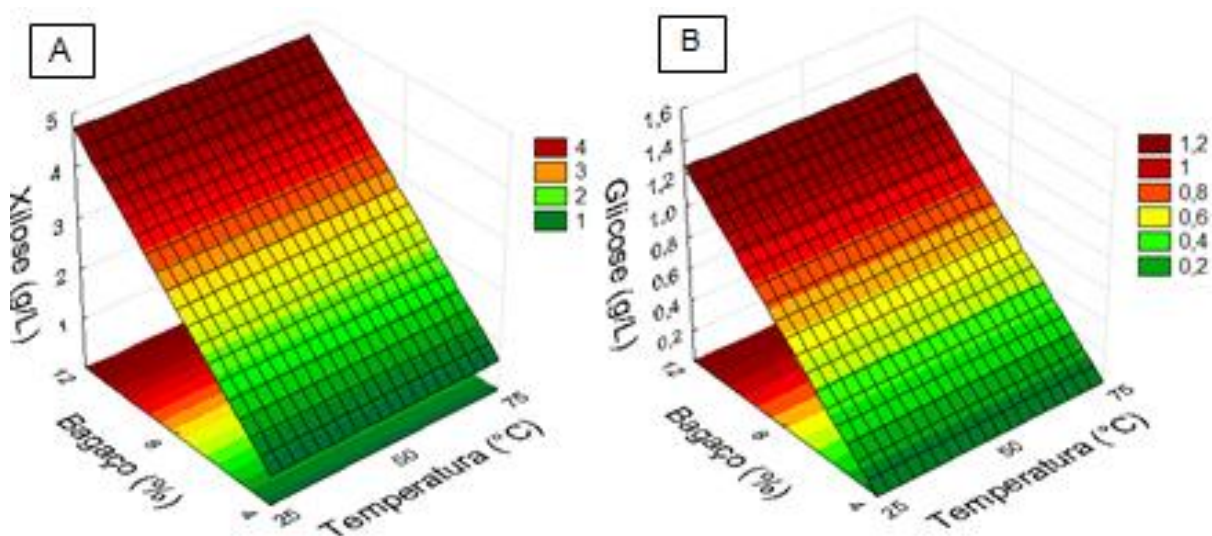


Figura 13 - Superfícies de resposta para a concentração de carboidratos em função da temperatura e a concentração de bagaço (A: xilose; B: glicose).

Embora a concentração de BCA seja uma variável importante para alcançar elevada concentração de carboidratos e, teoricamente, com o aumento da porcentagem de bagaço o processo se torna mais eficiente, o aspecto operacional deve ser considerado. O bagaço tende a absorver grandes quantidades de água, tornando as etapas de agitação e separação das fases mais complicadas. Nesse sentido, foi estabelecido uma condição de concentração de bagaço entre 8% e 12% para cada etapa se considerou adequada.

A temperatura dentro da faixa estudada não apresentou efeito significativo, contudo temperaturas mais próximas da ambiente facilitam o controle e requerem menor consumo energético, definindo-se assim 25 °C como a condição ótima para a extração de glicose e xilose no H-H.

3.2.2.2 Determinação do tempo de extração

Durante o teste de extração de H-H a partir do bagaço a 25 °C com 10% de biomassa foram retiradas amostras a cada 30 minutos, totalizando 3 horas. Através de um teste de Tukey observou-se que após 30 minutos, as concentrações de glicose e xilose permaneceram constantes, podendo ser extraídas $5,38 \pm 0,20$ g/L destes carboidratos. Assim, foi definido 30 minutos como a tempo de lavagem de bagaço para a extração de carboidratos no H-H. (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração dos carboidratos glicose e xilose na cinética de extração de H-H por 3 horas.

Tempo (min)	Carboidratos (g/L)
0	4,73 ± 0,09 ^a
30	5,38 ± 0,20 ^b
60	5,27 ± 0,17 ^{ab}
90	5,40 ± 0,29 ^b
120	5,41 ± 0,26 ^b
150	5,37 ± 0,24 ^b
180	5,21 ± 0,24 ^{ab}

a, b – Médias na mesma coluna com letras iguais não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

A extração da glicose e xilose por lavagens é um processo que ocorre na superfície do BCA, para recuperar os açúcares liberados durante a explosão á vapor. Durante este pré-tratamento as ligações dos polissacarídeos são rompidas (SCHLITTLER e PEREIRA JR, 2008) com a subsequente geração de carboidratos monoméricos (xilose e glicose principalmente), os quais ficam retidos na superfície do bagaço explodido (MOSIER *et al.*, 2005). Estes carboidratos nas concentrações encontradas são solúveis em água a temperatura ambiente, fato pelo qual a solubilização destas é um processo que não requer, mas do que 30 minutos de agitação.

3.2.2.3 Produção de H-H para fermentação

No H-H obtido após sete extrações sequenciais de bagaço foram recuperados parte dos açúcares hemicelulósicos bem como vários produtos de degradação provocados pelo pré-tratamento. A caracterização do hidrolisado em cada uma das etapas de extração está apresentada na Figura 14.

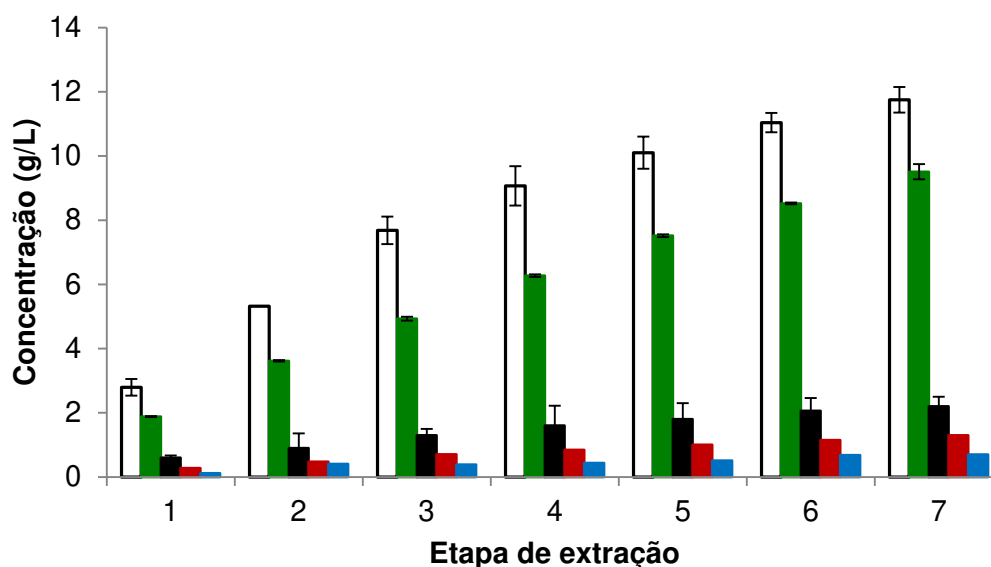


Figura 14 - Concentrações de açúcares e inibidores obtidos em cada etapa de extração no preparo do H-H: (□) xilose; (■) ácido acético; (■) glicose; (■) HMF; (■) furfural.

No H-H obtido após a última etapa de extração, foram obtidas aproximadamente 12 g/L de xilose e 2 g/L de glicose. A partir dos resultados apresentados na Figura 14, verificou-se que não houve aumento significativo da concentração desses açúcares que justificasse etapas posteriores de extração. As condições da explosão a vapor empregadas para pré-tratar o bagaço de cana-de-açúcar forneceram um H-H rico em xilose e com baixa concentração de glicose.

Adicionalmente, a Figura 14 apresenta a concentração de ácido acético, furfural e HMF gerados durante explosão a vapor do bagaço e recuperados em cada etapa de extração no H-H. O ácido acético, gerado a partir da hidrólise dos grupos acetil da fração hemicelulósica, foi o inibidor obtido em maior proporção em todas as etapas de extração, na sétima etapa (10 g/L aproximadamente). Enquanto que, furfural e HMF foram encontrados em concentrações máximas de 0,7 e 1,3 g/L, respectivamente, ao final da sétima etapa de extração.

Martin e colaboradores (2002), aplicaram três pré-tratamentos com vapor em bagaço de cana-de-açúcar: sem impregnação de catalizador, com impregnação de

dióxido de enxofre (SO_2) e com impregnação de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Os resultados da caracterização dos hidrolisados indicaram diferenças consideráveis das concentrações de carboidratos e inibidores obtidos em cada teste devido ao tipo de catalizador utilizado em cada teste. Com o pré-tratamento sem impregnação de catalizador, que corresponde ao mesmo tipo de tratamento aplicado sob o bagaço utilizado neste estudo, foi obtido um H-H contendo: 6,1 g/L de xilose, 1,0 g/L de glicose e 3,5 g/L de ácido acético. Essas concentrações correspondem à metade da concentração de xilose e glicose recuperadas neste estudo e quase a terceira parte de ácido acético.

É importante destacar que, as concentrações de inibidores dependem principalmente da temperatura e do tempo de residência no reator durante o pré-tratamento por explosão a vapor (CARRASCO *et al.*, 1990; BALLESTEROS *et al.*, 2002). Elevadas temperaturas e longos tempos de residência durante a explosão a vapor, promovem uma maior concentração de ácido acético no H-H (BALLESTEROS *et al.*, 2002; PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2011). A presença de furfural e HMF indica a degradação de pentoses e hexoses, respectivamente, durante o pré-tratamento (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a; MUSSATTO e ROBERTO, 2004). Contudo, o furfural é um composto volátil, podendo-se apresentar diminuição da concentração deste por evaporação e re-condensação durante o pré-tratamento (ALLEN *et al.*, 2001; LASER *et al.*, 2002).

Visando o aumento das concentrações de glicose e xilose no H-H, a rotaevaporação pode ser utilizada assim como as extrações sequenciais (procedimento utilizado no presente trabalho). Fonseca (2009), utilizando a metodologia da rotaevaporação, reduziu cinco vezes o volume do H-H de bagaço de cana-de-açúcar e aumentou aproximadamente o mesmo fator a concentração de xilose e glicose. Contudo, ambas as metodologias, promovem a concentração de todos os compostos do hidrolisado, incluindo as concentrações de furfural, HMF, ácido acético e compostos fenólicos.

3.3 CONCLUSÕES

Após sete etapas sequenciais de extração de bagaço de cana-de-açúcar previamente explodido a vapor (45% de umidade), foi obtido um H-H com 12 g/L de xilose; 2 g/L de glicose; 10 g/L de ácido acético; 0,7 g/L de furfural e 1,3 g/L HMF.

A faixa de temperatura entre 25 e 75 °C não apresentou efeito significativo sob a extração de glicose e xilose, permitindo estabelecer temperatura próxima da ambiente (25°C) como a temperatura de extração.

O aumento da concentração de bagaço de 4 para 12 %, apresentou efeito significativo sobre as concentrações de carboidratos, pelo tanto foi definido 10% de bagaço como uma condição operacional indicada, dado que não são apresentadas dificuldades operacionais nas etapas de agitação e filtração.

Através de um teste de Tukey foi determinado tempo de extração de 30 minutos para cada etapa sequencial.

4 ADAPTAÇÃO DE *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 POR ENGENHARIA EVOLUTIVA AO H-H OBTIDO DE BCA

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

4.1.1 Microrganismo

A cepa *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi preservada a 4 °C em agar inclinado YPX (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 20 g/L de xilose e 20 g/L de ágar, com pH ajustado a 5,5). A criopreservação das cepas foi realizada a -80 °C em meio líquido correspondente a cada etapa de adaptação e com 10 % (v/v) de glicerol.

4.1.2 Meios de cultivo

4.1.2.1 Preparo do inóculo

A levedura foi reativada (pré-inóculo) em meio de cultura YPX líquido (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 20 g/L de xilose), e transferida (30% v/v) para meio de inóculo com a seguinte composição: 12 g/L de xilose, 2 g/L de glicose, 0,43 g/L de extrato de levedura, 0,32 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de Na_2HPO_4 e 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A fermentação começou em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L.. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 500 mL (volume de trabalho de 100 mL) a 150 RPM, 28 °C e o pH foi ajustado a 5,5 com HCl 1 M.

4.1.2.2 Fermentação em meio sintético

Ao meio de fermentação foram adicionadas as quantidades equivalentes de carboidratos obtidos no H-H, mantendo-se a relação C/N de 50 (GARZÓN, 2009): 12 g/L de xilose, 2 g/L de glicose, 0,43 g/L de extrato de levedura, 0,32 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de Na_2HPO_4 , 0,04 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ e 0,005 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL (volume de trabalho de 150 mL) com 30% de inóculo (v/v), iniciando a fermentação em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L, a 150 RPM, 28 °C e pH 5,5. Para evitar escurecimento do meio de cultivo devido às reações de degradação (caramelização e Maillard), a solução de carboidratos foi esterilizada (121°C, 20 minutos) separadamente e adicionada em câmara de fluxo laminar.

4.1.2.3 Preparo do H-H para meio de cultivo

O pH do H-H, obtido descrito no item 3.1.2, foi ajustado a 5,5 com hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) em pó (YU *et al.*, 2011; HUANG *et al.*, 2012), e depois o mesmo foi centrifugado (HETTICH modelo 420R, Alemanha) a 4500 RPM, 20°C por 10 minutos para a remoção de material particulado e finalmente foi esterilizado (121°C, 20 minutos). A composição desse H-H foi de 12 g/L de xilose, 2g/L de glicose, 10 g/L de ácido acético, 0,7 g/L de furfural e 1,3 g/L de HMF.

4.1.3 Adaptação da *L. starkeyi* por engenharia evolutiva

Com o objetivo de obter uma cepa de *L. starkeyi* DSM 70296 com maior tolerância aos inibidores e mais eficiente consumo de xilose, a linhagem foi adaptada

por aumento da pressão de seleção. O meio de adaptação foi composto pelo meio de cultivo sintético (4.1.2.2) e pelo H-H de pH 5,5 (4.1.2.3) em proporções distintas dependendo da etapa de adaptação da levedura. A adaptação das células foi realizada em meio líquido contendo H-H em concentrações crescentes, de modo que a linhagem fosse exposta a concentrações cada vez maiores dos inibidores conforme Figura 15.

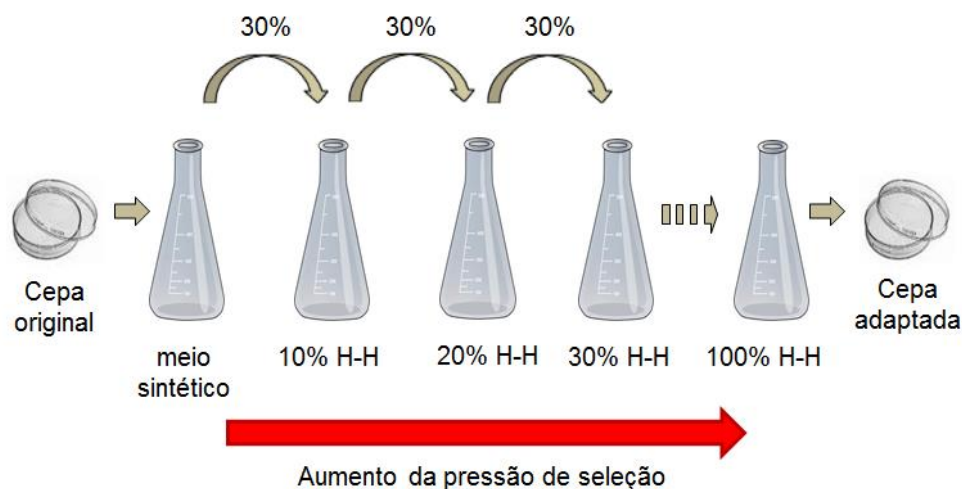


Figura 15 - Esquema da estratégia de engenharia evolutiva aplicada em *Lipomyces starkeyi* DSM 70296.

A adaptação da *L. starkeyi* foi iniciada com a transferência de inóculo na fase final do crescimento logarítmico em meio de cultivo sintético para a primeira etapa de adaptação constituída de 10% de H-H e 90% de meio de cultivo sintético (AD-1). As etapas sucessivas de adaptação foram conduzidas da seguinte forma: em cada etapa de adaptação, a concentração de H-H era aumentada em 10% ao passo que a concentração de meio de cultivo sintético foi diminuída em 10%. Esta sequência foi repetida até o máximo tolerável de H-H no meio de cultivo pela cultura, como apresentado na Tabela 12. Todas as fermentações foram feitas em frascos Erlenmeyers de 500 mL (150 mL de volume útil) a 150 RPM e 28 °C, com transferência sequencial de 30% de inóculo da cultura anterior, iniciando cada fermentação em

concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L. Após cada etapa de adaptação, amostras de cultura foram criogenizadas em glicerol conforme item 4.1.1.

Tabela 12 - Etapas de adaptação por pressão seletiva.

Etapa de adaptação	Meio sintético sintético (%)	H-H (%)
(AD-1)	90	10
(AD-2)	80	20
(AD-3)	70	30
(AD-4)	60	40
(AD-5)	50	50

Paralelamente às fermentações, foram feitos testes controle dos meios de cultivo, sem inóculo e com as respectivas concentrações de H-H a fim de verificar se mudanças nas concentrações dos inibidores poderiam ser devidas a variações físico-químicos dos cultivos.

4.1.4 Cinética fermentativa em meio de cultivo sintético e contendo 30 % de H-H em regime de batelada

As fermentações foram realizadas em batelada em biorreator BioFlo/Celli Gen 115 (Newbrunswick, Alemanha), com 1 L de volume útil. As condições de cultivo foram: 400 RPM, aeração de 1 VVM, 28 °C e pH 5,5 controlado pela adição de NaOH 2 M e HCl 2 M. Amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento da cinética de crescimento e análise de açúcares e inibidores. Todas as fermentações foram feitas em duplicata simultânea.

As condições da fermentação como pH, velocidade de agitação, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido foram registradas pelo software Bio Command Track and Trend. Revisão C. 2011 (New Brunswick Scientific, EUA).

4.1.4.1 Fermentação em meio sintético

O volume de trabalho no biorreator foi de 1 L, sendo 300 mL de inóculo (preparado segundo item 4.1.2.1) iniciando a fermentação em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L e 700 mL de meio de cultivo sintético (item 4.1.2.2). As condições de cultivo utilizadas no reator estão descritas no item 4.1.4. O final da fermentação foi determinado pelo esgotamento dos carboidratos, sendo toda a cultura retirada do fermentador e separada por centrifugação (HETTICH modelo 420R, Alemanha) a 4500 RPM, 4 °C por 10 minutos para posterior análise de lipídeos. Amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento da cinética de crescimento e análise de açúcares e inibidores. As fermentações foram realizadas em duplicata.

4.1.4.2 Fermentação em meio contendo 30% de H-H

Para esse ensaio, foram utilizados como inóculo, 300 mL de cultura da terceira etapa de adaptação, iniciando a fermentação em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L. Dos 700 mL de meio de cultivo, 30% (210 mL) foram de H-H, preparado segundo item 4.1.2.3, e o restante de meio de cultivo sintético (4.1.2.2), completando 1 L de volume útil. As condições de cultivo utilizadas no reator estão descritas no item 4.1.4. O final da fermentação foi determinado pelo esgotamento dos carboidratos, sendo toda a cultura retirada do fermentador e separada por centrifugação (HETTICH modelo 420R, Alemanha) a 4500 RPM, 4 °C por 10 minutos para posterior análise de lipídeos. Amostras foram retiradas periodicamente para acompanhamento da cinética de crescimento e análise de açúcares e inibidores. As fermentações foram realizadas em duplicata.

4.1.5 Metodologia analítica

4.1.5.1 Crescimento celular

O crescimento celular foi determinado por contagem celular (N° células/mL), utilizando Câmara de Neubauer. Não foi possível quantificar o crescimento celular por turbidimetria em espectrofotômetro, devido à formação de precipitado no hidrolisado durante a esterilização, interferindo na determinação da densidade celular. A biomassa inicial e final foi quantificada gravimetricamente mediante liofilização de amostras do início e final da fermentação, descontando o conteúdo de precipitado presente no meio de cultivo antes da inoculação em cada etapa de adaptação.

4.1.5.2 Determinação de lipídeos

O conteúdo de lipídeos totais para cada fermentação foi quantificado utilizando o método de extração de Bligh & Dyer (BLIGH e DYER, 1959) modificado. A cultura obtida ao final da fermentação foi centrifugada (HETTICH modelo 420R, Alemanha) a 4500 RPM, 4 °C por 15 minutos. O sedimentado foi ressuspenso em água destilada e lavado duas vezes. A biomassa foi congelada a -80°C por 24 horas e liofilizada (Liobras modelo L101, Brasil) a -30°C e 50 µHg durante aproximadamente 48 horas.

Para facilitar a extração de lipídeos, usou-se uma digestão ácida das amostras visando o rompimento da parede celular. Entre 300 e 500 mg de biomassa seca e triturada foram tratados com 5 mL de HCl 2 M por uma hora a 80 °C. Após esse período, a biomassa digerida foi separada por centrifugação a 4500 RPM, 4 °C por 10 minutos. A essa biomassa úmida foram adicionados 6 mL de solução metanol:clorofórmio (2:1, v/v). A suspensão foi agitada em vortex por 2 minutos. Seguidamente foram adicionados 2 mL de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3,6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por

centrifugação por 10 minutos a 4500 RPM. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa de vidro e agulha. Uma etapa de reextração foi feita com a fase superior, sendo adicionados 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio e agitado em vortex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador (IKA modelo HB 10 control, Alemanha) e o resíduo seco em estufa a 60°C até massa constante. O lipídeo final foi quantificado gravimetricamente.

4.1.5.3 Determinação de lignina solúvel no H-H

O teor dos produtos derivados da decomposição da lignina foi analisado pela quantificação da lignina solúvel presente em cada meio de cultivo da etapa de adaptação. De acordo com metodologia proposta por de Moraes Rocha (2000) *apud* Gouveia (2009), 2,5 mL do meio de cultivo contendo o hidrolisado foi alcalinizado até pH 12 pela adição de NaOH 6 M (aproximadamente 1 mL) e diluído com água destilada em balão volumétrico de 50 mL. A absorbância (IMPLEM, NanoPhotometer, Alemanha) desta solução foi determinada em comprimento de onda de 280 nm utilizando água destilada como referência. Quando necessário, alíquotas do meio de cultivo alcalinizado foram diluídas para obter medida inferior a uma unidade de absorbância. A concentração de lignina foi calculada por meio das Equações (4) e (5), levando-se em consideração o fator de diluição utilizado.

$$C_{lig} = 4,187 \times 10^{-2}(A_{lig} - A_{pd}) - 3,279 \times 10^{-4} \quad (4)$$

$$A_{pd} = C_1 * \varepsilon_1 + C_2 * \varepsilon_2 \quad (5)$$

Onde:

C_{lig} = concentração de lignina solúvel (g/L) calculada através da equação (4)

A_{lig} = valor da absorbância da solução a 280 nm.

C_1 = concentração de furfural (g/L) determinada por HPLC.

C_2 = concentração de HMF (g/L) determinada por HPLC.

ε_1 = coeficiente de extinção do furfural, 146,85 L/g/cm.

ε_2 = coeficiente de extinção do HMF, 114,00 L/g/cm.

A_{pd} = valor da absorbância dos produtos de degradação dos açúcares (furfural e HMF), calculada através da equação (5).

4.1.5.4 Determinação de xilose e glicose

As concentrações de xilose e glicose foram determinadas usando sistema de cromatografia líquida HPLC Waters (EUA) com detector de índice de refração e coluna Shodex KS-801. A fase móvel usada foi água deionizada com vazão de 1 mL/min e injeção de 10 μ L. As temperaturas da coluna e do detector foram 80 °C e 40°C, respectivamente.

4.1.5.5 Determinação de ácido acético

A concentração de ácido acético foi analisada por cromatografia de troca iônica em sistema Metrohm, composto detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan; aparelho de interface 771 IC Compact e coluna Metrosep Organic Acid (250 x 7,8 mm Metrohm AG CH 9101) O eluente usado foi H₂SO₄ 0,5 mmol/L : Acetona (85:15) e LiCl 50 mmol/L com fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna e do detector foi 28,3°C.

4.1.5.6 Determinação de furfural e HMF

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas usando um sistema de cromatografia líquida HPLC Waters acoplado a detector UV (280nm) e coluna Delta Pak C18 (150 x 3.9mm) 5 μ m, 300 Å (Waters, EUA) com pré-coluna. Como fase móvel foi

utilizada solução de acetonitrila 2,5% em ácido fosfórico 2 mM a uma vazão de 0,5 mL/min e injeção de 10 µL. A temperatura da coluna e do detector foram de 25°C.

4.1.6 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos calculados para as fermentações com a cepa adaptada estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros cinéticos obtidos durante as fermentações de adaptação de *L. starkeyi* DSM 70296.

Parâmetro		Descrição	Equação
Velocidade máxima específica de crescimento	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Item 4.1.7	
Densidade celular máxima	$X_{\max}$ (g/L)	Item 4.1.5.1	
Conteúdo de lipídeos	(%, m/m)	Item 4.1.5.2	
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{x/s}$	$Y_{x/s} = \frac{X_{\max} - X_o}{-S_o + S_{x,\max}}$	(6)
Máxima produtividade celular	P_x (mg/Lh)	$P_x = \frac{X_{\max} - X_o}{t_{x,\max} + t_o}$	(7)
Velocidade de consumo de substrato	r_s (mg/L/h)	$r_s = \frac{-S_{x,\max} + S_o}{t_{x,\max} + t_o}$	(8)
Conversão global de substrato	S (%)	$S(\%) = \left(1 - \left(\frac{S_{x,\max}}{S_o}\right)\right) * 100$	(9)

Fonte: adaptado de (DORAN e LABIANO, 1998).

4.1.7 Modelos matemáticos

O modelo de Gompertz modificado Equação (10) foi testado para prever o crescimento celular. Esta expressão inclui três parâmetros biologicamente importantes: duração da fase lag (λ), velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) e densidade celular máxima ($X_{\max}$) (LACERDA *et al.*, 2011).

$$y = C \cdot \exp^{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \exp(1)}{C} (\lambda - t) + 1\right]} \quad (10)$$

Onde:

C = assintótica $\ln X_t/X_0$

t = tempo de fermentação (h)

λ = duração da fase lag (h)

X_t = concentração de células no tempo t (N° células/mL)

X_0 = concentração inicial de células (N° células/mL)

Uma técnica de regressão não linear foi aplicada para resolver o modelo matemático usando a função “solver” de Excel® 2010. A rotina aplicada para a solução do modelo consistiu nos seguintes passos: (i) usar planilha de Excel contendo os dados experimentais, (ii) adicionar uma coluna que contenha os dados calculados pelo modelo, (iii) adicionar uma coluna com o cálculo dos mínimos quadrados, (iv) fazer a soma dos mínimos quadrados, (v) usar a função “solver” para minimizar o valor da célula contendo a soma dos mínimos quadrados. Estimativas iniciais dos valores dos parâmetros são requeridas: um valor inicial razoável da velocidade máxima específica de crescimento foi obtida do gráfico “Ln (X) x t” (LACERDA *et al.*, 2011). O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação R^2 , calculado através da função estatística de Pearson “PEARSON(matriz1, matriz2)” em Excel® 2010.

4.1.8 Análise estatística

O software comercial Statistica 7.0 foi utilizado para a análise estatística dos resultados.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Adaptação da *L. starkeyi* por engenharia evolutiva

A levedura foi adaptada mediante fermentações sequenciais em meio sintético contendo diferentes concentrações de H-H (Figura 16). Após fermentação em meio sintético, a primeira adaptação foi feita em Ernelmeyer contendo 90% de meio sintético e 10% de H-H (AD-1). Foi dada continuidade às etapas de adaptação até o máximo de tolerância pela *L. starkeyi*. Usou-se 30% (v/v) de inóculo nas fermentações em cada etapa de adaptação para garantir elevado número de células, aumentando a probabilidade de adaptação da levedura em cada meio de cultivo.



Figura 16 - Fermentações em meio sintético e contendo H-H durante o processo de adaptação.

As concentrações de inibidores de cada meio de adaptação são apresentadas na Tabela 14. A concentração de carboidratos para todos os meios corresponde à mesma que foi obtida no H-H 12 g/L de xilose e 2 g/L de glicose. É importante salientar que a concentração crescente de inibidores nos meios de cultivo exerce a pressão de seleção na levedura resultando na reprodução de células adaptadas aos meios com H-H.

Tabela 14 - Concentrações de inibidores em cada etapa de adaptação

Inibidor	AD-1	AD-2	AD-3	AD-4	AD-5
Ácido acético (g/L)	0,94	1,95	3,11	4,39	5,42
HMF (mg/L)	58,66	118,42	180,28	232,98	289,98
Furfural (mg/L)	ND	32,47	61,88	116,47	147,41

A Figura 17 apresenta as curvas de crescimento celular e concentração de carboidratos para a fermentação em meio sintético e nas etapas 1, 2 e 3 de adaptação. Adicionalmente os gráficos apresentam o ajuste do modelo Gompertz modificado aos dados experimentais com o respectivo coeficiente de determinação (R^2). Na etapa 4 a *L. starkeyi* precisaria de inóculo de tamanho maior ao padronizado neste estudo (entre 1,5 e 2,0 g/L) e na etapa 5 a levedura não sobreviveu (dados não apresentados).

L. starkeyi foi transferida para etapa seguinte de adaptação na fase final do crescimento exponencial. Neste ponto a levedura não se encontrava limitada por carboidratos, atingindo velocidade de crescimento máxima e constante tendo se adaptado aos inibidores presentes no meio de cultura. Do meio sintético para a etapa 1 de adaptação, a levedura foi transferida em 23 h de cultivo. Para as etapas 2 e 3, a mesma foi transferida em 25 e 30 h, respectivamente.

Foi observado que a levedura consumiu preferencialmente glicose em relação à xilose (Figura 17) no início da fermentação. Porém, com o aumento da concentração celular, os dois carboidratos passaram a ser consumidos simultaneamente.

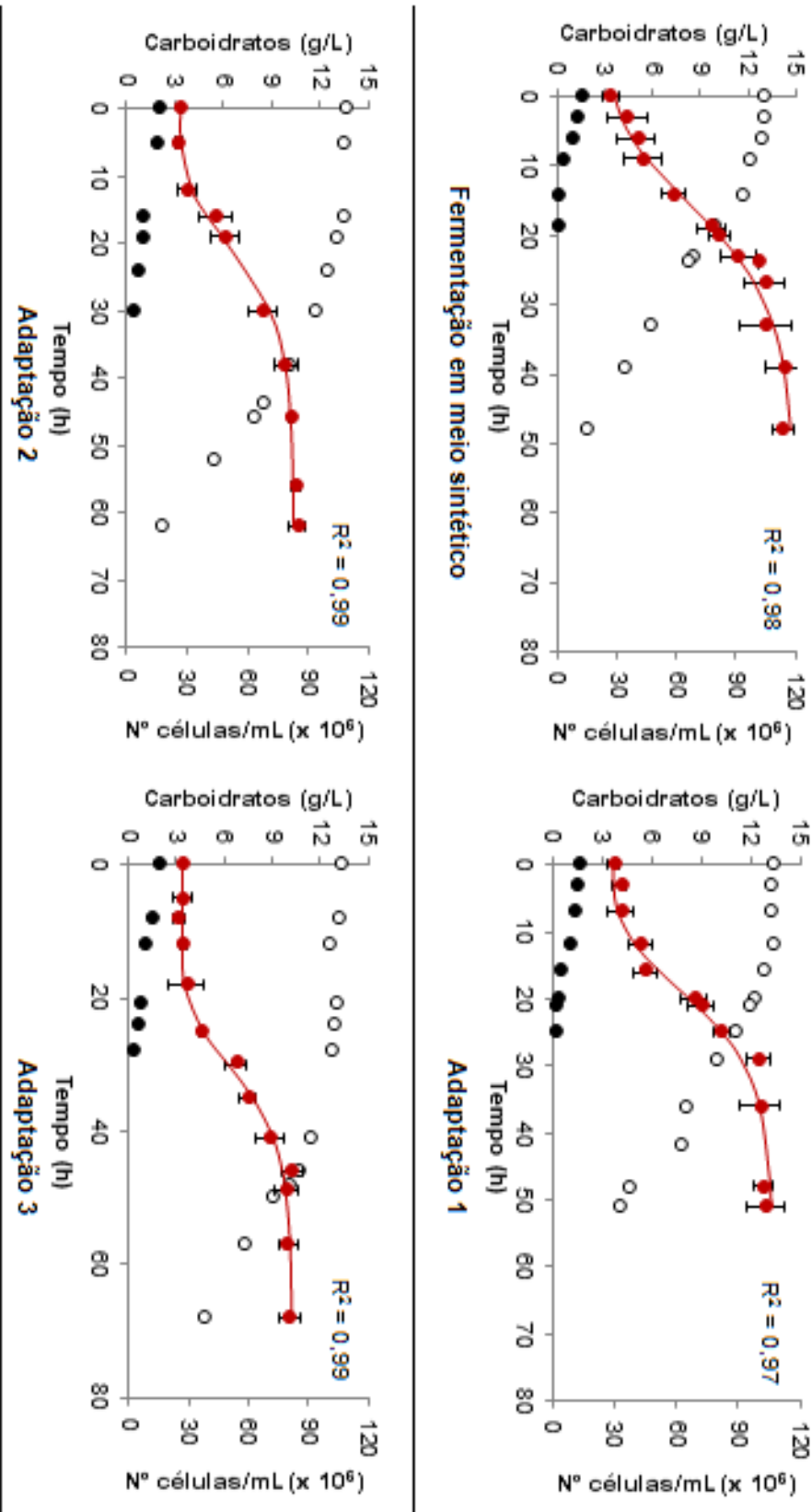


Figura 17 - Perfis de crescimento e consumo de substratos durante a adaptação.
(●) N° células/mL experimental; (—) N° células/mL predita; (○) xilose; (●) glicose.

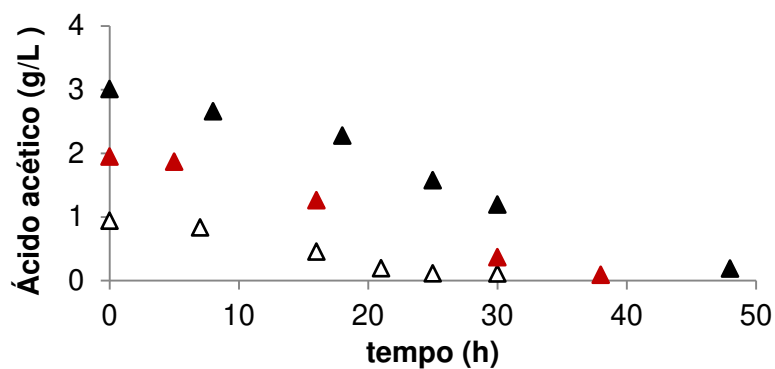
A duração das fases de latência foi maior com o aumento da porcentagem de H-H no meio de cultura. Com 10% de H-H, a fase de latência foi de 7h, aumentando para 12h e 18h com 20% e 30% de H-H, respectivamente (Figura 17). Isto se deve ao aumento na concentração dos inibidores no meio de cultivo.

Observou-se que a concentração dos três inibidores nas culturas foi diminuindo até esgotar ao longo das fermentações (Figura 18). As concentrações de furfural e HMF diminuíram durante a fase de latência nas etapas de adaptação, justificando os tempos cada vez maiores pelo consumo ou a síntese das enzimas para a redução dos inibidores. Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b), é na etapa de latência que são sintetizadas as enzimas e co-enzimas necessárias para reduzir os inibidores a formas menos tóxicas ao microrganismo.

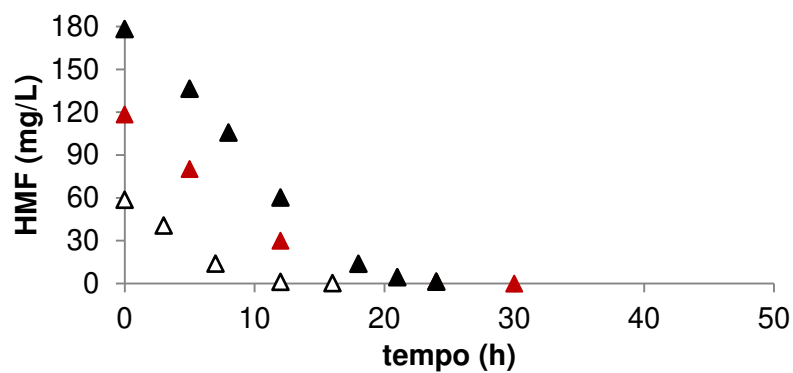
As análises de inibidores nos testes controle revelaram que as mesmas permaneceram constantes ao longo do tempo de incubação, verificando assim que a diminuição da concentração não é devida a variações físico-químicos dos cultivos.

Estudos com outras cepas, como a levedura *S. cerevisiae*, indicaram que o crescimento foi inibido completamente em meio de cultivo contendo 2 g/L furfural e 2 g/L HMF, contudo em quantidades menores de furfural e HMF ela é capaz de reduzir, por via enzimática, o furfural e o HMF a álcool furfurílico e álcool 5-hidroximetilfurfurílico, respectivamente, durante fermentações alcoólicas (TAHERZADEH *et al.*, 2000).

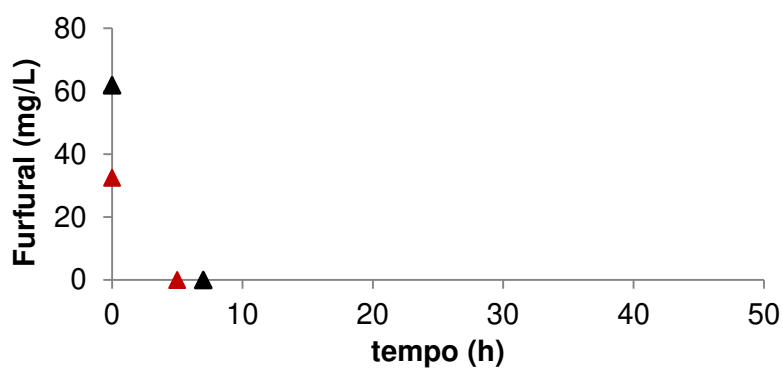
Huang *et al.* (2009), conseguiu adaptar a levedura *Pichia stipitis* para a produção de etanol com 100% de H-H de palha de arroz unicamente neutralizado com NaOH, sem mais processos de detoxificação. O H-H continha no máximo: 2,5 g/L de ácido acético, 0,4 g/L de furfural e 0,2 g/L de HMF, concentrações menores às do H-H usado no presente estudo.



Ácido acético



HMF



Furfural

Figura 18 - Perfis de ácido acético, HMF e furfural das fermentações de adaptação (Δ) AD-1; ($\blacktriangle$) AD-2; ($\blacktriangle$) AD-3.

Foram determinadas as concentrações de lignina para todos os meios de cultivo usados nas etapas de adaptação (Tabela 15). A concentração de lignina solúvel aumentou com o aumento da concentração de H-H no meio de cultivo, o que indica que o teor de compostos tóxicos, com alta capacidade inibitória, aumentou em cada etapa de adaptação.

Tabela 15 - Concentrações de lignina solúvel nas etapas de adaptação

Etapa de adaptação	Lignina solúvel (g/L)
1	1,99
2	3,09
3	4,48
4	6,08
5	7,32

A incapacidade da levedura em se adaptar as seguintes etapas (4^a e 5^a) se deve à presença dos inibidores em concentrações crescentes nos meios de cultivo. As concentrações de lignina solúvel encontrada nos meios de cultivo das etapas 4 e 5 de adaptação atingiram 6,08 e 7,32 g/L, respectivamente. Segundo a literatura, esses valores estão acima da tolerância das leveduras, sendo a possível causa da morte celular observada nesses experimentos (FONSECA, 2009; ZHANG *et al.*, 2012).

A Tabela 16 apresenta estudos realizados com leveduras em meio sintético para determinar nível de inibição de alguns produtos liberados pela degradação da lignina. Os dados apresentados indicam o alto nível de inibição destes produtos no crescimento e produção de metabólitos das leveduras.

Tabela 16 - Nível de inibição em leveduras de compostos liberados pela degradação da lignina.

Levedura	Nível de inibição	Referência
<i>Rhodospiridium toruloides</i> Y4 (produção de lipídeos)	12 mM de vanilina e 10 mM de p-hidroxibenzaldeído causaram quase completa inibição do crescimento celular	Hu et al. (2009)
<i>L. starkeyi</i> 2.1608 (produção de lipídeos)	Concentrações acima de 0,5 g/L cada inibidor (vanilina e hidroxibenzaldeído) causaram completa inibição do crescimento	Chen et al. (2009)
<i>Candida athensensis</i> SB18 (produção de xilitol)	Concentração acima de 1 g/L de mistura de inibidores (vanilina, 4-hidroxilbenzaldeído, siringaldeído e fenol) originou inibição significativa na produção de xilitol.	Zhang et al. (2012)

Parâmetros cinéticos

Foram determinados os parâmetros cinéticos das fermentações do estudo de adaptação em frascos Erlenmeyers (Tabela 17). Foi observado que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi diminuindo ao longo das etapas de adaptação em relação à fermentação em meio sintético. Isso possivelmente se deve ao efeito dos inibidores no crescimento da levedura, sugerindo a incapacidade de detoxificação *in vivo* completa dos produtos de degradação por parte da *L. starkeyi*. Zhang *et al.* (2012), indicaram que a levedura *Candida athensensis* SB18 não conseguiu eliminar o fenol presente nos meios devido à toxicidade do mesmo, diminuindo assim a velocidade específica máxima de crescimento.

A concentração máxima de biomassa ($X_{\text{máx}}$) foi obtida na terceira etapa de adaptação (9,79 g/L) e a mínima, na primeira etapa (3,89 g/L). Esse fato pode estar relacionado à necessidade da levedura em se adaptar aos inibidores presentes no H-H quando é feita a transferência do meio sintético para a primeira etapa de adaptação. Assim, para as seguintes etapas, a levedura apresentou um processo de adaptação aos inibidores, não exercendo sobre ela efeito tão severo, conseguindo aumentar a produtividade celular e a conversão de substrato em células. Como observado por Oliveira (2010) durante a adaptação de *Pichia stipitis* ao H-H de bagaço de cana, o aumento na concentração de biomassa é devido ao sucesso da adaptação das células aos inibidores presentes nos meios de cultivo.

Tabela 17 - Parâmetros cinéticos de crescimento celular para fermentações em meio sintético e nas adaptações.

Parâmetro	Sintético	AD-1	AD-2	AD-3
μ_{max} (h^{-1})	0,051	0,042	0,038	0,039
$X_{\text{máx}}$ (g/L)	5,21	3,89	7,99	9,79
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,29	0,23	0,52	0,77
P_x (mg/L/h)	73,54	46,18	102,10	113,90
r_s (mg/L/h)	256,15	202,00	196,21	147,04
S (%)	85,10	68,83	79,86	66,00
Lipídeos (% m/m)	31,55	30,61	26,30	18,53
Lipídeos (g/L)	1,64	1,19	2,10	1,81

(μ_{max}) Velocidade específica máxima de crescimento; ($X_{\text{máx}}$) Densidade celular máxima; ($Y_{x/s}$) Fator de conversão de substrato em células; (P_x) Produtividade celular (r_s); Velocidade de consumo de substrato; (S) Conversão global de substrato.

A diminuição da conversão global de substrato (S%) e da velocidade de consumo de substrato (r_s) também resultam da diminuição do crescimento das células. Outro fato que pode ser destacado é o possível acúmulo de substâncias segregadas pelas leveduras no meio, o que em concentrações elevadas, pode ser tóxico e inibir o crescimento celular (TOGOES, 2002).

Foi observada uma pequena diminuição no acúmulo de lipídeos ao longo das etapas de adaptação (Tabela 17), devido, provavelmente, aos efeitos dos inibidores. Porém, cabe destacar a relação entre a máxima concentração celular ($X_{\text{máx}}$) e de lipídeos obtida para cada etapa. Na segunda etapa de adaptação (AD-2), a biomassa chegou a 7,99 g/L com 26,30% de lipídeos, enquanto que no meio sintético foram obtidos 5,21 g/L de biomassa com 31,55% de lipídeos. Obteve-se, portanto, 0,46 g/L (22% mais) de lipídeos a mais na segunda etapa de adaptação em relação ao meio sintético. Na primeira etapa de adaptação, a concentração de lipídeos (1,19 g/L) foi 0,45 g/L inferior (27% menos) em relação ao meio sintético, possivelmente devido à primeira interação entre as células e os inibidores. No início da adaptação parte da energia disponível no meio pode ter sido destinada ao processo de adaptação, e, portanto, não foi usada em outros processos metabólicos necessários ao crescimento celular e acúmulo de lipídeos.

Com o intuito de verificar o sucesso do processo de adaptação, células não adaptadas foram fermentadas em meio de cultivo contendo 30% de H-H, sob as mesmas condições das demais fermentações. Os resultados foram a completa inibição do crescimento celular seguido de morte celular de 100% das células em 18 horas. Este resultado evidencia a necessidade de adaptação da levedura, em um processo sucessivo para melhorar a tolerância às concentrações dos inibidores presentes nos meios de cultivo contendo H-H. Fato verificado com o sucesso da adaptação da *L. starkeyi* DSM 70296.

De modo similar, Martin e colaboradores (2002), obtiveram completa inibição e morte celular em estudo sem adaptação de fermentação alcoólica de *S. cerevisiae* TMB 3001 em H-H de bagaço de cana obtido por explosão com vapor usando H_2SO_4 como catalizador, o H-H continha: 25,6 g/L de glicose, 4,4 g/L de xilose, 4,9 g/L, 3,1 g/L de furfural, 1,4 g/L de HMF e 2,8 g/L de compostos fenólicos.

4.2.2 Cinética fermentativa em meio de cultivo sintético e contendo 30 % de H-H em regime de batelada

A fermentação da *L. starkeyi* DSM 70296 foi realizada em meio sintético e em meio contendo uma mistura 70:30 de meio sintético e H-H, respectivamente, (Figura 19). Para fermentação com H-H, como inóculo foi utilizada a cultura após a terceira etapa de adaptação em incubadora rotatória, ao final do crescimento exponencial. Neste ponto, a levedura atingiu velocidade de crescimento constante e máxima e se encontrava adaptada aos inibidores presentes nesse meio de cultivo.

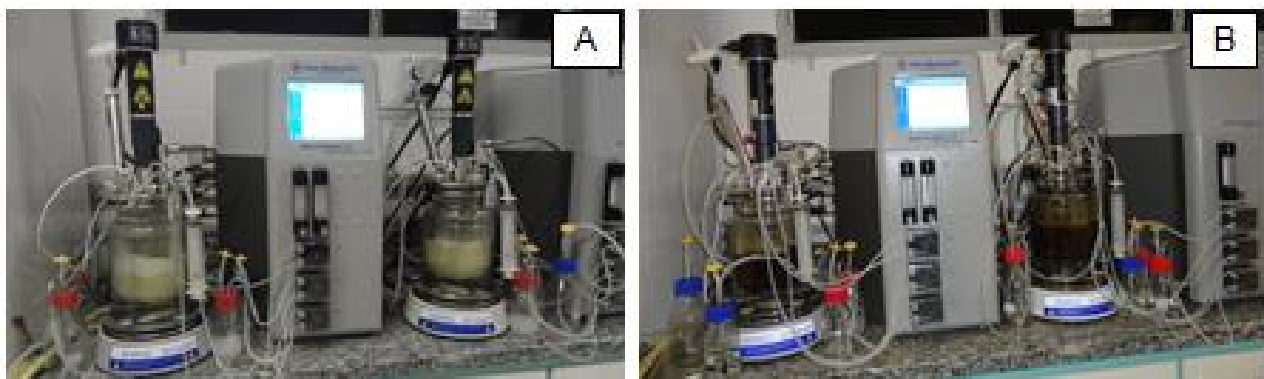
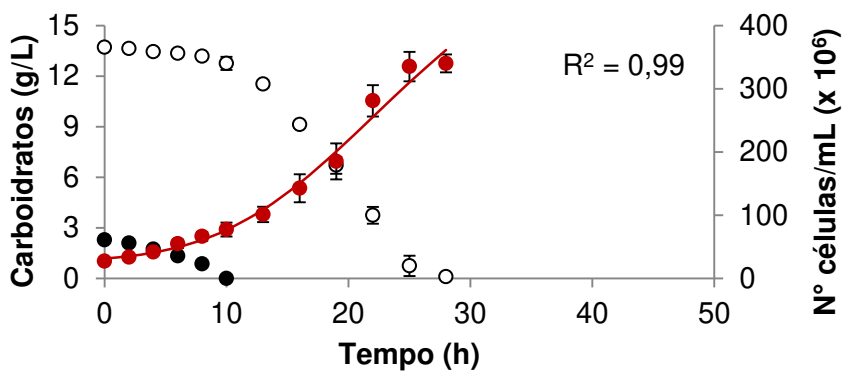
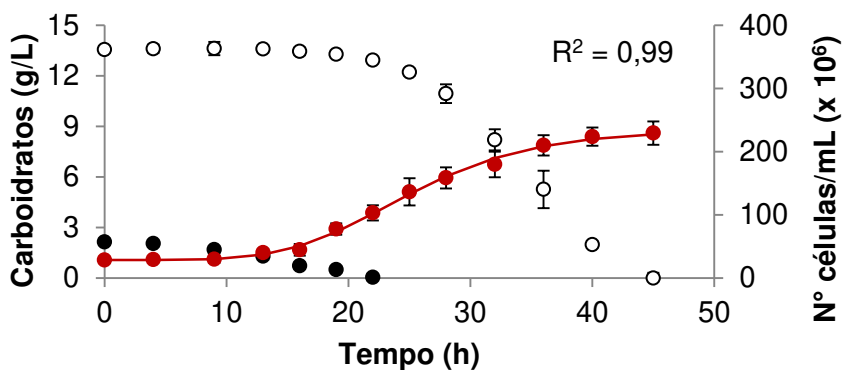


Figura 19 - Fermentação em batelada
A: meio sintético; B: meio contendo 30% de H-H.

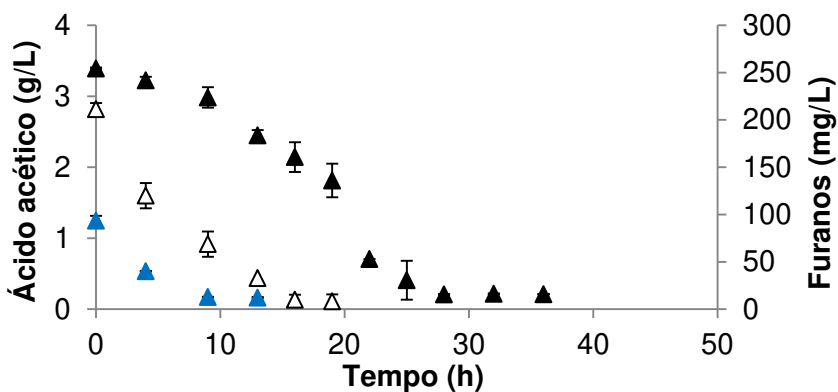
A Figura 20 apresenta as curvas de crescimento celular, consumo de carboidratos para as duas fermentações e a redução dos inibidores durante a fermentação com 30% de H-H. Adicionalmente os gráficos apresentam o ajuste do modelo Gompertz modificado aos dados experimentais com o respectivo coeficiente de determinação (R^2). Foi utilizada a mesma concentração de inóculo nas fermentações para garantir a reprodutibilidade dos experimentos e comparar os resultados obtidos.



Fermentação em meio sintético



Fermentação contendo 30% de H-H (carboidratos)



Fermentação contendo 30% de H-H (inibidores)

Figura 20 - Perfis de crescimento celular, concentração de substratos e de inibidores de cultivo em biorreator. (●) N° células/mL experimental; (—) N° células/mL predita; (o) xilose; (●) glicose; (▲) ácido acético; (▲) furfural; (Δ) HMF.

Apesar de apresentar consumo preferencial da glicose em relação à xilose nas primeiras horas de fermentação (Figura 20), os dois açúcares são consumidos durante o crescimento celular e na redução da concentração dos inibidores. Esta ordem preferencial de consumo dos açúcares foi observada também no estudo de Schirmer-Michel *et al.* (2008) na produção de etanol usando *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 a partir de meios contendo hidrolisados de casca de soja.

Como observado anteriormente nas etapas de adaptação, a presença dos inibidores promove o aumento da fase de latência (11 horas para a fermentação com H-H e 1 hora para a fermentação em meio sintético). Tanto na fermentação contendo H-H, assim como nas etapas de adaptação, a concentração dos inibidores foi reduzida ao longo da fermentação, especialmente durante a fase de latência.

Foram determinados os parâmetros cinéticos das fermentações em biorreator (Tabela 18). Foi observado que a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) foi ligeiramente maior no cultivo contendo H-H ($0,122 \text{ h}^{-1}$) em relação ao cultivo sintético ($0,117 \text{ h}^{-1}$). Um estudo feito com *L. starkeyi* para a produção de lipídeos em meio sintético revelou resultados similares, sendo obtida uma velocidade de $0,091 \text{ h}^{-1}$ em regime de batelada usando xilose como fonte de carbono (GARZÓN, 2009).

Outro fato importante é o aumento da concentração de biomassa ($X_{\max}$), pela substituição do meio sintético (9,34 g/L) por 30% de H-H no meio de cultivo (11,56 g/L), o que indica que a presença de algumas proteínas e microelementos do H-H promovem o crescimento celular em relação à meios sintéticos, como relatado por Zhao *et al.* (2012). Em um estudo realizado por Tsigie *et al.* (2011), foi obtida maior concentração de celular de *Y. lipolytica* Po1g em cultivo com H-H de bagaço de cana (11,42 g/L) em relação a meios sintéticos contendo glicose (10,19 g/L) ou xilose (5,88 g/L).

Tabela 18 - Parâmetros cinéticos em biorreator de crescimento celular da fermentação em meio sintético e contendo H-H.

Parâmetro	Meio sintético	Meio contendo H-H
$\mu_{\max}$ (h^{-1})	0,117	0,122
$X_{\max}$ (g/L)	9,34	11,56
$Y_{x/s}$ (g/g)	0,45	0,60
P_x (mg/L/h)	253,21	209,78
r_s (mg/L/h)	562,66	348,57
S (%)	99,38	100,00
Lipídeos (% m/m)	23,74	22,65
Lipídeos (g/L)	2,22	2,62

($\mu_{\max}$) Velocidade específica máxima de crescimento; ($X_{\max}$) Densidade celular máxima; ($Y_{x/s}$) Fator de conversão de substrato em células; (P_x) Produtividade celular (r_s); Velocidade de consumo de substrato; (S) Conversão global de substrato.

A conversão global de substrato (S%) e conteúdo total de lipídeos permaneceram praticamente constantes para ambos os meios de cultura, observando-se um ligeiro aumento (ou diminuição no caso da produtividade celular, P_x) na fermentação com H-H. Caso contrário ocorreu com a velocidade de consumo de substrato (r_s), que foi maior na fermentação no meio sintético (562,66 mg/L/h) em relação ao meio com H-H (348,57 mg/L/h), como observado nas etapas de adaptação. Isto sugere inibição de crescimento celular no cultivo contendo H-H.

Comparando as fermentações em incubadora orbital com as fermentações em biorreator foi observado que os parâmetros cinéticos melhoraram sob as condições controladas do biorreator. A fase de latência na fermentação contendo 30% de H-H diminuiu de 19 horas em frasco agitado para 11 horas do biorreator, o que indica menor tempo total de fermentação (Figura 17 e Figura 20).

A concentração de lipídeos foi maior em frascos agitados (31%) em relação ao biorreator (23%). Porém, como a concentração celular foi maior em frascos agitados, a

concentração de lipídeos totais também foi maior na fermentação no biorreator (2,22 g/L) em relação à fermentação em incubadora orbital (1,64 g/L).

As diferenças nos resultados obtidos entre as fermentações em incubadora orbital e em biorreator se devem principalmente às condições de operação. É importante considerar que condições de operação como a oxigenação, podem influenciar significativamente o curso da fermentação. A taxa de oxigenação determina a divisão do consumo de substrato entre o crescimento celular e a formação do produto. No caso de fermentações alcoólicas, excesso de oxigênio pode anular a formação de etanol e como consequência o substrato é direcionado para a formação de biomassa (CARVALHO *et al.*, 2008).

4.3 CONCLUSÕES

O processo de adaptação por seleção aplicado na *L. starkeyi* DSM 70296, originou em meio contendo 30% de H-H uma população com maior tolerância aos inibidores, além de desenvolver maior concentração de biomassa (9,79 g/L) e produtividade celular (113,90 mg/L/h) em relação à cepa original 5,21 g/L e 73,54 mg/L/h, cultivada em meio sintético. As células adaptadas atingiram 18,53 % de lipídeos e as células originais cultivadas em meio sintético 31,55%.

As concentrações de inibidores presentes na última etapa de adaptação (30 % H-H) tolerada pela *L. starkeyi* foram 3 g/L de ácido acético, 180 mg/L de furfural, 62 mg/L de HMF e 4,5 g/L de ligninas solúveis.

A duração das fases de latência foi maior com o aumento da porcentagem de H-H, até de 19 horas com o 30% deste, para a fermentação em frascos agitados e de 11 horas para biorreator. Durante esse período a concentração de furfural e HMF presentes no meio de cultivo foi diminuída até esgotamento. Por outro lado, a

concentração de ácido acético foi reduzida ao longo das fermentações, após finalização da fase de latência.

Completa inibição do crescimento seguido por 100% de morte celular foi o resultado da fermentação com o 30% de H-H, quando células da cepa original foram fermentadas sem prévia adaptação, indicando, assim, o sucesso do processo de adaptação por seleção da *L. starkeyi* DSM 70296.

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\max}$) para as fermentações em biorreator foi ligeiramente maior no cultivo contendo 30% de H-H ($0,122 \text{ h}^{-1}$) em relação ao cultivo sintético ($0,117 \text{ h}^{-1}$). Adicionalmente, o cultivo em biorreator aumentou a concentração de biomassa ($X_{\max}$) de 9,34 g/L em meio sintético para 11,56 g/L em meio contendo 30% H-H. A concentração de lipídeos também aumentou de 2,22 g/L em meio sintético em relação a 2,62 g/L para o 30% de H-H.

5 ESTUDO DE INIBIÇÃO NA PRODUÇÃO DE LIPÍDEOS E NO CRESCIMENTO DE *Lipomyces starkeyi* DSM 70296

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Microrganismo

A cepa *Lipomyces starkeyi* DSM 70296 foi preservada a 4 °C em Agar inclinado YPX (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 20 g/L de xilose e 20 g/L de ágar, com pH ajustado a 5,5).

5.1.2 Meios de cultivo

5.1.2.1 Preparo do inóculo

A levedura foi reativada (pré-inóculo) em meio de cultura YPX líquido (10 g/L de extrato de levedura, 10 g/L de peptona, 20 g/L de xilose), e transferida (30% v/v) para meio de inóculo com a seguinte composição: 12 g/L de xilose, 2 g/L de glicose, 0,43 g/L de extrato de levedura, 0,32 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de Na_2HPO_4 e 0,2 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A fermentação começou em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L.. O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyers de 500 mL (volume de trabalho de 100 mL) a 150 RPM, 28 °C e o pH foi ajustado a 5,5 com HCl 1 M.

5.1.2.2 Fermentação em meio sintético

Ao meio de fermentação foram adicionadas as quantidades equivalentes de carboidratos obtidos no H-H, mantendo-se a relação C/N de 50 (GARZÓN, 2009): 12 g/L de xilose, 2 g/L de glicose, 0,43 g/L de extrato de levedura, 0,32 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,5 g/L de KH_2PO_4 , 0,4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/L de Na_2HPO_4 , 0,04 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,001 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_2\text{O}_7$ e 0,005 g/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 500 mL (volume de trabalho de 150 mL) com 30% de inóculo (v/v) iniciando a fermentação em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L, a 150 RPM, 28 °C e pH 5,5. Para evitar escurecimento do meio de cultivo devido às reações de degradação (caramelização e Maillard), a solução de carboidratos foi esterilizada (121°C, 20 minutos) separadamente e adicionada em câmara de fluxo laminar.

5.1.3 Planejamento fatorial completo 2^3

Foi utilizado um planejamento fatorial completo 2^3 para estudar os efeitos dos inibidores ácido acético, furfural e HMF na produção de lipídeos e no crescimento celular da *L. starkeyi* DSM 70296. A matriz do planejamento com três repetições no ponto central totalizou 11 ensaios (Tabela 19).

Tabela 19 - Codificação das variáveis do planejamento experimental 2^3 .

Variável	Ácido acético (g/L)	HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
-1	0	0	0
0	3	200	60
1	6	400	120

As fermentações foram feitas em frascos de 500 mL (volume de trabalho de 150 mL) contendo meio de cultivo sintético (item 5.1.2.2) e concentração dos inibidores conforme Tabela 19. Para evitar degradação ou diminuição da concentração dos inibidores diluídos no meio de cultivo, os mesmos foram esterilizados por filtração (0,22 µm). Todos os materiais utilizados foram autoclavados (121 °C, 20 minutos). No meio de cultivo estéril foi adicionado inóculo (30% v/v) preparado conforme item 5.1.2.1, iniciando a fermentação em concentração celular entre 1,5 e 2,0 g/L. As condições de fermentação foram 150 RPM, 28 °C e o pH foi ajustado para 5,5 com HCl 1M.

A seleção da faixa de concentração dos três inibidores foi realizada em acordo com as concentrações encontradas nas etapas de adaptação (capítulo 4), sendo apresentadas na Tabela 20. O nível inferior de cada variável representa a ausência do mesmo, o ponto central e o nível superior correspondem a valores próximos as 3ª e 5ª etapas de adaptação. Pode-se observar que os pontos máximos para os três inibidores se encontram próximos das concentrações da quinta etapa de adaptação, correspondente a completa inibição de crescimento celular.

Tabela 20 - Concentrações dos inibidores nas 3ª e 5ª etapas de adaptação.

Etapa de adaptação	Ácido acético (g/L)	HMF (mg/L)	Furfural (mg/L)
3ª	3,11 ± 0,14	180,28 ± 6,51	61,88 ± 7,41
5ª	5,42 ± 0,12	289,98 ± 5,08	147,41 ± 8,23

Paralelamente às fermentações, foram feitos testes controle dos meios de cultivo, sem inóculo e com as respectivas concentrações de inibidores a fim de verificar se mudanças nas concentrações dos inibidores poderiam ser devidas a variações físico-químicos dos cultivos.

5.1.4 Metodologia analítica

5.1.4.1 Crescimento celular

A quantificação da biomassa para a determinação do crescimento celular por feita por gravimetria. Amostras de volume conhecido foram retiradas ao longo da fermentação e centrifugadas em tubos Eppendorfs (420R, HETTICH, Alemanha) a 5000 RPM 4 °C por 10 minutos. O sedimentado foi ressuscitado em água destilada e lavado duas vezes. A biomassa foi congelada por 24 horas a -80 °C e liofilizada (L101, Liobras, Brasil) a -30 °C e 50 µHg durante aproximadamente 48 horas.

5.1.4.2 Determinação de lipídeos

O conteúdo de lipídeos totais para cada fermentação foi quantificado utilizando o método de extração de Bligh & Dyer (BLIGH e DYER, 1959) modificado. A cultura obtida ao final da fermentação foi centrifugada (HETTICH modelo 420R, Alemanha) a 4500 RPM, 4 °C por 15 minutos. O sedimentado foi ressuscitado em água destilada e lavado duas vezes. A biomassa foi congelada a -80°C por 24 horas e liofilizada (Liobras modelo L101, Brasil) a -30°C e 50 µHg durante aproximadamente 48 horas.

Para facilitar a extração de lipídeos, usou-se uma digestão ácida das amostras visando o rompimento da parede celular. Entre 300 e 500 mg de biomassa seca e triturada foram tratados com 5 mL de HCl 2M por uma hora a 80 °C. Após esse período, a biomassa digerida foi separada por centrifugação a 4500 RPM, 4 °C por 10 minutos. A essa biomassa úmida foram adicionados 6 mL de solução metanol:clorofórmio (2:1, v/v). A suspensão foi agitada em vortex por 2 minutos. Seguidamente foram adicionados 2 mL de clorofórmio e agitou-se por 2 minutos. Para gerar um sistema de duas fases líquidas, 3,6 mL de água foram adicionados e o sistema foi agitado novamente por 2 minutos. As fases foram separadas por centrifugação por 10 minutos a 4500 RPM. A fase inferior foi transferida a um balão de 25 mL usando seringa de

vidro e agulha. Uma etapa de reextração foi feita com a fase superior, sendo adicionados 4 mL de uma solução 10% (v/v) de metanol em clorofórmio e agitado em vortex por 2 minutos. Após centrifugação, a fase de clorofórmio foi adicionada ao primeiro extrato. O clorofórmio foi evaporado em rotaevaporador (IKA modelo HB 10 control, Alemanha) e o resíduo seco em estufa a 60°C até massa constante. O lipídeo final foi quantificado gravimetricamente.

5.1.4.3 Determinação de xilose e glicose

As concentrações de xilose e glicose foram determinadas usando sistema de cromatografia líquida HPLC Waters com detector de índice de refração e coluna Shodex KS-801. A fase móvel usada foi água deionizada com vazão de 1 mL/min e injeção de 10 µL. As temperaturas da coluna e do detector foram 80 °C e 40°C, respectivamente.

5.1.4.4 Determinação de ácido acético

A concentração de ácido acético foi analisada por cromatografia de troca iônica em sistema Metrohm, composto detector amperiométrico 871 Advanced Bioscan; aparelho de interface 771 IC Compact e coluna Metrosep Organic Acid (250 x 7,8 mm Metrohm AG CH 9101) O eluente usado foi H₂SO₄ 0,5 mmol/L : Acetona (85:15) e LiCl 50 mmol/L com fluxo de 0,5 mL/min. A temperatura da coluna e do detector foi 28,3°C.

5.1.4.5 Determinação de furfural e HMF

As concentrações de furfural e HMF foram determinadas usando um sistema de cromatografia líquida HPLC Waters acoplado a detector UV (280nm) e coluna Delta Pak C18 (150 x 3.9mm) 5 µm, 300 Å (Waters, EUA) com pré-coluna. Como fase móvel foi

utilizada solução de acetonitrila 2,5% em ácido fosfórico 2 mM a uma vazão de 0,5 mL/min e injeção de 10 µL. A temperatura da coluna e do detector foram de 25°C.

5.1.5 Cálculo dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos calculados para as fermentações do estudo de inibição estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Parâmetros cinéticos obtidos durante as fermentações do estudo de inibição em *L. starkeyi* DSM 70296.

Parâmetro		Descrição	Equação
Velocidade máxima específica de crescimento	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	Item 5.1.6	
Densidade celular máxima	$X_{\max}$ (g/L)	Item 5.1.4.1	
Conteúdo de lipídeos	(%, m/m)	Item 5.1.4.2	
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{x/s}$	$Y_{x/s} = \frac{X_{\max} - X_o}{-S_o + S_{x,\max}}$	(11)
Máxima produtividade celular	P_x (mg/Lh)	$P_x = \frac{X_{\max} - X_o}{t_{x,\max} + t_o}$	(12)
Velocidade de consumo de substrato	r_s (mg/L/h)	$r_s = \frac{-S_{x,\max} + S_o}{t_{x,\max} + t_o}$	(13)
Conversão global de substrato	S (%)	$S(\%) = \left(1 - \left(\frac{S_{x,\max}}{S_o}\right)\right) * 100$	(14)

Fonte: adaptado de (DORAN e LABIANO, 1998).

5.1.6 Modelos matemáticos

O modelo de Gompertz modificado Equação (15) foi testado para prever o crescimento celular. Esta expressão inclui três parâmetros biologicamente importantes: duração da fase lag (λ), velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) e densidade celular máxima ($X_{\max}$) (LACERDA *et al.*, 2011).

$$y = C \cdot \exp^{-\exp\left[\frac{\mu_{\max} \exp(1)}{C} (\lambda - t) + 1\right]} \quad (15)$$

Onde:

C = assintótica $\ln X_t/X_0$

t = tempo de fermentação (h)

λ = duração da fase lag (h)

X_t = concentração de células no tempo t (g/L)

X_0 = concentração inicial de células (g/L)

Uma técnica de regressão não linear foi aplicada para resolver o modelo matemático usando a função “solver” de Excel® 2010. A rotina aplicada para a solução do modelo consistiu nos seguintes passos: (i) usar planilha de Excel contendo os dados experimentais, (ii) adicionar uma coluna que contenha os dados calculados pelo modelo, (iii) adicionar uma coluna com o cálculo dos mínimos quadrados, (iv) fazer a soma dos mínimos quadrados, (v) usar a função “solver” para minimizar o valor da célula contendo a soma dos mínimos quadrados. Estimativas iniciais dos valores dos parâmetros são requeridas: um valor inicial razoável da velocidade máxima específica de crescimento foi obtida do gráfico “Ln (X) x t” (LACERDA *et al.*, 2011). O ajuste do modelo foi avaliado pelo coeficiente de determinação R^2 , calculado através da função estatística de Pearson “PEARSON(matriz1, matriz2)” em Excel® 2010.

5.1.7 Análise estatística

O software comercial Statistica 7.0 foi utilizado para a análise estatística dos resultados.

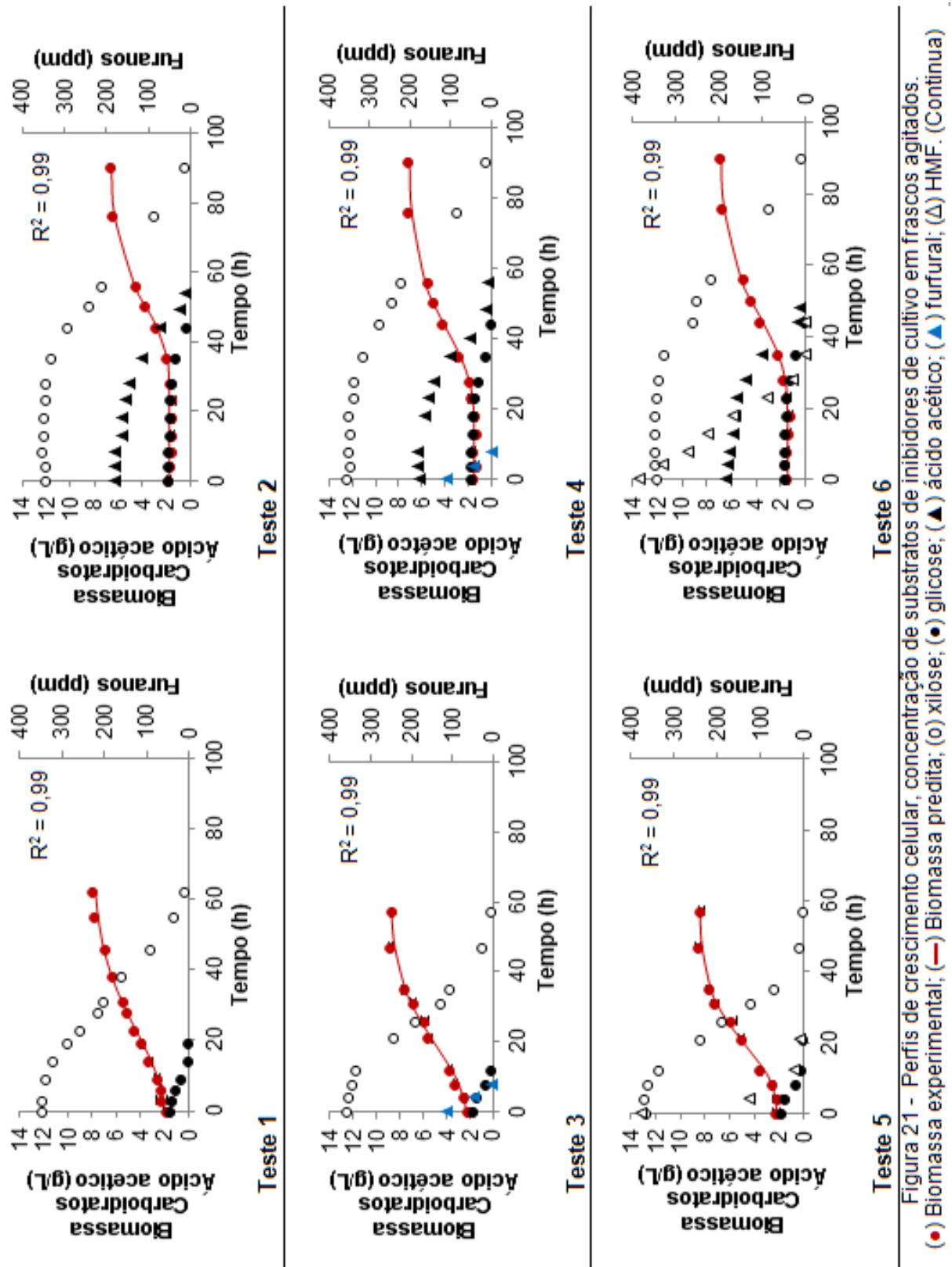
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

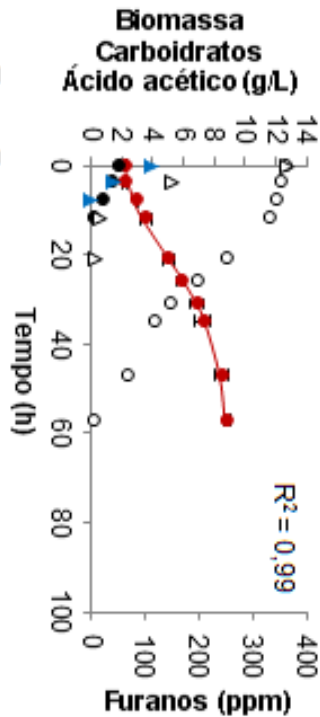
Foram determinados os efeitos do ácido acético, furfural e HMF sobre o crescimento e a produção de lipídeos da *L. starkeyi* DSM 70296, através da fermentação da levedura em meios de cultivo contendo os três inibidores em concentrações definidas a partir do planejamento experimental 2^3 .

A Figura 21 apresenta os perfis de crescimento celular, concentração de carboidratos e de inibidores ao longo das 11 fermentações. Adicionalmente, os gráficos apresentam o ajuste do modelo Gompertz modificado aos dados experimentais com o respectivo coeficiente de determinação (R^2) obtido para cada caso.

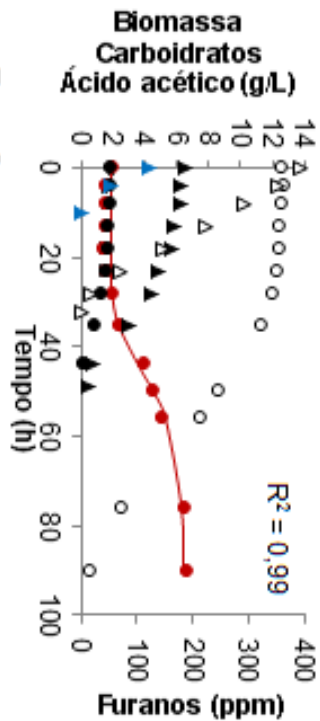
Foram determinados os parâmetros cinéticos das fermentações para o estudo dos efeitos dos inibidores em frascos Erlenmeyers (Tabela 22). Os valores de velocidade máxima específica de crescimento ($\mu_{\max}$) e duração da fase lag correspondem aos calculados através do modelo matemático usado para cada fermentação. Os resultados foram analisados com auxílio do software STATISTICA 7.

As análises de inibidores nos testes controle revelaram que as concentrações destes permaneceram constantes ao longo do tempo de incubação, verificando assim que a diminuição da concentração não é devida a variações físico-químicas dos cultivos.

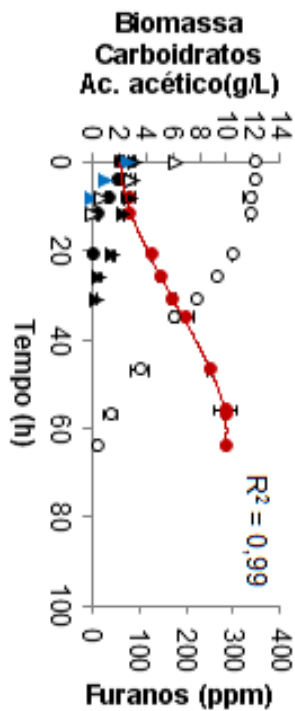




Teste 7



Teste 8



Ponto central (média dos testes 9, 10 e 11)

Figura 21 - Perfis de crescimento, concentração de substratos de inibidores de cultivo em frascos agitados.
(●) Biomassa experimental; (—) Biomassa predita; (○) xilose; (●) glicose; (▲) ácido acético; (▲) furfural; (Δ) HMF. (Conclusão)

Tabela 22 - Valores reais das variáveis e parâmetros cinéticos de cada fermentação do planejamento 2³.

Variáveis				Respostas								
Ensaio	Ácido acético (g/L)	Furfural (mg/L)	HMF (mg/L)	Biomassa (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	Fase lag (h)	$Y_{x/t}$ (g/g)	P_x (mg/L/h)	r_c (mg/L/h)	S (%)	Lipídeos (%)	Lipídeos (g/L)
1	0	0	0	7,95	0,041	0,52	0,46	99,19	215,17	97,78	31,23	2,48
2	6	0	0	6,55	0,048	34,63	0,33	52,78	159,18	97,09	21,68	1,42
3	0	120	0	8,70	0,047	1,00	0,46	115,20	249,39	99,24	31,93	2,78
4	6	120	0	7,15	0,051	23,42	0,42	62,78	151,17	96,59	32,51	2,32
5	0	0	400	8,30	0,057	5,39	0,42	107,60	254,07	99,66	31,10	2,58
6	6	0	400	6,90	0,051	27,01	0,41	60,37	148,88	97,38	34,08	2,35
7	0	120	400	8,80	0,049	2,41	0,34	117,54	251,09	99,54	34,15	3,01
8	6	120	400	6,55	0,049	30,83	0,38	51,67	152,91	96,97	36,77	2,41
9	3	60	200	8,62	0,047	4,76	0,54	112,49	209,43	96,61	34,23	2,95
10	3	60	200	8,79	0,043	4,17	0,47	103,49	220,58	98,60	35,54	3,12
11	3	60	200	8,72	0,046	4,90	0,49	105,00	212,42	96,45	36,53	3,19

(μ_{max}) Velocidade específica máxima de crescimento; (X_{max}) Densidade celular máxima; ($Y_{x/s}$) Fator de conversão de substrato em células; (P_x) Produtividade celular (r_c); Velocidade de consumo de substrato; (S) Conversão global de substrato.

A Figura 22 apresenta gráficos de Pareto com os efeitos exercidos pelo ácido acético, furfural, HMF e a interação dos mesmos sobre cada um dos parâmetros cinéticos das fermentações.

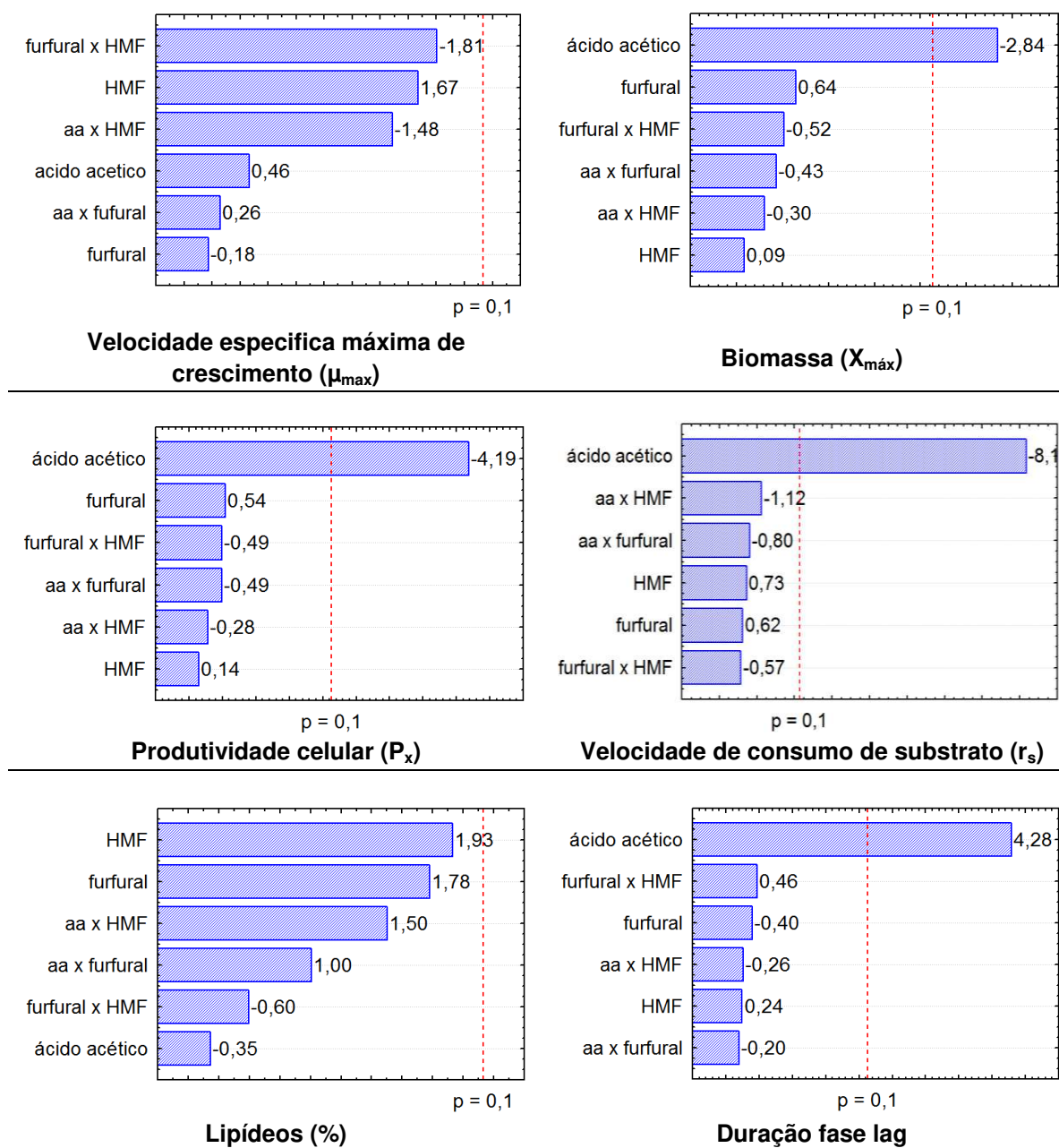


Figura 22 - Efeitos dos inibidores sobre os parâmetros cinéticos.

Ao nível de confiança de 90% ($p \leq 0,1$) foi observado que a concentração de ácido acético, dentro do intervalo estudado (0 a 6 g/L), apresentou efeito significativo sobre a densidade celular máxima ($X_{\text{máx}}$), produtividade celular (P_x), velocidade de consumo de substrato (r_s) e duração da fase lag. Os inibidores HMF e furfural não apresentaram efeitos significativos sob os parâmetros cinéticos na faixa de concentração estudada (0 a 400 mg/L para HMF e 0 a 120 mg/L para furfural). A velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e a concentração de lipídeos não foram afetadas pelos inibidores nas concentrações estudadas.

Pela análise de variância (ANOVA), para a densidade celular máxima ($X_{\text{máx}}$) apresentada na Tabela 23, obteve-se R^2 de 0,69, valor aceitável para este processo, considerando-se assim, o modelo matemático preditivo. Visto que o F_{cal} (1,50) foi 0,37 vezes maior que o F_{tab} , o modelo é considerado não significativo.

Tabela 23 - ANOVA para as respostas densidade celular, produtividade celular, velocidade de consumo de substrato e duração da fase lag.

Respostas	Fonte de Variação	SQ	GL	Quadrado médio	F_{cal}	F_{tab}	R^2
Densidade celular máxima ($X_{\text{máx}}$)	Regressão	6,0975	6	1,0163	1,50	4,01	69,28
	Resíduos	2,7039	4	0,6760			
	Total	8,8014	10				
Produtividade celular (P_x)	Regressão	5615,4470	1	5615,4470	32,42	3,36	78,27
	Resíduos	1559,0590	9	173,2288			
	Total	1770,4840	10				
Velocidade de consumo de substrato (r_s)	Regressão	15982,6331	1	15982,6331	83,87	3,36	90,31
	Resíduos	1714,9876	9	190,5542			
	Total	17697,6206	10				
Fase lag	Regressão	1419,6460	1	1419,6460	36,42	3,36	80,18
	Resíduos	350,8380	9	38,9820			
	Total	1770,4840	10				

Pela análise ANOVA para produtividade celular, velocidade de consumo de substrato e fase lag (Tabela 24), não foram significativos os termos lineares da concentração de furfural, de HMF e das interações entre os três inibidores, tendo sido incorporados aos resíduos para o cálculo. Para os três casos, o F_{calc} foi maior que o F_{tab} , considerando-se assim, os modelos matemáticos significativos e a porcentagem de variação (R^2) explicada pelo modelo foi boa, pode-se concluir que os modelos se ajustam bem aos dados experimentais. A Tabela 24 apresenta um resumo da análise ANOVA para Produtividade celular, Velocidade de consumo de substrato e fase lag.

Tabela 24 - Preditividade e significância dos modelos matemáticos de P_x , r_s e fase lag.

	Efeito significativo	R^2	Modelo preditivo	$F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$	Modelo significativo	Equação
P_x	Ácido acético	78,27	Sim	9,65	Sim	(16)
r_s	Ácido acético	90,31	Sim	24,96	Sim	(17)
Fase lag	Ácido acético	80,18	Sim	10,84	Sim	(18)

As Equações (16), (17) e (18) apresentam os modelos matemáticos (em níveis codificados) construídos para a produtividade celular máxima, a velocidade de consumo de substrato e duração da fase lag.

$$[P_x] = 89,83 - 26,49 * [aa] \quad (16)$$

$$[r_s] = 202,23 - 44,70 * [aa] \quad (17)$$

$$[\lambda] = 12,64 + 13,32 * [aa] \quad (18)$$

Onde:

$[P_x]$ = Produtividade celular (mg/L/h)

$[r_s]$ = Velocidade de consumo de substrato (mg/L/h)

$[\lambda]$ = fase lag (h)

$[aa]$ = concentração de ácido acético (g/L)

As superfícies de resposta (Figura 23) geradas pelos modelos descrevem o efeito do ácido acético e furfural (com o HMF no ponto central) sobre os parâmetros cinéticos. O aumento da concentração de ácido acético resultou em diminuições na produtividade celular e no consumo de substrato e no aumento da fase lag de fermentação.

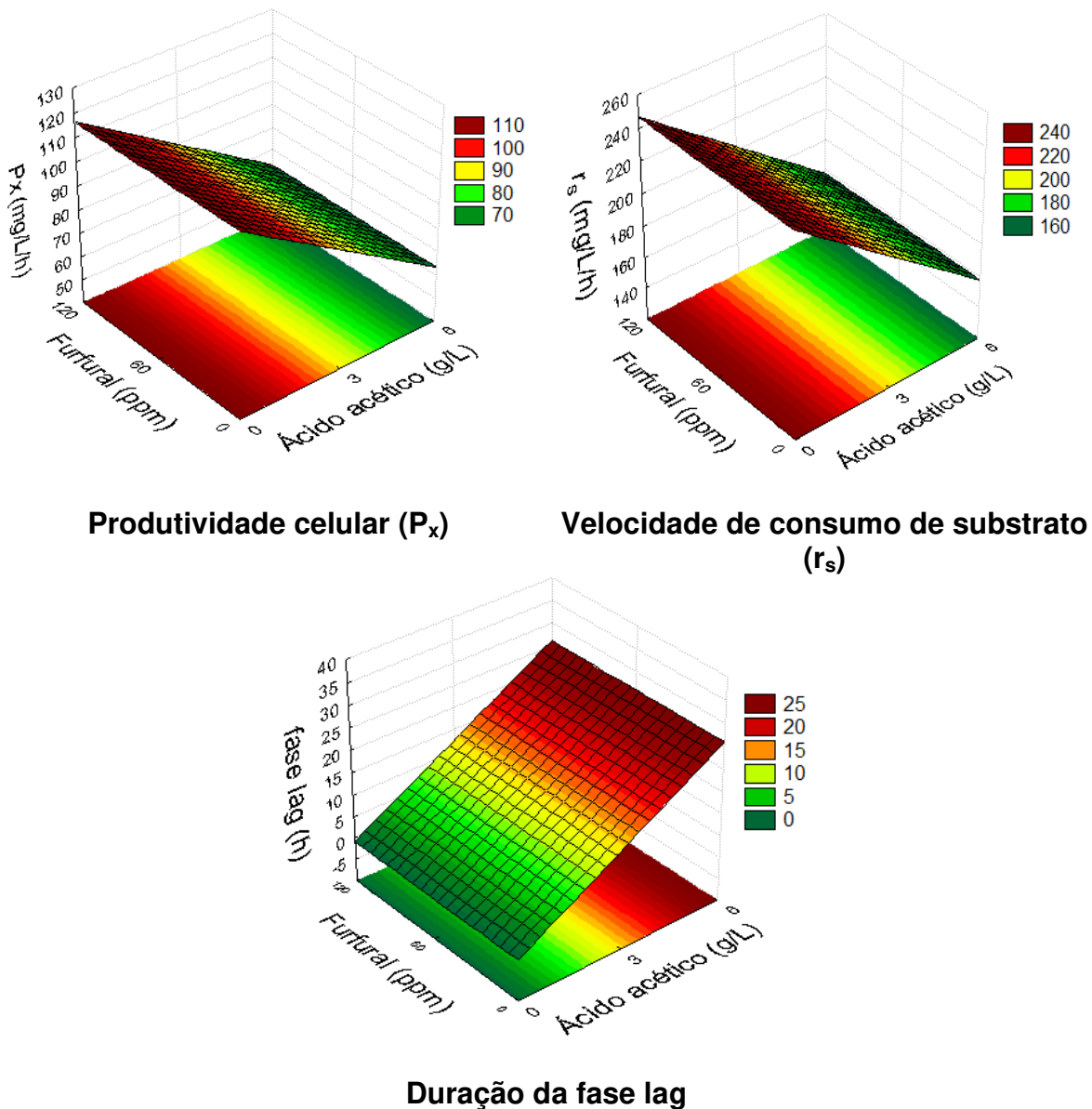


Figura 23 - Superfícies de resposta dos parâmetros cinéticos.

Mediante análise estatística foi possível observar que dos três inibidores (nas faixas de concentração estudadas), o somente o ácido acético apresentou efeito significativo sobre a produtividade celular, velocidade de consumo de substrato e duração da fase lag. Esta última teve uma duração até de 34 horas no ensaio 2 (Tabela 22) contendo unicamente ácido acético (6 g/L). A mesma concentração de ácido foi adicionada nos ensaios 4, 6 e 8, em combinação com o HMF e furfural e podem ser observadas fases lag mais curtas 23, 27 e 30 horas, respectivamente. Estes resultados indicam efeitos sinérgicos positivos quando o ácido acético encontra-se nos meios de cultivo juntamente com furfural e HMF.

Analogamente, foi observado para a concentração de lipídeos, as quais foram de 2,32, 2,35 e 2,41 g/L, para os ensaios 4, 6 e 8, respectivamente, maiores em relação à 1,42 g/L obtida quando se adicionou unicamente ácido acético (6 g/L, ensaio 2), e próximas da concentração 2,48 g/L obtida na ausência de inibidores (ensaio 1).

A velocidade de consumo de substrato, apresentou o valor mais baixo (148,88 mg/L/h) para o meio de cultivo contendo 6 g/L de ácido acético juntamente com 400 mg/L de HMF, em relação aos meios contendo unicamente um dos inibidores, 159,18 mg/L/h (ácido acético) e 254,04 mg/L/h (furfural). Concluindo-se que estes efeitos são sinérgicos antagônicos.

Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b) indicou efeito sinérgico antagônico em fermentação alcoólica na presença de 10 g/L de ácido acético e 3 g/L de furfural. Tal efeito negativo foi maior que a soma dos efeitos individuais, contudo o efeito dos inibidores sobre a produtividade volumétrica do etanol foi sinérgico positivo.

Segundo nossos resultados do planejamento experimental, dentro da faixa de concentração estudada, o furfural e o HMF não tiveram efeito significativo em nenhum dos parâmetros cinéticos estudados. Estudos de literatura reportam resultados similares para a fermentação de H-H. Yu *et al* (2011), determinou que os inibidores não tiveram impacto negativo sob a produção de lipídeos em H-H (contendo 0,44 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF) para as leveduras *Y. lipolytica*, *C. curvatus*, *R. glutinis* e *L. starkeyi*.

5.2.1 Comparativo dos resultados adaptação e estudo de inibição

Comparando os resultados obtidos no planejamento experimental do presente capítulo e as adaptações apresentadas no capítulo 4, foi possível observar as quantidades de ácido acético, furfural e HMF (6 g/L, 120 mg/L e 400 mg/L, respectivamente) não foram inibitórias em meio de cultivo sintético. Contudo, o H-H contendo as mesmas concentrações desses compostos promoveu a inibição do crescimento celular e produção de lipídios, indicando a necessidade de sucessivas etapas de adaptação.

Resultados semelhantes foram publicados por Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000b), que descreveu a completa inibição de células durante a fermentação alcoólica em H-H de pino abeto vermelho, porém, o crescimento celular e a produção de etanol não foram afetados em fermentações em meio sintético contendo as mesmas concentrações de inibidores (5 g/L de ácido acético, 10 g/L de ácido fórmico, 23 g/L de ácido levulínico, 1,2 g/L de furfural e 1,3 g/L de HMF). Segundo o autor, estes resultados indicam a possibilidade de altos níveis de inibição em função dos produtos gerados pela degradação da lignina.

Caso similar ocorreu em estudo de Fonseca (2009) que fermentou as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis* em H-H de bagaço de cana-de-açúcar obtido por hidrólise ácida. As concentrações de inibidores presentes no meio de cultivo eram de 3,30 g/L de ácido acético, 16 mg/L de furfural, 20 mg/L de HMF e 6,95 g/L de ligninas solúveis. O resultado para as duas leveduras foi de completa inibição do crescimento seguido por morte celular. As concentrações de inibidores estão abaixo das utilizadas no presente trabalho, exceto pelos valores próximos na concentração de ligninas solúveis, o que poderia ser um indicador do nível de inibição pelos compostos fenólicos.

Nesse sentido, foi possível concluir que o H-H apresenta outros inibidores, como os produtos de degradação das ligninas, que podem ser responsáveis pela inibição do crescimento e produção de lipídios. Segundo a literatura, ácido acético, furfural e HMF são produzidos durante os pré-tratamentos para a liberação da fração hemicelulósica

em H-H (AGUILAR *et al.*, 2002; HUANG, C.-F. *et al.*, 2009), ao mesmo tempo em que, grande variedade de compostos fenólicos são produzidos pela degradação parcial da lignina tendo significativa capacidade inibitória (ZHANG *et al.*, 2012).

O tipo e a concentração dos compostos existentes nos hidrolisados dependem do tipo de matérias primas e das condições do pré-tratamento aplicado (ZHANG *et al.*, 2012). A identificação da maioria dos inibidores produzidos pela degradação da biomassa lignocelulósica durante os pré-tratamentos é um trabalho complexo que envolve grande variedade de técnicas analíticas. Luo e colaboradores (2002) identificaram mais de 35 inibidores potenciais em hidrolisados de álamo. Tem sido observado que os efeitos inibitórios variam com a concentração e com o tipo microrganismo (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000a; ZHANG *et al.*, 2012).

Nos H-H de bagaço de cana-de-açúcar, além do ácido acético, furfural e HMF, foram encontrados produtos derivados da degradação da lignina, tais como: ácido benzoico, ácido cafeico, catecol, ácido ferúlico, guaiacol, 4-hidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido protocatecuico, fenol, siringaldeído, ácido vanílico e vainilina. As concentrações destes compostos dependem do agente catalizador impregnado ou da ausência dos mesmos durante o pré-tratamento por explosão a vapor (MARTIN *et al.*, 2002).

Como foi discutido acima, grande quantidade de compostos é liberada durante o processo de explosão a vapor de materiais lignocelulósicos potencialmente tóxicos para *L. starkeyi*, especialmente os relacionados com a degradação da lignina, os quais como foram indicados, apresentam alto nível de inibição.

5.3 CONCLUSÕES

Na faixa de concentração dos inibidores estudada (0 a 6 g/L para ácido acético, 0 a 400 mg/L para HMF e 0 a 120 mg/L para furfural) foi determinado que o furfural e o HMF não exerceram efeito significativo sobre os parâmetros cinéticos das fermentações em frascos Erlenmeyer. Não obstante, o aumento da concentração de ácido acético resultou em diminuições na produtividade celular e no consumo de substrato e no aumento da fase lag de fermentação.

Efeitos sinérgicos positivos foram verificados quando o ácido acético encontra-se nos meios de cultivo juntamente com furfural e HMF, pela diminuição da duração da fase lag e aumento na concentração de lipídeos das fermentações com mistura de inibidores em relação às realizadas unicamente com ácido acético.

Completa inibição de células foi encontrada durante a fermentação com 50% de H-H, porém, o crescimento celular e a produção de lipídeos não foram afetados na fermentação em meio sintético contendo as mesmas concentrações de ácido acético, furfural e HMF (6 g/L, 120 mg/L e 400 mg/L, respectivamente), o que indica a possibilidade de altos níveis de inibição em função dos produtos gerados pela degradação da lignina (7,32 g/L).

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar outros processos para extração do H-H que permita a obtenção de concentrações menores de inibidores, tais como a explosão a vapor com tempos curtos de operação e com a impregnação de algum tipo de agente catalizador como amônia ou dióxido de carbono.

Estudar outras alternativas de adaptação de leveduras em meios com altas concentrações de inibidores, como a adaptação por seleção através da transferência sequencial da *L. starkeyi* em meios contendo sempre a mesma concentração de H-H até melhorar satisfatoriamente os parâmetros cinéticos da fermentação.

Estudar novos intervalos de concentração de furfural, HMF e ácido acético para determinar os efeitos sobre o crescimento e produção de lipídeos. Concentrações de 1 g/L para furfural e HMF e de 15 g/L para ácido acético poderiam ser estudadas.

Estudar os efeitos das ligninas solúveis na fermentação de *L. starkeyi* DSM 70296. Compostos como catecol, fenol, vanilina, seryngaldeido, entre outros são encontrados em H-H. Poderiam ser realizados estudos de identificação e determinação dos efeitos individuais e sinérgicos.

7 REFERÊNCIAS

- AGEITOS, J. M.; VALLEJO, J. A.; VEIGA-CRESPO, P.; VILLA, T. G. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 90, n. 4, p. 1219-1227, May 2011.
- AGUILAR, R.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G.; VAZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *Journal of Food Engineering*, v. 55, n. 4, p. 309-318, Dec 2002.
- ALLEN, S. G.; SCHULMAN, D.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LASER, M.; LYND, L. R. A comparison between hot liquid water and steam factionation of corn fiber. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 40, n. 13, p. 2934-2941, Jun 27 2001.
- ALMEIDA, J. R. M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; LIDEN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 82, n. 4, p. 340-349, Apr 2007.
- AMYRIS. 2013. Disponível em: < <http://www.amyris.com> >. Acesso em: 20 de jan 2013.
- ANGERBAUER, C.; SIEBENHOFER, M.; MITTELBAACH, M.; GUEBITZ, G. M. Conversion of sewage sludge into lipids by *Lipomyces starkeyi* for biodiesel production. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 3051-3056, May 2008.
- ANP. AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO (Brasil). Produção Nacional de Biodiesel puro B100 (metros cúbicos) entre 2005 e 2012. 2012. Disponível em: < www.anp.gov.br >. Acesso em: 13 de set 2012.
- ANTONI, D.; ZVERLOV, V. V.; SCHWARZ, W. H. Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 77, n. 1, p. 23-35, Nov 2007.
- BALLESTEROS, I.; OLIVA, J. M.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry*, v. 38, n. 2, p. 187-192, Oct 2002.
- BEOPOULOS, A.; CESCUT, J.; HADDOUCHE, R.; URIBELARREA, J. L.; MOLINA-JOUE, C.; NICAUD, J. M. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 48, n. 6, p. 375-387, Nov 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

- CAKAR, Z. P.; SEKER, U. O.; TAMERLER, C.; SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research, v. 5, n. 6-7, p. 569-78, Apr 2005.
- CARRASCO, J.; MARTINEZ, I. M.; NEGRO, M. J.; MANERO, J.; MAZON, P.; SAEZ, F.; CABANAS, A.; MARTIN, C. Evaluation of Steam Explosion as Pretreatment for Dilute Acid and Enzymatic-Hydrolysis of Sweet Sorghum Bagasse. Biomass for Energy and Industry, Vols 1 and 2, p. B38-B44, 1990.
- CARVALHO, M.; GRAÇA V.S.; MENDES; CÁTIA V.T.; BAPTISTA; CRISTINA M.S.G.; ROCHA; M.S., J. Valorização energética das hemicelulosas de globulus extraídas antes do cozimento. Em: V CONGRESO IBEROAMERICANO DE INVESTIGACION EN CELULOSA Y PAPEL. Jalisco, México 2008.
- CHANG, Y.-H.; CHANG, K.-S.; HSU, C.-L.; CHUANG, L.-T.; CHEN, C.-Y.; HUANG, F.-Y.; JANG, H.-D. A comparative study on batch and fed-batch cultures of oleaginous yeast *Cryptococcus* sp. in glucose-based media and corncob hydrolysate for microbial oil production. Fuel, v. 105, n. 0, p. 711-717, 2013.
- CHEN, X.; LI, Z.; ZHANG, X.; HU, F.; RYU, D. D.; BAO, J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 159, n. 3, p. 591-604, Dec 2009.
- CHIARAMONTI, D.; PRUSSI, M.; FERRERO, S.; ORIANI, L.; OTTONELLO, P.; TORRE, P.; CHERCHI, F. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. Biomass and Bioenergy, v. 46, n. 0, p. 25-35, 2012.
- DAHLMAN, O.; JACOBS, A.; SJOBERG, J. Molecular properties of hemicelluloses located in the surface and inner layers of hardwood and softwood pulps. Cellulose, v. 10, n. 4, p. 325-334, Dec 2003.
- DE MORAES ROCHA, G. J. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. 2000.
- DORAN, P. M.; LABIANO, F. J. G. Principios de Ingeniería de Los Bioprocesos. Acribia, 1998. ISBN 9788420008530.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. W. de Gruyter, 1984. ISBN 9783110084818.
- FERREIRA-FILHO, E. X. The xylan-degrading enzyme system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 27, n. 5, p. 1093-109, May 1994.
- FONSECA, B. G. Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia*

- orientalis. 2009. (Mestrado). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- GALAFASSI, S.; CUCCHETTI, D.; PIZZA, F.; FRANZOSI, G.; BIANCHI, D.; COMPAGNO, C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*, v. 111, n. 0, p. 398-403, 2012.
- GARZÓN, C. S. L. Produção microbiana de lipídeos. 2009. (Master). Department of Chemical Processes, State University of Campinas, Campinas.
- GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T. D.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. D. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova*, v. 32, p. 1500-1503, 2009.
- GRANGER, L. M.; PERLOT, P.; GOMA, G.; PAREILLEUX, A. Efficiency of fatty acid synthesis by oleaginous yeasts: Prediction of yield and fatty acid cell content from consumed C/N ratio by a simple method. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 42, n. 10, p. 1151-1156, Nov 1993.
- HASSAN, M.; BLANC, P. J.; GRANGER, L.-M.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G. Influence of nitrogen and iron limitations on lipid production by *Cryptococcus curvatus* grown in batch and fed-batch culture. *Process Biochemistry*, v. 31, n. 4, p. 355-361, 1996.
- HASSAN, M.; BLANC, P. J.; GRANGER, L. M.; PAREILLEUX, A.; GOMA, G. Lipid production by an unsaturated fatty acid auxotroph of the oleaginous yeast *Apiotrichum Curvatum* grown in single stage continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, n. 4, p. 483-488, 1993.
- HU, C. M.; WU, S. G.; WANG, Q.; JIN, G. J.; SHEN, H. W.; ZHAO, Z. B. K. Simultaneous utilization of glucose and xylose for lipid production by *Trichosporon cutaneum*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 4, Aug 24 2011.
- HU, C. M.; ZHAO, X.; ZHAO, J.; WU, S. G.; ZHAO, Z. B. K. Effects of biomass hydrolysis by-products on oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 20, p. 4843-4847, Oct 2009.
- HUANG, C.-F.; LIN, T.-H.; GUO, G.-L.; HWANG, W.-S. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 17, p. 3914-3920, 2009.
- HUANG, C.; WU, H.; LI, R.-F.; ZONG, M.-H. Improving lipid production from bagasse hydrolysate with *Trichosporon fermentans* by response surface methodology. *New Biotechnology*, v. 29, n. 3, p. 372-378, 2012.

HUANG, C.; WU, H.; LIU, Q. P.; LI, Y. Y.; ZONG, M. H. Effects of aldehydes on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 9, p. 4606-13, May 11 2011.

HUANG, C.; ZONG, M. H.; WU, H.; LIU, Q. P. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 19, p. 4535-8, Oct 2009.

IPCC. INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. Working Group III Mitigation of Climate Change. Special Report on Renewable Energy Sources and Climate Change Mitigation. Final Release. . 2011. Disponível em: < http://srren.ipcc-wg3.de/report/IPCC_SRREN_Full_Report.pdf >. Acesso em: 26 fev 2012.

KAAR, W. E.; GUTIERREZ, C. V.; KINOSHITA, C. M. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 14, n. 3, p. 277-287, 1998.

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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, n. 1, p. 10-26, Nov 2004.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. *International Sugar Journal*, v. 106, n. 1263, p. 147-150, Mar 2004.

KOVACS, K.; MACRELLI, S.; SZAKACS, G.; ZACCHI, G. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated lignocellulosic materials with *Trichoderma atroviride* enzymes produced in-house. *Biotechnol Biofuels*, v. 2, p. 14, 2009.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, Apr 15 2009.

LACERDA, L. M. C. F.; QUEIROZ, M. I.; FURLAN, L. T.; LAURO, M. J.; MODENESI, K.; JACOB-LOPES, E.; FRANCO, T. T. Improving refinery wastewater for microalgal biomass production and CO₂ biofixation: Predictive modeling and simulation. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, v. 78, n. 3-4, p. 679-686, 2011.

LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood - Anion accumulation versus uncoupling. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 24, n. 3, p. 151-159, 1999.

LARSSON, S.; QUINTANA-SAINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84-86, p. 617-32, Spring 2000.

- LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL JR, M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology*, v. 81, n. 1, p. 33-44, 2002.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*, v. 56, n. 1, p. 1-24, 1997.
- LI, M.; LIU, G.-L.; CHI, Z.; CHI, Z.-M. Single cell oil production from hydrolysate of cassava starch by marine-derived yeast *Rhodotorula mucilaginosa* TJY15a. *Biomass and Bioenergy*, v. 34, n. 1, p. 101-107, 2010.
- LI, Q.; DU, W.; LIU, D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 80, n. 5, p. 749-56, Oct 2008.
- LI, Y.-H.; LIU, B.; ZHAO, Z.-B.; BAI, F.-W. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 22, n. 4, p. 650-656, 2006.
- LI, Y.; ZHAO, Z.; BAI, F. High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* Y4 in fed-batch culture. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, n. 3, p. 312-317, 2007.
- LIU, Z. L.; SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; BERHOW, M. A.; KURTZMAN, C. P.; GORSICH, S. W. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 31, n. 8, p. 345-52, Sep 2004.
- LUO, C.; BRINK, D. L.; BLANCH, H. W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol. *Biomass and Bioenergy*, v. 22, n. 2, p. 125-138, 2002.
- MACEDO, I. C.; SEABRA, J. E. A.; SILVA, J. E. A. R. Green house gases emissions in the production and use of ethanol from sugarcane in Brazil: The 2005/2006 averages and a prediction for 2020. *Biomass and Bioenergy*, v. 32, n. 7, p. 582-595, 2008.
- MARTIN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolyzates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 98, p. 699-716, Spr 2002.
- MARTIN, C.; KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B. Wet oxidation as a pretreatment method for enhancing the enzymatic convertibility of sugarcane bagasse. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 3, p. 426-432, Feb 5 2007.

MEESTERS, P.; HUIJBERTS, G. N. M.; EGGINK, G. High cell density cultivation of the lipid accumulating yeast *Cryptococcus curvatus* using glycerol as a carbon source. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 45, n. 5, p. 575-579, 1996.

MENG, X.; YANG, J.; XU, X.; ZHANG, L.; NIE, Q.; XIAN, M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*, v. 34, n. 1, p. 1-5, 2009.

MORETON, R. S. Single cell oil. Longman Scientific & Technical, 1988. ISBN 9780582989009. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=tr2LAAAAIAAJ> >.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, n. 6, p. 673-686, Apr 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.

ÖHGREN, K.; RUDOLF, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass and Bioenergy*, v. 30, n. 10, p. 863-869, 2006.

OLIVA, J. M.; SAEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZALEZ, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 105, p. 141-153, Spr 2003.

OLIVEIRA, F. P. Avaliação da aclimação de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares. 2010. (Mestrado). Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campinas.

OPEC. ORGANIZATION OF THE PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES. Annual Statistical Bulletin 2006. Disponível em: < http://www.opec.org/opec_web/static_files_project/media/downloads/publications/ASB2006.pdf >. Acesso em: 07 out 2011.

OPEC. ORGANIZATION OF THE PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES. Bulletin 02/08. 2008. Disponível em: < http://www.opec.org/opec_web/static_files_project/media/downloads/publications/OB022008.pdf >. Acesso em: 07 out 2011.

OPEC. ORGANIZATION OF THE PETROLEUM EXPORTING COUNTRIES. Annual Statistical Bulletin 2010/2011., 2011. Disponível em: <

http://www.opec.org/opec_web/static_files_project/media/downloads/publications/ASB2010_2011.pdf >. Acesso em: 07 out 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 25-33, 2000b.

PAN, X. J.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwood with high residual lignin content. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 121, p. 1069-1079, Spr 2005.

PANAGIOTOPOULOS, I. A.; BAKKER, R. R.; DE VRIJE, T.; KOUKIOS, E. G. Effect of pretreatment severity on the conversion of barley straw to fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Bioresource Technology*, v. 102, n. 24, p. 11204-11211, Dec 2011.

PANAGIOTOU, G.; OLSSON, L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates. *Biotechnol Bioeng*, v. 96, n. 2, p. 250-8, Feb 1 2007.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipid production by *Yarrowia lipolytica* growing on industrial glycerol in a single stage continuous culture. *Bioresource Technology*, v. 82, n. 1, p. 43-49, 2002.

PAPANIKOLAOU, S.; AGGELIS, G. Lipids of oleaginous yeasts. Part II: Technology and potential applications. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 8, p. 1052-1073, Aug 2011.

PAPANIKOLAOU, S.; CHATZIFRAGKOU, A.; FAKAS, S.; GALIOTOU-PANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; NICAUD, J.-M.; AGGELIS, G. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 111, n. 12, p. 1221-1232, 2009.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.

PILLAI, M. G.; CERTIK, M.; NAKAHARA, T.; KAMISAKA, Y. Characterization of triacylglycerol biosynthesis in subcellular fractions of an oleaginous fungus, *Mortierella*

ramanniana var. angulispora. Biochimica et Biophysica Acta, v. 1393, n. 1, p. 128-36, Jul 31 1998.

RAO, R. S.; JYOTHI, C. P.; PRAKASHAM, R. S.; SARMA, P. N.; RAO, L. V. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. Bioresource Technology, v. 97, n. 15, p. 1974-1978, 2006.

RATLEDGE, C. Regulation of lipid accumulation in oleaginous micro-organisms. Biochemical Society Transactions, v. 30, p. 1047-1050, 2002.

RATLEDGE, C.; WYNN, J. P. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. Advances in Applied Microbiology, Vol 51, v. 51, p. 1-51, 2002.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; ALBERTO RAMÍREZ, J.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. Journal of Food Engineering, v. 61, n. 2, p. 143-152, 2004.

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

SAUER, U. Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. Advances in Biochemical Engineering Biotechnology, v. 73, p. 129-169, 2001.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLORES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. Bioresource Technology, v. 99, n. 8, p. 2898-904, May 2008.

SCHLITTLER, L. A. F. S.; PEREIRA JR, N. Produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósicos: pré-tratamento e estratégias de processamento. Diálogos & Ciência: revista eletrônica da Faculdade de Tecnologia e Ciências de Feira de Santana. Disponível em: <<http://www.ftc.br/dialogos>>. Acesso em: fev. 2013, v. 15, 2008.

SUBRAMANIAM, R.; DUFRECHE, S.; ZAPPI, M.; BAJPAI, R. Microbial lipids from renewable resources: production and characterization. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 37, n. 12, p. 1271-87, Dec 2010.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDEN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, v. 53, n. 6, p. 701-708, Jun 2000.

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. Int J Mol Sci, v. 9, n. 9, p. 1621-51, Sep 2008.

TAPIA, Ó. C. Bioquímica de los procesos metabólicos. Reverté, 2004. ISBN 9789686708554. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=2Zy1GulZcScC> >.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, P. V. N. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. . Revista eletrônica de Veterinária, v. 8, n. 6, p. 1-9, 2007.

TOGOIRES, J. H. Tratado de Enologia. Tomo II. Grupo Mundi-Prensa, 2002.

TOGOIRES, J. H. Tratado de Enología. Ediciones Mundi-Prensa, 2003. ISBN 9788484761198. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=IhDAXRKSfDUC> >.

TOMAS-PEJO, E.; BALLESTEROS, M.; OLIVA, J. M.; OLSSON, L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. J Ind Microbiol Biotechnol, v. 37, n. 11, p. 1211-20, Nov 2010.

TSIGIE, Y. A.; WANG, C.-Y.; TRUONG, C.-T.; JU, Y.-H. Lipid production from *Yarrowia lipolytica* Po1g grown in sugarcane bagasse hydrolysate. Bioresource Technology, v. 102, n. 19, p. 9216-9222, 2011.

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <http://www.unica.com.br/> Acesso em: 11 de out de 2011. 2011.

UNICA. UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/18631428920340519885/safra-praticamente-encerrada-no-centro-sul-totaliza-531-por-cento2C35-milhoes-de-toneladas/> Acesso em: 06 de jan de 2013. 2013.

USDOE. UNITED STATE DEPARTMENT OF ENERGY. Biodiesel blends. Clean cities, april 2005. Disponível em: <http://www.nrel.gov/docs/fy05osti/37136.pdf> Acesso em: 26 out 2011. 2005.

WYMAN, C. E.; YANG, B. Cellulosic biomass could help meet California's transportation fuel needs. California Agriculture, v. 63, n. 4, 2009.

YU, X. C.; ZHENG, Y. B.; DORGAN, K. M.; CHEN, S. L. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. Bioresource Technology, v. 102, n. 10, p. 6134-6140, May 2011.

ZHANG, J. M.; GENG, A. L.; YAO, C. Y.; LU, Y. H.; LI, Q. B. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. Bioresource Technology, v. 121, p. 369-378, Oct 2012.

ZHAO, X.; HU, C.; WU, S.; SHEN, H.; ZHAO, Z. K. Lipid production by *Rhodosporidium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, n. 5, p. 627-32, May 2011.

ZHAO, X.; KONG, X. L.; HUA, Y. Y.; FENG, B.; ZHAO, Z. B. Medium optimization for lipid production through co-fermentation of glucose and xylose by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 110, n. 5, p. 405-412, 2008.

ZHAO, X.; PENG, F.; DU, W.; LIU, C.; LIU, D. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. *Bioprocess Biosyst Eng*, v. 35, n. 6, p. 993-1004, 2012/08/01 2012.

ZHAO, X. B.; WANG, L.; LIU, D. H. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 6, p. 950-956, Jun 2008.

ZHENG, Y.; PAN, Z.; ZHANG, R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering* v. 2, n. 3, p. 51-68, 2009.