



**Ana Jorge Ferreira Senos
Tróia**

**Produção de Bioetanol: Efeito da Concentração da
Fonte de Carbono**



**Ana Jorge Ferreira Senos
Tróia**

**Produção de Bioetanol: Efeito da Concentração da
Fonte de Carbono.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais.

O júri

Presidente

Doutor Dmitry Victorovitch Evtugin
Professor Associado com Agregação do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Ana Paula Mora Tavares
Investigadora Auxiliar no Laboratório de Separação e Engenharia da Reação/Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto

Doutora Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
Professora Auxiliar do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Leal
Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Química, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Professora Doutora Ana Xavier e à Professora Doutora Luísa Serafim agradeço toda a orientação do trabalho, disponibilidade contínua, ajuda, ensinamentos valiosos e amizade.

À Dora agradeço por todo o apoio, conhecimentos transmitidos e amizade.

Ao Staff do Laboratório 29.1.16 e em especial à Susana, agradeço pela incansável ajuda tanto na parte experimental do trabalho como na parte teórica, pela sincera amizade e pelos bons momentos.

À Liliana, agradeço toda a ajuda e amizade.

Às minhas grandes colegas de caminhada e agora grandes amigas, Ana Ferreira e Sara Rodrigues, agradeço por todos os momentos, pelo apoio e amizade.

À minha amiga de sempre, Sininho, agradeço pelo apoio, paciência e verdadeira amizade.

À minha família, em particular aos meus pais, agradeço o incansável apoio, amor e carinho que demonstraram em toda a minha vida e em especial durante a elaboração deste trabalho.

Palavras-chave

Bioetanol, *Scheffersomyces stipitis*, Xilose, Ácido acético, Glucose, HSSL.

Resumo

O licor de cozimento ao sulfito ácido de madeira folhosa, o HSSL (Hardwood Spent Sulphite Liquor), é um subproduto da indústria papelreira e uma matéria-prima adequada para a produção de bioetanol de 2ª geração, pois é rico em monossacarídeos, nomeadamente xilose. Contudo também contém compostos, como o ácido acético e diversos fenólicos, que exercem efeitos inibitórios em alguns microrganismos. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi o estudo da concentração da fonte de carbono na produção de bioetanol pela levedura *Scheffersomyces stipitis*.

Para se conseguir estudar a influência da composição do substrato na produção do bioetanol, foram inicialmente efetuadas oito fermentações variando as concentrações de xilose e glucose entre 10, 20, 30 e 40 g/L e 0 e 5 g/L respetivamente. A concentração de ácido acético foi mantida nas 4g/L. Nos ensaios com 40 g/L de xilose obteve-se a maior concentração de etanol, 17,3 g/L, a produtividade máxima de etanol, 0,477 g/L.h e o maior rendimento produto/substrato, 0,390 g/g. A taxa específica de crescimento mais elevada foi obtida num dos ensaios com 30 g/L de xilose, 0,124 h⁻¹.

Numa segunda fase do trabalho realizaram-se três fermentações com concentrações fixas de xilose, 30 g/L, e glucose, 5 g/L, variando a concentração de ácido acético entre 6, 8 e 10 g/L. Verificou-se que um aumento da concentração deste composto tem um efeito negativo na taxa específica de crescimento, na produtividade máxima de etanol, no rendimento produto/substrato e na concentração máxima de etanol. Foi também observado a extensão da fase lag com o aumento da concentração do ácido acético. Nestes ensaios obtiveram-se 10,6 g/L de etanol, com uma produtividade máxima de 0,196 g/L.h e um rendimento produto/substrato 0,259 g/g.

Por fim executaram-se duas fermentações, uma com 60% HSSL e outra constituída por soluções definidas de modo a igualar as concentrações de xilose (34g/L), glucose (5g/L) e ácido acético (16g/L) no licor. Nestes ensaios foi possível observar uma queda drástica de todos os parâmetros estudados, tendo-se obtido uma concentração máxima de etanol de 5,52 g/L no ensaio em meio definido e 3,21 g/L no ensaio com 60% HSSL.

keywords

Bioethanol, *Scheffersomyces stipitis*, Xylose, Acetic Acid, Glucose, HSSL.

abstract

Hardwood Spent Sulphite Liquor (HSSL) is a by-product from the pulp and paper industry. It is rich in monosacharides being a suitable raw material for the production of 2° generation bioethanol. However it also has compounds which may have an inhibitory effect on some microorganisms. In this way, the aim of this work was to study the concentration of the carbon source for in production of bioethanol using the yeast *Scheffersomyces stipitis*.

In order to study the influence of substrate composition on the production of bioethanol, eight fermentations were initially performed. The xylose and glucose concentrations varied between 10, 20, 30 and 40 g/L, and 0 and 5 g/L, respectively. The acetic acid concentration was maintained at 4 g/L. The assays with 40 g/L of xylose were the ones with the higher fermentation parameters: ethanol concentration of 17,3 g/L, maximum ethanol productivity of 0,477 g/L.h and the ethanol yield of 0,390 g/g. The highest specific growth rate was obtained in a 30 g/L xylose assay, 0,124 h⁻¹.

In the second part of this work three fermentation took place with 30g/L of xylose, 5 g/L of glucose, and the acetic acid concentration varied between 6, 8 and 10 g/L. It was found that an increased concentration of this compound has a negative effect in the specific growth rate, in ethanol productivity, ethanol yield and concentration and mostly in the lag phase period. In this assays the highest ethanol concentration was 10,6 g/L, with a maximum ethanol productivity of 0,196 g/L.h and an ethanol yield of 0,259 g/g.

Finally, two fermentations were performed. The first one with 60% HSSL and the second one with synthetic solutions in order to even the xylose (34 g/L), glucose (5g/L), and acetic acid (16g/L) concentrations in HSSL. In this assays it was observed a drastic decline in all studied parameters. The maximum ethanol concentration was 5,52 g/L in the synthetic medium assay and 3,32 g/L in the 60% HSSL assay.

Índice

Índice.....	I
Índice de Figuras	III
Índice de Tabelas.....	V
Nomenclatura	VI
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Biocombustíveis	3
2.2. Bioetanol	4
2.2.1. Bioetanol de 2 ^a Geração	5
2.2.1.1. Biomassa Lenhocelulósica	5
2.2.1.2. Licores de cozimento ao sulfito ácido.....	7
2.2.1.3. Hardwood Spent Sulphite Liquor (HSSL)	8
2.3. Produção biológica de etanol	11
2.3.1. <i>Scheffersomyces stipitis</i>	12
2.3.2. Mecanismo de fermentação.....	13
3. Materiais e Métodos	17
3.1. Microrganismos.....	17
3.2. Meios de Cultura	17
3.2.1. Yeast Medium (YM)	17
3.2.2. Meio <i>Verduyn</i>	17
3.2.2.1. Solução Tampão.....	18
3.2.2.2. Solução de Sais.....	18
3.2.2.3. Solução de Vitaminas.....	18
3.2.2.4. Solução de Elementos	19
3.3. Ensaio Fermentativos.....	19

3.3.1.	Pré-inóculo	19
3.3.2.	Inóculo.....	20
3.3.3.	Ensaio de produção de bioetanol	20
3.4.	Métodos de Amostragem e Análise.....	20
3.4.1.	Densidade Ótica- análise da biomassa	20
3.4.2.	Análise por HPLC	21
3.5.	Cálculos.....	22
3.5.1.	Taxa específica de crescimento.....	22
3.5.2.	Taxas volumétricas.....	22
3.5.3.	Rendimento	23
3.5.4.	Produtividade Máxima	23
4.	Resultados e Discussão	25
4.1.	Ensaio com variação das concentrações de Xilose e Glucose	25
4.2.	Ensaio com variação da concentração de Ácido Acético	34
4.3.	Ensaio com HSSL sintético e 60% HSSL	39
5.	Conclusões	45
6.	Proposta de trabalho futuro	47
7.	Bibliografia	49
8.	ANEXOS.....	53
8.1.	ANEXO 1- Volumes de soluções de Xilose, Glucose e Acetato de Sódio	53
8.2.	ANEXO 2 - Curva de Calibração da Biomassa	54

Índice de Figuras

Figura 1 - Produção mundial do bioetanol de 2007 até ao ano de 2011. (adaptado de ^[9])	4
Figura 2 - Representação do processo de cozimento da madeira ao sulfito ácido com o aproveitamento do HSSL. (adaptado de ^[14])	8
Figura 3 - Degradação da xilose com a formação de etanol. (adaptado de ^[41]).....	14
Figura 4 - Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 10-0-4.....	25
Figura 5 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 10-5-4.....	26
Figura 6 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 20-0-4.....	27
Figura 7 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 20-5-4.....	28
Figura 8 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-0-4.....	29
Figura 9 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-4.....	30
Figura 10 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 40-0-4.....	31
Figura 11 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 40-5-4.....	32
Figura 12 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-6.....	35
Figura 13 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-8.....	36
Figura 14 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-10.....	36

Figura 15 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 34-5-16.	40
Figura 16 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo para o ensaio 60% HSSL.....	41
Figura 17 – Duração da fase lag em função da concentração de ácido acético.....	43
Figura 18 – Curva de Calibração obtida entre o peso seco e a absorvância a 650 nm para a <i>S. stipitis</i>	54

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Dimensões celulares e composição química dos dois tipos de madeira. (adaptado de [20])	7
Tabela 2- Resultados de fermentações utilizando a levedura <i>S. stipitis</i>	16
Tabela 3 – Componentes do Yeast Medium.	17
Tabela 4 – Componentes da solução tampão.	18
Tabela 5 – Componentes da solução de sais.	18
Tabela 6 – Componentes da solução de vitaminas e respectivas quantidades.	18
Tabela 7 – Componentes da solução de elementos e respectivas quantidades.	19
Tabela 8 – Concentração de xilose, glucose, acetato de sódio e etanol em cada padrão.	22
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos nas experiências em que se variou a concentração inicial de açúcares.	33
Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para as experiências em que se variou a concentração de ácido acético.	38
Tabela 11 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para os ensaios com HSSL sintético e 60% HSSL.	42
Tabela 12 – Volumes das soluções de xilose, glucose e acetato de sódio utilizadas nos ensaios biológicos de produção de etanol.	53

Nomenclatura

Símbolo	Significado	Unidades
NO _x	Termo genérico para monóxidos de nitrogénio	-
BLC	Biomassa Lenhocelulósica	-
HSSL	Hardwood Spent Sulphite Liquor	-
SSL	Sulphite Spent Liquor	-
HMF	Hidroximetilfurfural	-
μ	Taxa Específica de Crescimento	h ⁻¹
YM	Yeast Medium	-
x	Concentração de Biomassa	g/L
x_0	Concentração inicial de Biomassa	g/L
t	Tempo	h
$-r_s$	Taxa Volumétrica de Consumo de Substrato	g/L.h
r_{Etanol}	Taxa Volumétrica de Produção de Etanol	g/L.h
$P_{\text{máx}}$	Produtividade máxima de Etanol	g/L.h
$Y_{X/S}$	Rendimento Biomassa/Substrato	g _{biomassa} /g _{substrato}
$Y_{P/S}$	Rendimento Produto/Substrato	g _{produto} /g _{substrato}
$Y_{P/X}$	Rendimento Produto/Biomassa	g _{produto} /g _{biomassa}
Etanol _{Máx}	Concentração Máxima de Etanol	g/L

1. Introdução

Os combustíveis fósseis apresentam um papel muito importante na sociedade atual. Contudo o seu consumo excessivo tem levado à especulação sobre uma possível rotura nas reservas das suas matérias-primas. De modo a criar alguma independência face a estes produtos e também com uma preocupação assente no impacto ambiental destes combustíveis, a procura de energias renováveis tem aumentado nos últimos anos. Um combustível renovável que se tem tornado apelativo é o bioetanol. Em alguns países como o Brasil e os Estados Unidos, este combustível já é bastante utilizado. Porém é um bioetanol de 1ª geração pois é produzido a partir do milho e cana-de-açúcar, culturas normalmente destinadas ao consumo humano, entrando em concorrência direta com o mercado alimentar.

Para ultrapassar esta situação, a investigação nesta área tem vindo a ser dirigida para a produção de bioetanol a partir de resíduos e subprodutos industriais, o designado bioetanol de 2ª geração. Os licores de cozimento ao sulfito ácido são um exemplo de subprodutos da indústria papelreira já usados para a produção de bioetanol devido a elevadas quantidades de açúcares fermentáveis. De entre estes microrganismos produtores destaca-se a levedura *Scheffersomyces stipitis*, que apresenta uma capacidade de produção de elevadas concentrações de bioetanol, utilizando hexoses e pentoses como fonte de carbono. Todavia, a *S. stipitis* é sensível a alguns compostos, presentes nos licores, que podem exercer um efeito negativo nos microrganismos produtores de bioetanol, como o ácido acético.

O objetivo deste trabalho foi o estudo da influência da concentração das fontes de carbono, xilose e glucose, na produção de bioetanol pela *S. stipitis*. Desta forma determinaram-se as concentrações ótimas de xilose e glucose para uma concentração fixa de ácido acético, considerando as proporções destes compostos no licor. Numa segunda fase analisou-se a influência do ácido acético no crescimento da levedura e no processo fermentativo, utilizando as concentrações ótimas de açúcares anteriormente determinadas. Na terceira e última fase estudou-se a influência do licor de cozimento ao sulfito ácido não tratado no processo fermentativo da levedura e comparou-se com meios definidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Biocombustíveis

A sociedade moderna depende grandemente de fontes de energia poluentes e não renováveis, como o petróleo e seus derivados, e a sua escassez prevê-se para as próximas décadas. Como resposta a este problema, diferentes setores económicos têm mostrado interesse na utilização de combustíveis alternativos e de fontes renováveis, de modo a que, para além de os manter competitivos no mercado global ainda contribuam para a redução dos poluentes gerados.^[1] A Comissão Europeia estabeleceu, para o setor dos transportes, a substituição de 20 e 25 % dos combustíveis fósseis convencionais por combustíveis alternativos até 2020 e 2030, respetivamente. Também o Departamento de Energia dos Estados Unidos da América propôs que até 2030 se produzissem 30% dos combustíveis, para o setor dos transportes, a partir de biomassa.^[2]

Os biocombustíveis, obtidos a partir de biomassa ou através de processos biológicos, apresentam diversas vantagens como a facilidade de disponibilização e produção a partir de matérias-primas renováveis, biodegradabilidade, diminuição de produção de gases responsáveis pelo efeito de estufa e a possibilidade de mistura com os combustíveis fósseis em quantidades apreciáveis sem necessidade da alteração dos motores dos veículos.^[3]

Este tipo de combustíveis é produzido a partir de diversas matérias-primas renováveis:

- Culturas alimentares como o milho, o girassol, a cana-de-açúcar, ou a soja. No entanto, a sua utilização neste processo deve ser evitada, pois este tipo de materiais está geralmente destinado à cadeia alimentar humana e animal.^[4, 5]
- Materiais celulósicos incluindo arbustos, árvores e resíduos de produtos diversos que provêm de instalações de processamento de madeira.^[4]
- Resíduos urbanos, industriais e agrícolas.^[4]

Atualmente, o biocombustível mais utilizado é o bioetanol. Este biocombustível tem recebido um particular interesse, pois é uma fonte de energia sustentável e uma alternativa mais económica e amiga do ambiente face aos combustíveis fósseis.^[6] O bioetanol é produzido em grande quantidade no Brasil e nos Estados Unidos da América (Figura 1), partindo de cana-de-açúcar e milho, respetivamente. Estes dois países juntos perfaziam em 2010 cerca de 70% da produção mundial de bioetanol.^[7, 8]

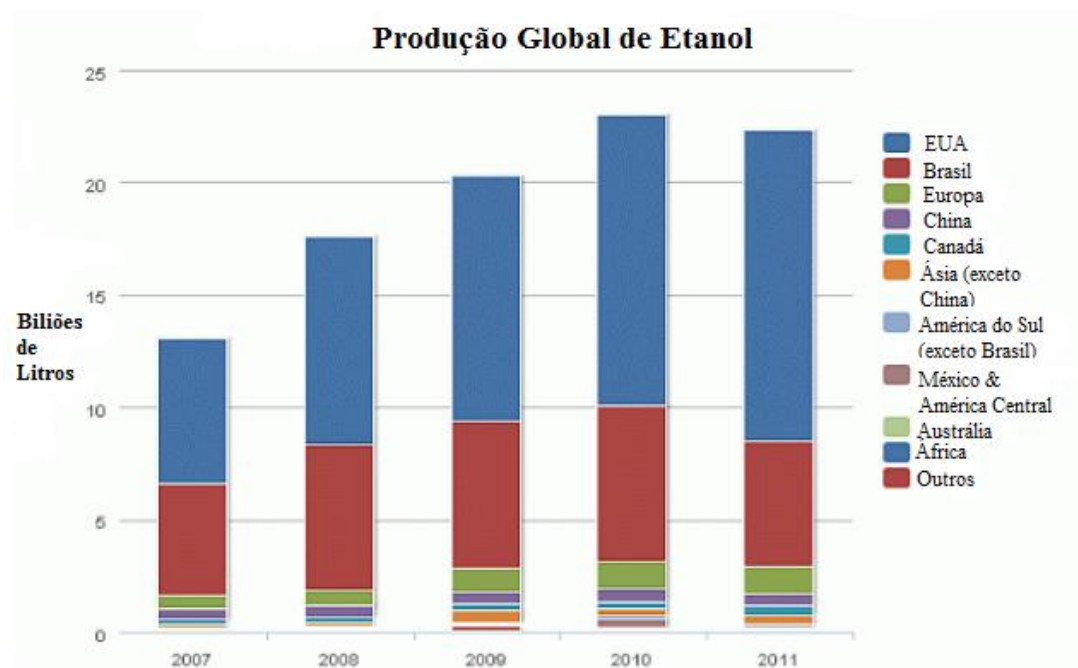


Figura 1 - Produção mundial do bioetanol de 2007 até ao ano de 2011. (adaptado de^[9])

2.2. Bioetanol

O etanol é um combustível alternativo atrativo visto que pode ser misturado com gasolina ou utilizado puro em motores específicos para a sua utilização, tendo como vantagem o elevado índice de octanas e o elevado calor de vaporização.^[7] A utilização de “*gasohol*” (mistura de gasolina e etanol) é uma alternativa aos combustíveis fósseis e a sua utilização tem vindo a aumentar em todo o mundo. A utilização do etanol como combustível pode contribuir para diminuir a dependência do petróleo, reduzir a poluição da atmosfera, bem como o efeito de estufa devido à menor acumulação de dióxido de carbono. O etanol ao contrário da gasolina é um combustível oxigenado que contém cerca de 35% de oxigénio, o que reduz a emissão de partículas e NO_x.^[10]

Este biocombustível pode ser considerado de primeira, segunda ou terceira geração. O etanol de primeira geração provém de matéria-prima vegetal pertencente à cadeia alimentar humana e animal, como a cana-de-açúcar ou o milho^[4]. O de segunda geração é produzido a partir de resíduos agroflorestais ou industriais.^[2, 11] O bioetanol de terceira geração produz-se através de novas tecnologias que utilizam algas.^[8, 12, 13]

A elevada produção comercial de etanol a partir de milho tornou-se bastante popular pois é obtido por fermentação de monossacáridos. Os cereais como o milho são ricos em amido e a sua sacarificação não é um processo complexo sendo facilmente convertido nos seus

monossacarídeos. Contudo e como foi referido anteriormente, para evitar a competição com matérias-primas destinadas ao consumo humano e animal, é urgente o desenvolvimento tecnológico que permita a utilização de outro tipo de matérias-primas.^[1] Deste modo o etanol de segunda geração sendo produzido a partir de subprodutos industriais e resíduos agroflorestais torna-se uma alternativa sustentável.

2.2.1. Bioetanol de 2ª Geração

Como foi referido anteriormente, o bioetanol de segunda geração produz-se a partir de matérias-primas como resíduos agroflorestais e industriais, principalmente os constituídos por biomassa lenhocelulósica.

2.2.1.1. Biomassa Lenhocelulósica

A biomassa lenhocelulósica (BLC) é o recurso renovável mais abundante na Terra e é considerada uma matéria-prima complexa que pode ser processada de diferentes modos para se obterem produtos de valor acrescentado.^[14] Este material pode ser utilizado como substrato para a produção de biocombustíveis de segunda geração, contribuindo para uma diversificação do fornecimento energético e mitigação de gases, oferecendo uma competição diminuta com a indústria alimentar.^[14]

A BLC pode ser classificada segundo a sua origem.^[14]

- Madeira (resinosa e folhosa) e pequenos arbustos;
- Culturas agrícolas não alimentares (colza, canas) e outros resíduos (caroços de azeitona, palha de trigo);
- Resíduos sólidos urbanos relacionados com o desbaste de árvores, jardinagem e manutenção de estradas;
- Resíduos de indústria papeleira como licores de cozimento, papel, fibras de lamas primárias.

A BLC é composta por três frações principais: celulose (40-50%), hemiceluloses (25-35%) e lenhina (15-20%). A celulose é o polímero natural mais abundante na terra e o constituinte principal da madeira^[15], é composto por milhares de moléculas de glucose ($C_6H_{12}O_6$) ligadas por ligações $\beta(1,4)$.^[16, 17, 18] As moléculas de celulose são completamente lineares e têm uma forte tendência a formar ligações de hidrogénio intra e intermoleculares. Estas agregam-se na forma de microfibrilas, nas quais, regiões altamente ordenadas (cristalinas)

alternam com regiões menos ordenadas (amorfas).^[15] Estas microfibrilas acumulam-se formando fibras de celulose.^[15] Devido à sua estrutura fibrosa e às fortes ligações de hidrogénio, a celulose tem uma elevada resistência à tração.^[15] A celulose pode ser hidrolisada quimicamente utilizando ácido concentrado ou diluído, ou por ação enzimática.^[16]

As hemiceluloses são heteropolímeros altamente ramificados, contendo resíduos de açúcares como hexoses, pentoses e ácido urónicos.^[16, 17] Tal como a celulose a maioria das hemiceluloses tem um papel de suporte nas paredes celulares.^[15] As hemiceluloses são mais facilmente hidrolisadas que a celulose^[16], e podem ser hidrolisadas a glucose, manose, galactose, xilose e arabinose.^[15, 18] A composição e estrutura das hemiceluloses depende do tipo de madeira sendo distinta para folhosas e resinosas.^[15]

A lenhina é o polímero aromático mais abundante na natureza, é uma macromolécula de carácter fenólico, com uma estrutura complexa de unidades de fenil propano ligadas numa estrutura tridimensional, sendo o produto de desidratação de três álcoois monoméricos que derivam do ácido p-cinâmico.^[16] A lenhina pode ser considerada como o cimento que mantém as fibras da celulose unidas, e como tal é difícil de remover completamente.^[17] A lenhina confere rigidez à madeira e pode também fornecer proteção contra ataques microbianos.^[18]

A utilização de BLC como substrato para a produção de etanol apresenta uma barreira, pois esta matéria-prima apresenta uma estrutura macromolecular complexa que resiste à degradação. Por esta razão, a BLC deve ser previamente hidrolisada para obter os monossacarídeos necessários para a produção de etanol. A hidrólise pode ser ácida, básica ou enzimática.

2.2.1.1.1. BLC de resinosas versus folhosas

As resinosas são árvores gimnospéricas, como por exemplo pinheiro. A madeira de resinosas é composta por dois tipos de células diferentes: traqueídeos (90-95%) e raios (5-10%).^[15] Os traqueídeos fornecem à madeira a força mecânica necessária e promovem o transporte de água. As folhosas pertencem às árvores angiospéricas, como por exemplo o eucalipto. Este tipo de madeira é composto por uma diversidade de células, especializadas em diferentes funções.^[15]

As madeiras que se obtém a partir destes dois grupos de árvores diferem na morfologia das fibras e na composição química. Embora as fibras de ambos os tipos sejam compostas pelos mesmos componentes (celulose, hemiceluloses, lenhina e quantidade mínimas de extratáveis e inorgânicos), as suas proporções e características estruturais são diferentes^[17, 19, 20], como se pode observar na Tabela 1.

Tabela 1 - Dimensões celulares e composição química dos dois tipos de madeira. (adaptado de ^[20])

	Dimensões celulares		Composição Química		
	Comprimento Médio (mm)	Diâmetro Médio (µm)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lenhina (%)
Resinosas	3,3	33	40-44	23-28	25-31
Folhosas	1	20	45-50	25-35	18-24

2.2.1.2. Licores de cozimento ao sulfito ácido

Os licores de cozimento ao sulfito ácido (SSLs) são subprodutos do cozimento ao sulfito ácido da madeira, na indústria papelreira, e são considerados como matéria-prima promissora para a produção de bioetanol.^[20] O objetivo principal do cozimento da madeira é a remoção da lenhina, mantendo a integridade da celulose, proporcionando fibras celulósicas com a composição (percentagem de celulose e hemiceluloses) e rendimento pretendido das pastas por cada fábrica (dependendo do grau de deslenhificação).^[14, 20] Durante o cozimento da madeira, simultaneamente com a dissolução da lenhina, são também removidos alguns hidratos de carbono.^[15] A seletividade da deslenhificação pode ser expressa como a proporção de lenhina e hidratos de carbono removidos da madeira depois de um determinado tempo de cozimento ou a um dado grau de deslenhificação. No cozimento ao sulfito, são dois os tipos de reação responsáveis pela remoção da lenhina, a hidrólise e a sulfonação. A sulfonação gera grupos ácido sulfônicos hidrofílicos na lenhina hidrofóbica, enquanto que a hidrólise quebra ligações éter entre unidades fenilpropano, reduzindo o peso molecular e criando grupos hidroxil fenólicos livres.^[15] Ambas as reações aumentam a capacidade hidrofílica da lenhina, tornando-a mais solúvel.^[15]

As condições extremas, que incluem temperatura elevada (125-145°C) e acidez do meio (pH 1-2), aplicadas durante o processo de cozimento ao sulfito ácido causam a hidrólise parcial das hemiceluloses libertando açúcares monoméricos e oligossacarídeos, que podem ser facilmente fermentados a etanol.^[20] É devido à sensibilidade das ligações glicosídicas face à hidrólise ácida, que a despolimerização de parte dos polissacarídeos da madeira não pode ser evitada durante o processo de cozimento ao sulfito ácido.^[15] As hemiceluloses são atacadas mais rapidamente que as celulosas devido à sua estrutura amorfa e ao seu baixo grau de polimerização.^[15] Além disso, a maioria das ligações glicosídicas das hemiceluloses são mais lábeis em relação à hidrólise ácida do que as da celulose.^[15] Sendo assim, a maioria do material

orgânico presente nos licores de cozimento ao sulfito ácido tem origem na lenhina (lenhosulfonatos) e nas hemiceluloses (monossacarídeos e oligossacarídeos).^[15]

Os licores de cozimento ao sulfito ácido de madeira resinosa contêm uma elevada porção de hexoses (> 76%),^[14] maioritariamente manose e glucose, enquanto aqueles obtidos do cozimento de madeira folhosa contêm principalmente pentoses (> 70%) nos seus açúcares.^[20]

Os SSLs depois de concentrados por evaporação, são normalmente queimados para recuperação energética.^[14, 15]

2.2.1.3. Hardwood Spent Sulphite Liquor (HSSL)

O HSSL é um subproduto que resulta do cozimento ao sulfito ácido de madeira folhosa, tendo como principais componentes orgânicos os lenhosulfonatos e os açúcares. Uma vez que é uma fonte de açúcares, o HSSL pode ser utilizado como matéria-prima para a produção de bioetanol de segunda geração. Neste licor o material lenhocelulósico já sofreu a etapa de hidrólise, libertando a maior parte dos açúcares que podem ser fermentados a etanol, ou seja, os mono e essencialmente os di ou trissacarídeos.^[5] O processo de cozimento da madeira ao sulfito ácido com aproveitamento de HSSL encontra-se representado na Figura 2.

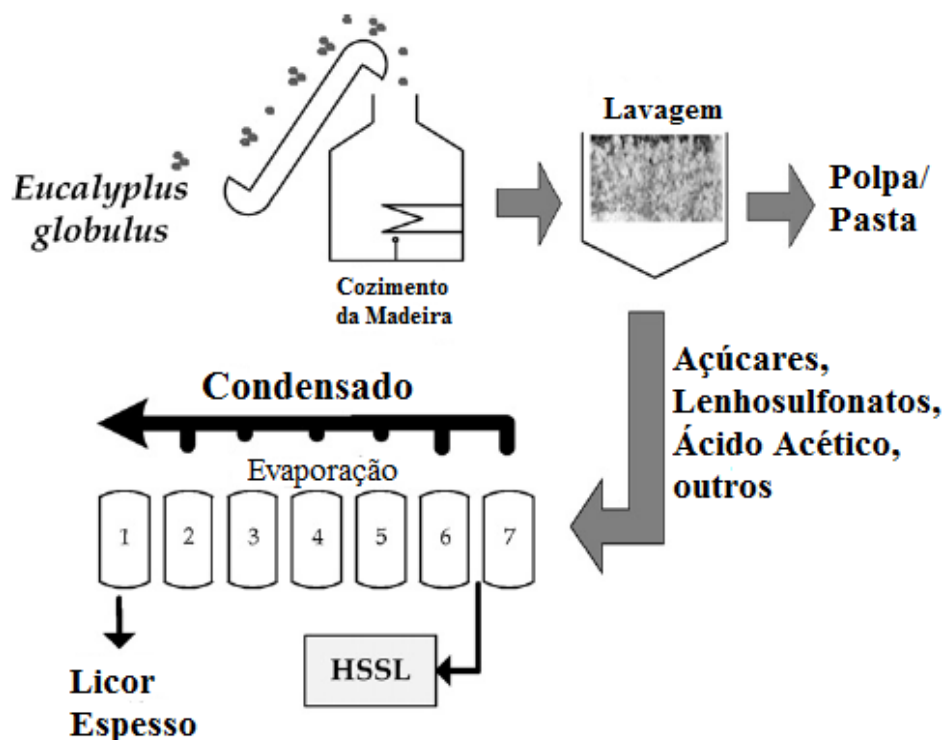


Figura 2 - Representação do processo de cozimento da madeira ao sulfito ácido com o aproveitamento do HSSL. (adaptado de ^[14])

A aplicação e o processamento dos HSSLs dependem significativamente da sua composição química que é determinada pela origem da madeira envolvida no processo de cozimento.^[20]

2.2.1.3.1. Composição dos HSSLs

As pentoses são o açúcar dominante nos HSSLs, nomeadamente a xilose (16 - 43 g/L) e a arabinose (1,0 – 21,0 g/L). As hexoses também estão presentes mas em menor quantidade: glucose (2,3 – 9,0 g/L), manose (1,0 – 9,0 g/L) e galactose (1,6 – 5,0 g/L). Cerca de 25% dos hidratos de carbono presentes no HSSL estão na forma de oligossacarídeos.^[20] De entre os compostos voláteis, o ácido acético é o mais abundante (8,2 – 16 g/L), embora o furfural também esteja presente mas em concentrações mais reduzidas.^[20] As quantidades significativas de ácido acético e de xilose no HSSL são resultado da degradação das glucoroxilanas, que são predominantes nas hemiceluloses da madeira folhosa. Outros componentes destes licores são os lenhosulfonatos ($78,2 \pm 0,6$ g/L).^[5]

2.2.1.3.2. Inibidores microbianos presentes nos HSSLs

Apesar de serem ricos em açúcares, que os torna potenciais substratos para processos biológicos, os HSSLs possuem também inibidores microbianos na sua constituição. A variedade e concentração de compostos tóxicos presentes nos licores dependem do processo de cozimento da madeira. O máximo de concentração para cada inibidor depende de diversos fatores: a origem do composto tóxico, o seu mecanismo de inibição, o microrganismo utilizado e o seu estado fisiológico, a tecnologia do processo fermentativo, a concentração de oxigénio dissolvido do meio e o pH.^[14] O conhecimento dos compostos inibidores presentes no HSSL é essencial para a escolha adequada de uma metodologia de desintoxicação.^[14] O processo de hidrólise ácida da BLC, que dá origem ao HSSL, envolve um procedimento a elevadas temperaturas sob condições ácidas, como é o caso do cozimento ao sulfito ácido da madeira, e leva à formação e libertação de uma grande gama de inibidores.^[21] Além disso, a extensão da inibição é maior quando vários componentes inibitórios estão presentes. Estes inibidores são convencionalmente classificados segundo a sua origem nos componentes lenhocelulósicos e no processo de hidrólise: produtos da degradação de açúcares, produtos da degradação da lenhina, compostos derivados de extrativos e iões de metais pesados.

Durante a degradação das hemiceluloses libertam-se, além da xilose, manose, galactose e glucose, ácido acético.^[21] O ácido acético tem ação antimicrobiana cujo metabolismo de

inibição é conhecido. A baixos valores de pH, na sua forma não dissociada, o ácido acético pode difundir através da membrana celular, promovendo a diminuição da atividade citoplasmática das células, podendo mesmo causar morte celular.^[14, 21] Contudo, o grau de inibição do ácido acético não depende apenas da sua concentração, mas também da concentração de oxigénio e do pH do meio.^[14] Quando as condições de hidrólise ácida são muito fortes (temperaturas e pressões bastante elevadas e utilização de ácido muito concentrado) a xilose pode ser degradada a furfural, outro inibidor do crescimento celular que afeta a taxa de crescimento específica e o rendimento biomassa/substrato.^[14, 21] Contudo, este composto em concentrações abaixo das 0,5 g/L não tem um efeito negativo nos microrganismos, podendo mesmo contribuir para o crescimento celular. Da mesma forma, o 5-hidroximetilfurfural (HMF) resulta da degradação extensa de hexoses.^[14, 21] Este composto tem um efeito inibitório similar ao furfural, aumentando também a fase lag e diminuindo o crescimento celular, contudo numa menor extensão pois tem uma reatividade elevada.^[14, 21] O HMF e o furfural podem sofrer hidrólise e dar origem a ácido fórmico.^[21] As concentrações de furfural e de HMF no HSSL costumam ser baixas pois o processo de hidrólise não é suficientemente intensivo de modo a existirem grandes quantidades destes compostos, visto existir a necessidade das fibras de celulose e algumas das hemiceluloses permanecerem intactas nas pastas produzidas.

Os compostos fenólicos formam-se na degradação parcial da lenhina.^[21] Outros compostos como os aromáticos, poliaromáticos e aldeídos também se podem libertar da lenhina durante a hidrólise no processo de cozimento da madeira.^[14] Os compostos libertados da hidrólise da lenhina são considerados mais tóxicos para os microrganismos que o furfural e o HMF, mesmo a concentrações reduzidas, sendo os compostos fenólicos os mais tóxicos presentes nos hidrolisados lenhocelulósicos.^[14, 22] Estes promovem a perda de integridade das membranas biológicas, afetando a sua capacidade como barreiras seletivas e como matrizes enzimáticas, apresentam também um efeito negativo na assimilação de açúcares e no crescimento celular.^[14]

Os iões de metais pesados, nomeadamente, o ferro, o crómio, o níquel e o chumbo, resultam da corrosão do equipamento durante a hidrólise ácida no processo de cozimento da madeira e são de elevada toxicidade para os microrganismos.^[14]

Conhecendo-se os compostos inibitórios presentes nos licores de cozimentos ao sulfito ácido, o processo de fermentação pode ser melhorado em diversos estágios.^[21] Primeiro, a formação de inibidores pode ser minimizada através da otimização das condições de hidrólise. Numa segunda etapa, a análise do HSSL e da sua composição pode ajudar a melhorar as condições de fermentação. Em terceiro, e também através do conhecimento da composição do HSSL, desenvolver métodos de desintoxicação mais eficientes para a remoção dos inibidores antes da fermentação.^[21]

2.2.1.3.3. Remoção de inibidores

Tendo como objetivo a diminuição da concentração de compostos inibidores e o melhoramento das condições fermentativas para a produção de bioetanol foram testadas, até ao momento, algumas abordagens diferentes: a prevenção da formação de inibidores durante o processo de cozimento, a desintoxicação do HSSL antes da fermentação.^[14]

Face à desintoxicação dos HSSLs antes da fermentação, têm vindo a ser utilizadas uma série de tecnologias. Estes incluem o tratamento alcalino com “cal” ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), denominado usualmente por “overliming”, o tratamento com carvão ativado, a separação com resinas de permuta iónica^[23], e a extração com solventes.^[20]

Xavier *et al.* (2010) apresentaram a primeira desintoxicação biológica para o HSSL, especificamente para a remoção do ácido acético, mostrando pela primeira vez a possibilidade da utilização deste fungo para desintoxicar HSSL para a fermentação do bioetanol.^[5] Os fungos que provêm da madeira degradada são microrganismos atrativos para desintoxicar subprodutos como o HSSL, visto excretarem enzimas extracelulares capazes de degradar lenhina e lenhosulfonatos que se verificou serem eficientes na degradação de fenólicos de baixo peso molecular.^[20] *Trametes versicolor* é o fungo mais utilizado para a produção de enzimas lenholíticas. Recentemente, o fungo filamentosso *Paecilomyces variotti* tem sido utilizado para remover alguns inibidores do HSSL.^[24] A desintoxicação com este fungo produziu HSSL com baixos níveis de ácido acético, além de consumir totalmente compostos fenólicos de baixo peso molecular, indicando que é um método de desintoxicação adequado.^[24] Uma fermentação utilizando HSSL desintoxicado por este método foi realizada por estes mesmos autores, tendo-se obtido um rendimento de etanol de $0,24 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{açúcar}}$.^[24]

2.3. Produção biológica de etanol

Para se obter etanol de origem biológica utiliza-se normalmente o mecanismo de fermentação alcoólica com recurso a leveduras ou bactérias que são capazes de metabolizar alguns dos açúcares presentes nos hidrolisados de BLC e promover elevados rendimentos de etanol.^[10, 14] Um dos microrganismos mais conhecido e eficiente na produção de etanol partindo de hexoses é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esta levedura é empregue com sucesso em escala industrial permitindo uma elevada produtividade de etanol, uma vez que apresenta elevada tolerância aos inibidores usualmente presentes nas matérias-primas dos processos em que é utilizada (produção de bebidas alcoólicas).^[14] Contudo, esta levedura não é capaz de

fermentar a xilose a etanol de maneira eficiente, pois só consegue utilizar um dos seus isómeros, a xilulose.^[14, 25]

Outras leveduras foram referidas como capazes de converter xilose em etanol, como a *Scheffersomyces stipitis*, a *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*.^[14] Entre estas a *S. stipitis* é a levedura que exibe o melhor potencial para uma aplicação industrial devido ao elevado rendimento de etanol obtido.^[14, 26]

2.3.1. *Scheffersomyces stipitis*

O microrganismo escolhido para este estudo a levedura *Scheffersomyces stipitis* (nova designação de *Pichia stipitis*). É uma levedura que se encontra na madeira em decomposição e nas larvas de insetos que nela habitam. Tem a capacidade de utilizar a grande maioria dos açúcares presentes na madeira, devido à produção de enzimas que permitem hidrolisar os polissacarídeos da madeira em monossacarídeos.^[27] Este microrganismo é aeróbico, mostrando-se capaz de metabolizar a celobiose, glucose, xilose, manose e galactose, tendo também uma grande capacidade de produção de biomassa.^[28]

A temperatura ótima da *S. stipitis* varia entre os 25 e os 33 °C e o pH situa-se entre os 4.5 e 5.5.^[28] Esta levedura apresenta colónias com uma cor creme, um aspeto cremoso e formas circulares e alongadas.

Sendo aeróbia, a *S. stipitis* cresce com elevadas taxas de arejamento mas apenas produz etanol sob condições com baixas taxas de arejamento.^[28, 29] O fornecimento de oxigénio deve ser limitado de forma a prevenir a utilização de xilose apenas para o crescimento celular, e ainda evitar a oxidação do etanol produzido. Contudo, o oxigénio deve ser suficiente para a manutenção celular e para evitar o consumo lento da xilose.^[20]

S. stipitis é bastante sensível a alguns dos inibidores existentes nos materiais lenhocelulósicos, como o ácido acético e o furfural.^[20, 22, 28, 30, 31, 32, 33] O ácido acético diminui drasticamente a produção e o rendimento de etanol^[34], pois faz decrescer o pH intracelular abaixo do alcance fisiológico. O seu efeito resulta numa longa fase lag, inibição do crescimento celular e uma grande diminuição no consumo de xilose.^[31] Uma das maneiras de controlar este efeito inibitório do ácido acético em concentrações até 5g/L é controlando o pH.^[31, 34]

Num contínuo esforço de melhoramento e avanço genético, *S. stipitis* e outras leveduras, têm vindo a ser geneticamente manipuladas de forma a otimizar a produção de etanol e a resistência a inibidores.^[20, 35, 36, 37] No entanto a produção de etanol utilizando a *S. stipitis* não está ainda implementada industrialmente, visto o processo de fermentação não estar ainda otimizado.^[20]

2.3.2. Mecanismo de fermentação

A fermentação alcoólica é realizada por leveduras, certos fungos filamentosos e bactérias, sendo um processo bioquímico de transformação de açúcares em etanol. Dá-se a oxidação de monossacáridos, sem introdução de qualquer aceitador de eletrões, em condições de microarejamento ou de total ausência de oxigénio.^[16, 38, 39]

A fermentação através da via glicolítica é caracterizada por uma série de reações oxidação-redução na qual são produzidas ligações fosfato de elevada energia na forma de ATP e é formado ácido pirúvico, que vai ser aceitador de eletrões. No final o equilíbrio redox é restaurado e os produtos de fermentação (etanol e dióxido de carbono) são libertados.^[39]

A equação que traduz a fermentação alcoólica a partir de hexoses é:



A equação que traduz a fermentação alcoólica a partir de pentoses é:



A Figura 3 mostra a fermentação da xilose a etanol, com a formação de um intermediário, a xilulose. A formação deste intermediário ocorre através da ação da enzima xilose redutase, que converte a xilose a xilitol requerendo a presença de NADPH. Por sua vez o xilitol pode ser excretado da célula ou oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase necessitando de NAD^+ . A xilulose é então transformada em xilulose-5-fosfato com gasto de ATP. Posteriormente a xilulose-5-fosfato, através da via da pentose fosfato, é convertida em gliceraldeído-3-fosfato e este pela via glicolítica é convertido em piruvato. O piruvato pela ação da piruvato descarboxilase é transformado em acetaldeído. Finalmente, este é convertido em etanol, pela ação da álcool desidrogenase.^[16, 40, 41]

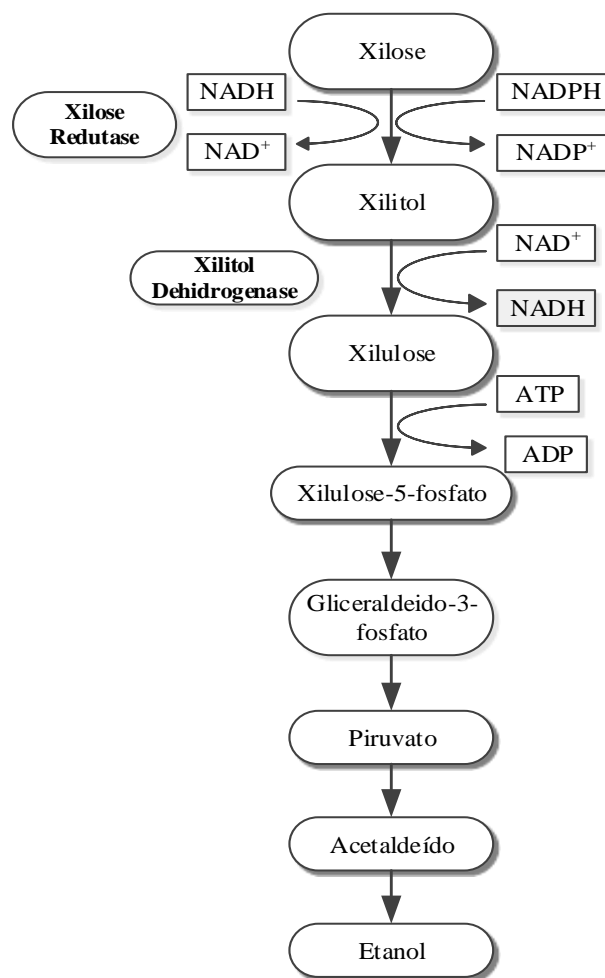


Figura 3 - Degradação da xilose com a formação de etanol. (adaptado de [41])

2.4. Produção de Etanol por *S. stipitis*

A produção de bioetanol por *S. stipitis* tem sido estudada utilizando como substratos de xilose e glucose, hidrolisados de BLC, e HSSL.

Agbogbo *et al.* (2006) estudaram a produção de bioetanol por *S. stipitis* em misturas de xilose e glucose em meio definido, verificando que nas fermentações em que a percentagem de xilose era mais elevada que a de glucose, o rendimento e a concentração máxima de etanol eram superiores, tendo obtido uma concentração máxima de etanol de 24,4 g/L no ensaio com 25% de glucose e 75% de xilose num total de 60g/L de açúcares.^[42] Díaz *et al.* (2009) reportaram o efeito de determinados inibidores no mecanismo de fermentação de *S. stipitis*. No seu estudo, realizaram diversas fermentações utilizando meios definidos ricos em açúcares (xilose e glucose) na presença de ácido acético, ácido fórmico e furfural.^[43] Silva *et al.* (2010) estudaram a influência da agitação e do arejamento utilizando meios definidos constituídos por xilose e glucose^[44]. Mais recentemente, Isabella *et al.* (2013) estudaram a capacidade fermentativa da *S.*

stipitis livre, imobilizada e em co-cultura com *S. cerevisiae*, em meios definidos com diferentes concentrações de açúcares (xilose + glucose).^[45] Outros estudos comparam diferentes tipos de biorreatores e modos de operação na fermentação de etanol utilizando a *S. stipitis*.^[46]

Mussato *et al.* (2009) estudaram a influência da concentração inicial de xilose, bem como da agitação e do arejamento na produção de etanol pela *S. stipitis*, utilizando hidrolisados da palha de arroz.^[47] Díaz *et al.* (2009) também estudaram a fermentação utilizando como substrato um hidrolisado de desbaste de oliveira desintoxicado com diferentes diluições, tendo obtido um rendimento máximo de etanol de $0,42 \text{ g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{substrato}}$.^[43]

Nigam (2001) comparou a produção de bioetanol a partir de HSSL e de meios definidos utilizando a estirpe nativa e uma estirpe adaptada *S. stipitis* e estudou também o efeito do arejamento e da velocidade de agitação em biorreator.^[34]

Na Tabela 2, apresentam-se alguns destes resultados de fermentações com substratos de origem lenhocelulósica utilizando a *S. stipitis*. Nela estão reportados a concentração de etanol obtida, o rendimento etanol/substrato, a percentagem de açúcares consumidos e o tempo de fermentação. A maior concentração de etanol (41 g/L) foi obtida nos estudos de Parekh (1988) utilizando como substrato um hidrolisado enzimático de aparas de madeira de faia.^[48] Xavier *et al.* (2010) estudaram a fermentação de açúcares do HSSL purificados por permuta iônica, que apresentou o rendimento mais elevado $0,49 \text{ g/g}$,^[5] bastante próximo do valor do rendimento teórico, $0,51 \text{ g/g}$.^[47]

Tabela 2- Resultados de fermentações utilizando a levedura *S. stipitis*.

Substrato	Tipo de Hidrólise	Tipo de fermentador	Etanol (g/L)	Rendimento Etanol/Substrato (g/g)	Açúcares consumidos (%)	Tempo de Fermentação (h)	Referências
Aparas de Madeira de Faia	Enzimática	Erlenmeyer de 250 mL	41	0,47	95	96	[48]
Aparas de Madeira de Faia	Enzimática	Erlenmeyer de 250 mL	29	0,41	78	96	[48]
Aparas de Madeira de Carvalho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 250 mL	14,5	0,4	93,5	100	[49]
Aparas de Madeira de Carvalho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 500 mL	9,9	0,46	98a	-	[28]
Espiga de milho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 250 mL	10,4	0,34	85	96	[28]
Palha de milho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 125 mL	25	0,42	92	72	[50]
Palha de milho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 125 mL	15	0,37	97	72	[28]
Palha de milho	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 250 mL	14,5	0,39-0,41	-	20a	[28]
Palha de arroz	Enzimática	Fermentador de 3L	6	0,4	100	20	[51]
Ervas (<i>Panicum virgatum</i>)	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 250 mL	14	0,36-0,42	-	36	[28]
Álamo	Hidrólise ácida fraca	Erlenmeyer de 250 mL	12	0,31-0,38	-	50	[28]
HSSL (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Cozimento ao sulfito ácido	Erlenmeyer de 500 mL	2,4	0,24	-	32	[24]
HSSL (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Cozimento ao sulfito ácido	Erlenmeyer de 500 mL	8,1	0,49	96	50	[5]
Licor de cozimento ao sulfito ácido da madeira de carvalho	Cozimento ao sulfito ácido	Erlenmeyer de 250 mL	20,2	0,41	89	46	[34]

3. Materiais e Métodos

3.1. Microrganismos

O microrganismo utilizado neste estudo foi a *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL – 7124, do Agriculture Research Service Culture Collection at National Center do Agricultural Utilization Research, USDA. A levedura foi replicada mensalmente em meio sólido, durante 48 horas a 29°C e posteriormente reservada a 4°C.

3.2. Meios de Cultura

Neste estudo utilizaram-se meios sintéticos diferentes, o YM sólido para a replicação mensal da levedura, YM líquido para o pré-inóculo e o meio *Verduyn* para inóculo e fermentações.

3.2.1. Yeast Medium (YM)

O meio YM foi preparado em água destilada e foi esterilizado em frascos em autoclave a 120 °C durante 22 minutos. Os componentes deste meio encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 – Componentes do Yeast Medium.

Componente	Concentração (g/L)
Agar (para meio sólido)	20,0
Extrato de levedura	3,00
Extrato de malte	3,00
Glucose	10,0

3.2.2. Meio *Verduyn*

O meio *Verduyn* é constituído pelas soluções tampão, sais, elementos e vitaminas (ver seções 3.2.2.1 a 2.3.2.4). Este meio foi preparado em condições de assepsia na câmara laminar e à chama, em condições de esterilidade.

À exceção das soluções de vitaminas e de elementos que foram filtradas, todas as outras soluções foram autoclavadas a 120°C durante 22 minutos.

3.2.2.1. Solução Tampão

A solução tampão era constituída pelos componentes presentes na Tabela 4.

Tabela 4 – Componentes da solução tampão.

Componente	Concentração (g/L)
C ₆ H ₄ COOHCOOK	10,20
KOH	2,20

3.2.2.2. Solução de Sais

A solução de sais era constituída pelos componentes presentes na Tabela 5.

Tabela 5 – Componentes da solução de sais.

Componente	Concentração (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	5,00
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,50
KH ₂ PO ₄	3,00

3.2.2.3. Solução de Vitaminas

Para um volume de solução de 100 mL, concentrada 1000 vezes, dissolveram-se 0,0050 g de biotina em 1,0 mL de NaOH (0,1 M), adicionaram-se 80,0 mL de água destilada e acertou-se o pH a 6,5 com HCl (1M) e NaOH (1M). Seguidamente adicionaram-se as seguintes vitaminas pela ordem abaixo descrita na tabela 6, tendo-se acertado o pH a 6,5 após cada adição.

Tabela 6 – Componentes da solução de vitaminas e respetivas quantidades.

Panthothelic acid calcium salt	0,1000 g
Nicotin Acid	0,1000 g
Myo-inositol	2,5000 g
Thiamine.HCl	0,1000 g
Piridoxine.HCl	0,1000 g
Para-aminobenzoic acid	0,0200 g

Com água destilada perpez-se o volume até aos 100,0 mL e acertou-se novamente o pH a 6,5. A solução foi filtrada, através de um filtro de 0,2 μm , em condições de esterilidade e reservou-se a 4°C, protegida da luz, com uma folha de alumínio.

3.2.2.4. Solução de Elementos

Para um volume de solução de 100,0 mL, concentrada 1000 vezes, dissolveram-se 1,50 g de EDTA em 50,0 mL de água destilada, adicionaram-se 0,45 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e acertou-se o pH a 6,0. De seguida, adicionaram-se os seguintes compostos pela ordem abaixo descrita na tabela 7, acertando-se o pH a 6,0 após a adição de cada um deles.

Tabela 7 – Componentes da solução de elementos e respetivas quantidades.

$\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1000 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0300 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0300 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0400 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4500 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3000 g
H_3BO_3	0,1000 g
KI	0,0010 g

Com água destilada perpez-se o volume até aos 100,0 mL e acertou-se o pH a 4,0. Filtrou-se a solução, através de um filtro de 0,2 μm , em condições de esterilidade e esta foi reservada a 4°C, protegida da luz com uma folha de alumínio.

3.3. Ensaio Fermentativos

3.3.1. Pré-inóculo

O pré-inóculo preparou-se através da transferência de uma colónia de *Scheffersomyces stipitis* em cultura sólida, com o auxílio de uma ança de inoculação para 100 mL de meio YM e foi inoculado a 28°C com agitação orbital de 180 rpm durante 24 horas.

3.3.2. Inóculo

Para a obtenção do inóculo adicionaram-se 10 mL da solução de pré-inóculo num Erlenmeyer com os seguintes volumes de soluções componentes do meio *Verduyn*: 10 mL da solução tampão, 10 mL da solução de sais, 10 mL de água destilada, 100 µL da solução de elementos, 100 µL da solução de vitaminas e 60 mL de uma solução de Xilose (20g/L). Este meio de fermentação era incubado a 28°C com agitação orbital de 180 rpm durante 18 horas.

3.3.3. Ensaio de produção de bioetanol

Os ensaios experimentais foram conduzidos em Erlenmeyers de 500 mL com um volume total de meio de 250 mL. Cerca de 75 mL deste volume era constituído pelos seguintes volumes de soluções componentes do meio *Verduyn*: 25 mL da solução de inóculo, 25 mL da solução tampão, 25 mL da solução e de sais, 250 µL da solução de elementos e 250 µL da solução de vitaminas. Os restantes 175 mL eram constituídos por diferentes volumes das soluções de Xilose, Glucose, Acetato de Sódio e água destilada, que variavam consoante as concentrações pretendidas para cada ensaio. (ANEXO 1) Este ensaios denominam-se de acordo com a sua constituição em Glucose, Xilose e Acetato de Sódio no formato ([Xilose]-[Glucose]-[Acetato de Sódio]).

Realizou-se ainda um ensaio com HSSL, cedido pela Caima – Indústria de Celulose S.A., em 2012. Este licor foi retirado no processo de produção de pasta para viscosa e foi sujeito a uma análise em HPLC tendo determinado as suas concentrações em xilose (34 g/L), glucose (5 g/L) e ácido acético (16 g/L). Neste ensaio o HSSL foi diluído até 60% em meio *Verduyn* e compensado com xilose, glucose e acetato de sódio.

3.4. Métodos de Amostragem e Análise

A amostragem nas fermentações em Erlenmeyers foi efetuada com o auxílio de uma micropipeta com ponta estéril, em câmara de fluxo laminar, retirando-se amostras de 2 mL de volume.

3.4.1. Densidade Ótica- análise da biomassa

De modo a determinar a concentração celular ao longo das fermentações, foram lidas as absorvências de um pequeno volume de amostra, representativos do volume total de

fermentação. Para tal utilizou-se o espectrofotômetro de feixe duplo SHIMADZU, UVmini - 1240 a um comprimento de onda de 650 nm. Dos valores de absorvância registados foi possível determinar a concentração de biomassa existente, utilizando a seguinte curva de calibração da biomassa elaborado por outro membro do laboratório:

$$\text{Concentração biomassa} = 0,1945 \times \text{Absorvância} - 0,0017 \quad \text{Equação (3)}$$

3.4.2. Análise por HPLC

Após a recolha e filtração de amostras utilizando um filtro de 0,2 μm , estas foram analisadas através de cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC. As amostras foram injetadas num sistema de cromatografia líquida equipado com um injetor automático, uma coluna de troca iónica Eurokat H-10 μm (Knauer), um forno Paralab a 40°C e um detetor de índice de refração Hitachi RI Detector L-2490. Como eluente foi utilizado o H_2SO_4 (0,01N) a um caudal de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi 20 μL .

As amostras para injeção em HPLC foram preparadas da seguinte forma: recolheram-se 700 μL de amostra para um ependdorf de 1,0 mL e centrifugou-se a 13000 rpm durante 30 segundos. Recolheram-se 600 μL do sobrenadante e voltou-se a centrifugar em tubo de centrifugação Costar Spin-X Centrifuge Tube Filter 0.22 μm Nylon durante 15 minutos a 8000 rpm. Finalmente recolheu-se o filtrado para um *vail* específico para a injeção em HPLC.

De forma a conseguir determinar as concentrações dos diferentes compostos existentes a partir das áreas dos picos nos cromatogramas dos compostos presentes nas amostras injetadas em HPLC, obtiveram-se retas de calibração utilizando soluções padrão com concentrações definidas de xilose, glucose, acetato de sódio e etanol. Estas concentrações encontram-se na Tabela 8.

Tabela 8 – Concentração de xilose, glucose, acetato de sódio e etanol em cada padrão.

Padrão	Xilose (g/L)	Glucose (g/L)	Acetato de Sódio (g/L)	Etanol (g/L)
1	40,1	5,01	5,02	25,00
2	20,05	2,51	2,51	12,50
3	13,37	1,67	1,67	8,33
4	10,03	1,25	1,25	6,25
5	6,68	0,84	0,84	4,17
6	5,01	0,63	0,63	3,13
7	4,01	0,50	0,50	2,50

3.5. Cálculos

3.5.1. Taxa específica de crescimento

A taxa específica de crescimento foi determinada pela equação 4.

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t \quad \text{Equação (4)}$$

Onde x é a concentração de biomassa, x_0 é a concentração de biomassa inicial, μ é a taxa específica de crescimento e t é o tempo.

Representando graficamente o logaritmo natural da concentração de biomassa em função do tempo, durante fase exponencial de crescimento, obteve-se uma equação da reta, na qual μ foi determinada como sendo o declive dessa mesma reta.

3.5.2. Taxas volumétricas

A taxa volumétrica de consumo de substrato foi determinada utilizando a seguinte expressão:

$$-r_S = \frac{\text{Concentração substrato}_{\text{inicial}} - \text{Concentração substrato}_{\text{final}}}{\text{tempo}_{\text{final}} - \text{tempo}_{\text{inicial}}} \quad \text{Equação (5)}$$

A taxa volumétrica de formação de produto foi determinada utilizando a seguinte expressão:

$$r_{Etanol} = \frac{\text{Concentração produto}_{final} - \text{Concentração produto}_{inicial}}{\text{tempo}_{final} - \text{tempo}_{inicial}} \quad \text{Equação (6)}$$

3.5.3. Rendimento

O rendimento biomassa/substrato foi determinado utilizando a seguinte expressão:

$$Y_{X/S} = \frac{\text{Concentração Biomassa}_{final} - \text{Concentração Biomassa}_{inicial}}{\text{Concentração Substrato}_{inicial} - \text{Concentração Substrato}_{final}} \quad \text{Equação (7)}$$

O rendimento produto/substrato foi determinado utilizando a seguinte expressão:

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Concentração Produto}_{final} - \text{Concentração Produto}_{inicial}}{\text{Concentração Substrato}_{inicial} - \text{Concentração Substrato}_{final}} \quad \text{Equação (8)}$$

O rendimento produto/biomassa foi determinado utilizando a seguinte expressão:

$$Y_{P/X} = \frac{\text{Concentração Produto}_{final} - \text{Concentração Produto}_{inicial}}{\text{Concentração Biomassa}_{final} - \text{Concentração Biomassa}_{inicial}} \quad \text{Equação (9)}$$

3.5.4. Produtividade Máxima

A produtividade máxima de etanol foi determinada nos tempos correspondentes às concentrações máximas de etanol utilizando a seguinte expressão:

$$P_{m\acute{a}x} = \frac{\text{Concentração de etanol}}{\text{tempo correspondente ao máximo de etanol}} \quad \text{Equação (10)}$$

4. Resultados e Discussão

4.1. Ensaio com variação das concentrações de Xilose e Glucose

Com o objetivo de estudar o efeito da concentração inicial de açúcares foram realizadas oito fermentações, nas quais se variaram as concentrações de xilose, entre 10, 20, 30 e 40 g/L e glucose, entre 0 e 5 g/L, fixando a concentração de ácido acético (4 g/L). O pH nestas fermentações foi aproximadamente 5,6, verificando-se uma tendência de subida, mas nunca ultrapassando o valor máximo de 5,8.

As figuras 4 e 5 apresentam os resultados dos ensaios 10-0-4 e 10-5-4, respectivamente.

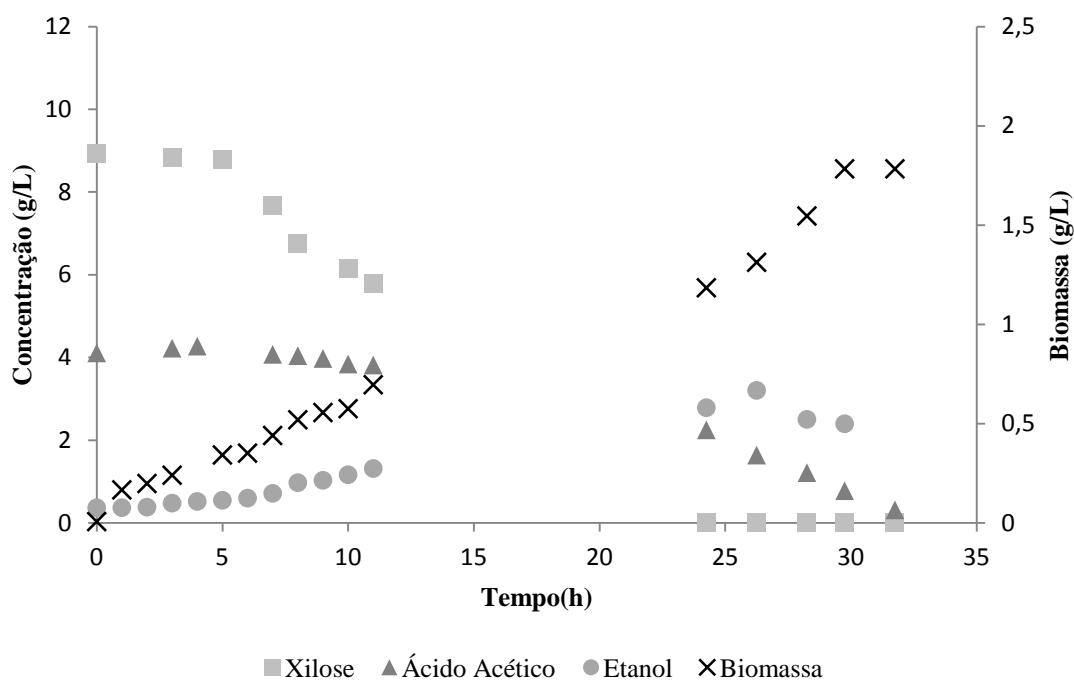


Figura 4 - Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 10-0-4.

No ensaio 10-0-4, representado na Figura 4, observou-se uma fase lag de 5 h. Após este período, a xilose começou a ser consumida e a sua exaustão deu-se antes das 25 h. Em simultâneo, observou-se o crescimento de *S. stipitis* e produção de etanol. Após a exaustão da xilose, o ácido acético começou a ser consumido, sobretudo para formação de biomassa, que atingiu o seu valor máximo de 1,7 g/L às 31,75 h. Neste período atingiu-se a concentração máxima de etanol (3,20 g/L) às 26,25 h. Após este tempo o etanol começou também a ser consumido provavelmente também para a formação de biomassa.

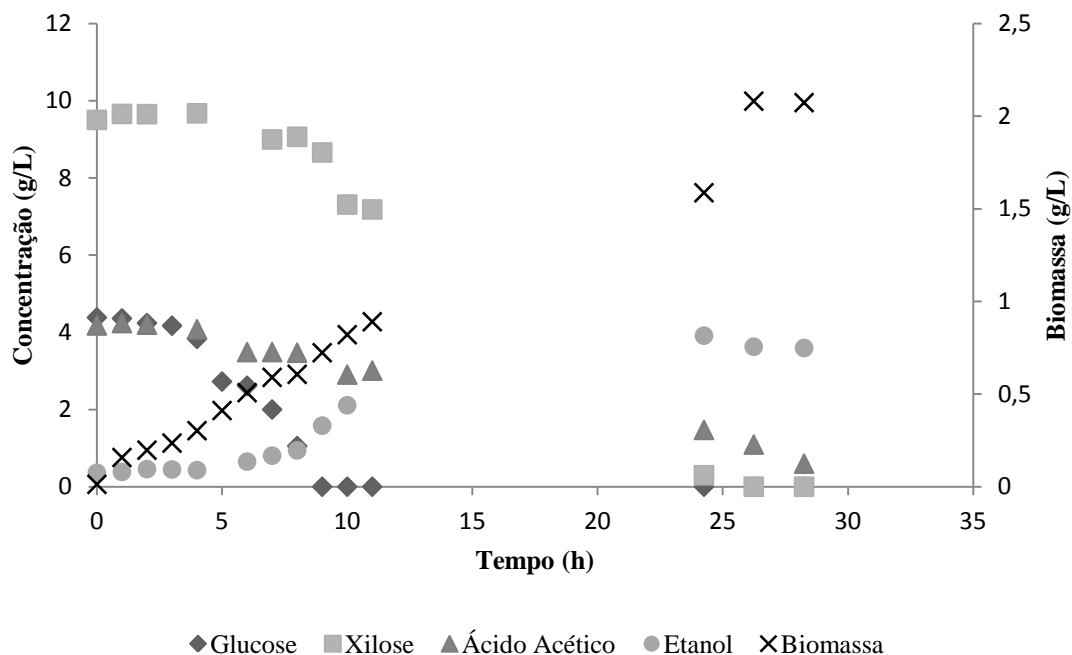


Figura 5 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 10-5-4.

Na Figura 5, referente ao ensaio 10-5-4, observou-se uma fase lag de 4 h. Neste ensaio o primeiro substrato a ser consumido foi a glucose, começando apenas a xilose a ser consumida quando a concentração de glucose era de 0,94 g/L. A exaustão da glucose deu-se antes das 10 h e a xilose perto das 26 h. O ácido acético tal como no ensaio 10-0-4, também foi consumido quando as concentrações dos açúcares estavam próximas de zero. Durante este período atingiu-se um máximo de biomassa de 2,08 g/L às 26,24 h. A $Etanol_{Máx}$ de 3,91 g/L atingiu-se às 24,25 h, verificando-se também aqui o seu consumo depois deste tempo.

As figuras 6 e 7 representam respectivamente os ensaios 20-0-4 e 20-5-4.

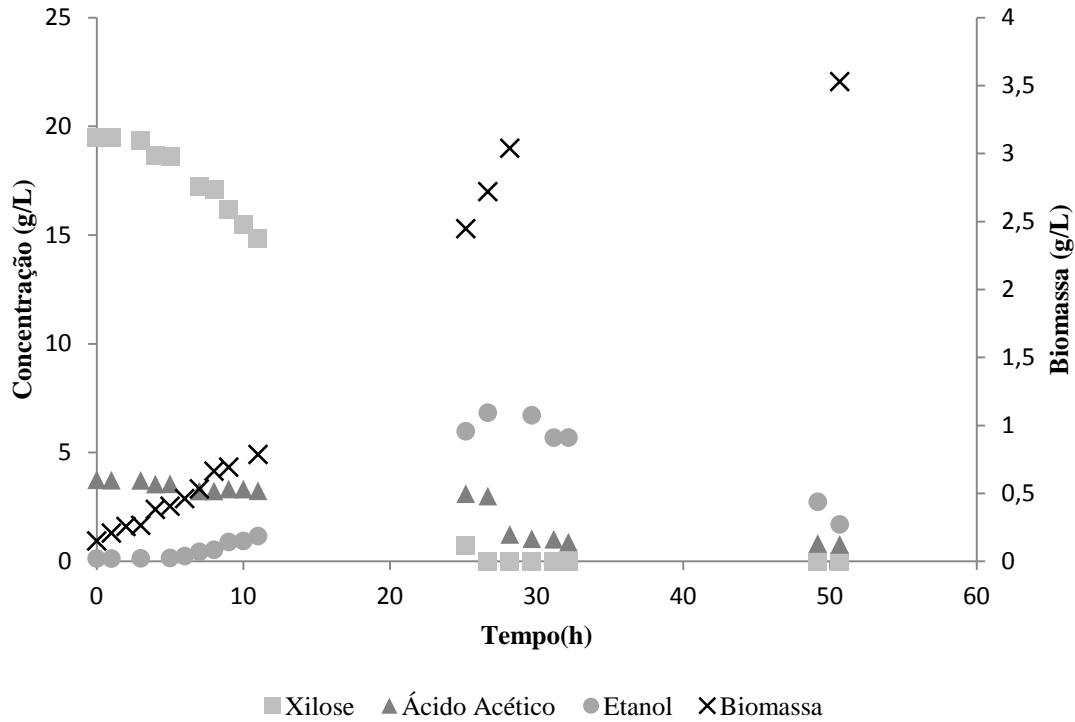


Figura 6 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 20-0-4.

No ensaio 20-0-4, Figura 6, observou-se uma fase lag de 5 h. Sendo a xilose o único açúcar no meio fermentativo foi o primeiro substrato a ser consumido depois deste período, começando, na mesma altura, a produção de etanol e o crescimento de *S. stipitis*. A exaustão da xilose deu-se perto das 25 h e de seguida, o ácido acético foi consumido. Durante este período, atingiu-se a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ de 6,83 g/L às 26,7 h, sendo consumido por *S. stipitis* após este tempo. A biomassa atingiu o seu valor de concentração máxima de 3,5 g/L às 50,7 h.

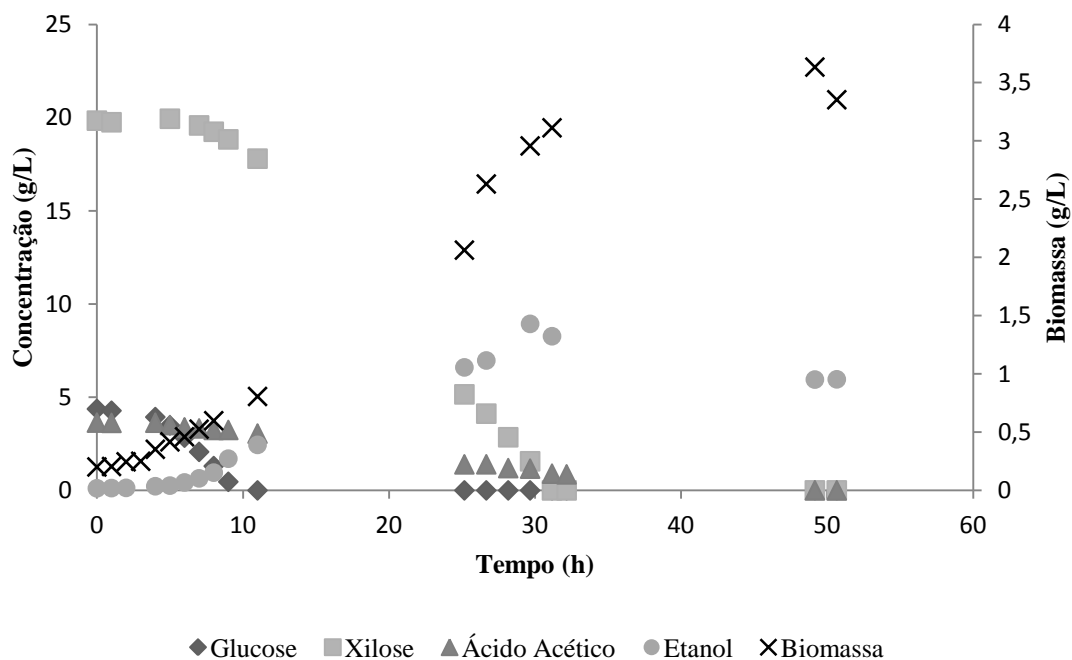


Figura 7 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 20-5-4.

Observando a Figura 7, alusiva ao ensaio 20-5-4, verificou-se uma fase lag de 3 h. Tal como no ensaio anterior com glucose (10-5-4), este foi o primeiro açúcar a ser consumido, seguindo-se a xilose após o esgotamento da glucose às 11 h. Acoplado a estes consumos observou-se a produção de etanol, que atingiu a sua concentração máxima (8,93 g/L) às 29,7 h. O ácido acético, como substrato carbonado, foi igualmente consumido após a exaustão da xilose depois das 30h. A concentração máxima de biomassa (3,6 g/L) atingiu-se às 49,17 h.

As figuras 8 e 9 apresentam o perfil de concentrações dos substratos, produto e biomassa ao longo do tempo para os ensaios 30-0-4 e 30-5-4, respetivamente.

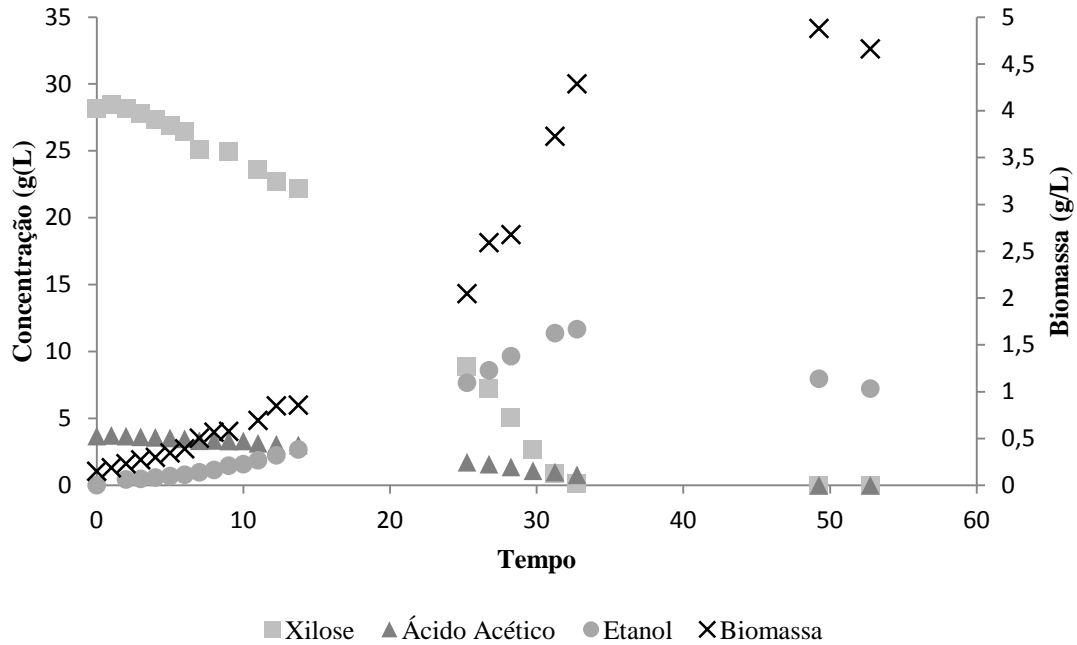


Figura 8 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-0-4.

No ensaio 30-0-4, representado na Figura 8, observou-se uma fase lag de 5 h. A xilose foi o primeiro substrato a ser consumido, seguindo-se o ácido acético, quando a concentração da xilose já era baixa, tendo-se esgotado perto das 32 h. Observou-se formação de biomassa, tendo-se atingido a concentração máxima de biomassa (4,87 g/L) às 49,25h. Durante este período, também houve produção de etanol, e a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (11,7 g/L) foi obtida às 32,75 h, havendo posteriormente uma diminuição da concentração do etanol produzido.

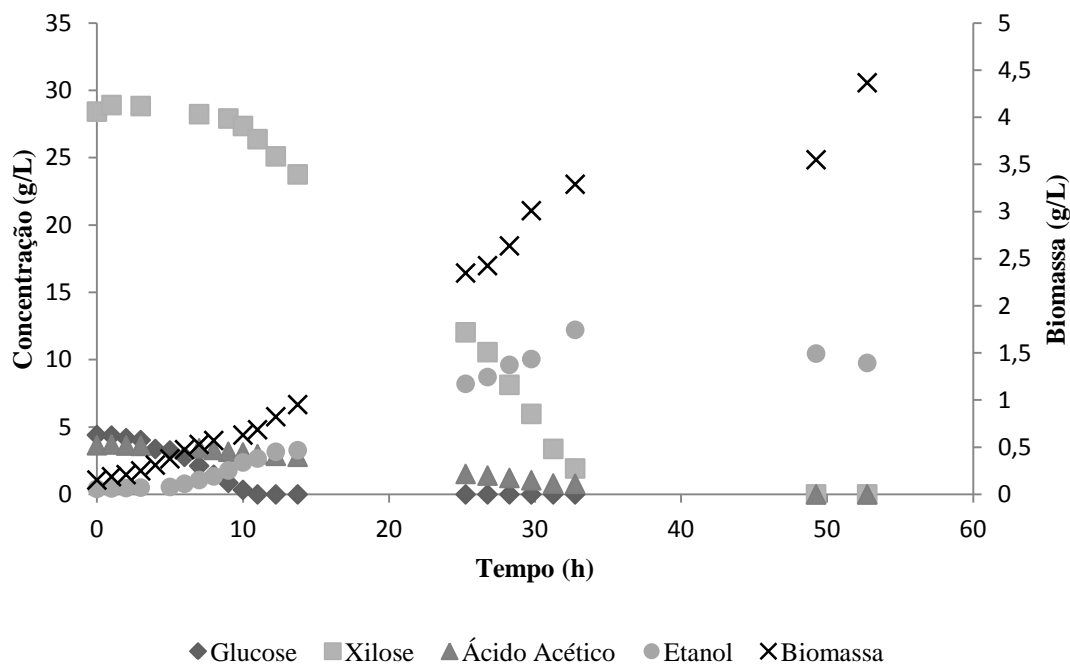


Figura 9 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-4.

Na Figura 9, relativa ao ensaio 30-5-4, foi visível uma fase lag de 3 h. Após este período a glucose foi consumida, esgotando-se às 11 h. Sucessivamente a levedura consumiu toda a xilose e o ácido acético, produzindo etanol e promovendo o seu crescimento. A concentração máxima de biomassa (4,37 g/L) atingiu-se às 52,75h. A Etanol_{Máx} (12,2 g/L) atingiu-se às 32,75 h, existindo depois disso um decréscimo de etanol devido ao seu consumo pela levedura.

As figuras 10 e 11 são correspondentes aos ensaios 40-0-4 e 40-5-4, respetivamente.

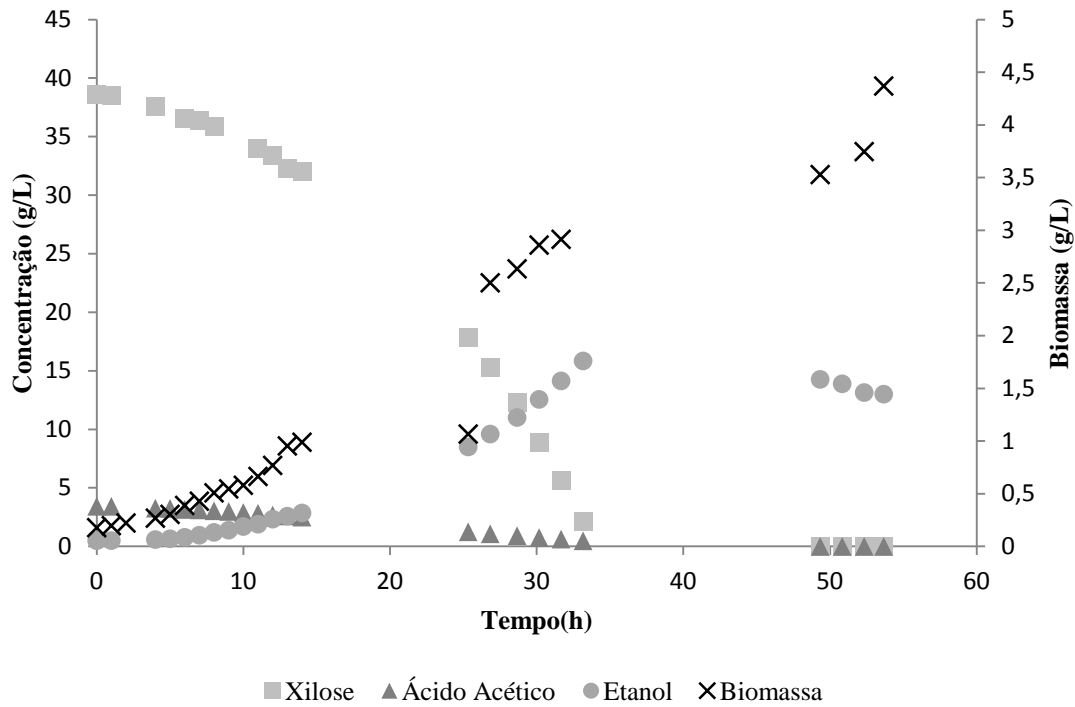


Figura 10 – Concentrações de xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 40-0-4.

No ensaio 40-0-4, Figura 10, observou-se uma fase lag de 5 h. Tal como nos ensaios sem glucose, acima referidos, a xilose foi o primeiro substrato a ser consumido, aumentando a concentração de biomassa e produzindo etanol. O ácido acético foi também consumido e esgotou-se em simultâneo com a xilose, cerca das 50 h. Às 33,2 h de fermentação obteve-se a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (15,3 g/L), verificando-se uma subsequente diminuição da concentração de etanol, tal como nos restantes ensaios, com formação de biomassa. Esta atingiu o seu máximo de concentração (4,37 g/L) às 53,6 h.

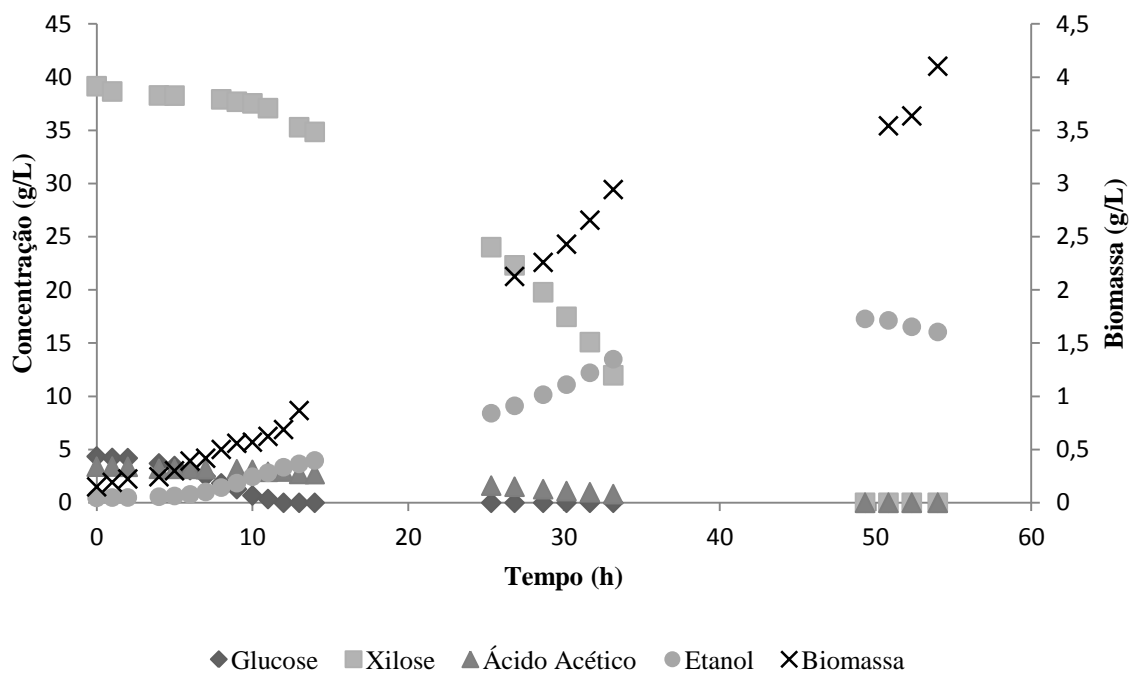


Figura 11 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 40-5-4.

Observando a Figura 11, referente ao ensaio 40-5-4, verificou-se que existiu uma fase lag de 3 h. A levedura consumiu primeiro a glucose até ao seu esgotamento às 13 h. De seguida consumiu a xilose, produzindo etanol para além de biomassa, que atingiu o seu máximo de concentração (4,10 g/L) às 54 h. O ácido acético foi também consumido chegando à exaustão antes das 35 h. A $Etanol_{Máx}$ (17,3 g/L) atingiu-se às 49,33 h, seguindo-se um consumo do etanol produzido, devido ao completo esgotamento dos substratos fornecidos.

Comparando os ensaios obtidos em que se variou a xilose e a glucose, verifica-se que em todos os ensaios com glucose (figuras 5, 7, 9 e 11), este substrato foi o primeiro a ser consumido pela *S. stipitis*, devido à repressão do consumo da xilose pela glucose. Panchal *et al.* (1988) reportaram que esta levedura requer que a concentração de glucose no meio seja menor que 2% para que se inicie uma utilização significativa da xilose.^[52] A xilose e o ácido acético também foram consumidos em simultâneo com a glucose mas a uma velocidade inferior à do consumo da glucose. A xilose começou a ser consumida mais rapidamente quando a glucose se esgotava ou estava próxima do fim.

Nos ensaios sem glucose, apenas com xilose e ácido acético (figuras 4, 6, 8 e 10), a xilose foi consumida mais rapidamente que nos ensaios na presença de glucose. O ácido acético também foi consumido em simultâneo com a xilose mas muito lentamente.

Na Tabela 9 encontram-se os parâmetros cinéticos e estequiométricos calculados para as diferentes fermentações: taxa específica de crescimento, concentração máxima de etanol, taxa

volumétrica de consumo de substrato e taxa volumétrica de produção de etanol, rendimento biomassa/substrato, rendimento produto/substrato, rendimento produto/biomassa e produtividade determinados no tempo correspondente à concentração máxima de etanol.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos nas experiências em que se variou a concentração inicial de açúcares.

Ensaio (Xilose-Glucose-Ácido Acético)	Taxa Específica de Crescimento μ (h^{-1})	$-r_s$ (g/L.h)	r_{etanol} (g/L.h)	$P_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	Etanol $_{\text{Máx}}$ (g/L)
10-0-4	$0,118 \pm 0,007$	0,434	0,108	0,122	0,115	0,249	2,17	3,20
10-5-4	$0,112 \pm 0,005$	0,672	0,147	0,161	0,097	0,218	2,26	3,91
20-0-4	$0,109 \pm 0,007$	0,833	0,251	0,256	0,116	0,302	2,61	6,83
20-5-4	$0,117 \pm 0,005$	0,847	0,297	0,301	0,110	0,351	3,20	8,94
30-0-4	$0,124 \pm 0,002$	0,944	0,345	0,356	0,134	0,365	2,73	11,7
30-5-4	$0,088 \pm 0,002$	1,03	0,360	0,373	0,093	0,350	3,76	12,2
40-0-4	$0,113 \pm 0,003$	1,19	0,463	0,477	0,085	0,390	4,58	15,8
40-5-4	$0,091 \pm 0,003$	0,951	0,341	0,350	0,072	0,359	4,96	17,3

Analisando a Tabela 9, verifica-se que as taxas específicas de crescimento não diferiram muito entre si, tendo-se obtido o valor mais elevado no ensaio 30-0-4 ($0,124 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$) e o valor mais baixo para o ensaio 30-5-4 ($0,088 \pm 0,002 \text{ h}^{-1}$). Para cada par de ensaios com concentração de xilose constante, com exceção dos ensaios com 20 g/L de xilose, todas as taxas específicas de crescimento (μ) foram mais baixas nos ensaios que continham glucose, isto deveu-se, provavelmente, ao facto da levedura ter como substrato xilose e glucose. Deste modo, a presença de glucose abrandou a taxa de consumo da xilose uma vez que o primeiro açúcar a ser consumido é a glucose. Kilian *et al.* (1988) reportaram que existem dois tipos de transporte de açúcares no metabolismo da *S. stipitis*: um de baixa e um de alta afinidade. A glucose e a xilose partilham um sistema de transporte de baixa afinidade e a glucose inibe o transporte da xilose por inibição não competitiva, no sistema de transporte de alta afinidade.^[53] Esta será a possível razão da taxa específica de crescimento para os ensaios com glucose ser menor.

A produção de etanol aumentou com a concentração de açúcares (xilose + glucose) como se pode comprovar pela concentração máxima de etanol atingida (17,3 g/L) no ensaio 40-5-4. Além disso, verificou-se que a produtividade máxima de etanol ($P_{\text{máx}}$) aumentou com a quantidade de xilose, atingindo o valor mais elevado no ensaio 40-0-4 (0,477 g/L.h). No entanto, no ensaio com maior concentração de açúcares (45 g/L) $P_{\text{máx}}$ teve um valor mais reduzido devido ao facto do tempo necessário para se atingir a concentração máxima de etanol

ser maior, cerca de 16 h. As taxas volumétricas de consumo de substrato ($-r_s$) e de produção de etanol (r_{etanol}), também seguiram esta tendência anteriormente descrita.

O rendimento biomassa/substrato ($Y_{X/S}$) foi sempre mais elevado nos ensaios sem glucose. Esta observação vai contra o que foi reportado por Agbogbo *et al.* (2006), que afirmaram que glucose era o açúcar de eleição de *S. stipitis* para o seu crescimento.^[42]

O rendimento produto/substrato ($Y_{P/S}$) elevou-se com o aumento da concentração da xilose, e o seu valor máximo foi obtido no ensaio 40-0-4 (0,390 g/g). À exceção dos ensaios com 20 g/L de xilose, o valor deste rendimento foi sempre mais elevado nas fermentações sem glucose. Também Agbogbo *et al.* (2006) reportaram que este rendimento era superior em fermentações apenas constituídas por xilose, visto a xilose ser o substrato preferido desta levedura para a produção de etanol.^[42] O rendimento produto/biomassa ($Y_{P/X}$) aumentou com a concentração de açúcares, pois a concentração de etanol e biomassa também aumentam com a concentração de substrato disponível para consumo.

O maior valor de concentração máxima de etanol ($\text{Etanol}_{\text{Máx}}$) foi obtido no ensaio 40-5-4 (17,3 g/L), e como esperado, esta aumentou com o aumento da concentração de açúcares no meio de fermentação. O ensaio com maior concentração de etanol não correspondeu ao ensaio no qual se verificou o maior valor de $Y_{P/S}$ e de $P_{\text{Máx}}$ (40-0-4). Comparando estes dois ensaios verificou-se que os valores de $-r_s$, de r_{etanol} , de $P_{\text{Máx}}$, de $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ do ensaio com maior quantidade de substrato, 40-5-4, foram inferiores aos do ensaio 40-0-4. Tal foi devido à diferença temporal na obtenção da $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ dos dois ensaios, cerca de 16 h. Esta diferença pode ser devida a uma maior concentração da fonte de carbono (49 g/L), que pode ter causado inibição. Silva *et al.* (2009) reportaram que com concentrações de xilose superiores a 47 g/L o metabolismo da levedura *S. stipitis* era inibido.^[47] Esta diferença não foi visível nos outros pares de ensaios.

4.2. Ensaios com variação da concentração de Ácido Acético

De modo a estudar a influência do ácido acético na produção do etanol foram realizados ensaios, nos quais apenas se variou a concentração de ácido entre 6, 8 e 10 g/L. A concentração de açúcares escolhida foi 30 g/L de xilose e 5 g/L de glucose, pois estas são as concentrações mais próximas das existentes no substrato final, o HSSL. O pH destes ensaios foi próximo de 6, observando-se uma ligeira subida no seu valor perto do final das fermentações, nunca ultrapassando o valor de 6,3.

As figuras 12, 13 e 14 mostram, respectivamente, as concentrações das fontes de carbono fornecidas, de etanol e de biomassa ao longo do tempo para os ensaios realizados com concentração de ácido acético superior a 4 g/L.

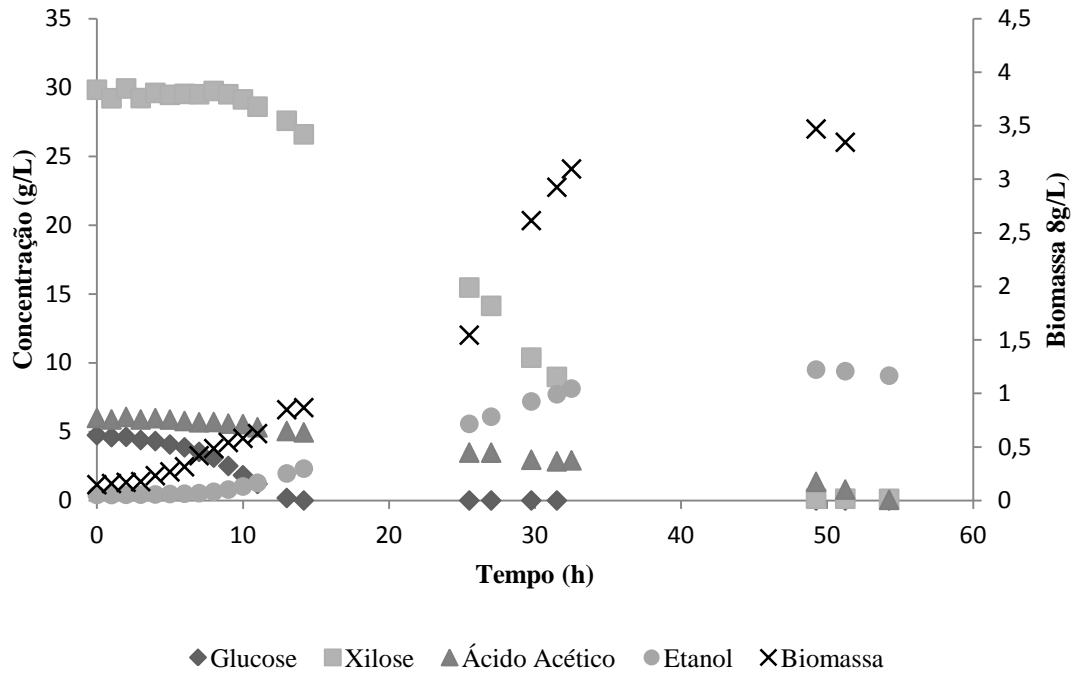


Figura 12 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-6.

Resultados e Discussão

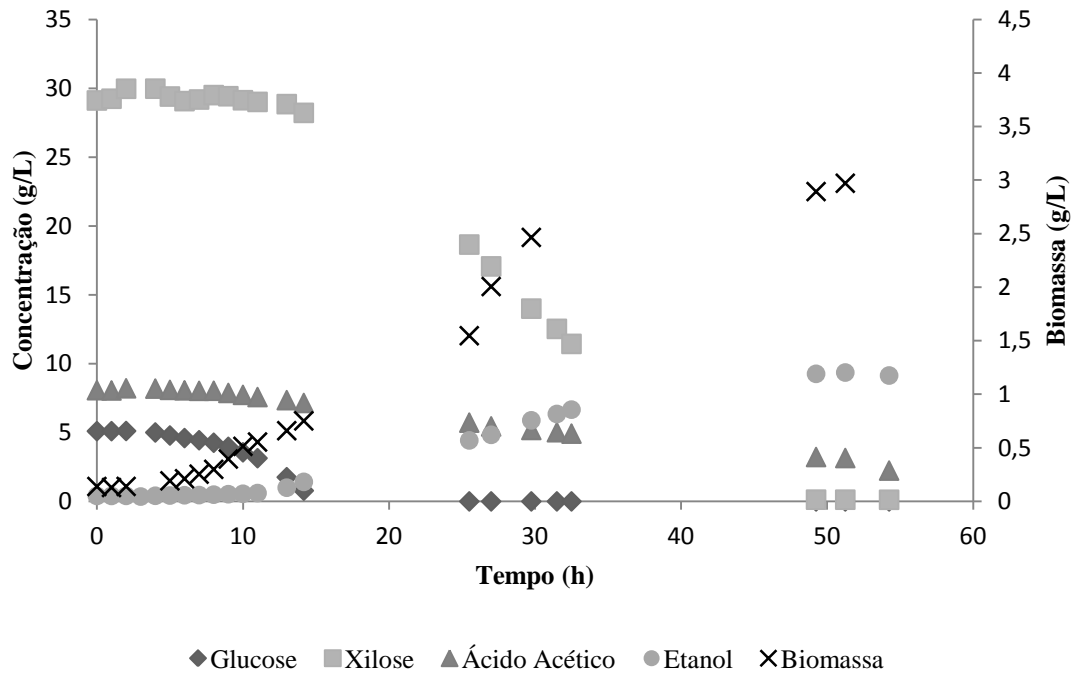


Figura 13 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-8.

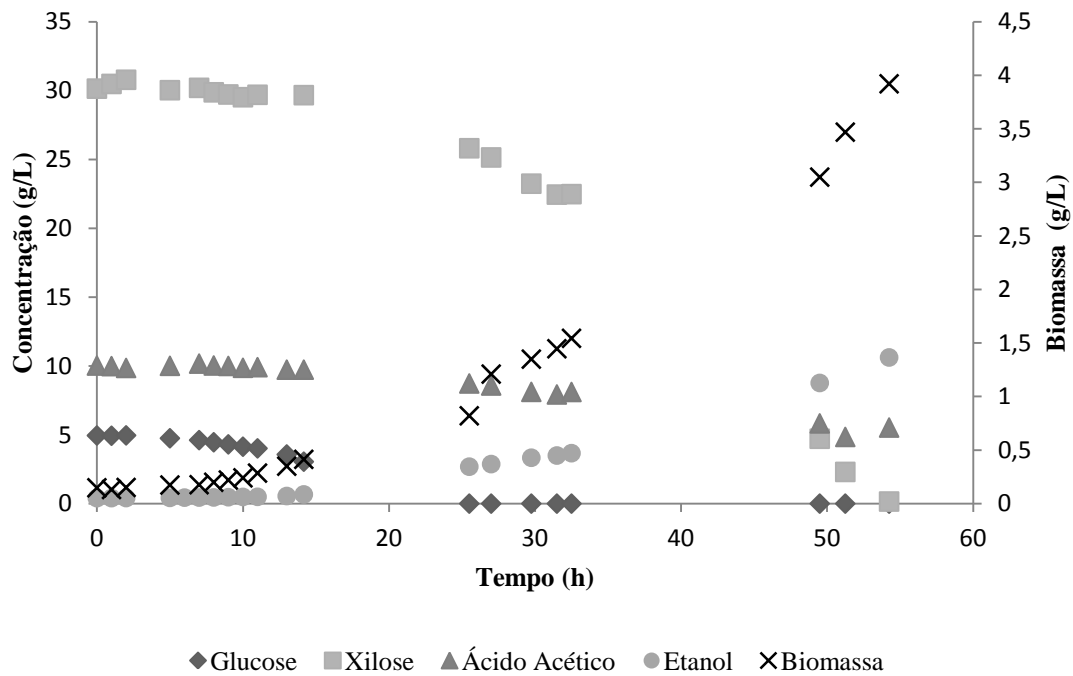


Figura 14 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 30-5-10.

Da observação das figuras 12, 13 e 14 e da sua comparação com a figura 8, verificou-se que o aumento da concentração de ácido acético no meio de fermentação aumentou a extensão da fase lag. Na Figura 12, correspondente ao ensaio 30-5-6, observou-se uma fase lag de aproximadamente 5 h e a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (9,5 g/L) foi atingida às 49,25 h. A concentração máxima de biomassa neste ensaio, 3,5 g/L, também foi atingida às 49,25 h. No ensaio 30-5-8, Figura 13, a fase lag teve uma duração aproximada de 10 h, tendo-se obtido a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (9,36 g/L) às 51,25 h, bem como a concentração máxima de biomassa (2,9 g/L). Na Figura 14 é visível que o ensaio 30-5-10 apresentou uma fase lag de cerca de 10 h e a $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (10,6 g/L) foi conseguida às 54,25 h. A esta mesma hora foi atingida a concentração máxima de biomassa (3,9 g/L).

Em todos estes ensaios a glucose foi o primeiro substrato a ser consumido, a xilose e o ácido acético também foram consumidos simultaneamente com a glucose mas muito lentamente. Também se observou em todos os ensaios que a xilose só apresentou um consumo mais rápido quando se esgotou a glucose. O ritmo de consumo do ácido acético também foi lento apenas se verificando uma aceleração quando a quantidade de xilose estava próxima de zero. Nos ensaios 30-5-8 e 30-5-10, apesar da elevada concentração de substrato carbonado disponível e em comparação com outros ensaios com quantidade similar, os substratos foram consumidos muito mais lentamente. Isto revelou que uma concentração de ácido acético acima das 6g/L, afetou negativamente o metabolismo da levedura, ou seja, houve inibição por este ácido a partir desta concentração.

Nigam (2000) reportou uma $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ de 11,2 g/L e um $Y_{P/S}$ de 0,30 g/g, utilizando 6,9 g/L de ácido acético num meio sintético com 45 g/L de xilose e 6,4 g/L de glucose. Estes valores estão próximos dos obtidos para o ensaio 30-5-10, uma vez que se obtiveram uma $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ de 10,6 g/L e um $Y_{P/S}$ de 0,259 g/g utilizando 10 g/L de ácido acético.^[22] O mesmo autor (2001) referiu que o aumento da concentração de ácido acético afeta negativamente o $Y_{P/S}$ e a $P_{\text{máx}}$, tal como aconteceu neste trabalho.^[34]

Resultados e Discussão

Na Tabela 10 encontram-se os parâmetros cinéticos e estequiométricos calculados para as diferentes fermentações: taxa volumétrica de consumo de substrato e taxa volumétrica de produção de etanol, rendimento biomassa/substrato, rendimento produto/substrato, rendimento produto/biomassa e produtividade determinados no tempo correspondente à concentração máxima de etanol.

Tabela 10 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para as experiências em que se variou a concentração de ácido acético.

Ensaio (Xilose-Glucose-Ácido Acético)	Taxa Específica de Crescimento μ (h ⁻¹)	$-r_S$ (g/L.h)	r_{etanol} (g/L.h)	$P_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Y_{P/X}$ (g/g)	Etanol _{Máx} (g/L)
30-5-4	0,088 ± 0,002	1,03	0,360	0,373	0,093	0,350	3,76	12,2
30-5-6	0,070 ± 0,0008	0,794	0,185	0,193	0,085	0,233	2,74	9,50
30-5-8	0,079 ± 0,001	0,791	0,180	0,188	0,070	0,228	3,22	9,36
30-5-10	0,043 ± 0,0009	0,727	0,188	0,196	0,084	0,259	3,08	10,6

Analisando os resultados apresentados na tabela 10, observou-se que um aumento na concentração de ácido acético, mantendo fixa a concentração dos açúcares, teve um efeito negativo na taxa específica de crescimento (μ), verificando-se uma queda acentuada deste parâmetro no ensaio com 10 g/L de ácido, $0,043 \pm 0,0009 \text{ h}^{-1}$. Isto indicou que o crescimento celular foi inibido pelo ácido acético a uma concentração de 10 g/L. Também Diaz *et al.* (2009) verificaram uma queda da taxa específica de crescimento quando a concentração de ácido acético aumentava.^[43]

A produção de etanol foi afetada negativamente por um aumento da concentração de ácido acético como se observou pelas concentrações máximas obtidas (Etanol_{Máx}), 9,50 g/L (30-5-6), 9,36 g/L (30-5-8) e 10,6 g/L (30-5-10) e consequentemente pelas produtividades máximas de etanol ($P_{\text{máx}}$), 0,193 g/L.h (30-5-6), 0,188 g/L.h (30-5-8) e 0,196 g/L.h (30-5-10). Contudo no ensaio 30-5-10 verificou-se uma subida destes parâmetros relativamente aos ensaios 30-5-6 e 30-5-8, mas que continuaram a ser inferiores aos observados para o ensaio 30-5-4, que apresentou uma Etanol_{Máx} de 12,2 g/L e uma $P_{\text{máx}}$ de 0,373 g/L.h. A taxa volumétrica de consumo de substrato ($-r_S$) diminuiu com o aumento da concentração de ácido acético. Isto está de acordo com o que foi descrito por Diaz *et al.* (2009), que referiram que a presença de inibidores torna a taxa de consumo de açúcares mais baixa.^[43] A taxa volumétrica de produção

de etanol (r_{etanol}) seguiu a tendência anteriormente descrita para a concentração máxima de etanol e produtividade. O mesmo se verificou com os rendimentos biomassa/substrato ($Y_{X/S}$), produto/substrato ($Y_{P/S}$). O rendimento produto/biomassa ($Y_{P/X}$) também decresceu nos ensaios 30-5-6, 30-5-8 e 30-5-10 face ao determinado no ensaio 30-5-4, mas não seguiram uma tendência de diminuição contínua com o aumento progressivo da concentração de ácido acético.

Nestes ensaios, a concentração de etanol mais elevada (12,2 g/L) observou-se no ensaio 30-5-4, bem como a maior produtividade máxima (0,373 g/L.h) e o rendimento produto/substrato mais elevado (0,350 g/g). Apesar de exercer um efeito negativo nos parâmetros observados, a concentração máxima de etanol obtida no ensaio com maior concentração de ácido acético, 30-5-10 (10,6 g/l), foi apenas 1,6 g/L menor, o que leva a crer que se a concentração de ácido acético não for muito elevada, a *S. stipitis* consegue utiliza-lo como substrato e produzir etanol. Díaz *et al.* (2009) observaram que quando determinados inibidores, entre eles o ácido acético, estão presentes em concentrações inferiores às inibitórias para o crescimento celular, até 6 g/L, podem mesmo exercer um efeito positivo nos rendimentos de etanol, se forem consumidos.^[43]

4.3. Ensaios com HSSL sintético e 60% HSSL

Com o objetivo principal de determinar a concentração ótima de ácido acético em fermentações com HSSL por *S. stipitis*, procedeu-se à realização de dois ensaios: um com 60% de HSSL e outro constituído por meio sintético que mimetizou as concentrações dos diferentes substratos no HSSL (ensaio 34-5-16). As concentrações de xilose (34g/L), glucose (5g/L) e ácido acético (16g/L) foram determinadas por HPLC, como anteriormente referido.

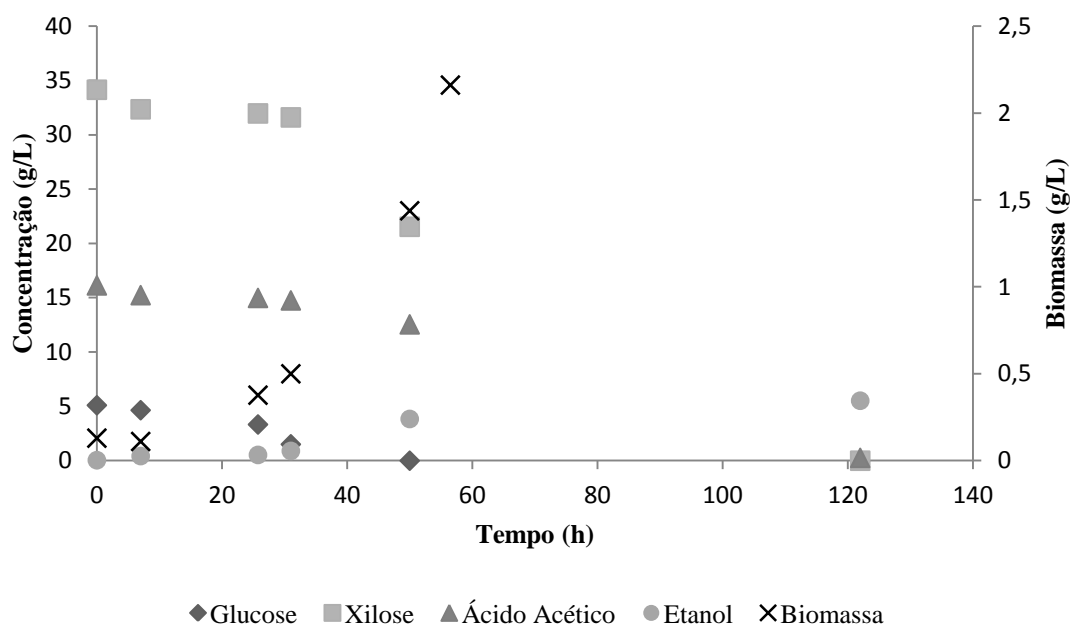


Figura 15 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo no ensaio 34-5-16.

A fase lag observada no ensaio 34-5-16 (Figura 15) durou cerca de 20 h. Observando a Figura 15 verificou-se que *S. stipitis* conseguiu consumir todos os substratos fornecidos e produzir etanol tendo-se obtido uma $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ de 5,52 g/L às 122 h.

A inexistência de valores de concentração de biomassa para o último ponto reside no facto de se ter observado um fenómeno de floculação da biomassa. Deste modo o método de densidade ótica usado para a análise de biomassa não pôde ser utilizado uma vez que a amostra não era homogénea. Ferrari *et al.* (1992) verificaram também este fenómeno num estudo com *S. stipitis* na produção de etanol utilizando hidrolisados de madeira de eucalipto.^[54] Guebel *et al.* (1994) estudaram o efeito dos iões Ca^{2+} e Mg^{2+} no crescimento e floculação da *S. stipitis*, e reportaram que esta apresenta diferentes padrões de agregação de acordo com a fonte de nitrogénio presente no meio de cultura.^[55] Os mesmos autores reportaram que os iões Ca^{2+} e Mg^{2+} têm um efeito negativo na floculação, que meios com baixo conteúdo em Mg^{2+} resultaram em floculação máxima e que o cálcio é um requisito específico para a floculação.^[55] Esta informação também foi reportada por Grootjen *et al.* (1991), que afirmaram que a adição de cálcio tem um efeito positivo na floculação da *S. stipitis*.^[56] Este autor também reportou que a concentração de açúcares fermentáveis pode influenciar as capacidades de floculação da levedura e que a formação de microfocos pode ser causada por uma incompleta divisão das células, o que pode originar complexos celulares longos e ramificados, e também por interações de parede-parede das diferentes células.^[56]

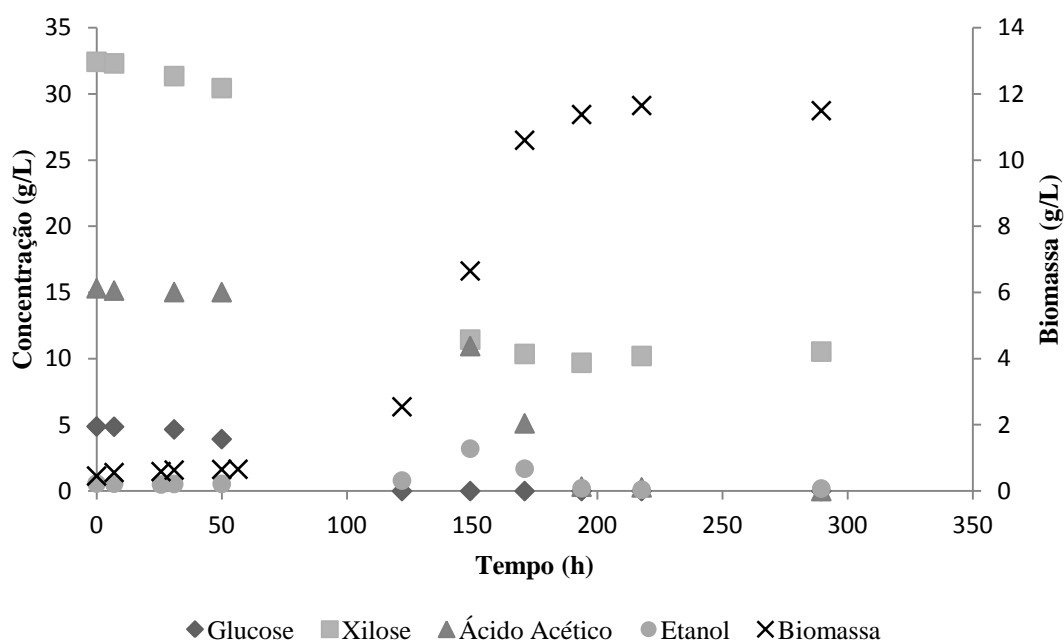


Figura 16 – Concentrações de glucose, xilose, ácido acético, etanol e biomassa ao longo do tempo para o ensaio 60% HSSL.

No ensaio 60% HSSL cujos resultados se apresentam na Figura 16, observou-se uma fase lag aproximada de 40 h. É visível que a *S. stipitis* conseguiu consumir os substratos disponíveis, crescer e produzir etanol num meio fermentativo com 60% de HSSL não desintoxicado. Alcançou-se uma $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ de 3,21 g/L às 149,5 h. Foi neste ensaio que se atingiu a maior concentração de biomassa, 11,65 g/L às 217,75 h. Contudo é de salientar que o HSSL foi diluído em meio *Verduyn* e deste modo compensado com açúcares sintéticos, o que pode ter influenciado o consumo dos substratos e a produção de etanol pela levedura. Xavier *et al.* (2010) também realizaram fermentações de HSSL a diferentes diluições utilizando a *S. stipitis*, tendo verificado que para uma diluição de 60% de HSSL num meio apenas com sais minerais e nutrientes, não houve qualquer produção de etanol e o consumo de açúcares foi muito baixo.^[5] Tal situação leva a crer que o crescimento da levedura e a produção de etanol poderão ter sido potenciados pela existência de substratos sintéticos. Como já anteriormente referido, também Nigam (2001) realizou um estudo no qual comparou fermentações com HSSL não desintoxicado, desintoxicado e HSSL sintético, utilizando uma estirpe original da *S. stipitis* e uma adaptada, tendo observado uma concentração máxima de etanol de 1,2 g/L e um $Y_{P/S}$ de 0,16 g/g na fermentação de HSSL não tratado com a *S. stipitis* original.^[34] No ensaio 60% HSSL deste trabalho, a concentração de etanol obtida foi superior, mas o $Y_{P/S}$ foi inferior.

Nos dois ensaios o pH teve comportamentos distintos. O pH do ensaio 34-5-16 foi sempre próximo do valor de 5,8. No ensaio 60% HSSL, o pH foi aproximadamente 6,

verificando-se uma subida deste valor no final da fermentação, tendo-se atingido um pH de 8,35 no final do ensaio. Este facto deve-se certamente à existência de reações paralelas que podem ocorrer quando se trabalha não com meios definidos mas com HSSLs reais.

Na Tabela 11 encontram-se os parâmetros cinéticos e estequiométricos calculados para as diferentes fermentações: taxa volumétrica de consumo de substrato e taxa volumétrica de produção de etanol, rendimento produto/substrato e produtividade determinados no tempo correspondente à concentração máxima de etanol.

Tabela 11 – Parâmetros cinéticos e estequiométricos para os ensaios com HSSL sintético e 60% HSSL.

Ensaio (Xilose-Glucose-Ácido Acético)	$-r_s$ (g/L.h)	r_{etanol} (g/L.h)	$P_{\text{máx}}$ (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ (g/L)
34-5-16	0,452	0,0449	0,0453	0,099	5,52
60% HSSL	0,203	0,0177	0,0215	0,087	3,21

Analisando a Tabela 11, verificou-se claramente que no ensaio com HSSL ocorreu forte inibição no metabolismo de *S. stipitis*, tendo-se observado que a $-r_s$ decresceu para cerca de metade, 0,203 g/L.h, quando se utilizou o HSSL (60%). A $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ também diminuiu, 3,21 g/L, bem como a r_{etanol} , 0,0177 g/L.h e a $P_{\text{máx}}$, 0,0215 g/L.h, obtidas. Os valores dos $Y_{P/S}$ foram próximos, 0,099 g/g (34-5-16) e 0,087 g/g (60% HSSL), mas mais uma vez para o ensaio 60% HSSL o valor decresce.

Comparando os resultados obtidos nestes 2 últimos ensaios com os anteriormente reportados na secção 4.2, verificou-se uma acentuada diminuição nos valores da r_{etanol} e na $P_{\text{máx}}$. Os ensaios 34-5-16 e 60% HSSL foram os que apresentam a maior concentração total de substrato, cerca de 55 g/L, contudo a $-r_s$ foi aproximada à obtida em ensaios com 14 g/L de substrato e até menor, no caso do ensaio 60% HSSL. A $\text{Etanol}_{\text{Máx}}$ obtida para o ensaio 60% HSSL, foi similar à obtida no ensaio 10-0-4 (3,20 g/L). No caso do ensaio 34-5-16 esta situação deveu-se à elevada concentração de ácido acético, no ensaio com 60% HSSL para além da elevada concentração de ácido acético (16 g/L), ainda devem existir outros inibidores como os lenhosulfonatos e compostos fenólicos. Pereira *et al.* (2011) procederam a uma desintoxicação biológica de HSSL utilizando do fungo *Paecilomyces variotti*, tendo conseguido remover com sucesso compostos inibidores como o ácido acético.^[24] Como já referido anteriormente, os mesmos autores utilizaram o HSSL desintoxicado numa fermentação com a *S. stipitis* tendo atingido uma concentração máxima de etanol de 2,4 g/L.^[24] É de salientar que o HSSL utilizado no presente trabalho não teve qualquer tipo de pré-tratamento de desintoxicação. Verifica-se

portanto que a *S. stipitisi* consegue fermentar o HSSL não desintoxicado, mas aconselha-se a sua desintoxicação para obtenção de melhores resultados.

Tran *et al.* (1985) reportaram uma concentração de etanol de 5,4 g/L, numa fermentação em meio sintético com cerca de 12 g/L de ácido acético e 50 g/L de xilose.^[32] Uma concentração similar foi obtida no ensaio 34-5-16, utilizando uma maior concentração de ácido acético e menor concentração de xilose. Como já referido anteriormente, Nigam (2001) estudou o efeito da concentração do ácido acético na produção de etanol e verificou que uma concentração deste composto no meio fermentativo, acima das 9,5 g/L, diminui drasticamente o $Y_{P/S}$ e a $P_{máx}$.^[34]

A Figura 17 relaciona a concentração de ácido acético com a duração da fase lag observada.

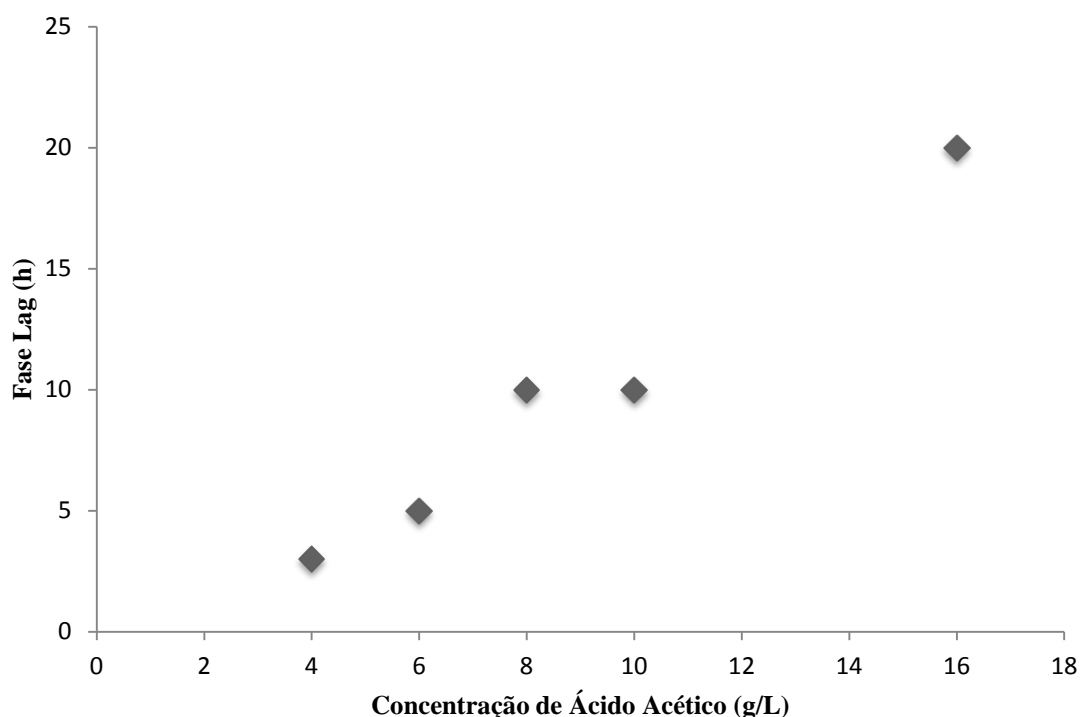


Figura 17 – Duração da fase lag em função da concentração de ácido acético.

Da observação da Figura 17, verificou-se que de modo geral, à medida que a concentração de ácido acético aumentou, a fase lag também aumentou. Quando a concentração de ácido acético aumentou de 8 para 10 g/L a duração da fase lag manteve-se nas 10 h. Mas quando a concentração de ácido acético aumentou das 10 para as 16 g/L, a duração da fase lag aumentou para o dobro, 20 h. Scordia *et al.* (2011) concluíram que um aumento da concentração de ácido acético resulta numa longa fase lag e numa inibição do crescimento celular, bem como um decréscimo considerável do consumo de xilose.^[31] Analisando todos os resultados de todos

Resultados e Discussão

os ensaios realizados, é de crer que a concentração máxima de ácido acético no HSSL não deve ser superior a 6 g/L, idealmente, 4 g/L, para se obter uma boa produção de etanol.

Num trabalho paralelo ao do projeto descrito nesta dissertação, foi estudada a desintoxicação do HSSL utilizando o fungo *P. variotti*. O pré-tratamento permitiu reduzir a concentração de ácido acético para cerca de 6 g/L, que já seria uma concentração aceitável de ácido acético para a produção de etanol utilizando a *S. stipitis*.

5. Conclusões

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da concentração da fonte de carbono na produção de bioetanol pela levedura *S. stipitis*. Para tal realizaram-se fermentações em meios definidos com diferentes concentrações de açúcares, xilose e glucose, e de ácido acético. Realizou-se ainda um ensaio de comparação com 60 % HSSL.

Dos ensaios efetuados com variação das concentrações de xilose e glucose, conclui-se que quanto maior a concentração de xilose, dentro da gama de concentrações estudadas, melhor a produção de etanol. Com uma concentração de xilose de 40 g/L, atingiu-se uma concentração de etanol de 17,3 g/L, com uma produtividade de 0,477 g/L.h e um rendimento produto/substrato de 0,39 g/g, cerca de 76,5 % do rendimento teórico. Verificou-se também que à medida que se aumenta a concentração de açúcares disponíveis, a concentração máxima de etanol tende a ser atingida com mais tempo. As taxas específicas de crescimento mais elevadas foram obtidas nos ensaios sem glucose. As taxas volumétricas de consumo de substrato e de produção de etanol aumentam com a concentração de xilose. O mesmo aconteceu para o rendimento biomassa/substrato, produto/substrato e produto/biomassa. A concentração final de biomassa aumentou com a soma das concentrações de todas as fontes de carbono.

Dos ensaios em que se variou a concentração de ácido acético e da fermentação com 60% HSSL, conclui-se que o ácido acético tem um efeito negativo na duração da fase lag observada e no metabolismo da levedura, causando uma diminuição em todos os parâmetros estudados. O aumento da concentração de ácido acético fez decrescer a taxa específica de crescimento, as taxas volumétricas de consumo de substrato e de produção de etanol, as produtividades máximas de etanol e todos os rendimentos estudados. Porém, verificou-se que se a concentração de ácido acético não for elevada o suficiente para causar total inibição do mecanismo da *S. stipitis*, a levedura consegue utilizá-lo como substrato e produzir etanol. Acima das 10g/L, o ácido acético provocou uma queda acentuada da produtividade máxima, do rendimento produto/substrato e da concentração máxima de etanol, mas abaixo deste valor parece ser possível que a levedura o consuma como substrato carbonado e consiga produzir etanol. Apesar da *S. stipitis* ter conseguido crescer no ensaio com HSSL não tratado, este estudo permitiu verificar que a fermentação direta de HSSL não desintoxicado não apresentou resultados satisfatórios para a produção de etanol, aconselhando-se a sua desintoxicação até se obter pelo menos uma concentração de ácido acético inferior a 6 g/L, idealmente de 4g/L.

6. Proposta de trabalho futuro

Como proposta de trabalho futuro propõe-se o estudo de algumas fermentações realizadas mas em biorreator, nomeadamente as que apresentam melhores resultados e que se assemelhem em concentrações de substrato às existentes no licor desintoxicado, 30-5-4, 30-5-6 e até 30-5-8 e com HSSL desintoxicado. Deste modo conseguir-se-ia um melhor controlo do arejamento, melhorando assim a transferência de oxigénio e conseqüentemente as capacidades fermentativas e de produção de etanol da *S. stipitis*.

7. Bibliografia

1. Silva, N. L. C., Betancur, G.J.V., Vasquez, M.P., Gomes, E.B. e Pereira Jr., N., Ethanol Production from Residual Wood Chips of Cellulose Industry: Acid Pretreatment Investigation, and Remaining Solid Fraction Fermentation by SSF Process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, 928-936.
2. Zhang, Y. H. P., Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2008**, 35, 367-375.
3. Demirbas, A., Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science* **2006**, 33, 1-18.
4. Office of Energy Efficiency, T. a. R. D. *Biofuels for Transport: An International Perspective*. 2004; p 33-49.
5. Xavier, A. M. R. B., Correia, M.F., Pereira, S.R., and Evtuguin, D.V., Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. *Bioresource Technology* **2010**, 101, 2755-2761.
6. Unrean, P. a. N., N.H.A., Metabolic pathway analysis of *Scheffersomyces (Pichia) Stipitis*: effect of oxygen availability on ethanol synthesis and flux distributions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, 94, 1387-1398.
7. Chen, H. a. Q., W., Key Technologies for bioethanol production from lignocellulose. *Biotechnology Advances* **2010**, 28, 556-562.
8. Mussato, S. I., Gragone, G., Guimarães, P.M.R., Silva, J.P.A., Carneiro, L.M., Roberto, I.C., Vicente, A., Domingues, L., Teixeira, J.A., Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. *Biotechnology Advances* **2010**, 28, 817-830.
9. <http://www.evscroll.com/images/ethanol-production-global.gif> (consultado em Maio 2013).
10. Demrbas, A., Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects* **2003**, 27:4, 327-337.
11. Sanchez, O. J. a. C., C.A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology* **2007**, 99, 5270-5295.
12. Daroch, M., Geng, S. and Wanga, G., Recent advances in liquid biofuel production from algal feedstocks. *Applied Energy* **2013**, 102, 1371-1381.
13. Lam, M. K. a. L., K.T., Microalgae biofuels: A critical review of issues, problems and the way forward. *Biotechnology Advances* **2011**, 30, 673-690.
14. Fernandes, D. L. A., Pereira, S.R., Serafim, L.S., Evtuguin, D.V., Xavier, A.M.R.B. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. In *Bioethanol*, Natalense, M. A. P. L. e. A. P. P., Ed. InTech: 2012; p 123-152.
15. Sjostrom, E. *WOOD CHEMISTRY Fundamentals and Applications*. Second ed.; ACADEMIC PRESS: Finland, 1993; p 6-12; 54-89; 132-164.

Bibliografia

16. Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L. , Fuel Ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2001**, *56*, 17-34.
17. Ek, M., Gellerstedt, G. e Henriksson, G. *Pulp and Paper Chemistry and Technology - Wood Chemistry and Wood Biotechnology*. de Gruyter: Sweden, 2009; Vol. 1, p 72-98; 102-119; 121-144.
18. Katzen, R., Madson, P.W., Monceaux, D.A. and Bevernitz, K. Lignocellulosic feedstock for ethanol production: the ultimate renewable energy source. In *The Alcohol Textbook*, Third ed.; Press, N. U., Ed. 1999; p 107-116.
19. Mussato, S. I., Roberto, I.C., Alternativer for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative process: a review. *Bioresource Technology* **2004**, *93*, 1-10.
20. Pereira, S. R., Portugal-Nunes, D.J., Evtuguin, D.V., Serafim, L.S., Xavier, A.M.R.B., Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry* **2012**, *48*, 272-282.
21. Palmqvist, E., Hagerdal-Hahn, B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* **1999**, *74*, 25-33.
22. Nigam, J. N., Ethanol production from wheat straw hemicellulase hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Journal of Biotechnology* **2000**, *87*, 17-27.
23. Fernandes, D. L. A., Silva, C.M., Xavier, A.M.R.B., Evtuguin, D.V., Fractionation of sulphite spent liquor for biochemical processing using ion exchange resins. *Journal of Biotechnology* **2012**, *162*, 415-421.
24. Pereira, S. R., Ivanusa, S., Evtuguin, D.V., Serafim, L.S., Xavier, A.M.R.B., Biological treatment of eucalypt spent sulphite liquors: A way to boost the production of second generation bioethanol. *Bioresource Technology* **2011**, *103*, 131-135.
25. Kim, S. R., Lee, K., Kong, I.I., Lesmana, A., Lee, W., Seo, J., Kweon, D. e Jin, Y., Construction of an efficient xylose-fermenting deploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation. *Journal of Biotechnology* **2013**, *164*, 105-111.
26. Huang, C.-F., Lin, T.-H., Guo, G.-L. e Hwang, W.-S., Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. *Biosource Tecnology* **2009**, *100*, 3914-3920.
27. Jeffries, T. W., Engineering yeasts for xylose metabolism. *Biotechnology* **2006**, *17*, 320-326.
28. Agbogbo, F. K. a. C.-K., G., Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. *Biotechnology Letters* **2008**, *30*, 1515-1524.
29. Nian-Qing Sgi, D., B., Sherman, F., Cruz, J. and Jeffries, T.H., Disruption of the Cytochrome *c* Gene in Xylose-utilizing Yeats *Pichia Stipitis* Leads to Higher Ethanol Production. *Yeast* **1999**, *15*, 1021-1030.
30. Lin, T., Huang, C., Guo, L., Hwang, W. and Huang, S., Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia Stipitis*. *Bioresource Technology* **2012**, *116*, 314-319.

31. Scordia, D., Cosentino, S.L., Lee, J. and Jeffries T.W, Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Sheffersomyces stipitis* CBS6054. *Biomass and Bioenergy* **2012**, 39, 296-305.
32. Tran, A. V., Chambers, R.P., Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia Stipitis* CBS 5776. *Biotechnology Letters* **1985**, 7 (11), 641-846.
33. Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N.Q. and Hahn-Hagerdal, B., Main and Interaction Effects of Acetic Acid, Furfural, and pHydroxybenzoic Acid on Growth and Ethanol Productivity of Yeasts. *Biotechnology and Bioengineering* **1998**, 63 (1), 46-55.
34. Nigam, J. N., Ethanol production from hardwood spent sulfite liquor using an adapted strain of *Pichia Stipitis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **2001**, 26, 145-150.
35. Slininger, P. J., Thompson, S.R., Weber. S., Liu Z.L. and Moon., J., Repression of Xylose-Specific Enzymes by Ethanol in *Sheffersomyces* (*Pichia*) *stipitis* and Utility of Repitching Xylose-Grown Populations to Eliminate Diauxic Lag. *Biotechnology and Bioengineering* **2011**, 108 (8), 1801-1815.
36. Kumari, R. a. P., K., Improved Bioethanol Production Using Fusants of *Saccharomyces cerevisiae* and Xylose-Fermenting Yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, 167, 873-884.
37. Bajwa, P. K., Shireen, T., D'Aoust, F., Pinel, D., Martin, V.J.J., Trevors, J.T. and Lee, H., Mutants of the Pentose-Fermenting Yeast *Pichia stipitis* With Improved Tolerance to Inhibitors in Hardwood Spent Sulfite Liquor. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, 104, 892-900.
38. Waites, M. J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Higton, G. *Industrial Microbiology: An Introduction*. First ed.; 2001; p 46-72.
39. Brock, T. D., Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., e Clark, D.P. *Biology of Microorganisms*. Thirteenth ed.; 2012; p 85-108.
40. Gray, K. A., Zhao, L. and Emptage, M., Bioethanol. *Chemical Biology* **2006**, 10, 141-146.
41. Chandrakant, P. a. B., V.S., Simultaneous Bioconversion of Cellulose and Hemicellulose to Ethanol. *Critical Reviews in Biotechnology* **1998**, 18:4, 295-331.
42. Agbogbo, F. K., Coward-Kelly, G., Torry-Smith, M. and Wenger, K.S., Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochemistry* **2006**, 41, 2333-2336.
43. Díaz, M. J., Ruiz, E., Romero, I., Cara, C., Moya, M., Castro, E. , Inhibition of *Pichia stipitis* fermentation of hydrolysates from olive tree cuttings. *World Journal of Microbiololy and Biotechnology* **2009**, 25, 891-899.
44. Silva, J. P. A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C. and Teixeira, J.A., Ethanol Production from Xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a Stirred Tank Bioreactor. *Brazilian Journal of Chemical Engineering* **2011**, 28 (1), 151-156.
45. Bari I., D. C., P., Cuna, D. Liuzzi, F., Capece, A. e Romano, P., Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. *New Biotechnology* **2013**, 00, 1-7.

Bibliografia

46. Unrean, P. a. N., N.H.A., Optimized Fed-Batch Fermentation of *Scheffersomyces stipitis* for Efficient Production of Ethanol from Hexoses and Pentoses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2013**, *169*, 1895-1909.
47. Silva, J. P. A., Mussatto, S.I., Roberto, I.C., The Influence of Initial Xylose Concentration, Agitation, and Aeration on Ethanol Production by *Pichia stipitis* from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2009**, *162*, 1306-1315.
48. Pareck, S. r., Wayman, M. , Fermentation of xylose and cellobiose by *Pichia stipitis* and *Brettanomyces clausenii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **1988**, *18*, 325-338.
49. Nigam, J. N., Development of xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate. *Journal of Applied Microbiology* **2000**, *90*, 208-215.
50. Agbogbo, F. K., Haagensen, F.D., Milam, D., Wenger, K.S., Fermentation of acid pretreated corn stover to ethanol without detoxification using *P. stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2007**, *145*, 53-58.
51. Moninuzzaman, M., Alcohol fermentation of enzymatic hydrolysate of exploded rice straw by *Pichia stipitis*. *World Journal of Microbiololy and Biotechnology* **1995**, *11*, 646-648.
52. Panchal, C. J., Bats, L., Russell, I. e Stewart G.G., Repression of xylose utilization by glucose in xylose-fermentating yeasts. *Canadian Journal of Microbiology* **1988**, *34*, 1316-1320.
53. Kilian, S. G., e van Uden, N., Transport of xylose and glucose in the xylose fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **1988**, *27*, 545-548.
54. Ferrari, M. D., Neirotti, E., Alborno, C. e Saucedo, E., Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Biotechnology and Bioengineering* **1992**, *40* (7), 753-759.
55. Guebel, D. V., e Nudel, C. B., Antagonism between growth and flocculation in *Pichia stipitis* NRRL Y-7124: Influence of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. *Biotechnology Letters* **1994**, *16*, 143-148.
56. Grootjen, D. R. J., Vleesenbeek, R., Windmeijer, M. G. A., van der Lans, R. G. J. M. e Luyben, K. Ch. A., A flocculating strain of *Pichia stipitis* for the conversion of glucose/xylose mixtures. *Enzyme and Microbial Technology* **1991**, *13*, 734-739.

8. ANEXOS

8.1. ANEXO 1- Volumes de soluções de Xilose, Glucose e Acetato de Sódio

Tabela 12 – Volumes das soluções de xilose, glucose e acetato de sódio utilizadas nos ensaios biológicos de produção de etanol.

Ensaio	Xilose (100g/L) mL	Glucose (62,5 g/L) mL	Acetato de Sódio (50 g/L) mL
10-0-4	25	-	20
10-5-4	25	20	20
20-0-4	50	-	20
20-5-4	50	20	20
30-0-4	75	-	20
30-5-4	75	20	20
40-0-4	100	-	20
40-5-4	100	20	20
30-5-6	75	20	30
30-5-8	75	20	40
30-5-10	75	20	50
34-5-16	76,5	18	72
60% HSSL	30,6	7,2	28,8

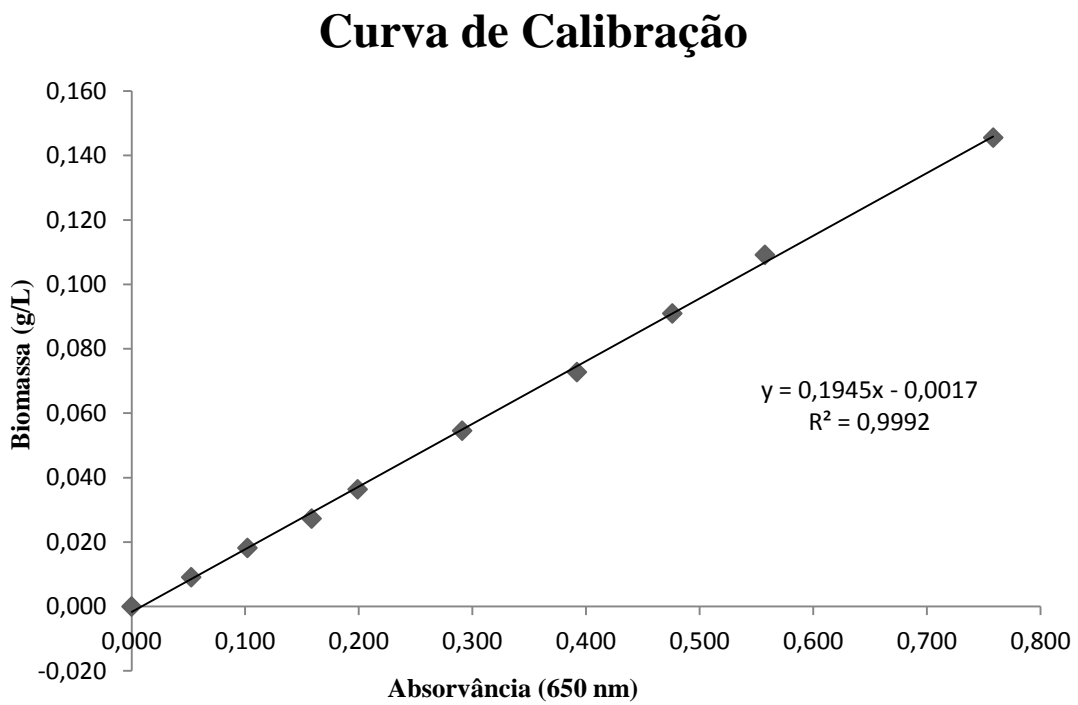
8.2. ANEXO 2 - Curva de Calibração da Biomassa

Figura 18 – Curva de Calibração obtida entre o peso seco e a absorvância a 650 nm para a *S. stipitis*.