

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE**  
**PROCESSOS E TECNOLOGIAS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL E**  
**XILITOL A PARTIR DE XILOSE POR MACROMICETOS**

**Silvana Rissi**

Caxias do Sul, 2016.

R596a Rissi, Silvana

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL E  
XILITOL A PARTIR DE XILOSE POR MACROMICETOS / Silvana Rissi.

- 2016.

62 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, 2016.

Orientação: Marli Camassola.

Coorientação: Aldo José Pinheiro Dillon.

1. Biomassa lignocelulósica macromicetos etanol xilitol. I. Camassola,  
Marli, orient. II. Dillon, Aldo José Pinheiro, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UCS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**Silvana Rissi**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL E  
XILITOL A PARTIR DE XILOSE POR MACROMICETOS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de mestre em Engenharia de Processos, orientado por Dra. Marli Camassola e coorientado por Dr. Aldo J. P. Dillon.

Caxias do Sul, 2016.

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE PRODUÇÃO DE ETANOL E XILITOL A PARTIR DE XILOSE POR MACROMICETOS.”**

**Silvana Rissi**

Dissertação de Mestrado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias da Universidade de Caxias do Sul, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Processos e Tecnologias, Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos e Produtos Industriais.

Caxias do Sul, 05 de maio de 2016.

Banca Examinadora:

---

Dra. Marli Camassola (Orientadora)

Universidade de Caxias do Sul

---

Dr. Aldo José Pinheiro Dillon (Coorientador)

Universidade de Caxias do Sul

---

Dra. Camila Baldasso

Universidade de Caxias do Sul

---

Dra. Lorena Benathar Ballod Tavares

Fundação Universidade Regional de Blumenau

---

Dra. Raquel Cristine Kuhn

Universidade Federal de Santa Maria

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que de alguma forma participaram desta caminhada:

- primeiramente a Deus;
- a orientadora deste trabalho, a professora Dra. Marli Camassola, por ser esta pessoa mais que especial. Dedicada, comprometida, persistente e incansável;
- ao co-orientador, professor Dr. Aldo J. P. Dillon;
- a técnica do laboratório, Roselei Fontana, por ser esta pessoa tão dedicada;
- ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias, professor Dr. Ademir J. Zattera;
- aos professores da banca;
- aos colegas do Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos e Tecnologias e do Laboratório de Enzimas e Biomassas;
- aos colegas do Laboratório de Enzimas e Biomassas;
- a minha família;
- aos meus amigos;
- ao apoio estrutural e financeiro da UCS, FAPERGS e CNPq;
- ao Laboratório de Análises e Pesquisas Ambientais.

# SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	OBJETIVOS .....	13
	<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	13
	<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
	<b>3.1 Biomassa lignocelulósica</b> .....	14
	3.1.1 Celulose .....	15
	3.1.2 Hemicelulose .....	16
	3.1.3 Lignina .....	17
	<b>3.2 Pentoses</b> .....	17
	<b>3.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica</b> .....	18
	3.3.1 Pré-tratamento químico.....	19
	3.3.2 Pré-tratamento biológico .....	20
	<b>3.4 Hidrólise enzimática</b> .....	21
	<b>3.5 Macromicetos</b> .....	21
	<b>3.6 Bioconversão da xilose</b> .....	22
	3.6.1 Produtos da bioconversão.....	23
	3.6.2 Etanol .....	24
	3.6.3 Xilitol .....	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	30
	<b>4.1 Micro-organismos</b> .....	31
	<b>4.2 Crescimento e manutenção das linhagens</b> .....	31
	<b>4.3 Pré-inóculo</b> .....	31
	<b>4.4 Ensaio de seleção das linhagens de macromicetos</b> .....	32
	<b>4.5 Avaliação do consumo de xilose</b> .....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
	<b>5.1 Condições de aeração para produção de etanol e xilitol</b> .....	34
	<b>5.2 Seleção de meio de cultivo para produção de etanol e xilitol</b> .....	35
	<b>5.3 Produção de etanol e xilitol em cultivos com xilose</b> .....	35
	5.3.1 Xilitol .....	35
	5.3.2 Etanol .....	36
	<b>5.4 Produção de etanol e xilitol em cultivos com glicose e xilose</b> .....	38
	<b>5.5 Diferentes condições de pH e temperatura para obtenção de etanol e xilitol através da glicose e xilose</b> .....	40
	<b>5.6 Produção de etanol e xilitol a partir de açúcares obtidos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar</b> .....	48
6	CONCLUSÕES.....	51
7	PERSPECTIVAS .....	52
	REFERÊNCIAS .....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição de algumas biomassas lignocelulósicas agrícolas.....	14
<b>Tabela 2.</b> Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento.....	18
<b>Tabela 3.</b> Macromicetos utilizados e seus respectivos locais de coleta.....	30
<b>Tabela 4.</b> Rendimento (%) de xilitol em condição aeróbia e anaeróbia por diferentes linhagens de macromicetos.....	33
<b>Tabela 5.</b> Rendimento em xilitol de diferentes linhagens de macromicetos a partir de xilose.....	35
<b>Tabela 6.</b> Produção de etanol e xilitol por diferentes macromicetos.....	46

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1.</b> Fator de conversão de substrato em produto.....	32
<b>Equação 2.</b> Rendimento para xilitol.....	32
<b>Equação 3.</b> Rendimento para etanol.....	32
<b>Equação 4.</b> Produtividade volumétrica.....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura da biomassa lignocelulósica presente na parede celular vegetal, evidenciando os componentes majoritários (celulose, hemicelulose e lignina).....	13
<b>Figura 2.</b> Estrutura da celulose com a região cristalina e amorfa.....	15
<b>Figura 3.</b> Açúcares fermentáveis da hemicelulose.....	15
<b>Figura 4.</b> Estrutura dos álcoois precursores da lignina.....	16
<b>Figura 5.</b> Esquema representando as etapas de obtenção de etanol a partir de xilose em microorganismos.....	22
<b>Figura 6.</b> Obtenção química de xilitol a partir da xilana.....	26
<b>Figura 7.</b> Fluxograma das principais etapas do presente estudo.....	29
<b>Figura 8.</b> Concentração de etanol e rendimento percentual em função do tempo de cultivo para diferentes espécies e linhagens de macromicetos, empregando xilose como substrato <i>Trametes hirsuta</i> (A e B), <i>Trametes membranacea</i> (C a F) e <i>Trametes versicolor</i> (G e H).....	37
<b>Figura 9.</b> Produção de etanol e xilitol a partir do meio T com 20 g.L <sup>-1</sup> de glicose, empregando diferentes linhagens de <i>Trametes membranacea</i> .....	38
<b>Figura 10.</b> Produção de etanol e xilitol a partir do meio T com 10 g.L <sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L <sup>-1</sup> de xilose (A a D), empregando diferentes linhagens de <i>Trametes membranacea</i> .....	39
<b>Figura 11.</b> Consumo de glicose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C).....	41
<b>Figura 12.</b> Consumo de xilose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C).....	42
<b>Figura 13.</b> Consumo de xilose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C).....	43
<b>Figura 14.</b> Concentração de xilitol em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C) com glicose e xilose.....	44
<b>Figura 15.</b> Figura 16. Consumo de glicose e xilose por diferentes linhagens de <i>T. membranacea</i> . Os açúcares foram obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente.....	47
<b>Figura 16.</b> Concentração dos produtos etanol e xilitol através da fermentação de açúcares obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente em função do tempo, com seus respectivos rendimentos percentuais.....	48

## RESUMO

**Palavras-chave:** biomassa lignocelulósica, macromicetos, etanol, xilitol.

A biomassa lignocelulósica é composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, sendo a hemicelulose cerca de 30% da biomassa lignocelulósica, e desta fração 60% é xilose. Atualmente estudos vêm sendo realizados para aproveitar as pentoses provenientes da hidrólise de lignocelulósicos. Neste sentido avaliou-se o potencial de produção de etanol e xilitol a partir de xilose, pelos macromicetos *Fomitella supina* FS044/09, *Pycnoporus sanguineus* PS451/10, *Trametes elegans* TE604/10, *Trametes hirsuta* TH172/10, *T. hirsuta* TH358/10, *T. hirsuta* TH703/10, *Trametes membranacea* TM102/10, *T. membranacea* TM130/10, *T. membranacea* TM140/10, *T. membranacea* TM157/10, *T. membranacea* TM158/10, *T. membranacea* TM397/10 e *Trametes versicolor* TV482/10. De modo aleatório, selecionou-se uma linhagem de cada gênero e avaliou-se a condição de aeração. A linhagem *Trametes elegans* TE604/10 apresentou rendimento de 41,11% na produção de xilitol, em condição anaeróbia, em contrapartida na condição aeróbia o rendimento foi de 3,66%. As outras duas linhagens, *F. supina* FS044/09 e *P. sanguineus* PS451/10 também apresentaram rendimentos maiores para xilitol em condição anaeróbia. Verificou-se produção de etanol apenas por fungos do gênero *Trametes*. As maiores produções de etanol a partir de xilose foram obtidas para a linhagem *T. membranacea* TM158/10, sendo de  $5,65 \pm 0,21$  g.L<sup>-1</sup> em pH 4 e 28°C (288 h de processo) e  $5,59 \pm 0,05$  g.L<sup>-1</sup> em pH 5 e 24°C (360 h). Quando realizada a conversão dos açúcares gerados a partir da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar, verificou-se maiores rendimentos de 74% para etanol e 15% para xilitol. Embora as produções precisam ser otimizadas, neste trabalho evidenciou-se a possibilidade de utilização de micélios de *T. membranacea* para a produção simultânea de etanol e xilitol a partir de pentoses, abrindo a possibilidade de novos desenvolvimentos de tecnologias empregando açúcares liberados da hidrólise de lignocelulósicos.

## ABSTRACT

**Keywords:** lignocellulosic biomass, mycetes, ethanol, xylitol.

Lignocellulosic biomass is primarily composed of cellulose, hemicellulose and lignin, wherein hemicellulose is about 30% of the lignocellulosic biomass and this fraction contains about 60% xylose. Currently studies are being conducted to take advantage of pentose from lignocellulosic hydrolysis. In this sense, it was evaluated the potential production of ethanol and xylitol from xylose, by the macromycetes *Fomitella supine* FS044/09, *Pycnoporus sanguineus* PS451/10, *Trametes elegans* TE604/10, *Trametes hirsute* TH172/10, *T. hirsute* TH358/10, *T. hirsute* TH703/10, *Trametes membranacea* TM102/10, *T. membranacea* TM130/10, *T. membranacea* TM140/10, *T. membranacea* TM157/10, *T. membranacea* TM158/10, *T. membranacea* TM397/10 and *Trametes versicolor* TV482/10. Randomly, it was selected a strain of each genus and evaluated the condition of aeration. The strain *Trametes elegans* TE604/10 showing a yield of 41.11% in the production of xylitol in anaerobic conditions, in contrast aerobic condition, the yield was 3.66%. The other two strains, *F. supine* FS044/09 and *P. sanguineus* PS451/10 also had higher yields for xylitol in anaerobic condition. It was ethanol production only by fungi of the genus *Trametes*. The highest yields of ethanol from xylose were obtained for the strain *T. membranacea* TM158/10, and  $5.65 \pm 0.21 \text{ g.L}^{-1}$  in pH 4 to 28 ° C (288 h process time) and  $5.59 \pm 0.05 \text{ g.L}^{-1}$  pH 5 to 24 ° C (360 h). When carried out the conversion of the sugars generated from the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse there was higher yields from 74% to 15% for ethanol and xylitol, respectively. Although the production need to be optimized, this study showed the possibility of using *T. membranacea* mycelia for the simultaneous production of xylitol and ethanol from pentose sugars, opening the possibility of using new technology developments of the released sugars lignocelulósicos hydrolysis.

# 1 INTRODUÇÃO

O mercado mundial de etanol está se expandindo, devido a alta demanda por combustíveis e como consequência de políticas ambientais que estão recomendando a sua adição à gasolina, ou mesmo o seu uso em carros movidos a gasolina, que já tem 27% de etanol ou em carros com motores multicomcombustível *Flex*. Além disso, o uso do etanol como combustível torna desnecessária a utilização de aditivos à base de chumbo para aumentar a eficiência da octanagem da gasolina.

Todavia, os processos de utilização dessa biomassa como fonte de energia, visando a sua viabilidade econômica, ainda estão em estudo. Diversos gargalos precisam ser superados para tornar esta tecnologia economicamente viável. Entre estes destacam-se: a) a realização de pré-tratamento para a remoção do invólucro de lignina do material lignocelulósico e a desorganização da estrutura da celulose cristalina para facilitar o acesso das enzimas e consequentemente aumentar o rendimento da hidrólise enzimática; b) o elevado custo das enzimas, e; c) a fermentação das pentoses, resultantes da degradação da hemicelulose, visto que as leveduras conhecidas apresentam capacidade limitada para fermentação de pentoses. Portanto, estudos comprovaram a capacidade de microrganismos produzirem etanol a partir de xilose.

Além do etanol, o xilitol também é um produto do metabolismo microbiano que por sua vez, apresenta propriedades organolépticas e anticariogênicas de interesse. Além de prevenir osteoporose, pode ser utilizado em produtos alimentares para diabéticos tornando-se uma alternativa parcial a sacarose. Atualmente, a produção de xilitol envolve processo industrial com base na hidrogenação catalítica de xilose altamente purificada obtida a partir de hidrolisados de materiais ricos em hemicelulose, um processo de alto custo de produção que utiliza pressão e temperatura elevada, e requer passos de purificação extensos de xilose. Para estas reações, várias pesquisas vêm explorando a rota alternativa, buscando micro-organismos e condições de cultivo para a produção de xilitol, usando a xilose presente nos hidrolisados derivados de resíduos lignocelulósicos agroindustriais.

Dentro deste contexto, neste trabalho realizaram-se avaliações para selecionar isolados de microrganismos com potencial para produção de etanol e xilitol a partir da glicose e xilose, visando o desenvolvimento de processos de aproveitamento da xilose para a produção destes produtos biotecnológicos, xilitol e etanol.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir etanol e/ou xilitol a partir de xilose e/ou glicose empregando micélio de macromicetos, visando desenvolver processo de produção de etanol de segunda geração e/ou xilitol a partir de açúcares obtidos da degradação enzimática de resíduos lignocelulósicos.

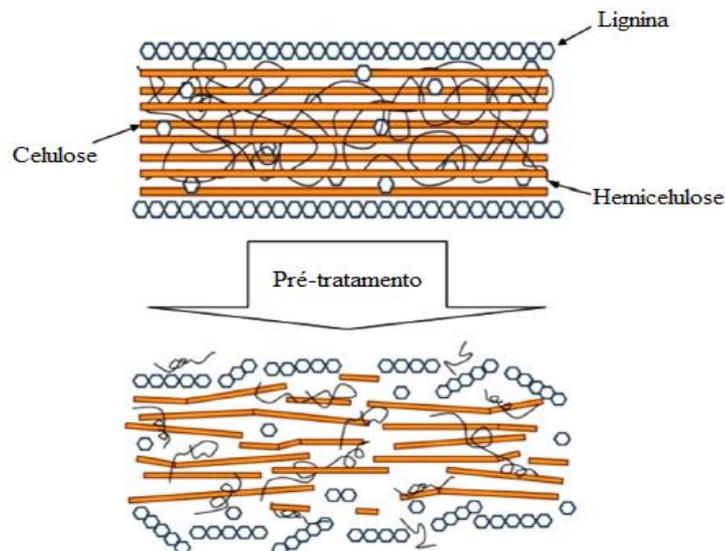
### **2.2 Objetivos Específicos**

- Realizar seleção de macromicetos para identificar isolados com potencial para a produção de etanol e de xilitol a partir de xilose, em cultivos submersos.
- Avaliar a utilização de isolados de macromicetos para a produção de etanol e/ou xilitol, em misturas de xilose e glicose.
- Avaliar a utilização de isolados de macromicetos produtores de etanol e/ou de xilitol para produção destes produtos, a partir de açúcares obtidos da hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar.
- Selecionar as condições de cultivo para os três isolados que apresentarem maior produção de etanol e/ou de xilitol, variando parâmetros de temperatura e pH.

## 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 3.1 Biomassa lignocelulósica

Biomassa de plantas refere-se a materiais lignocelulósicos disponíveis em grande parte na forma de resíduos agrícolas (palha de milho, bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz e etc.) e culturas (gramíneas, álamo e salgueiro). É um recurso promissor por ser abundante, ter baixo custo e por não competir com alimentos. A biomassa vegetal é composta principalmente pela parede celular das plantas; aproximadamente 75% desse material são polissacarídeos que são uma importante fonte potencial de açúcares (Gomez *et al.*, 2008). Na **Figura 1**, estão representados os principais componentes da biomassa lignocelulósica – celulose, hemicelulose e lignina – os quais constituem o material mais abundante e de menor custo contendo açúcares disponíveis para bioconversão em etanol (Okamoto *et al.*, 2014).



**Figura 1.** Estrutura da biomassa lignocelulósica presente na parede celular vegetal, evidenciando os componentes majoritários (celulose, hemicelulose e lignina) (Mood *et al.*, 2013).

A biomassa lignocelulósica apresenta características químicas semelhantes a da madeira, porém em diferentes quantidades percentuais (Fengel & Wegner, 1989). Suas diferenças em estruturas químicas podem levar a reatividades químicas diferentes, tornando a composição relativa em celulose, hemicelulose e lignina na biomassa um fator crucial para o planejamento do processo (Carrier *et al.*, 2011). As composições destes materiais variam,

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

sendo que o componente principal é a celulose (35-50%), seguido por hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%). A **Tabela 1** fornece a composição de alguns materiais lignocelulósicos (Wyman, 1994).

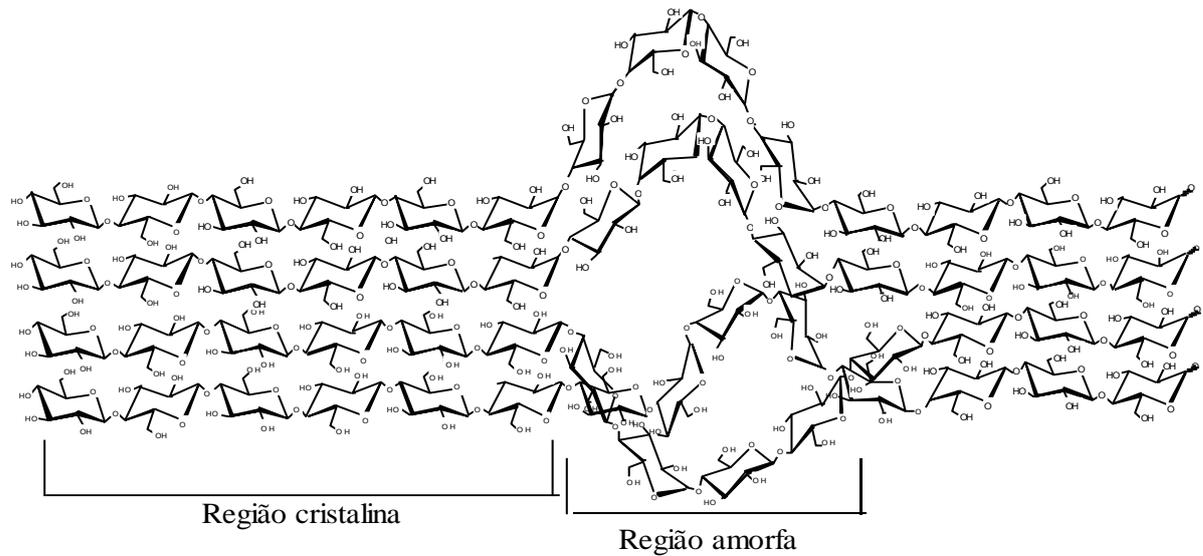
**Tabela 1.** Composição de algumas biomassas lignocelulósicas agrícolas (Wyman, 1994).

	Composição (% massa seca)		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Fibra de milho	15	35	8
Espiga de milho	45	35	15
Palha de milho	40	25	17
Palha de arroz	35	25	12
Palha de trigo	30	50	20
Bagaço de cana-de-açúcar	40	24	25
Gramíneas	45	30	12

#### 3.1.1 Celulose

A celulose ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub>, o principal constituinte da biomassa lignocelulósica, é um polissacarídeo que consiste em uma cadeia linear composta por subunidades de D-glicose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídica formando dímero de celobiose. As ligações de celulose são associadas em conjunto para formar fibrilas de celulose. Os grupos funcionais da celulose são hidroxilas, tornando a superfície altamente hidrofílica. Por apresentar hidroxila nas duas extremidades, o C1 apresenta propriedades redutoras. Em sua estrutura duas unidades de glicose adjacente são ligadas pela eliminação de uma molécula de água entre seus grupos hidroxílicos no carbono 1 e carbono 4 (Canettire, 2004; Mood *et al.*, 2013). Deste modo, forma longas cadeias (ou fibrilas elementares) ligadas por ligações de hidrogênio e forças de van der Waals (Sánchez, 2009). Normalmente, está presente na forma cristalina e uma pequena quantidade de cadeias não organizadas de celulose formam a celulose amorfa, conforme **Figura 2**. Nesta última conformação, a celulose é mais suscetível à degradação enzimática (Pérez *et al.*, 2002).

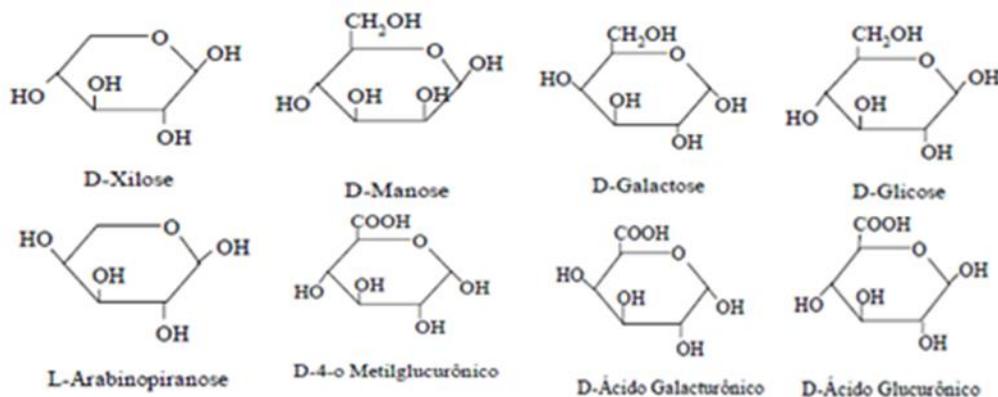
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



**Figura 2.** Estrutura da celulose com a região cristalina e amorfa (adaptado de Dillon, 2004).

#### 3.1.2 Hemicelulose

Hemicelulose, o segundo polissacarídeo mais comum na natureza, representa 20 a 35% da biomassa lignocelulósica (Saha, 2003). É um polissacarídeo com massa molecular inferior ao da celulose. Sendo formado por D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, 4-O-metil-glicurônico, D-galacturônico e ácido D-glicurônico. Os açúcares são ligados entre si por  $\beta$ -1, 4 - e, por vezes, por  $\beta$ -1, 3-glicosídicas (Sánchez, 2009). Na **Figura 3**, estão representadas as estruturas dos principais açúcares fermentáveis da hemicelulose.



**Figura 3.** Açúcares fermentáveis da hemicelulose (Fengel & Wegner, 1989).

As hemiceluloses mais relevantes são xilanas e glucomananas, sendo as xilanas mais abundantes. Xilanas são os principais componentes de hemicelulose da parede celular secundária constituindo cerca de 20-30% da biomassa de folhas e plantas herbáceas. Em

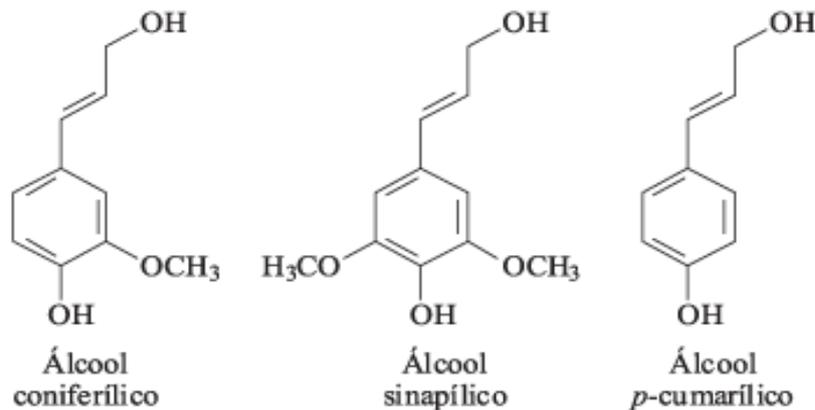
### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

alguns tecidos de gramíneas e de cereais as xilanas representam até 50% (Ebringerová *et al.*, 2005). As xilanas estão geralmente disponíveis em grandes quantidades como subprodutos da floresta, agricultura, agro-indústrias, madeira e indústrias de papel e celulose. Dependendo da origem biológica, diferentes estruturas de hemicelulose podem ser encontradas (Gírio *et al.*, 2010).

#### 3.1.3 Lignina

A lignina está ligada a hemicelulose, formando uma vedação física. Está presente na parede celular para dar apoio estrutural, impermeabilidade, resistência contra ataque microbiano e estresse oxidativo. É um heteropolímero amorfo, não solúvel em água e opticamente inativo. Este polímero é sintetizado por geração de radicais livres que são liberados na desidrogenação peroxidase mediada por três álcoois fenil propiônico (**Figura 4**): álcool coniferílico (guaiacil propanol), álcool sinapílico (siringil propanol), e álcool cumarílico (p-hidroxifenil propanol). Esta estrutura heterogênea está ligada por C-C e por ligações éter- aril, com aril-glicerol,  $\beta$ -aril sendo estas as estruturas predominantes (Sánchez, 2009).

A lignina é identificada como um importante impedimento ao ataque das enzimas à celulose, pois sua estreita associação com as microfibrilas da celulose impede acessibilidade enzimática (Chang e Holtzapple, 2000; Draude *et al.*, 2001).



**Figura 4.** Estrutura dos álcoois precursores da lignina (Theander *et al.*, 1993).

#### 3.2 Pentoses

Segundo Voet *et al.* (2000) os carboidratos ou sacarídeos do grego, *sakcharon* que significa açúcar, apresentam apenas três elementos: carbono, hidrogênio e oxigênio. As unidades básicas de carboidratos são denominadas monossacarídeos, estes são aldeídos ou

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

cetonas derivados de poliidroxiálcoois de cadeia linear contendo no mínimo três átomos de carbono, chamadas de trioses. Deste modo, conforme o número de átomos carbonos na cadeia será designada a nomenclatura. Por exemplo, carboidratos com cinco ou seis carbonos são chamados de pentoses e hexoses, respectivamente.

Xilose é especialmente importante em angiospermas, cerca de aproximadamente 17% da massa seca em angiospermas lenhosas (madeiras) e até 31% em angiospermas herbáceas (Jeffries & Shi, 1999).

A conversão química tradicional de xilose em xilitol apresenta um custo elevado e consumo elevado de energia. Apresenta baixo rendimento do produto e, conseqüentemente, o seu preço elevado tem impedido a utilização do xilitol em indústrias de alimentos ou de medicamentos. A conversão microbiana de xilose em xilitol tem atraído à atenção global porque o processo é relativamente simples e não necessita de catalisador tóxico (Ding & Xia, 2006; Cheng *et al.*, 2010). Supõe-se que os fungos que utilizam a hexose sejam capazes de utilizar a pentose correspondente, pois muitos fungos são capazes de utilizar arabinose e xilose presentes nas hemiceluloses de plantas, devido à configuração semelhante entre L-arabinose e D-galactose (Esposito & Azevedo, 2010).

#### 3.3 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica

Um processo de pré-tratamento adequado envolve (1) o rompimento das ligações de hidrogênio na celulose cristalina, (2) rompem a matriz de hemicelulose e lignina fortemente ligada, e, finalmente, (3) aumenta a porosidade e a superfície da celulose para posterior hidrólise enzimática (Lynd *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2010).

Existem vários métodos de pré-tratamento, incluindo o pré-tratamento, físico (moagem, micro-ondas e extrusão), pré-tratamento químico (alcalino, ácido, organosolvente, ozonólise e líquido iônico), físico-químico (explosão de vapor, água quente, explosão da fibra com amônia, oxidação úmida e explosão de CO<sub>2</sub>) e pré-tratamento biológico. Por outro lado, o método de pré-tratamento utilizado, produz alguns compostos inibidores durante o processo que tem efeitos negativos na atividade microbiana na etapa de hidrólise.

Inibidores são classificados em três grandes grupos: (1) ácidos fracos, tais como levulínico, o ácido acético e o ácido fórmico, (2) os derivados de furano, tais como, HMF (5-hidroxi-2-metilfurfural) e furfural, bem como (3) compostos fenólicos (Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000). A **Tabela 2** compara os métodos de pré-tratamento, com suas vantagens e desvantagens.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Tabela 2.** Vantagens e desvantagens de diferentes métodos de pré-tratamento (Alvira *et al.*, 2010).

Método de pré-tratamento	Vantagens	Desvantagens
Biológico	*Degrada lignina e hemicelulose. *Baixo consumo de energia.	*Baixo rendimento de hidrólise.
Moagem	*Reduz a cristalinidade da celulose.	*Alto consumo de energia.
Explosão a vapor	*Provoca transformações na lignina e solubilização da hemicelulose. *Custo benefício.	*Geração de compostos tóxicos.
Explosão de amônia (AFEX)	*Aumenta a área de superfície acessível. *Baixa formação de inibidores.	*Degradação parcial da hemicelulose.
Explosão de CO <sub>2</sub>	*Aumenta a área de superfície de contato. *Custo-benefício. *Não gera compostos tóxicos.	*Não atinge a lignina e a hemicelulose.
Oxidação úmida	*Eficiente remoção da lignina. *Baixa formação de inibidores. *Reduz o consumo de energia (exotérmica).	*Alto custo de oxigênio e catalisador alcalino.
Ozonólise	*Reduz o teor de lignina. *Não gera compostos tóxicos.	*Alto custo, devido a grande quantidade de ozônio necessária.
Organossolventes	*Causa hidrólise de lignina e hemicelulose.	*Elevado custo. *Os solventes precisam ser drenados e reciclados.
Ácido concentrado	*Elevado rendimento de glicose. *Temperatura ambiente.	*Custo elevado dos ácidos e necessitam de recuperação. *Problemas de corrosão. *Formação de inibidores.
Ácido diluído	*Menos problemas com corrosão. *Menos formação de compostos inibidores.	*Geração de produtos de degradação.

#### 3.3.1 Pré-tratamento químico

O pré-tratamento químico tem sido um dos métodos mais promissores para melhorar a biodegradabilidade de celulose, removendo a lignina e / ou a hemicelulose, e para diminuir o grau de polimerização e a cristalinidade do componente celulósico (Mtui, 2009; Agbor *et al.*, 2011). Além disso, alguns produtos químicos foram relatados por não produzir resíduos tóxicos e realizados à temperatura e pressão ambiente (Mtui, 2009). Produtos químicos que variam de agentes oxidantes, alcalinos, ácidos e sais podem ser utilizados para degradar a lignina, hemicelulose e celulose dos resíduos lignocelulósicos. Ácidos orgânicos, tais como o ácido oxálico, ácido acetilsalicílico e ácido salicílico também são utilizados como catalisador, em que numa mistura de solventes orgânicos ou orgânico aquoso com ácidos inorgânicos (HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), também são utilizados para degradar a ligação entre lignina e hemicelulose (Carvalho & Duarte, 2008; Aita & Kim, 2010; Singh *et al.*, 2011).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Pré-tratamento ácido, em particular, por meio de ácido sulfúrico é o mais comumente empregado para o pré-tratamento químico de biomassa lignocelulósica, onde polissacarídeos (principalmente hemicelulose) são hidrolisados em monossacarídeos que conduzem a maior acessibilidade da hidrólise enzimática da celulose. Pré-tratamento ácido pode ser realizado com baixa concentração de ácido e elevada temperatura ou sob a concentração de ácido mais elevada e temperatura inferior (Taherzadeh & Karimi, 2008).

#### 3.3.2 Pré-tratamento biológico

Pré-tratamento biológico é geralmente associado à ação de fungos que são capazes de produzir enzimas que degradam lignina, hemicelulose e polifenóis presentes na biomassa. Ela tem atraído interesse devido às suas potenciais vantagens sobre pré-tratamentos físicos e químicos, como substrato e reação com especificidade, os requisitos de baixa energia, não há geração de substâncias tóxicas e há alto rendimento dos produtos desejados (Ria-Millat *et al.*, 2011; Saritha *et al.*, 2012). No entanto, as suas desvantagens são tão evidentes como as suas vantagens, uma vez que é um processo muito lento e requer controle cuidadoso de condições de crescimento e grande espaço para realização (Chandra *et al.*, 2007). Além disso, a maioria dos micro-organismos ligninolíticos, além de solubilizar não consomem apenas lignina, mas também hemicelulose e celulose (Kuhar *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2008).

A conversão da biomassa lignocelulósica por micro-organismos, especialmente fungos, em compostos mais acessíveis para hidrólise e posterior produção de etanol de segunda geração é forma promissora de aplicação para os pré-tratamentos biológicos (Singh *et al.*, 2008). Em contraste com a maioria dos métodos de pré-tratamento que requerem elevado custo operacional, este método utiliza fungos da decomposição branca, marrom e/ou macia para deslignificar e melhorar a hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica (Shi *et al.*, 2009). A degradação da lignina ocorre por fungos da podridão branca, através da ação enzimática de peroxidases e lacases (Kumar & Wyman, 2009). Enquanto, os fungos da podridão marrom degradam principalmente a celulose, já os fungos da podridão branca e macia degradam celulose e lignina (Fan *et al.*, 1987; Sánchez, 2009).

O pré-tratamento da biomassa é um problema global que exige um processo favorável ao meio ambiente. Assim, o interesse tem sido dirigido para um método biológico e recentes estudos mostram o crescente interesse nessa direção (Bak *et al.*, 2010; Ma *et al.*, 2010).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

#### 3.4 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática de celulose utilizando celulases como biocatalisador vem apresentando uma crescente atenção por ser uma fonte econômica de açúcares fermentáveis, tais como a glicose e envolve um processo ambientalmente correto (Chakraborty *et al.*, 2010).

Segundo Arantes e Saddler (2011), durante o processo de hidrólise enzimática, a adsorção das celulases inicia rapidamente sobre a celulose prontamente acessível, com velocidade inicial elevada de hidrólise. No entanto, a reação alcança rapidamente uma fase intermediária, caracterizada por uma velocidade de reação de hidrólise moderada quando cerca de 50-70% do substrato inicial foi hidrolisado. Depois disso, uma fase muito lenta é caracterizada por uma diminuição constante da velocidade de reação, o que resulta em apenas um pequeno aumento na conversão do remanescente (o chamado "inacessível" ou recalcitrante) celulose.

A concentração do substrato é um dos principais fatores da hidrólise enzimática, com o aumento da concentração, normalmente ocorre o aumento do rendimento e da velocidade do processo de hidrólise. Porém, uma concentração muito elevada de substrato pode ocasionar inibição, reduzindo a taxa de hidrólise (Cheung & Anderson, 1997).

A hidrólise enzimática e a fermentação podem ser realizadas de dois modos: a sacarificação e a fermentação, em que a hidrólise enzimática e a fermentação são realizadas em reatores separados e a sacarificação e fermentação simultâneas, a hidrólise enzimática e a fermentação acontecem simultaneamente, no mesmo reator (Galbe & Zacchi, 2002).

#### 3.5 Macromicetos

Os fungos são responsáveis pela produção de importantes ácidos orgânicos, pela produção de fármacos, enzimas de interesse industrial e de elevado valor econômico, destacando-se as celulases, lacases, xilanases, pectinases e amilases, pelo controle biológico de insetos-pragas e moléstias da agricultura e pela produção de etanol. São importantes agentes de degradação, sendo os principais decompositores de celulose e lignina (Esposito & Azevedo, 2010).

Os Basidiomycota atuam em ambientes terrestres, como decompositores de madeira que ocasionam a podridão branca, onde os materiais lignocelulósicos adquirem uma aparência esbranquiçada e se rompem facilmente no sentido das fibras, ou a podridão castanha, no qual o material apresenta-se na cor marrom e quebra-se facilmente em cubos, no sentido transversal ao das fibras vegetais. Outros decompõem esterco ou folhas, além disso, alguns

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

são comestíveis, outros produzem substâncias antibióticas, também atuam como biorremediadores de solos, no clareamento de efluentes industriais (Esposito & Azevedo, 2010).

Os fungos basidiomicetos são decompositores da madeira e desempenham papéis fundamentais na reciclagem de recursos florestais, através de sistemas multi-enzimáticos que degradam materiais lignocelulósicos (Okamoto *et al.*, 2010). Os basidiomicetos são considerados os micro-organismos com maior capacidade de degradação de lignocelulose na natureza. Um número de basidiomicetos da decomposição branca são particularmente adequados para o pré-tratamento biológico ou sacarificação e fermentação simultâneas da biomassa lignocelulósica (Taniguchi *et al.*, 2005; Bark *et al.*, 2009;. Jeya *et al.*, 2009;. Shi *et al.*, 2009; Dias *et al.*, 2010).

Outra importante potencialidade dos basidiomicetos da decomposição branca e da decomposição parda é a produção de etanol a partir de pentoses. Para obter rendimentos mais elevados de etanol a partir de biomassa lignocelulósica composta principalmente de glicose e xilose, é necessário o consumo completo da xilose (Okamoto *et al.*, 2011).

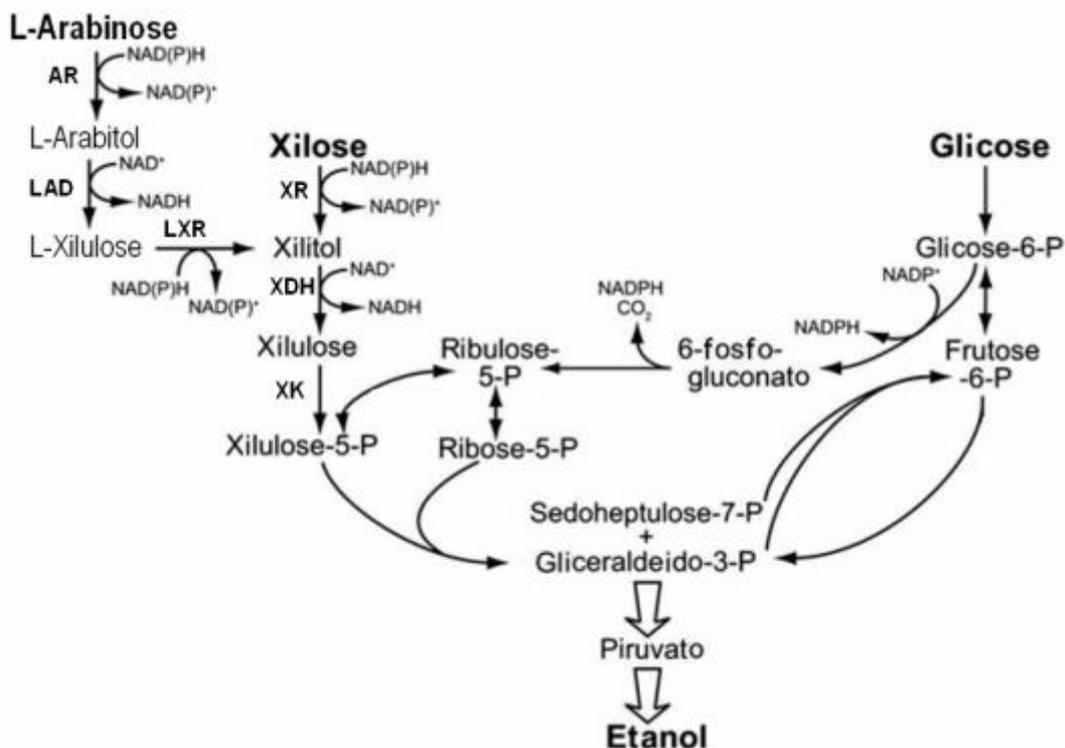
Conforme Okamoto *et al.*(2012),o fungo da podridão branca e o fungo da podridão castanha são capazes de produzir etanol. Dentre os isolados em suas pesquisas, o fungo da podridão parda, o *Fomitopsis palustres* apresentou pouca habilidade para converter xilose em etanol, enquanto que o *Trametes hirsuta*, o fungo da podridão branca havia apresentado melhor fermentabilidade para xilose. No entanto, o consumo de xilose por *T. hirsuta* procedeu de forma insuficiente e permaneceu incompleta, mesmo após sete dias. Para atingir uma produção de etanol lignocelulósico superior, o consumo completo de xilose é necessário. Posteriormente, basidiomicetos com uma maior capacidade de fermentar naturalmente e consumir xilose do que *T. hirsuta* foram selecionados e identificou-se o fungo da podridão marrom *Neolentinus lepideus*, que exibiu consumo eficiente e conversão relativamente rápida de açúcares hexose e xilose (Okamoto *et al.*2012).

#### 3.6 Bioconversão da xilose

Conforme **Figura 5**, a via metabólica inicial de xilose em micro-organismos envolve a sua conversão em xilulose seguido da fosforilação pela enzima xilulose quinase, formando a D-xilulose-5-fosfato e, em seguida, dirigida a via das fosfopentoses (PPP). A conversão da xilulose por bactérias geralmente utiliza a enzima xilose isomerase (XI), enquanto que as leveduras e fungos filamentosos empregam um passo de redução e um de oxidação (Singh &

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Mishra, 1993). Em leveduras e fungos, a xilose é primeiramente reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR) e subsequentemente oxidada para xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), que é fosforilada formando xilulose-5-fosfato. A xilulose é metabolizada pela via das PPP, resultando na formação de gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, o qual através da glicólise (via Embden Meyerhof Parnas – EMP) pode ser levado à piruvato, sendo oxidado pelo ciclo dos ácidos tricarbóxicos, recuperando as coenzimas através da cadeia respiratória, ou ser fermentado a etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e etanol desidrogenase, sendo neste processo, reoxidado o NADH resultante da oxidação de gliceraldeído-3-fosfato (Jeffries, 2006).



**Figura 5.** Esquema representando as etapas de obtenção de etanol e xilitol a partir de xilose em micro-organismos (adaptado de Wohlbach *et.al.*, 2011).

#### 3.6.1 Produtos da bioconversão

A produção de etanol de segunda geração requer o desenvolvimento de processos economicamente viáveis e sustentáveis que utilizem biomassa lignocelulósica como matéria-prima renovável (Okamoto *et al.*, 2014). Além disso, a fermentação de açúcares pentoses presentes na hemicelulose, também é importante para que seja eficaz a utilização da biomassa lignocelulósica (Saha, 2003).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Quanto à bioconversão de xilose em xilitol, sabe-se que a conversão química tradicional de xilose em xilitol apresenta um custo elevado e consumo elevado de energia. Apresenta baixo rendimento do produto e, conseqüentemente, o seu preço elevado tem impedido a utilização do xilitol em indústrias de alimentos ou de medicamentos. A conversão microbiana de xilose em xilitol tem atraído à atenção global porque o processo é relativamente simples e não necessita de catalisador tóxico (Ding & Xia, 2006; Cheng *et al.*, 2010). O xilitol é um poliol natural, particularmente interessante devido ao seu poder adoçante semelhante ao da sacarose, porém fornece menos calorias. O xilitol é também conhecido por ser metabolizado através de vias independentes da insulina no corpo humano e, por isso, pode ser utilizado como substituto do açúcar para o tratamento de diabetes. Além disso, uma propriedade significativa do xilitol é apresentar propriedades anti-cariogênicas, que podem auxiliar a promover a saúde bucal e prevenção da cárie (Huang *et al.*, 2011).

Algumas espécies de leveduras como *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* apresentaram elevado rendimento de produção de xilitol através de materiais ricos em xilose (Barbosa *et al.*, 1988.; Nolleau *et al.*, 1993).

#### 3.6.2 Etanol

A produção de etanol no Brasil é a partir da cana-de-açúcar, primeiramente um sistema de limpeza remove quantidades excessivas de solo, areia e poeira vindos com a cana-de-açúcar. Após a limpeza, a cana é preparada por meio de facas rotativas e trituradores que a corta em pedaços pequenos, adequados para o processo de extração subsequente. Um sistema de extração separa o bagaço e melado através da compressão da cana. O bagaço é usado como combustível para o sistema de cogeração e o melado bruto é enviado para o sistema de processamento.

Algumas impurezas são separadas pela adição de reagentes químicos, tais como, o óxido de cálcio, também é necessário aquecimento para as reações de purificação. Depois disso, o caldo passa por um tanque no qual é misturado a ele um fermento com leveduras. Após horas de fermentação é produzido o vinho, chamado também de vinho fermentado, que possui leveduras, açúcar não fermentado e etanol. O vinho é concentrado num evaporador, seguido da condensação é separado o vinho do etanol. Com isso, é obtido o álcool hidratado, usado como etanol combustível. A fim de remover o restante da água e a produção de etanol anidro, uma fase de desidratação é necessária no fim do processo (Palacios-Bereche *et al.*, 2014).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

Atualmente, a fração significativa do consumo de energia na produção de etanol acontece na etapa de destilação. Sendo que o sistema convencional de fermentação utilizado na indústria da cana requer baixa concentração de substrato e, por conseguinte, produz um baixo teor de etanol no vinho, que deve ser destilado, conseqüentemente, com elevado consumo de energia (Dias *et al.*, 2012).

Existem outros métodos menos utilizados para obtenção de etanol. A hidratação do etileno que consiste em uma síntese química entre as moléculas de água, às moléculas do etileno, resultando no etanol. Esse método é controlado em laboratório, utiliza ácidos como catalizadores, como o ácido sulfúrico ou o ácido fosfórico. Outra possibilidade de se obter o etanol é pela redução do acetaldeído. Com a ação de um agente redutor, o acetaldeído ganha um íon de hidrogênio que se liga ao oxigênio formando a hidroxila, e conseqüentemente, o etanol. A matéria-prima desse processo costuma ser o acetileno (NOVACANA, 2016).

A principal utilização do etanol atualmente é como combustível, sendo utilizado também na sua forma anidro como matéria-prima de tintas, solventes, aerossóis, etc. E na forma etanol hidratado (etanol com cerca de 5% de água), na produção de bebidas, alimentos, cosméticos, aromatizantes, produtos de limpeza, remédios e vacinas (NOVACANA, 2016).

Dados divulgados pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) e compilados pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA) indicam que o consumo total de combustíveis utilizados pela frota de veículos leves (ciclo Otto) em 2015 permaneceu estável ante 2014, com singelo aumento de 0,34%. Entretanto, vale ressaltar a maior participação do etanol hidratado carburante na matriz energética, sendo responsável por 33,3% do total consumido. Para tanto houve ampliação de 37,47% do consumo, alcançando quase 18 bilhões de litros (13 bilhões registrados em 2014), contra queda de 7,27% no consumo de gasolina C (UNICA, 2016).

O etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica é uma opção de combustível renovável, que têm o potencial de substituir grande fração do combustível derivado do petróleo usado globalmente (Sheehan & Himmel, 1999).

Segundo Prior *et al.* (1989), espécies de leveduras como *Pichia stipitis* ou *Candida shehatae* foram eficientes para fermentar xilose. O consumo e a fermentação de xilose por *Neolentinus lepideus* foi investigado sob três condições de aeração diferentes, em sistema aeróbio, condições limitadas de oxigênio e anaeróbio. A xilose foi consumida completamente após 96 h, 96 h e 192 h de fermentação e as concentrações máximas obtidas de etanol foram de 5,9g.L<sup>-1</sup>, 6,5g.L<sup>-1</sup>, e 6,7 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente (Okamoto *et al.*, 2012). O *T. hirsuta*

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

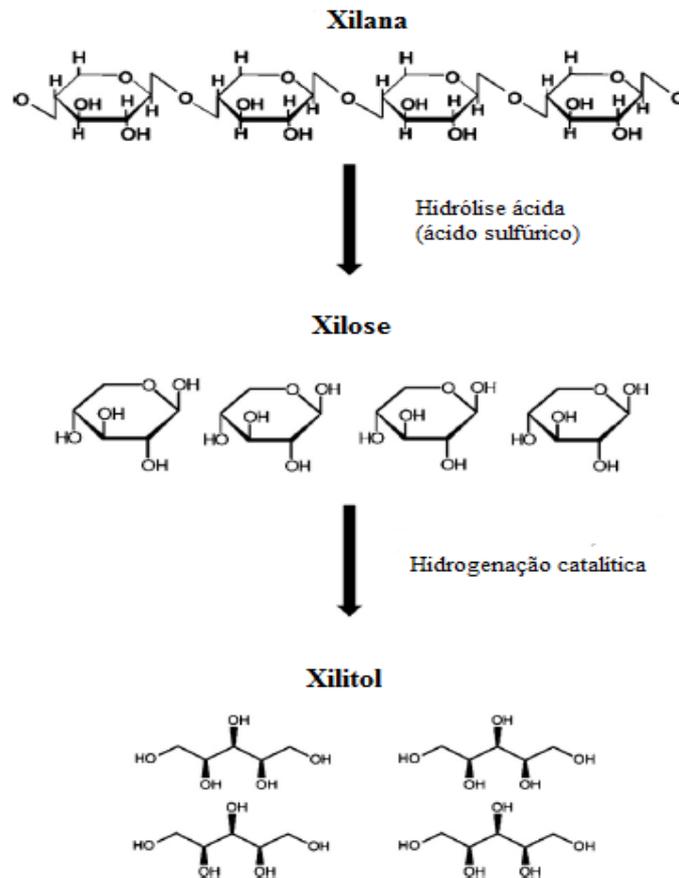
---

cultivado em 20 g.L<sup>-1</sup>xilose apresentou concentração máxima em etanol de 3,9 g.L<sup>-1</sup>, após 144 h de cultivo e etanol, porém a concentração de xilitol não foi significativa (Okamoto *et al.*, 2010).

#### 3.6.3 Xilitol

O xilitol foi descoberto em 1891 pelo químico Emil Fischer (Alemão, 1852-1919) e sua equipe, que o obteve em forma de xarope a partir da reação de xilose com amálgama de sódio (Bär *et al.*, 1991).

Atualmente, a produção de xilitol em larga escala é um processo químico dividido em várias etapas (**Figura 6**): primeiramente é realizada a hidrólise ácida do material natural rico em xilana; após a hidrólise é realizada a purificação até ser obtida uma solução de xilose pura; depois da purificação é realizada a hidrogenação catalítica da xilose pura a fim de obter xilitol, utilizando como catalisador uma liga de NiAl<sub>2</sub>; a quarta etapa é a purificação da solução de xilitol obtida; e finalmente, a cristalização do xilitol (Jaffe *et al.*, 1974; Melaja *et al.*, 1977). Elevadas temperaturas e pressões empregadas, e equipamentos de elevado custo, são necessários para alcançar as condições adequadas para o processo; além de várias etapas de purificação, o que torna o custo do processo de obtenção de xilitol bastante elevado (Nigam & Singh, 1995; Franceschin *et al.*, 2011; Kelloway & Daoutidis, 2014).



**Figura 6:** Obtenção química de xilitol a partir da xilana (adaptado de Albuquerque *et al.*, 2014).

A literatura inclui vários estudos sobre a utilização de xilitol como um substituto para a sacarose em determinados alimentos destinados à redução de calorias, tais como bolos, biscoitos, chocolates e gomas de mascar (Fisker & Nissen, 2006; Sokmen & Gunes, 2006; Winkelhausena *et al.*, 2007; Edelstein *et al.*, 2008). A utilização de xilitol na indústria farmacêutica é atualmente difundida, devido principalmente às suas propriedades anticariogênicas comprovadas, que pode reduzir a cárie dentária em até 100%. Vários estudos têm mostrado a eficácia deste açúcar-álcool, contra a formação de biofilmes orais, especialmente quando se trata das bactérias *Streptococcus mutans*. Alguns autores afirmam que as características anticariogênicas de xilitol contra esta bactéria é devido a uma diminuição na concentração de glucosil-transferase, no micro-organismo. Outros autores afirmam que altera a estrutura da célula. Além de *S. mutans*, outros estudos têm mostrado a eficácia do emprego xilitol contra outros micro-organismos que são prejudiciais à saúde bucal, tais como: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*-ZAE, *Staphylococcus aureuse*, *Pseudomonas aerugionosa* (Akiyama *et al.*, 2002; Tapiainen *et al.*, 2004; Ammons

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

*et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2011). Além de combater a cárie dentária, o xilitol é reconhecido por ser capaz de contribuir para a calcificação dos dentes (Imazato *et al.*, 2006). Também tem sido relatado como sendo eficaz no tratamento de várias doenças, por exemplo: diabetes, anemia, otite média aguda e a osteoporose (Mattila *et al.*, 2005; Danhauer *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013).

Ao contrário dos açúcares convencionais, o xilitol independe da insulina para ser metabolizado pelo organismo, por este motivo é tolerado pelas pessoas portadoras de Diabetes mellitus Tipo I ou Tipo II (Manz *et al.*, 1973; Pepper & Olinger, 1988; Bar, 1991). Considerando que nenhuma das duas principais vias de absorção do xilitol (fígado e flora intestinal) é mediada pela insulina. Embora o xilitol possa penetrar em quase todas as células do organismo, as do fígado são especialmente permeáveis e contêm uma enorme quantidade de enzimas capazes de rapidamente metabolizá-lo e transformá-lo em energia. Enquanto, a absorção pelo intestino é consideravelmente lenta. Toda a D-glicose proveniente do metabolismo do xilitol é primeiro estocada como glicogênio no fígado e depois liberada gradualmente. Desse modo, sua concentração no sangue não sofre as mudanças bruscas causadas pela sacarose e pela glicose, o que faz do xilitol um adoçante apropriado para diabéticos (Ylikahri, 1979).

Em seres humanos, a deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma patologia conhecida como anemia hemolítica. Essa deficiência promove a diminuição dos eritrócitos, devido à incapacidade das células de regenerar NADPH, um cofator importante nos processos biológicos oxidativos (Vieira-Neto *et al.*, 1999). O xilitol é um agente terapêutico que pode ser utilizado (dose máxima de 1 mM/L de sangue) por pessoas com deficiência de G6PDH, uma vez que essa enzima não é requerida para o seu metabolismo. Assim sendo, o xilitol supre a célula de NADPH<sub>2</sub> por meio da oxidação da L-xilulose, mantendo a integridade da membrana dos glóbulos vermelhos (Van Eys *et al.*, 1974; Ylikahri, 1979).

Segundo Kontiokari *et al.* (1995), o xilitol atua na prevenção ou no combate da otite média aguda, inibindo o crescimento da bactéria *Streptococcus pneumoniae*, principal causadora de sinusites e infecções no ouvido médio.

A eficiência do xilitol no tratamento ou na prevenção da osteoporose foi comprovada por Mattila *et al.* (1998; 1999). Em suas pesquisas com animais, esses autores verificaram que o xilitol promove o aumento da massa dos ossos, preserva os minerais neles existentes e evita o enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas. Para essas pesquisas, a dieta dos

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

animais foi suplementada com uma quantidade de xilitol que variou de 10 a 20% na formulação da ração, tendo ficado evidente que, no combate à osteoporose, quanto maior é a dose de xilitol na alimentação, melhores foram os resultados alcançados.

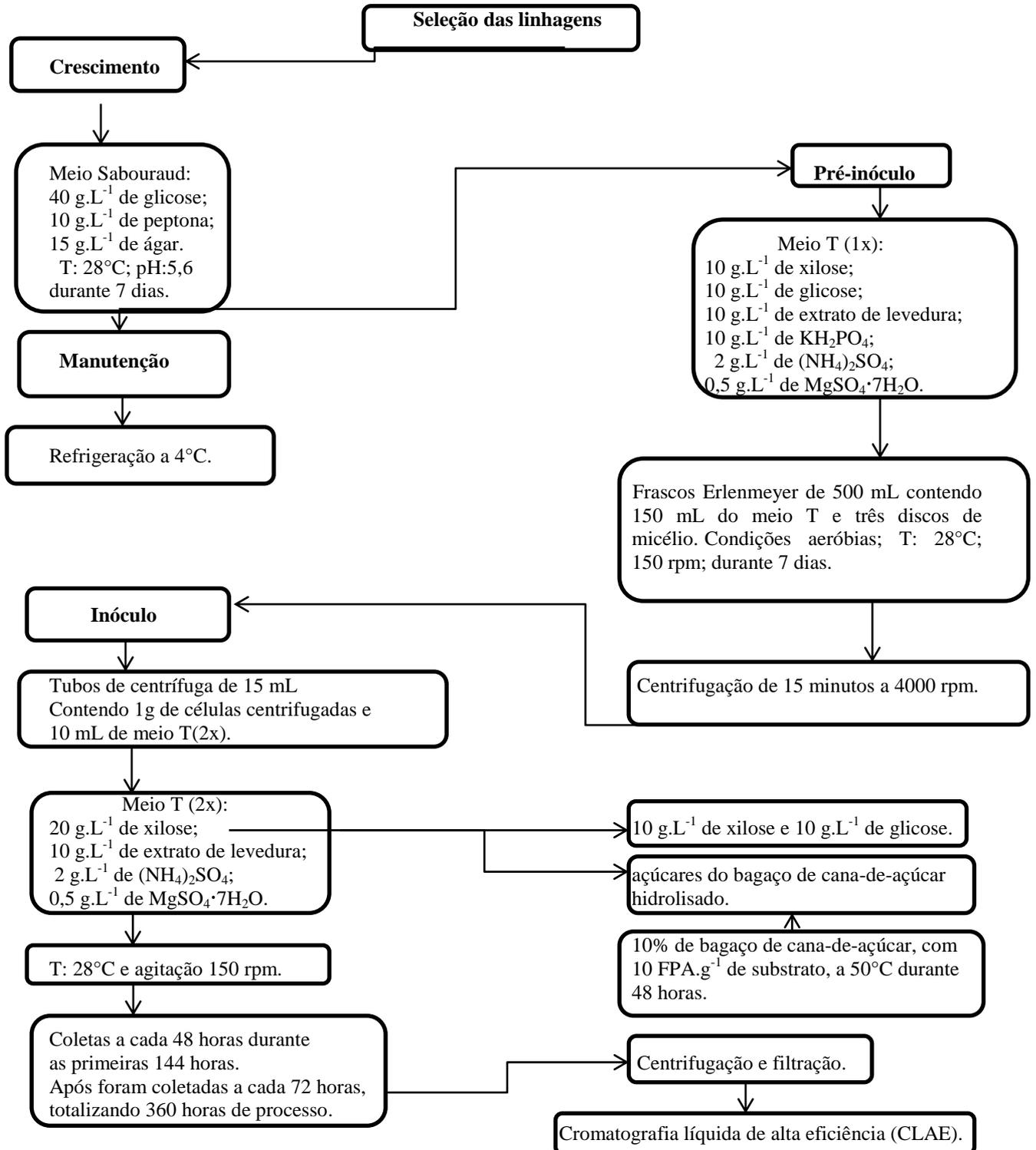
As indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética são as maiores interessadas na produção de xilitol, que atualmente ultrapassa 100.000 toneladas por ano, mas é em produtos que cuidam da saúde bucal que está sua maior aplicação, atuando como anticariogênico (NONAKA *et al.*, 2005). O mercado anual de xilitol é estimado em 340 milhões de dólares, com preço em US\$ 4-5 por quilo (KADAM *et al.*, 2008).

O processo biotecnológico para obter xilitol através de diferentes espécies de micro-organismos, bem como diversas matérias-primas vem sendo investigadas como alternativas promissoras. Segundo Misra *et al.* (2012) investigou-se 18 cepas de leveduras e, por coincidência, as leveduras *Candida* apresentaram melhor desempenho de produção. A *C. tropicalis* produziu 12,11 g.L<sup>-1</sup> de xilitol utilizando concentração inicial de xilose 50 g.L<sup>-1</sup>, nas condições 30°C, pH 5 e 200 rpm durante 72 h. Enquanto Arruda *et al.* (2011) estudaram a produção de xilitol por meio da *Candida guilliermondii* FTI20037 e como material lignocelulósico contendo xilose, o bagaço de cana-de-açúcar. As condições do processo foram pH 5,5, temperatura 30°C, tempo 120h e obtiveram 50,5 g.L<sup>-1</sup> de xilitol, o processo realizou-se em frascos Erlenmeyer. Hongzhi *et al.* (2011) utilizaram espiga de milho como fonte de obtenção de xilose e o micro-organismo *Candida tropicalis* HDY-02, na temperatura de 35°C, pH 7,0 e durante 78h de fermentação obtiveram 58g.L<sup>-1</sup> de xilitol, em biorreator.

Desta revisão, evidencia-se a necessidade de desenvolvimento de processos para o aproveitamento de xilose para produção de etanol e/ou xilitol. Assim, a seleção de micro-organismos ainda não estudados que possam realizar esta conversão biotecnologicamente é fundamental para o desenvolvimento de novos processos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo apresenta-se descrita a metodologia utilizada no presente estudo e os materiais utilizados. A **Figura 7** é um fluxograma contemplando os procedimentos realizados.



**Figura 7:** Fluxograma das principais etapas do presente estudo.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Micro-organismos

Foram avaliados três gêneros e seis espécies de macromicetos pertencentes à micoteca do Laboratório de Enzimas e Biomassas da Universidade de Caxias do Sul. A **Tabela 3** apresenta o nome de cada macromiceto analisado e seu local de coleta.

**Tabela 3.** Macromicetos utilizados e seus respectivos locais de coleta.

Macromiceto	Local de coleta
<i>Fomitella supina</i> FS044/09	São Francisco de Paula, RS-Brasil.
<i>Pycnoporus sanguineus</i> PS451/10	Dom Pedro de Alcântara, RS-Brasil.
<i>Trametes elegans</i> TE604/10	Matinhos, PR-Brasil.
<i>Trametes hirsuta</i> TH172/10	Porto Alegre, RS-Brasil.
<i>Trametes hirsuta</i> TH358/10	Riozinho, RS-Brasil.
<i>Trametes hirsuta</i> TH703/10	Foz do Iguaçu, PR-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM102/10	São Francisco de Paula, RS-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM130/10	São Francisco de Paula, RS-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM 140/10	São Francisco de Paula, RS-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM157/10	Alfredo Wagner, SC-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM158/10	Alfredo Wagner, SC-Brasil.
<i>Trametes membranacea</i> TM397/10	Santa Maria, RS-Brasil.
<i>Trametes versicolor</i> TV482/10	Porto Alegre, RS-Brasil.

### 4.2 Crescimento e manutenção das linhagens

As culturas fúngicas foram mantidas e repicadas em placas de Petri, em meio de cultivo Sabouraud (40 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g.L<sup>-1</sup> de peptona, 15 g.L<sup>-1</sup> de ágar). O pH foi ajustado para 5,6, as linhagens cresceram a 28°C por 7 dias e foram estocadas a 4°C até o momento da utilização.

### 4.3 Pré-inóculo

Os micélios crescidos em meio Sabouraud foram cultivados por 7 dias a 28°C. Após, foram cortados em discos de 1,5 cm de diâmetro e inoculados em meio T (1×), composto por

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

10 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. O pré-inóculo realizou-se em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 150 mL do meio T e três discos de micélio, em condições aeróbias (Okamoto *et al.*, 2012). O pré-inóculo foi mantido a 28°C e agitação constante (150 rpm) durante 7 dias.

### 4.4 Ensaios de seleção das linhagens de macromicetos

Após a fase de pré-inóculo, o inóculo foi transferido assepticamente para tubos de 50 mL e centrifugados a 4000 rpm durante 15 minutos. Em tubos de 15 mL adicionou-se 10 mL de meio T (2×), composto por 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose, 10 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 10 g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (Okamoto *et al.*, 2010) e aproximadamente 1 g de células. O ensaio foi mantido durante 15 dias, a 28°C e agitação constante (150 rpm), sendo realizado coletas a cada 48 horas durante as primeiras 144 horas. Após foram coletadas a cada 72 horas, totalizando 360 horas de processo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e todos materiais e meios de cultivo foram autoclavados, durante 15 minutos a 121°C.

Após a seleção de linhagens com potencial para produção de etanol e/ou xilitol, a xilose do meio T foi substituída por glicose e misturas de xilose e glicose. A partir do meio T, contendo concentrações de xilose (50%) e glicose (50%) semelhantes a biomassa do bagaço de cana-de-açúcar quando hidrolisada, buscou-se otimizar condições de pH e temperatura, foram testados pH 3, pH 4 e pH 5, e temperatura de 24°C, 28°C e 32°C. A maioria dos fungos de podridão branca crescem melhor a um pH levemente ácido, entre 4 e 5 (Zadrazil & Brunnert, 1982). O efeito da temperatura sobre a taxa de seletividade e de deslignificação varia entre os fungos da podridão branca, sendo a maioria mesófilos, com temperatura ótima entre 15 e 35°C ((Levonen-Munoz *et al.*, 1983).

Posteriormente, foram preparados meios contendo açúcares obtidos da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. As hidrólises realizadas empregaram 10% (m.v<sup>-1</sup>) de bagaço de cana-de-açúcar, com 10 FPA.g<sup>-1</sup> de celulasas de *Penicillium echinulatum* por substrato, a 50°C durante 48 horas. Selecionou-se as 3 linhagens com maior potencial e para estas foi realizado o inóculo utilizando a condição de pH e temperatura que apresentou o rendimento maior.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

---

### 4.5 Avaliação do consumo de xilose

As amostras foram centrifugadas e em seguida filtradas através de filtro de membrana de 0,20 µm. Os produtos etanol e xilitol, assim como os teores de açúcares residuais foram determinados através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 60 °C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (5mM.L<sup>-1</sup>) como eluente, com fluxo de 0,6 mL. min<sup>-1</sup> e detector por índice de refração. Conforme Okamoto *et al.* (2010) o rendimento teórico de etanol foi definido como 0,512g de etanol por g de xilose (1,67 mol de etanol por uma mol de xilose) e de xilitol foi definido como 1,01g de xilitol por g de xilose. As concentrações foram obtidas em g.L<sup>-1</sup> e a partir destas calculou-se o fator de conversão de substrato em produto e o rendimento percentual em xilitol e etanol e a produtividade, através das **equações 1, 2, 3 e 4** respectivamente.

$$Y^{P/s} = (P - P_0)/(S_0 - S)$$

**Equação 1.** Fator de conversão de substrato em produto.

Onde:

$P_0$ =produto inicial       $S_0$ =substrato inicial

$P$ =produto final       $S$ =substrato final

$$rxil(\%) = \frac{Y^{P/s}}{1,01} \times 100$$

**Equação 2.** Rendimento para xilitol

$$ret(\%) = \frac{Y^{P/s}}{0,512} \times 100$$

**Equação 3.** Rendimento para etanol

$$Q_p = (P - P_0)/(t - t_0)$$

**Equação 4.** Produtividade volumétrica

Onde:

$P_0$ =produto inicial       $P$ =produto final       $t_0$ =tempo inicial       $t$ =tempo final

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo, são apresentados e discutidos os resultados, avaliando inicialmente condições de aeração e selecionando o meio de cultivo para produção de etanol e xilitol. Na produção de etanol e xilitol em cultivos com xilose, foram testadas todas as linhagens inicialmente estudadas, após verificar a produção de etanol apenas por linhagens de *Trametes*. Estas foram selecionadas para as etapas seguintes deste trabalho, considerando as concentrações dos produtos de interesse e do rendimento em função do tempo. Utilizou-se como fonte de carbono no meio de cultivo para o inóculo xilose e mistura de xilose e glicose (1:1), após otimizou-se condições de pH e temperatura. Definidas as melhores linhagens e condições foram realizadas as fermentações.

### 5.1 Condições de aeração para produção de etanol e xilitol

Os cultivos foram realizados primeiramente em condições aeróbias e anaeróbias, a fim de verificar a condição de aeração favorável aos produtos de interesse (etanol e xilitol). As linhagens utilizadas foram selecionadas de modo aleatório para cada gênero. Abaixo, a **Tabela 4** apresenta os resultados para as mesmas linhagens em diferentes condições:

**Tabela 4.** Rendimento (%) de xilitol em condição aeróbia e anaeróbia por diferentes linhagens de macromicetos.

Linhagens	Rendimento em xilitol (%) para cultivo anaeróbio	Rendimento em xilitol (%) para cultivo aeróbio
<i>Fomitella supina</i> FS044/09	10,33	5,54
<i>Pycnoporus sanguineus</i> PS451/10	15,49	4,34
<i>Trametes elegans</i> TE604/10	41,11	3,66

A partir dos dados da Tabela 4, pode-se verificar que a condição anaeróbia apresenta rendimento percentual maior, indicando ser a condição mais favorável à bioconversão de xilose em xilitol. Por este motivo, estabeleceram-se ensaios em anaerobiose. Os dados obtidos neste trabalho para as linhagens *F. supina* FS044/09, *P. sanguineus* PS451/10 e *T. elegans* TE604/10 estão de acordo aos obtidos por Okamoto *et al.* (2014). Segundo estes autores, o consumo e a fermentação de xilose por *T. versicolor* KT9427 apresentaram rendimentos máximos de etanol e maior produtividade volumétrica na condição anaeróbia.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Esses dados obtidos para os micélios de macromicetos são contrários aos verificados para leveduras. Em leveduras, normalmente o metabolismo de pentoses ocorre por respiração ou fermentações em condições de microaerofília (Dahn *et al.*, 1996). Isto ocorre, pois as duas primeiras enzimas da rota de conversão de D-xilose a D-xilitol, a xilose redutase e a xilitol desidrogenase, possuem cofatores distintos (redutases com preferência por NADPH e desidrogenases que utilizam apenas  $\text{NAD}^+$ ) (Saleh *et al.*, 2006), provocando um desequilíbrio redox e impedindo a utilização anaeróbica destes açúcares, além de ser uma das principais causas de excreção de xilitol (Petschacher & Nidetzki, 2008). Assim, os resultados obtidos neste trabalho, indicam que o mecanismo de regulação para os macromicetos avaliados deve ser diferente ou mesmo procurando manter a condição de anaerobiose tenha restado oxigênio no meio de cultivo.

### 5.2 Seleção de meio de cultivo para produção de etanol e xilitol

O pré-inóculo realizado em meio T contendo como fonte de carbono,  $10 \text{ g.L}^{-1}$  xilose e  $10 \text{ g.L}^{-1}$  glicose, mostrou-se favorável para preparação do pré-inóculo, pois além de serem os açúcares mais abundantes do material lignocelulósico, apresenta composição semelhante ao do material utilizado neste trabalho.

O inóculo foi realizado primeiramente apenas com xilose a fim de avaliar as linhagens capazes de bioconverter esta pentose em etanol e/ou xilitol. Porém, o meio T utilizado para esta etapa do processo foi modificado, retirando-se  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que foi analisado em cromatografia de troca-iônica e não apresentou variação na concentração durante os diferentes tempos de coleta. Verificou-se que sem a adição do mesmo o rendimento foi semelhante. Além disso, este componente interferiu no cromatograma, apresentando-se no pico referente a glicose durante a análise em cromatografia líquida.

### 5.3 Produção de etanol e xilitol em cultivos com xilose

#### 5.3.1 Xilitol

Verificou-se que todos macromicetos investigados produziram xilitol, porém não houve consumo completo da xilose em todos os ensaios. Na **Tabela 5** são apresentados os rendimentos da produção de xilitol pelos diferentes macromicetos avaliados com a respectiva concentração de xilitol e tempo da coleta de produção máxima.

**Tabela 5.** Rendimento em xilitol de diferentes linhagens de macromicetos a partir de xilose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tempo (horas)	Linhasgens	Xilitol (g.L <sup>-1</sup> )	Y P/S	Rendimento (%)	Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
216	<i>T. membranacea</i> TM158/10	0,97	0,61	60,2	0,004
360	<i>T. membranacea</i> TM130/10	0,49	0,57	56,5	0,002
96	<i>T. membranacea</i> TM397/10	0,87	0,45	45,0	0,004
288	<i>T. membranacea</i> TM102/10	0,49	0,36	35,6	0,002
72	<i>T. membranacea</i> TM140/10	0,72	0,34	33,6	0,003
144	<i>T. membranacea</i> TM157/10	0,29	0,31	31,1	0,001
360	<i>T. hirsuta</i> TH703/10	0,61	0,27	26,5	0,003
216	<i>T. hirsuta</i> TH358/10	1,05	0,24	23,6	0,005
216	<i>T. versicolor</i> TV482/10	0,70	0,20	19,5	0,003
240	<i>P. sanguineus</i> PS451/10	0,68	0,13	12,6	0,003
360	<i>F. supina</i> FS044/09	0,78	0,10	10,0	0,004
360	<i>T. hirsuta</i> TH172/10	0,93	0,08	7,7	0,004
360	<i>T. elegans</i> TE604/10	0,33	0,04	3,7	0,002

Os maiores rendimentos para xilitol foram evidenciados para as linhagens de *T. membranacea*, atingindo rendimento de até 60%. Destaca-se que até o momento não há citação na literatura que esta espécie seja produtora de xilitol. Ainda é importante ressaltar que não há citações anteriores que apontem que os fungos *T. elegans*, *F. supina* e *P. sanguineus* sejam produtores de xilitol.

Outro dado que chama a atenção é a produção de xilitol pela linhagem *T. hirsuta* TH358/10, produzindo 1,05 g.L<sup>-1</sup>, enquanto seu rendimento percentual foi de 23,6%. Deve-se ao elevado consumo de xilose, conseqüentemente o fator de conversão obtido foi de aproximadamente 0,24, por este motivo apresenta-se o baixo rendimento.

### 5.3.2 Etanol

Verificou-se a produção de etanol apenas no gênero *Trametes*, para as espécies *T. hirsuta*, *T. membranacea* e *T. versicolor*. A **Figura 8** apresenta as concentrações de etanol em função do tempo e do rendimento percentual de etanol em função do tempo.

A partir das Figuras 8A e 8B, pode-se verificar que a espécie *T. hirsuta* apresentou maior concentração e rendimento percentual de etanol. No entanto, a linhagem TH703/10 em 360 horas de cultivo possibilitou uma produção de 0,240 g.L<sup>-1</sup> e 15,13% de rendimento para este álcool. Estes dados são inferiores aos obtidos por Okamoto *et al.* (2011). Estes autores obtiveram 3,9 g.L<sup>-1</sup> de etanol a partir da fermentação de xilose durante 144 horas de fermentação, porém não houve produção simultânea de xilitol, como constatada neste trabalho.

Quanto a concentração de etanol obtida por *T. membranacea*, as maiores concentrações de etanol foram 0,496 g.L<sup>-1</sup> para *T. membranacea* TM102/10 em 216 horas de fermentação (Figura 8C) seguida pela linhagem TM157/10 com 0,370 g.L<sup>-1</sup> de etanol em 288

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

horas de processo (Figura 8E). Quanto ao rendimento percentual de etanol *T. membranacea* TM158/10 apresentou maior rendimento 61,1% de rendimento em etanol (Figura 8F), seguido por *T. membranacea* TM130/10 com rendimento de 56,8% em 360 horas de processo (Figura 8D).

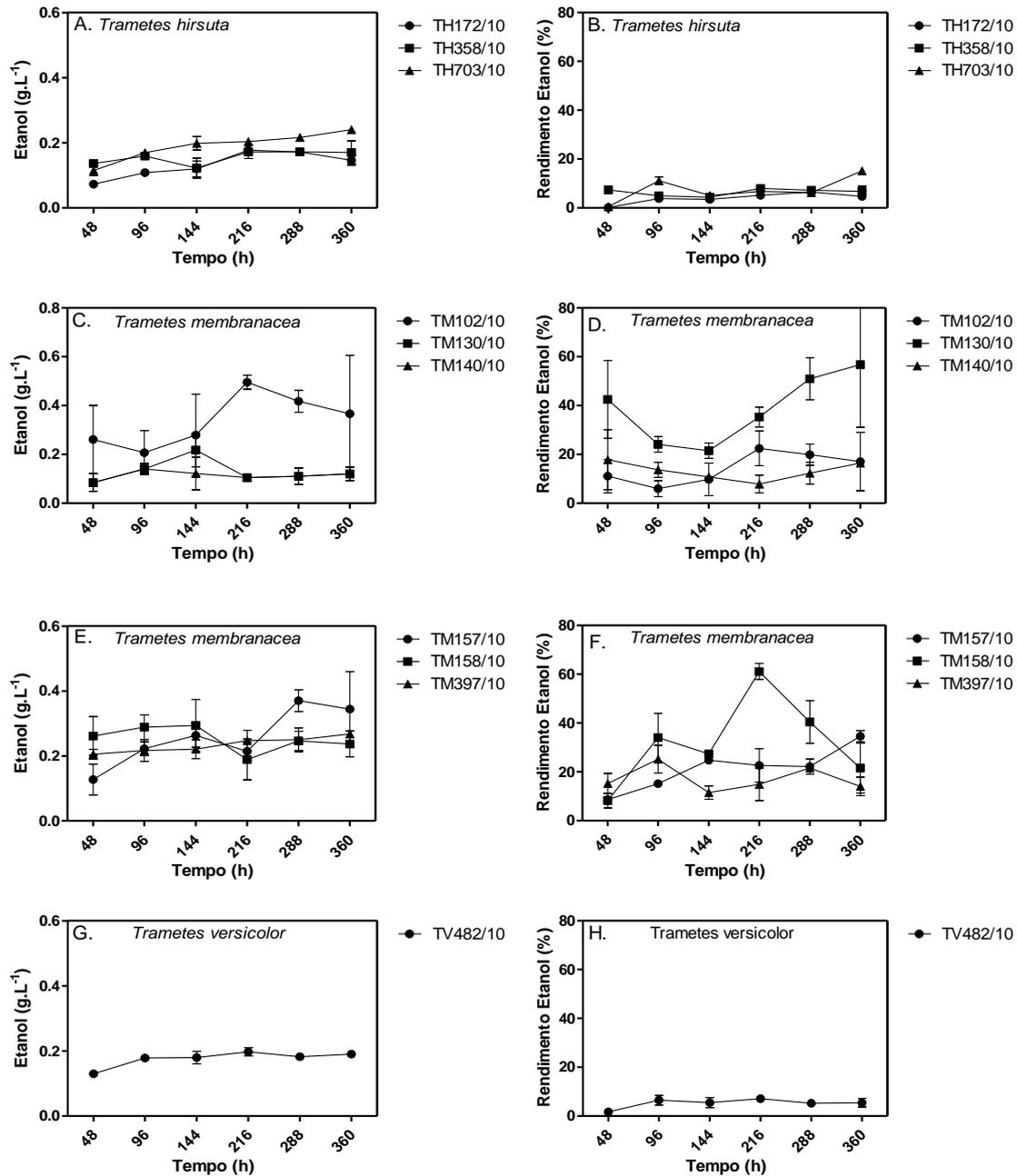
A espécie *T.versicolor* apresentou maior concentração de etanol em 216 horas de processo, sendo o rendimento de 7,11% (Figura 8H) e a concentração foi de 0,197 g.L<sup>-1</sup> de etanol (Figura 8G).

Observando-se a Figura 8, pode-se verificar que *T.membranacea* além de apresentar as maiores concentrações em etanol, apresentou os maiores rendimentos, sendo entre as linhagens avaliadas, a linhagem com maior potencial em converter xilose em etanol.

As diferentes produções de etanol a partir de xilose pelos diferentes micromicetos avaliados indicam o potencial de utilização de diferentes micro-organismos para a conversão de pentoses a etanol. Tradicionalmente, as leveduras vêm sendo estudadas para a produção de etanol, mas apesar do grande número de trabalhos (Sasaki *et al.*, 2013; Xiong *et al.*, 2014; Mofoluwake *et al.*, 2015) que relatam o esforço para a conversão das pentoses, ainda existem limitações para tornar este processo viável.

Diferentemente de *S. cerevisiae*, outras espécies de leveduras como *Candida intermedia*, *C. jeffriesii*, *C. shehatae*, *C. succiphila*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia tannophilus*, *Spathaspora arborariae*, *Spathaspora passalidarum* e *Scheffersomyces stipitis*, são capazes de crescer e fermentar xilose com diferentes graus de rendimento de etanol (Hahnagerdal *et al.*, 1994; Tavares *et al.*, 2000; Gardonyi *et al.*, 2003; Ryabova; Chmil; Sibirny, 2003; Stambuk *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2006; Jeffries *et al.*, 2007; Cadete *et al.*, 2009). Entretanto, não demonstram a mesma capacidade fermentativa de *S. cerevisiae* em condições industriais, uma vez que apresentam baixa tolerância ao etanol, à pressão osmótica, à presença de inibidores e aos níveis de pH ácido e requerem, em sua maioria, condições micro-aeróbias para uma fermentação mais eficiente (Jeffries e Shi, 1999; Hahn-Hagerdal *et al.*, 2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 8.** Concentração de etanol e rendimento percentual em função do tempo de cultivo para diferentes espécies e linhagens de macromicetos, empregando xilose como substrato. *Trametes hirsuta* (A e B), *Trametes membranacea* (C a F) e *Trametes versicolor* (G e H).

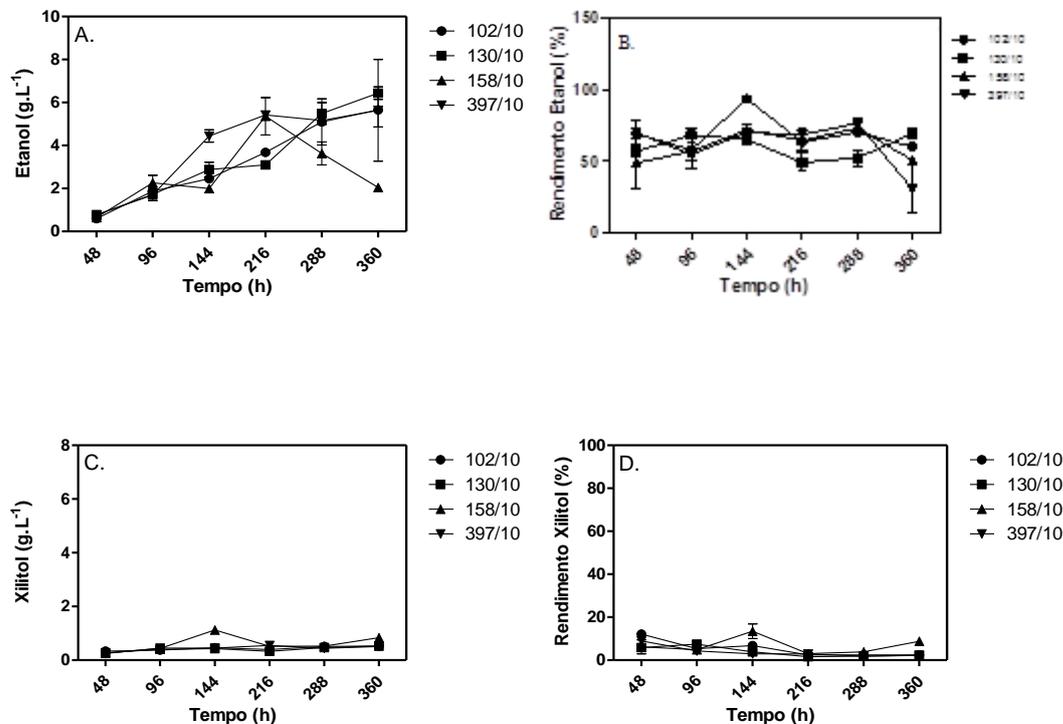
#### 5.4 Produção de etanol e xilitol em cultivos com glicose e xilose

Após avaliar a bioconversão de xilose em xilitol e etanol, investigou-se a produção dos mesmos modificando o meio de cultivo do inóculo, substituindo a xilose por glicose e pela mistura de ambos (10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose), considerando que a mistura possibilita estimar um resultado semelhante para biomassa lignocelulósica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para verificar a produção de etanol e de xilitol foram avaliadas apenas quatro linhagens de *T. membranacea*. Com a substituição de xilose por glicose, a concentração e o rendimento em etanol apresentaram um aumento (**Figura 9**). Para *T. membranacea* TM130/10 observa-se que a maior concentração obtida foi 6,44 g.L<sup>-1</sup> com rendimento de 69,4%, em 360 horas de processo (Figura 9 A e B). Para *T. membranacea* TM102/10 foi obtido um rendimento maior de 93,7% em 144 horas de processo e uma concentração de 2,45 g.L<sup>-1</sup> de etanol (Figura 9 A e B).

Em relação ao xilitol, a maior concentração e rendimento percentual foram obtidos do *T. membranacea* TM158/10, sendo que a concentração foi de 1,12 g.L<sup>-1</sup> e 13,5% de rendimento, durante 144 horas de processo (Figura 9 C e D).

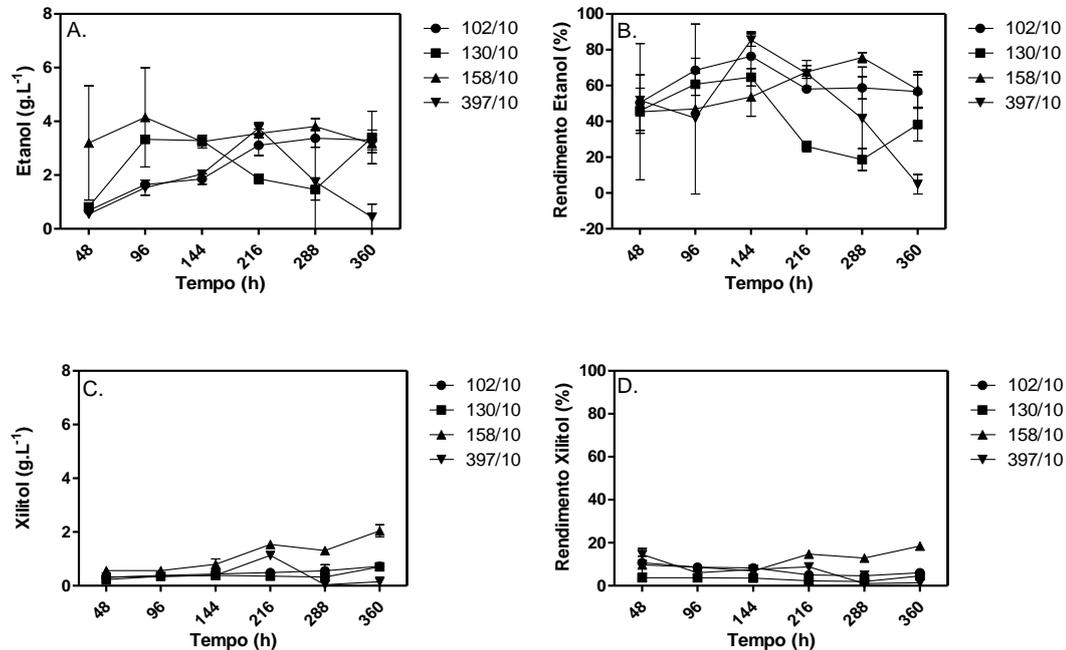


**Figura 9.** Produção de etanol e xilitol a partir do meio T com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicose, empregando diferentes linhagens de *Trametes membranacea*.

No meio T composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose (**Figura 10**), obteve-se a maior concentração em etanol durante as primeiras 96 horas de fermentação com rendimento de 46,9% e concentração de 4,15 g.L<sup>-1</sup> de etanol para linhagem *T. membranacea* TM158/10 (Figura 10A e B). O maior rendimento do *T. membranacea* TM397/10 foi de 85,5% em 144 horas de processo (Figura 10A e B). Quanto ao xilitol obteve-se a maior concentração e rendimento em 360 horas de processo, com rendimento de 18,4% e concentração de 2,04 g.L<sup>-1</sup>, com *T. membranacea* TM158/10 (Figura 9C e D).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A diferente concentração de glicose e xilose no meio de cultivo utilizado no inóculo permite verificar que maior concentração de glicose, ou seja, o meio T contendo apenas o açúcar glicose favoreceu a formação de etanol.



**Figura 10.** Produção de etanol e xilitol a partir do meio T com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose (A a D), empregando diferentes linhagens de *Trametes membranacea*.

### 5.5 Diferentes condições de pH e temperatura para obtenção de etanol e xilitol através da glicose e xilose

A partir do meio T, contendo concentrações de xilose (50%) e glicose (50%) otimizou-se condições de pH e temperatura. Foram testados pHs 3, 4 e 5, e temperatura de 24, 28 e 32°C. Salienta-se que os resultados apresentados anteriormente, realizaram-se a temperatura de 28°C e pH 5.

Na **Figura 11** são representados os dados de consumo de glicose em função do tempo nas diferentes condições testadas. Na **Figura 11A**, observa-se que o consumo completo de glicose ocorreu a 288 horas de processo para linhagem TM130/10 e para linhagem TM158/10 a 360 horas, enquanto as demais linhagens estudadas não consumiram completamente a glicose durante o tempo de processo.

Durante as 360 horas de processo, observa-se que as linhagens não foram capazes de consumir completamente a glicose na condição B (pH 4, 28°C) (**Figura 11B**), sendo que as linhagens que apresentaram maior consumo foram TM130/10 e TM158/10, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Conforme **Figura 11C**, apenas a linhagem TM130/10 consumiu completamente a glicose durante as 360 horas. Para condição pH 4 e temperatura 24°C (**Figura 11D**), a linhagem TM158/10 e TM130/10 apresentaram consumo maior de glicose.

A condição pH 5 e temperatura 24°C (**Figura 11E**) as linhagens TM397/10 e TM158/10 apresentaram maior consumo de glicose quando comparadas as linhagens TM102/10 e TM130/10.

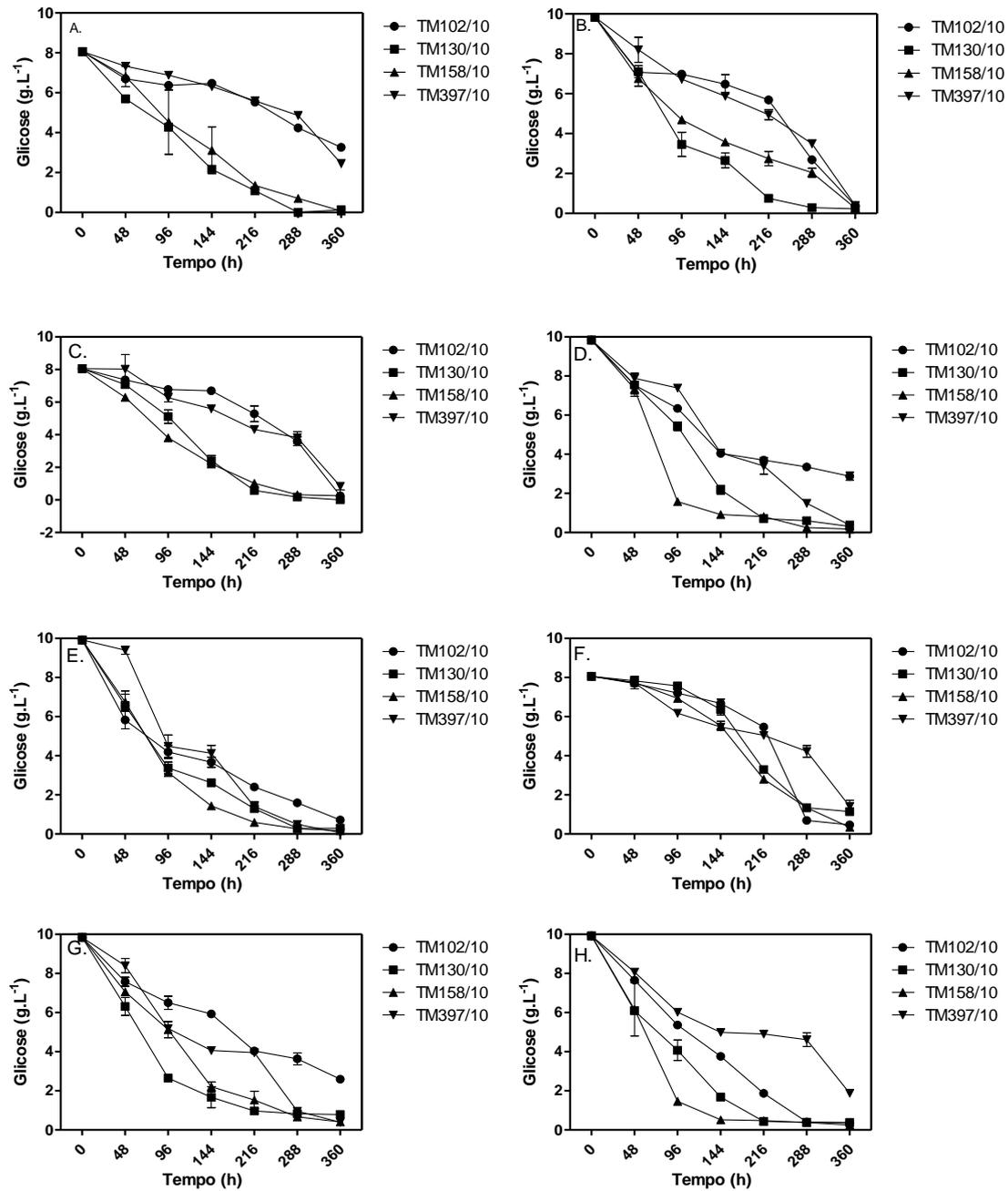
Nas condições com temperatura de 32°C e pH 3 (**Figura 11F**), as linhagens com maior consumo de glicose foram TM158/10 e TM102/10, respectivamente. Para pH 4 (**Figura 11G**) a linhagem TM397/10, seguida pela linhagem TM158/10 apresentaram maior consumo de glicose para esta condição. A condição pH 5 e temperatura de 32°C (**Figura 11H**), as linhagens TM102/10 e TM158/10 foram capazes de consumir uma quantidade superior de glicose quando comparadas com as linhagens TM130/10 e TM397/10.

A **Figura 12** apresenta o consumo de xilose em função do tempo para as 4 linhagens estudadas, conforme as condições de pH e temperatura, apresentadas anteriormente.

Conforme a **Figura 12**, as linhagens que apresentaram maior consumo de xilose durante as 360 horas de processo foram TM130/10 e TM158/10, sendo TM130/10 para as condições A (pH 3, 28°C), B (pH 4, 28°C), C (pH 3, 24°C) e E (pH 5, 24°C). Enquanto, a linhagem TM158/10 apresentou maior consumo nas condições D (pH 4, 24°C), F (pH 3, 32°C), G (pH 4, 32°C) e H (pH 5, 32°C). Porém, entre as 4 linhagens estudadas nas diferentes condições, nenhuma foi capaz de consumir completamente todo o conteúdo de xilose.

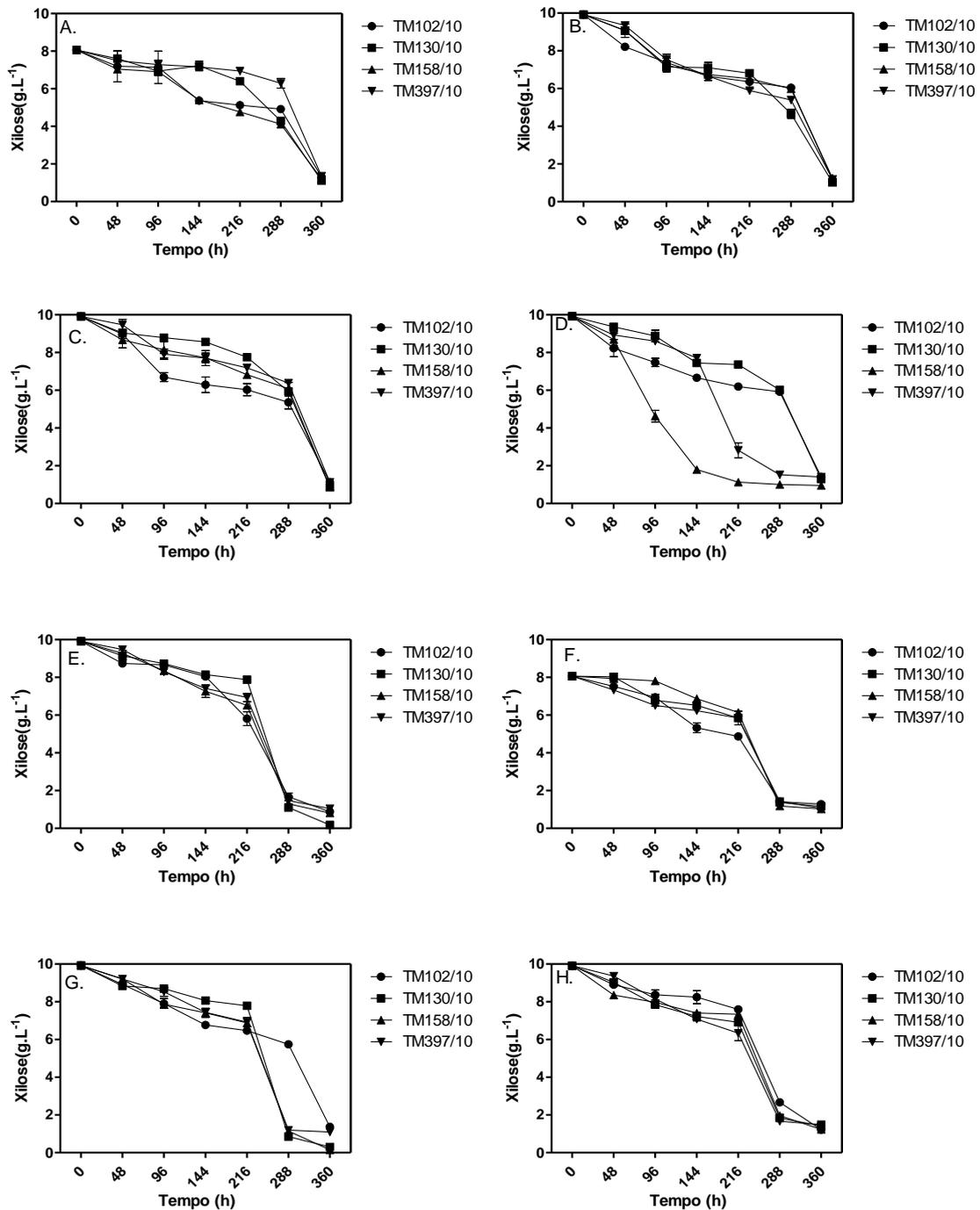
Um fato interessante observado é o rápido consumo de xilose entre 216 e 360 h de processo. Isto indica que houve o esgotamento de alguma substância que estivesse dificultando a xilose ou houve a necessidade de adaptação do substrato. Isto sugere que seja realizada a reutilização de células que já estão adaptadas ao consumo de xilose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO



**Figura 11.** Consumo de glicose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

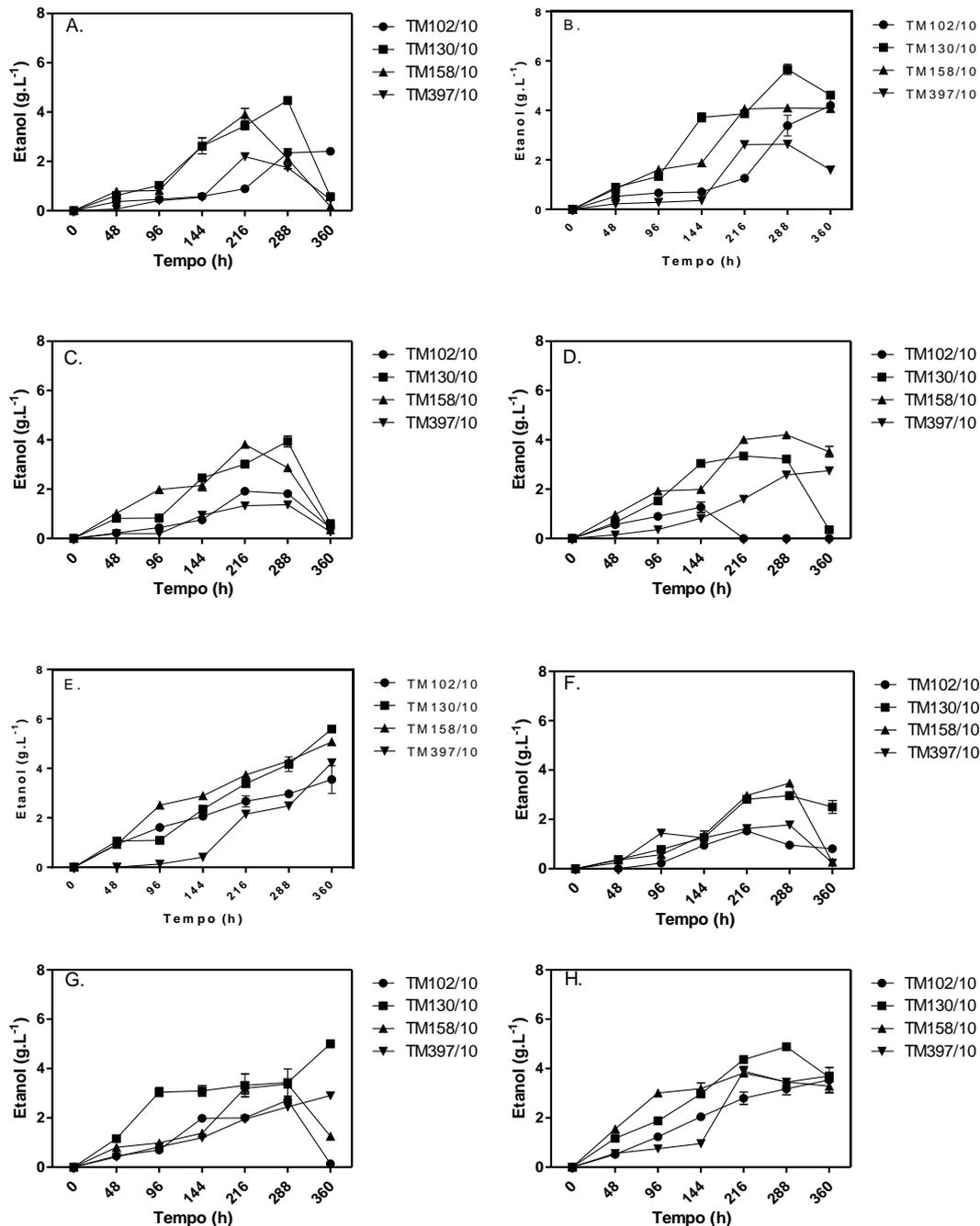


**Figura 12.** Consumo de xilose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C).

A produção de etanol obtida nas diferentes condições de pH e temperatura analisadas, apresentam-se na **Figura 13** para as quatro linhagens estudadas empregando glicose e xilose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

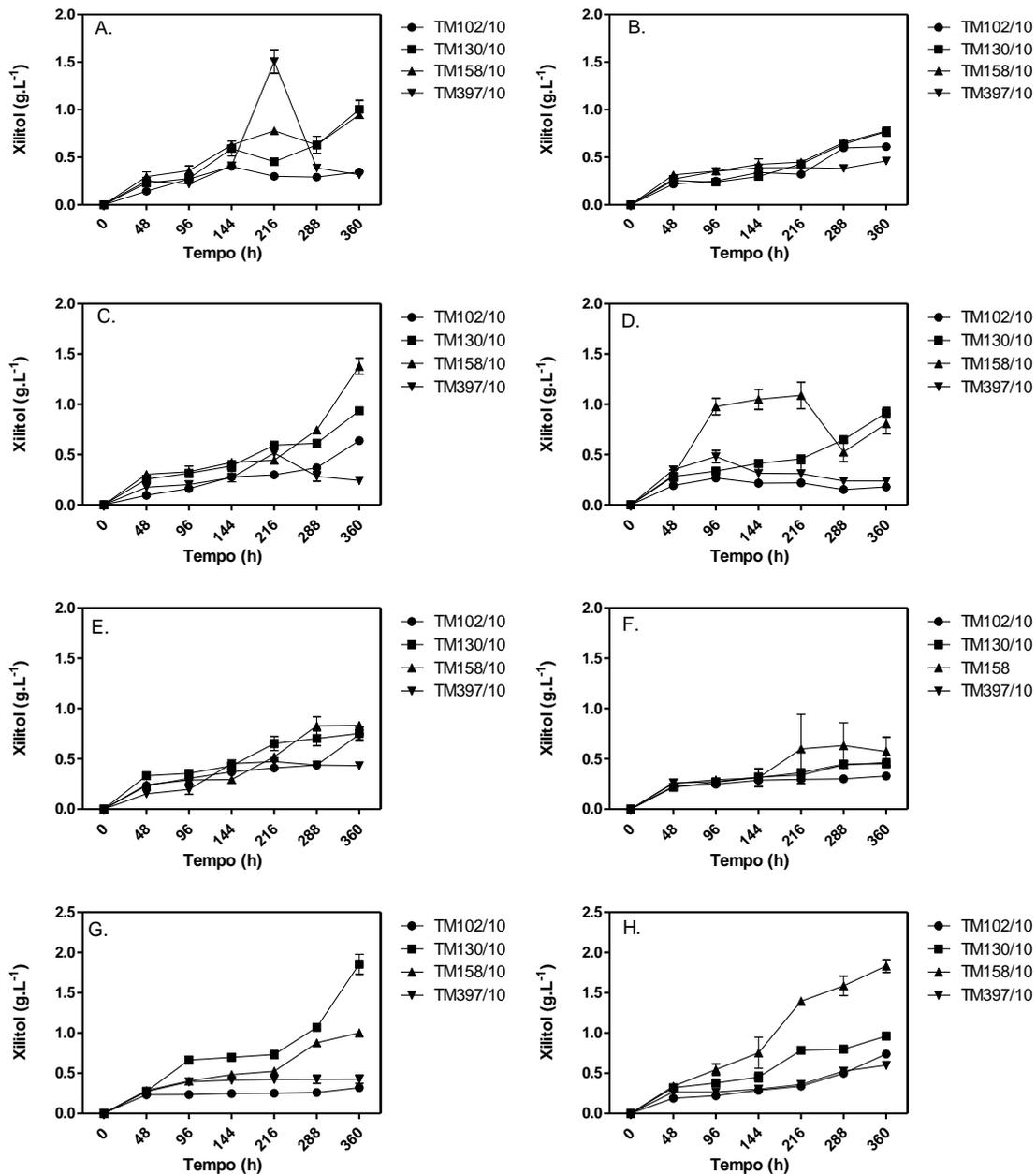
As maiores concentrações de etanol nas condições A, B, C, E, G e H foram obtidas com o emprego da linhagem *T. membranacea* TM130/10. Para as condições D e F a linhagem *T. membranacea* TM158/10 apresentou as maiores concentrações. Destacam-se as maiores produções obtidas nas condições B – pH 4 e 28°C de  $5,65 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$  (288 h) e E – pH 5 e 24°C de  $5,59 \pm 0,05 \text{ g.L}^{-1}$  (360 h).



**Figura 13.** Concentração de etanol produzido a partir de xilose em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C) com meio contendo glicose e xilose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A **Figura 14**, apresenta a concentração obtida para xilitol em função do tempo nas diferentes condições de pH e temperatura para as quatro linhagens de *T. membranacea* estudadas. Observa-se que as maiores concentrações de xilitol para as condições B, C, D, E, F e H foram da linhagem TM158/10. Para condição A (**Figura 14A**) a maior concentração da linhagem TM397/10 e para condição G (**Figura 14G**) a linhagem TM130/10 a maior concentração desta condição.



**Figura 14.** Concentração de xilitol em função do tempo nas diferentes condições, onde: A (pH 3, 28°C); B (pH 4, 28°C); C (pH 3, 24°C); D (pH 4, 24°C); E (pH 5, 24°C); F (pH 3, 32°C); G (pH 4, 32°C); H (pH 5, 32°C) com glicose e xilose.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Conforme os resultados obtidos para as oito condições de pH e temperatura analisados, considerando as concentrações de etanol e xilitol obtidas. A condição pH 5 e temperatura 32°C (H) foi selecionada para realização do ensaio, onde os açúcares do meio T foram substituídos por açúcares obtidos da biomassa lignocelulósica de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado.

Os dados obtidos neste trabalho são comparados com os dados obtidos nos trabalhos de Okamoto *et al.*(2010, 2011, 2012 e 2014), conforme **Tabela 6**. Verifica-se que os dados obtidos neste trabalho, embora ainda sejam inferiores aos obtidos nos trabalhos do grupo de pesquisa de Okamoto, indicam o potencial de aproveitamento desta linhagem *T. membranacea* TM158/10 para produção simultânea de etanol e xilitol, embora ainda seja necessário otimização dos parâmetros de produção.

Considerando que, apenas alguns micro-organismos são capazes de fermentar xilose a etanol, as concentrações superiores de etanol apresentam-se quando utilizada a glicose como substrato, necessitando de um tempo menor. Quando comparado o mesmo fungo, porém utilizando como fonte de carbono a xilose e a biomassa lignocelulósica. Verifica-se que o *Trametes hirsuta* apresenta praticamente a metade da concentração de etanol ao utilizar xilose ou material lignocelulósico. Observa-se também que o tempo de processo é superior quando a xilose é a fonte de carbono. Enquanto, para o *T. versicolor* KT9427 as maiores concentrações de etanol foram para glicose, xilose, seguida por ambas biomassas lignocelulósicas estudadas. O tempo de fermentação ao utilizar a xilose e a biomassa lignocelulósica foi o mesmo. Quanto ao resíduo de arroz adotado como biomassa lignocelulósica para *Trametes hirsuta* e *T. versicolor* KT9427, é possível observar concentração semelhante de etanol em igual tempo de processo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 6. Produção de etanol e xilitol por diferentes macromicetos.

Fungo	Substrato (g.L <sup>-1</sup> )	Condição	Etanol (g.L <sup>-1</sup> ) Tempo (h)	Xilitol (g.L <sup>-1</sup> ) Tempo (h)	Referência
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 3, 28°C	4,5 288	1,0 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 4, 28°C	5,6 288	0,8 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 3, 24°C	3,9 288	0,9 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 5, 24°C	5,6 360	0,8 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 4, 32°C	5,0 360	1,8 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM130/10	10 glicose e 10 xilose	pH 5, 32°C	4,9 288	1,0 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 4, 24°C	4,2 288	1,1 216	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 3, 32°C	3,5 288	0,6 216	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 4, 28°C	4,1 288	0,8 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 3, 24°C	3,8 216	1,4 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 5, 24°C	5,1 360	0,8 288	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM158/10	10 glicose e 10 xilose	pH 5, 32°C	3,8 216	1,8 360	Este trabalho
<i>T. membranacea</i> TM397/10	10 glicose e 10 xilose	pH 3, 28°C	2,2 216	1,5 216	Este trabalho
<i>Peniophora cinerea</i>	20 glicose	pH 6, 28°C	8,1 384	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2010.
<i>Trametes suaveolens</i>	20 glicose	pH 6, 28°C	7,7 432	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2010.
<i>Trametes hirsuta</i>	20 glicose	n.i..	9,7 72	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2011.
<i>Trametes hirsuta</i>	20 xilose	n.i..	3,9 144	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2011.
<i>Trametes hirsuta</i>	20 resíduo de arroz	n.i..	4,3 96	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2011.
<i>Neolentinus lepideus</i>	20 glicose	n.i..	7,6 48	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2012.
<i>Neolentinus lepideus</i>	20 xilose	n.i..	6,5 96	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2012.
<i>T. versicolor</i> KT9427	20 glicose	pH4, 28°C.	9,2 72	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2014.
<i>T. versicolor</i> KT9427	20 xilose	pH4, 28°C.	7,9 96	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2014.
<i>T. versicolor</i> KT9427	20 farelo de trigo	28°C.	5,0 96	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2014.
<i>T. versicolor</i> KT9427	20 resíduo de arroz	28°C.	4,8 96	–	Okamoto <i>et.al.</i> , 2014.

n.i.: não informado

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

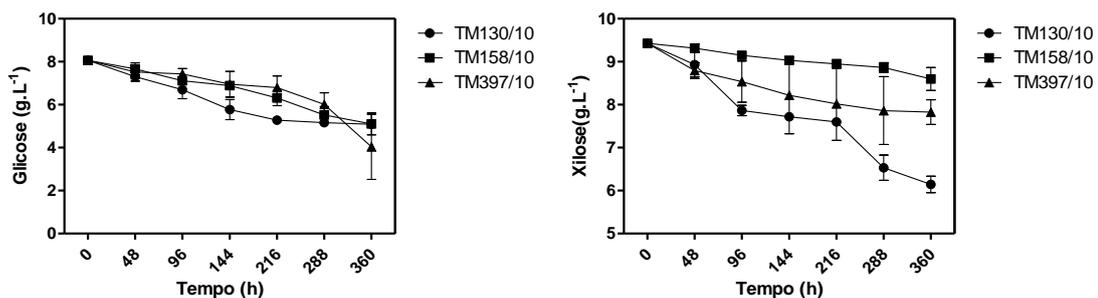
Observam-se na **Tabela 6** que o presente estudo utilizando glicose e xilose como fonte de carbono, produziu ambos os produtos de interesse, etanol e xilitol. Enquanto, Okamoto *et.al.* (2011) utilizando a linhagem *Trametes hirsuta* e 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose obteve apenas 3,9 g.L<sup>-1</sup> de etanol em 144 horas de processo. Okamoto *et.al.* (2012) realizou estudo com a linhagem *Neolentinus lepideus* e 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose, obtendo 6,5 g.L<sup>-1</sup> de etanol em 96 horas. Também Okamoto *et.al.* (2014) em estudo realizado nas condições pH 4 e temperatura de 28°C, utilizando *Trametes versicolor* KT9427, obteve apenas a formação de etanol, 7,9 g.L<sup>-1</sup> de produto, através de 20 g.L<sup>-1</sup> de xilose, em 96 horas. Verifica-se que este trabalho obteve concentrações menores dos produtos e maior tempo de processo, em contrapartida Okamoto apresenta concentrações maiores, em menor tempo, mas apenas a formação de etanol.

### 5.6 Produção de etanol e xilitol a partir de açúcares obtidos da hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar

Para a realização da hidrólise da biomassa lignocelulósica utilizou 10% de bagaço de cana-de-açúcar, com 10 FPA.g<sup>-1</sup> de substrato, a 50°C durante 48 horas. Para o ensaio com meios contendo açúcares obtidos da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar, selecionou-se as linhagens *T. membranacea* TM130/10, TM158/10 e TM397/10, pois a linhagem TM102/10 não apresentou concentrações significativas de ambos os produtos nas condições estudadas.

As 3 linhagens selecionadas foram submetidas a 360 horas de processo, nas condições de pH 5 e temperatura 32°C, conforme **Figura 15**, pode-se observar o consumo de glicose e xilose em função do tempo de processo.

Observa-se na **Figura 15** que o maior consumo de glicose ocorreu com a linhagem TM397/10 durante as 360 horas de processo, enquanto que o maior consumo de xilose aconteceu no mesmo tempo de processo, porém para linhagem TM130/10. Ressalva-se ainda que nenhum açúcar foi consumido completamente ao longo do ensaio.

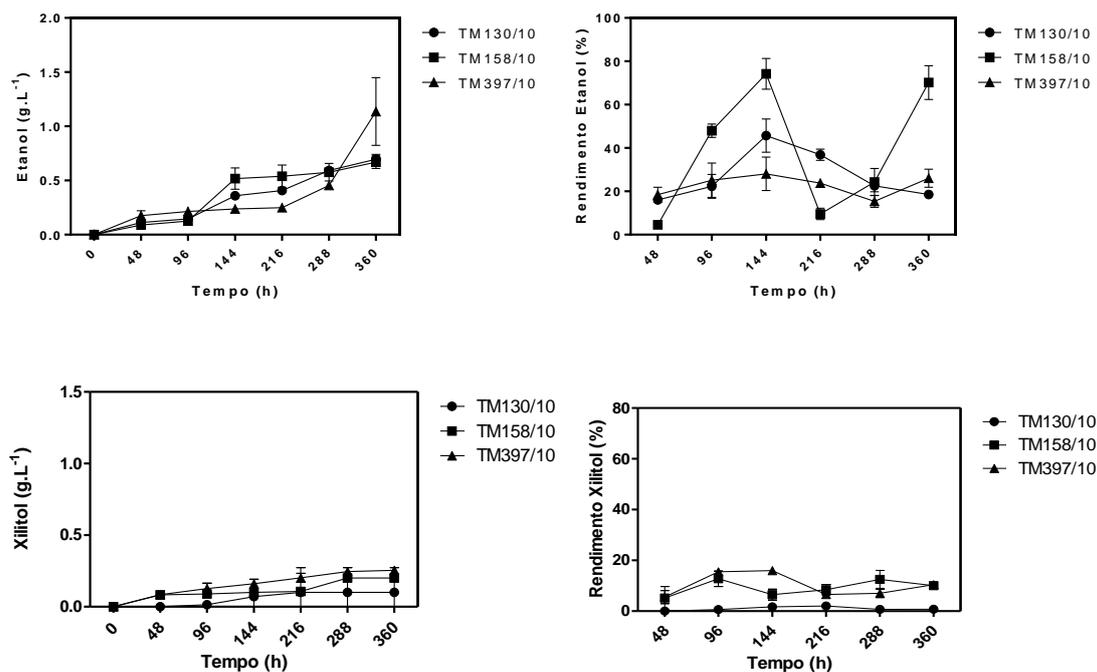


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Figura 15.** Consumo de glicose e xilose por diferentes linhagens de *T. membranacea*. Os açúcares foram obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente.

A **Figura 16** apresenta a concentração dos produtos de interesse, etanol e xilitol ao longo do ensaio com seus respectivos rendimentos percentuais. Observa-se que a linhagem que proporcionou a maior produção de ambos produtos é a linhagem *T. membranacea* TM397/10 no tempo de 360 horas de processo. Quanto ao rendimento percentual, a linhagem TM158/10, apresenta o maior rendimento para etanol durante 144 horas de ensaio e para o rendimento em xilitol a linhagem TM130/10 apresenta o maior rendimento durante as 144 horas de processo.

A linhagem *T. membranacea* TM397/10, apresenta o maior consumo de glicose obtido da hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar quando comparada as linhagens *T. membranacea* TM130/10 e *T. membranacea* TM158/10, apresentando também maior concentração para etanol e xilitol quando comparada as mesmas.



**Figura 16.** Concentração dos produtos etanol e xilitol através da fermentação de açúcares obtidos a partir de bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente em função do tempo, com seus respectivos rendimentos percentuais.

A partir dos resultados observados neste trabalho, verificou-se que existe potencial para o aproveitamento de linhagens de *T. membranacea* para a conversão de pentoses. No entanto este processo precisa ser ainda otimizado, visto que os dados obtidos indicam a necessidade de longos tempos de processo, o que dificultaria sua aplicação industrialmente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Alternativas como investigar nutrientes que auxiliem na formação de micélios e utilização de maiores concentrações destes micélios para converter pentoses poderia ser uma alternativa. Ainda, considerando que existem poucos estudos sobre a bioconversão de xilose em etanol e xilitol, sendo os trabalhos de Okamoto *et. al.* (2010, 2011, 2012 e 2014) os de maior relevância na execução do presente estudo, este trabalho é o primeiro a identificar linhagens de *T. membranacea* para como capazes de bioconverter pentoses em etanol e xilitol.

## 6 CONCLUSÕES

A partir da análise dos resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

- para bioconversão de pentoses aos produtos de interesse, etanol e xilitol deve ser realizada em anaerobiose;
- todos macromicetos, inicialmente escolhidos foram capazes de produzir xilitol a partir de xilose, destacando-se as linhagens *Trametes membranacea* com maiores rendimentos;
- ao utilizar apenas glicose como fonte de carbono, a linhagem *T. membranacea* TM130/10 apresentou a maior concentração de etanol, mas o maior rendimento para a linhagem *T. membranacea* TM102/10. Em relação ao xilitol, a maior concentração e rendimento foram obtidos por *T. membranacea* TM158/10;
- no meio T composto por 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 10 g.L<sup>-1</sup> de xilose, a maior concentração em etanol foi obtida pela linhagem *T. membranacea* TM158/10 e o maior rendimento a linhagem *T. membranacea* TM397/10. Quanto ao xilitol obteve-se a maior concentração e rendimento com *T. membranacea* TM158/10. O meio T (2x) contendo apenas o açúcar glicose favoreceu a formação de etanol, quando comparado ao mesmo meio contendo apenas xilose ou a mistura de glicose e xilose;
- as diferentes condições de pH e temperatura testadas, favoreceram a escolha pela condição pH 5,0 e temperatura de 32°C, considerando as concentrações obtidas para etanol e xilitol através das 4 linhagens avaliadas e o consumo de glicose e xilose durante as 360 horas de fermentação.
- a linhagem *T. membranacea* TM397/10 apresentou o maior consumo de glicose e as maiores concentrações para etanol e xilitol, quando comparada as outras duas linhagens estudadas quando utilizado os açúcares obtidos do bagaço de cana-de-açúcar hidrolisado enzimaticamente.

Os resultados descritos no presente trabalho indicam a capacidade de produção de etanol e xilitol através de macromicetos *Trametes membranacea*, utilizando a biomassa lignocelulósica de bagaço de cana-de açúcar.

## **7 PERSPECTIVAS**

Como perspectiva para a continuação deste estudo sugere-se:

- estudar a aplicação de culturas mistas (leveduras + macromicetos) para bioconverter os açúcares obtidos da biomassa lignocelulósica;
- avaliar diferentes concentrações de biomassa em diferentes tempos;
- realizar o processo de bioconversão empregando concentrações maiores de células, em menor tempo;
- avaliar a utilização de diferentes biomassas lignocelulósicas.

## REFERÊNCIAS

- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D.B. Biomass pretreatment: fundamentals toward application. **Biotechnol Adv.**, 29:675–685, 2011.
- AITA, G. M.; KIM, M. **Sustainability of the sugar and sugar-ethanol industries**. ACS symposium series. In: Eggleston G, editor., 8:117–145, 2010.
- AKIYAMA, H.; ONO, T.; HUH, W.K.; YAMASAKI, O.; OGAWA, S.; KATSUYAMA, M.; ICHIKAWA, H.; IWATSUKIA, K. Actions of farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, 48: 122-128, 2002.
- ALBUQUERQUE, T.L.; SILVA, I.J.J.; MACEDO, G. R.; ROCHA, M.V.P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, 49: 1779–1789, 2014.
- ALVIRA P.; TOMÁS-PEJÓ E.; BALLESTEROS M.; NEGRO M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technol.**, 101: 4851–4861, 2010.
- AMMONS, M.C.B.; WARD, L.S.; DOWD S.; JAMES, G. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. **Int J Antimicrob Agents**, 37:316–323, 2011.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. **Biotechnol. Biofuel.**, 4: 3, 2011.
- ARRUDA, P.V.; RODRIGUES, R.D.C.L.B.; SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.D.G.D.A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, 22:815–822, 2011.
- BAK, J. S.; KO, J.K.; CHOI, I.-G.; PARK, Y.-C.; SEO, J.-H.; KIM, K.H. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. **Biotechnol. Bioeng.**, 104: 471-482, 2009.
- BAK, J. S.; KIM, M. D.; CHOI, L. G.; KIM, K. H. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens*. **New Biotechnol.**, 27: 424-434, 2010.
- BÄR, A. Xylitol L. In: O'Brien Nabors L, Gelardi RC, editors. **Alternative sweeteners**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1991. p. 341-379.

**REFERÊNCIAS**

---

- BARBOSA, M.F.S.; DE MEDEIROS, M.B.; DE MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **J. Ind. Microbiol.** 3: 241–251, 1988.
- CADETE, R. M.; SANTOS, R. O.; MELO, M. A.; MOURO, A.; GOLÇALVES, D. L.; STAMBUK, B. U.; ROSA, C. A. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS Yeast Res.**, 9: 1338-1342, 2009.
- CANETTIÈRE, E.V. Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto. 2004. 146 f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista, Guaratinguetá, 2004.
- CANILHA, L.; SILVA I J.B.A.E.; FELIPE M.G.; CARVALHO W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnol. Lett.**, 25:1811-1814, 2003.
- CARRIER, M.; LOPPINET-SERANI, A.; DENUX, D.; LASNIER, J.; HAM-PICHAVANT, F.; CANSELL, F.; AYMONIER, C. Thermogravimetric analysis as a new method to determine the lignocellulosic composition of biomass. **Biomass bioenergy.**, 35: 298-307, 2011.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **J. Sci. Ind. Res.**, 67:849–64, 2008;
- CHANDEL, A. K.; SINGH, O. V.; RAO, L. V. Biotechnological application of hemicellulosic derived sugar: state-of-the-art. **Sustain. Biotechnol.: renew. resource new perspective.** , 63-81, 2010.
- CHANDRA, R. P.; BURA, R.; MABEE, W.; BERLIN, A.; PAN, X.; SADDLER, J.. Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics?. **Biofuel.**, 108: 67-93, 2007.
- CHAKRABORTY, S.; ANIKET; GAIKWAD, A. Mixing Effects in Cellulase-Mediated Hydrolysis of Cellulose for Bio-Ethanol Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 49: 10818-10825, 2010.
- CHANG, V.S., HOLTZAPPLE, M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 84: 5–37, 2000.
- CHENG, K. K.; LING, H. Z.; ZHANG, J.A.; PING, W. X.; HUANG, W.; GE, J.P.; XU, J.M.. Strain Isolation and Study on Process Parameters for Xylose-to-Xylitol Bioconversion. **Biotechnol. Biotec. Eq.**, 24: 1606-1611, 2010.

## REFERÊNCIAS

---

- CHEUNG, S. W.; ANDERSON, B. C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary waste water. **Bioresour. Technol.**, 59: 81- 96, 1997.
- DAHAN, K.M.; DAVIS, B.P.; PITTMAN, P.E.; KENEALY, W.R; JEFFRIES, T.W. Increased xylose reductase activity in the xylose-fermenting yeast *Pichia stipites* by overexpression of XYL1. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 57/58: 267-276, 1996.
- DANHAUER, J.L.; KELLY, A.; JOHNSON, C.E. Is mother-child transmission a possible vehicle for xylitol prophylaxis in acute otitis media? **Int J Audiol.**, 50:661-672, 2011.
- DIAS, M.O.S.; JUNQUEIRA, T.L.; JESUS, C.D.F.; ROSSELL, C.E.V.; MACIEL, F.R.; BONOMI, A.Improving second generation ethanol production through optimization of firstgeneration production process from sugarcane. **Energy**, 43:246-252, 2012.
- DIAS, A. A.; FREITAS G.S.; MARQUES G.S.M.; SAMPAIO A.; FRAGA I.S.; RODRIGUES M.A.M.; EVTUGUIN .D.V; BEZERRA R.M.F. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresour. Technol.**, 101: 6045-6050, 2010.
- DILLON, A.J.P. Celululases. In.: Enzimas como agentes biotecnológicos. Editado por Said, S.; Pietro, R.C.L.R. Editora Legis Summa, 243-269, 2004.
- DING, X.; XIA, L. Effect of aeration rate on production of xylitol from corn cob hemicellulose hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotech.**, 133: 263-270,2006.
- DRAUDE, K.M., KURNIAWAN, C.B., DUFF, S.T.B. Effect of oxygen delignification on the rate and extent of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic material. **Bioresour. Technol.**, 79: 113-120, 2001.
- EBRINGEROVÁ, A., HROMADKOVA, Z., HEINZE, T. Hemicellulose. **Adv. Polym. Sci.**, 186: 1-67, 2005.
- EDELSTEIN, S.; SMITH, K.; WORTHINGTON, A.; GILLIS, N.; BRUEN, D.; KANG, S.H.; GILPIN, K.; ACKERMAN, J.; GUIDUCCI, G. Comparisons of six new artificial sweetener gradation ratioswith sucrose in conventional-method cupcakes resulting in best percentagesubstitution ratios. **J. Cul. Sci. Technol.**, 5:61-74, 2008.
- ESPOSITO, E.; AVEVEDO, J. L. de. **Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: Educs, p. 9- 222, 2010.
- FAN, L. T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose Hydrolysis. Berlin, Germany: **Springer-Verlag.**, 3:168, 1987.
- FENGEL, D.; WEGNER G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 610 - 613, 1989.

**REFERÊNCIAS**

---

- FISKER, H.O.; NISSEN, V. Effect of gum base and bulk sweetener on release of specific compounds from fruit flavoured chewing gum. **Dev Food Sci.**, 46:429–432, 2006.
- FRANCESCHIN, G.; SUDIRO, M.; INGRAM, T.; SMIRNOVA, I.; BRUNNER, G.; BERTUCCO, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chem Eng Res Des.**, 89:631–640, 2011.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. A review of the production of ethanol from softwood. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 59:618-628, 2002.
- GARDONYI, M.; HAHN- HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme Microbiol. Technol.**, 32: 252–259, 2003.
- GÍRIO, F. M. et al. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresour. Technol.**, 101: 4775-4800, 2010.
- GOMEZ, L. D.; STEELE-KING, C. G.; MCQUEEN-MASON, S. J. Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls. **New Phytol.**, 178: 473-485, 2008.
- HAHN- HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microb. Tech.**, 16: 933-943, 1994.
- HAHN- HÄGERDAL, B.; WAHLBOM, C. F.; GÁRDONYI, M.; VAN ZYL, W. H.; OTERO, R. R. C.; JONSSON, L. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for xylose utilization. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 73: 53-84, 2001.
- HONGZHI, L.; KEKE, C.; JINGPING, G.; WENXIANG, P. Statistical optimization of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by *Candida tropicalis* HDY-02. **Nat Biotechnol.**, 28:673–678, 2011.
- HUANG, C.-F.; JIANG, Y.-F.; GUO, G.-L.; HWANG, W.-S. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresour. Technol.**, 102: 3322-3329, 2011.
- IMAZATO, S.; IKEBE, K.; NOKUBI, T.; EBISU, S.; WALLS, A.W. Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. **J Oral Rehabil.**, 33:137–143, 2006.
- ISHOLA, M. M.; BRANDBERG, T.; TAHERZDEH, M. Simultaneous glucose and xylose utilization for improved ethanol production from lignocellulosic biomass through SSFF with encapsulated yeast. **Biomass and Bioenergy**, 77: 192-199, 2015.
- JAFFE, G.M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P.H. Process for producing xylose. **US Patent no.3,784,408**; 1974.

## REFERÊNCIAS

---

- JEFFRIES, T.W.; SHI, N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, 65: 117–161, 1999.
- JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 17:320–326, 2006.
- JEFFRIES, T. W.; GRIGORIEV, I. V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J. M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.S.U.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature Biotechnol.**, 25: 319-326, 2007.
- JEYA, M.; ZHANG, Y.-W.; KIM, I.-W., LEE, J.-K. Enhanced saccharification of alkali-treated rice straw by cellulase from *Trametes hirsuta* and statistical optimization of hydrolysis conditions by RSM. **Bioresour. Technol.**, 100: 5155-5161, 2009.
- KADAM, K. L.; CHIN, C. Y.; BROWN, L. W. Flexible biorefinery for producing fermentation sugars, lignin and pulp from corn stover. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v.35, p. 331-341, 2008.
- KELLOWAY, A.; DAOUTIDIS, P. Process synthesis of biorefineries: optimization of biomass conversion to fuels and chemicals. **Ind Eng ChemRes.**, 53:5261–5273, 2014.
- KIM, S. R.; PARK, Y.; JIN, Y.; SEO, J. Strain engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced xylose metabolism. **Biotechnol. Adv.**, 31: 851-861, 2013.
- KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39:1820-1823, 1995.
- KUHAR, S.; NAIR, L.M.; KUHAD, R.C. Pretreatment of lignocellulosic material with fungi capable of higher lignin degradation and lower carbohydrate degradation improves substrate acid hydrolysis and the eventual conversion to ethanol. **Can. J. Microbiol.**, 54:305–13, 2008.
- KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of cellulose and xylanase enzyme on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. **Biotechnol. Prog.** 25: 302-314, 2009.
- LEE, S.H.; CHOI, B.K.; KIM, Y.J. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. **Arch Oral Biol.**, 57:697–703, 2011.
- LEVONEN-MUÑOZ, E.; BONE, D.H.; DAUGULIS, A.J. Solid state fermentation and fractionation of oat straw by basidiomycetes. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, 18: 120–123 1983.

## REFERÊNCIAS

---

- LI C.; KNIERIM, B.; MANISSERI, C.; ARORA, R.; SCHELLER, H.V.; AUER, M.; VOGEL, K.P.; SIMMONS, B.A.; SINGH, S. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switch grass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresour. Technol.**, 101: 4900–4906, 2010.
- LYND, R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnol. Prog.**, 15: 777–793, 1999.
- MA, F.; YANG, N.; XU, C.; YU, H.; WU, J.; ZHANG, X. Combination of biological pretreatment with mild acid pretreatment for enzymatic hydrolysis and ethanol production from water hyacinth. **Bioresour. Technol.**, 101: 9600–9604, 2010.
- MACEDO, I. C., NOGUEIRA, L. A. H. **Cadernos do Núcleo de Assuntos Estratégicos. Seção 2: Avaliação da Expansão da Produção de Etanol no Brasil**, 141, 2005.
- MAIORELLA, B.L., Ethanol, In: Moo, Young (Eds.), **Comprehensive Biotechnology**. Pergamon, Oxford, 862–914, 1985.
- MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - its properties and use as a sugar substitute in foods. In: **F. R. A. Symposium on sugar and sugar replacements**, 10, London, 1973.
- MATTILA, P. T.; KNUUTTILA, M. L. E.; SVANBERG, M. J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin - diabetic rats. **Metabolism**, 47: 578–583, 1998a.
- MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; KNUUTTILA, M. L. E. Dietary xylitol protects against osseal changes in experimental osteoporosis. In: BURCKHARDT, P., ed. **Nutritional aspects of osteoporosis. Norwell: A Serono Symposia S. A. Publication**, 16: 157–162, 1998.
- MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; PÖKKÄ, P.; KNUUTTILA, M. L. E. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **J. Nutr.**, 128: 1811–1814, 1998c.
- MATTILA, P., KNUUTTILA, M., KOVANEN, V., SVANBERG, M. Improved bone biomechanical properties in rats after oral Xylitol administration. **Calcified Tissue Int.**, 64: 340–344, 1999.
- MATTILA, P.T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M.L.E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism**, 54: 548–551, 2005.
- MELAJA, A.J.; HAMÄLÄINEN, L. Process for making Xylitol. **US Patent no.** 4,008,285; 18 June 1975, publ. 15 February 1977.

**REFERÊNCIAS**

---

- MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; GUPTA, P.; DUTT, K.; SAXENA, R.K. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 101:393–402, 2012.
- MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A.H.; TABATABAEI, M.; JOUZANI, G.S.; NAJAFI, G.H.; GHOLAMI, M.; ARDJAMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renew. Sust. Energ. Rev.**, 27: 77-93, 2013.
- MTUI, Y.S. Recent advances in pretreatment of lignocellulosic wastes and production of value added products. **Afr. J. Biotechnol.**, 8:1398–415, 2009.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochem**, 30:117–124, 1995.
- NGUYEN, N.H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycol. Res.**, 110: 1232-1241, 2006.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI BELLOY, L.; DELGENES, J.P.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from xylose by two strains: sugar tolerance. **Curr. Microbiol.** 27: 191–197, 1993.
- NONAKA, C. F. W.; GOULART FILHO, J. A. V.; PEREIRA, K. M. A.; QUEIROZ, L. M. G.; PINTO, L. P. Metabolismo dos açúcares por bactérias orais envolvidas no processo de cárie – uma revisão dos aspectos atuais. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, 4: 107-113, 2005.
- NOVACANA. Disponível em: <<http://www.novacana.com/etanol>> Acesso em 17 fev. 2016.
- OKAMOTO, K.; IMASHIRO, K.; AKIZAWA, Y.; ONIMURA, A.; YONEDA, M.; NITTA, Y.; MAEKAWA, N.; YANASE, H. Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. **Biotechnol. Lett.**, 32: 909-913, 2010.
- OKAMOTO, K.; NITTA, Y.; MAEKAWA, N.; YANASE, H. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. **Enzyme Microb. Tech.**, 48: 273-277, 2011.
- OKAMOTO, K.; KANAWAKU, R.; MASUMOTO, M.; YANASE, H. Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. **Enzyme Microb. Tech.** 50: 96-100, 2012.
- OKAMOTO, K.; UCCHI, A.; KANAWAKU, R.; YANASE, H. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. **SpringerPlus**, 3: 1-9, 2014.

## REFERÊNCIAS

---

- PALACIOS-BERECHE, R.; ENSINAS, A.; MODESTO, M.; NEBRA, S.A. New alternatives for the fermentation process in the ethanol production from sugarcane: Extractive and low temperature fermentation. **Energy**, 1-10, 2014.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresour. Technol.**, 74: 17-24, 2000.
- PENG, F.; REN, J.L.; XU, F., PENG, P.; SUN, R.C. Fractionation and characterization of alkali-extracted hemicelluloses from peashrub. **Biomass Bioenerg.**, 39: 20-30, 2012.
- PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar - free confections. **Food technol.**, v.42, n.10, 1988.
- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; DE-LA-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.**, 5:53–63, 2002.
- PETSCHACHER, B.; NIDETZKY, B. Altering the coenzyme preference of xylose reductase to favor utilization of NADH enhances ethanol yield from xylose in a metabolically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb. Cell Fact.**, v.7, n. 9, 2008.
- PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G., DU PREEZ, J.C. Fermentation of D-xylose by the yeast *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: prospects and problems. **Process. Biochem.**, 24: 21–32, 1989.
- RIA-MILLATI, I.; SYAMSIAH, S.; NIKLASSON, C.; CAHYANTO, M.N.; LUNDQUIST, K.; TAHERZADEH, M.J. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. **Bioresources**, 6:1–36, 2011.
- RYABOVA, O.B.; CHMIL, O.M.; SIBIRNY, A. A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermo tolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. **FEMS Yeast Research**, 4:157–164, 2003.
- SALEH, A. A.; WATANABE, S.; ANNALURU, N.; KODAKI, T.; MAKINO, K. Construction of various mutants of xylose metabolizing enzymes for efficient conversion of biomass to ethanol. **Nucleic. Acid. Symp. Ser.**, 50: 279-280, 2006.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, 30: 279-291, 2003.
- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnol. Adv.**, 27: 185–194, 2009.
- SARITHA, M.; ARORA, A.; LATA. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. **Indian J. Microbiol.**, 52: 122-130, 2012.

## REFERÊNCIAS

---

- SASAKI, K.; SASAKI, D.; SAKIHAMA, Y.; TERAMURA, H.; YAMADA, R.; HASUNUMA, T.; OGINO, C.; KONDO, A. Ethanol fermentation by xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae* using sugars in a rice straw liquid hydrolysate concentrated by nanofiltration. **Bioresource Technology**, 147: 84-88, 2013.
- SHEEHAN, J.; HIMMEL, M. Enzymes, energy, and the environment: a strategic perspective on the US department of energy ' s research and development activities for bioethanol. **Biotechnology Progress**, 15: 817-827 1999.
- SHI, J.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; CHIM, M.; HOWELL, N. Effect of microbial pretreatment on enzymatic hydrolysis and fermentation of cotton stalks for ethanol production. **Biomass Bioenerg.**, 33: 88-96, 2009.
- SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial production of ethanol. In: Singh A, Mishra P, editors. Microbial pentose utilization: current application in biotechnology. Progress in industrial microbiology, vol. 33. **The Netherlands: Elsevier Science B.V.**; 147-96, 1993.
- SINGH, P.; SUMAN, A.; TIWARI, P.; ARYA, N.; GAUR, A.; SHRIVASTAVA, A. K. Biological pretreatment of sugarcane trash for its conversion to fermentable sugars. **World J. Microb. Biot.**, 24: 667-673, 2008.
- SINGH, L.K.; CHOUDHARY, G.; MAJUNDER, C.B.; GHOSH, S. Utilization of hemicellulosic fraction of lignocellulosic biomaterial for bioethanol production. **Adv. Appl. Sci. Res.**, 2:508-21, 2011.
- SOKMEN, A.; GUNES, G. Influence of some bulk sweeteners on rheological properties of chocolate. **LWT – Food Sci Technol Int.**, 39:1053-1058, 2006.
- STAMBUK, B. U.; FRANDEN, M. A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 105, n. 108: 255-263, 2003.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic waste to improve ethanol and biogas production: a review. **Int. J. Mol. Sci.**, 9: 1621-1651, 2008.
- TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. **J. Biosci. Bioeng.**, 100: 637-643, 2005.
- TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKÄHEIMO, I.; UHARI, M. Ultra-structure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. **J Antimicrob Chemother**, 54:225-228, 2004.

## REFERÊNCIAS

---

- TAVARES, J. M.; DUARTE, L. C.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; GÍRIO, F. M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaryomyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme Microb. Tech.**, 26: 743-747, 2000.
- THEANDER, O.; WESRTLUND, E.; AMAN, P. Structure and components of dietary fiber. **Cereal Food World**, 38: 135-141, 1993.
- UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA-DE-AÇÚCAR. Disponível em :<<http://www.unica.com.br/noticia/14883647920325965467/consumo-de-etanol-hidratado-cresceu-mais-de-37-por-cento-em-2015>> Acesso em 15 fev. 2016.
- VAN EYS, J.; WANG, Y. M.; CHAN, S.; TANPHAICHITR, V. S.; KING, S. M. xylitol as a therapeutic agent in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. **In: SIPPLE, H. L., McNUTT, K. W.**, eds. Sugars in nutrition. New York: Academic Press, p.613-631, 1974.
- VIEIRA-NETO, E., PEREIRA, C. N., FONSECA, A. A. Avaliação do desempenho de rastreamento neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de sangue em papel filtro. **Laes & Haes**, 119: 98-104, 1999.
- VOET, D. ; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 196 – 201, 2000.
- WANG, R.; LI, L.; ZHANG, B.; GAO, X.; WANG, D.; HONG, J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of axylose isomerase pathway. **J Ind Microbiol Biotechnol.**, 40:841–854, 2013.
- WINKELHAUSENA, E.; MALINOVSKAA, R.J.; VELICKOVAA, E.; KUZMANOVAA, S. Sensory and microbiological quality of a baked product containing xylitol as an alternative sweetener. **Int J Food Prop.**, 10:639–649, 2007.
- WOHLBACH, D. J.; KUO, A.; SATO, T. K.; POTTS, K. M.; SALAMOV, A. A.; LABUTTI, K. M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGILINAN, J. L.; LINDQUIST, E. A.; LUCAS, S.; LAPIDUS, A.; JIN, M.; GUNAWAN, C.; BALAN, V.; DALE, B. E.; JEFFRIES, T. W.; ZINKEL, R.; BARRY, K. W.; GRIGORIEV, I. V.; GASCH, A. P. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **PNAS – Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 108: 13212-13217, 2011.
- WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: technology, economics, and opportunities. **Bioresour. Technol.**, 50:3–16, 1994.
- XIONG, M.; CHEN, G.; BARFORD, J. Genetic engineering of yeasts to improve ethanol production from xylose. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, 45: 32-39, 2014.

**REFERÊNCIAS**

---

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Adv. Food Res.**, 25:159-180, 1979.

ZADRAZIL, F.; BRUNNERT, H. Solid state fermentation of lignocellulose containing plant residues with *Sporotrichum pulverulentum* Nov. and *Dichomitus squalens* (Karst.) Reid. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 16 : 45-51, 1982.