

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Juliana Passamani Sandri

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURA RECOMBINANTE COM
ELEVADA TOLERÂNCIA A ETANOL POR ENGENHARIA EVOLUTIVA**

São Carlos- SP

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Juliana Passamani Sandri

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURA RECOMBINANTE COM
ELEVADA TOLERÂNCIA A ETANOL POR ENGENHARIA EVOLUTIVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora:

Prof^ª. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos- SP

2019

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE JULIANA PASSAMANI SANDRI APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 22 DE FEVEREIRO DE 2019.

BANCA EXAMINADORA:


Teresa Cristina Zangirofami
Orientadora, UFSCar


Thais Suzane Milessi Esteves
UNIFEI


Adilson José da Silva
UFSCar

Agradecimentos

À Deus, que é protetor e guia do meu caminho.

À minha família, que é a razão da minha vida: Sirlene, Dilceu e João. Por sempre me apoiar nos caminhos que escolhi seguir, incentivando meus estudos e acalmado meu coração nos momentos de dificuldade.

Às minhas amigas de infância, Renata, Julia, Luana e Bruna, que apesar da distância, sempre se fizeram presentes na minha vida.

À minha amiga e companheira de apartamento, Bru Pratto, pelas inúmeras vezes que me socorreu, pelas conversas, risos e festas compartilhados e por todo o suporte durante a trajetória acadêmica.

Aos amigos do mestrado, em especial Edi, Carol, Thiago e Ivan, pelas inúmeras ajudas, risadas e companheirismo. Agradeço imensamente por ter conhecido vocês e pela amizade sincera que sempre compartilhamos.

Às amigas de graduação, que estão dividindo os mesmos anseios em caminho ao futuro profissional na vida acadêmica, Millene, Patricia, Gabi e Carina.

Ao meu namorado, Reginaldo, pelo apoio, amor e compreensão em todos os momentos que precisei.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Teresa Cristina Zangirolami, pelo incentivo, paciência, ensinamento e exemplo de profissional.

À Universidade Federal de São Carlos e ao programa de Pós-Graduação de Engenharia Química por disponibilizarem laboratórios, equipamentos e diversos recursos que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa do Prof. Dr. Johan M. Thevelein, da K U Leuven, Bélgica, por ceder a linhagem de levedura utilizada na pesquisa.

À empresa Kerry, pelo fornecimento de material.

Aos órgãos financiadores desta pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001. E processo de nº 2016/10636-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). “As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

Resumo

O aproveitamento da fração hemicelulósica da biomassa é importante para viabilizar economicamente a produção industrial de bioetanol de segunda geração (2G). Linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não metabolizam xilose, mas estão disponíveis linhagens recombinantes dessa levedura capazes de assimilar eficientemente esse açúcar em condições fermentativas. No entanto, a implementação de um processo industrial de produção de etanol 2G utilizando linhagens recombinantes depende do desenvolvimento de estratégias de fermentação adequadas para a obtenção de etanol em altas concentrações a partir de hidrolisados de hemicelulose concentrados, contendo compostos inibidores. O objetivo deste estudo foi utilizar técnicas de Engenharia Evolutiva para adaptar a linhagem geneticamente modificada da levedura *S. cerevisiae* MDS 130, em condições fermentativas, a meio de cultivo contendo hidrolisado de hemicelulose destoxificado (HD) e concentrações de etanol superiores a 50 g.L⁻¹. A estratégia experimental adotada foi distribuída em 3 etapas principais. Na etapa 1, a linhagem parental foi avaliada em relação à tolerância ao etanol e aos inibidores. Na etapa 2, foram conduzidos os experimentos de Evolução Adaptativa, empregando-se a metodologia de transferências sucessivas para meios gradualmente enriquecidos com etanol e HD. Na etapa 3 fez-se a caracterização da linhagem evoluída, em experimentos similares aos da Etapa 1. Os experimentos foram acompanhados pela perda de massa associada à liberação de CO₂. A suspensão obtida ao final de cada fermentação foi caracterizada em termos de densidade ótica (600 nm) e viabilidade. As concentrações de açúcares e produtos presentes nas amostras filtradas foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A linhagem parental MDS 130 mostrou redução de 60 e 50 % na produtividade em etanol quando foi cultivada em meio formulado com HD e em YPX (extrato de levedura, peptona e xilose) suplementado com 40 g.L⁻¹ de etanol, respectivamente. Após 4 meses e 200 gerações, os experimentos de Evolução Adaptativa foram concluídos. As linhagens mutantes obtidas apresentaram melhor tolerância ao etanol e aos inibidores, mantendo viabilidade final de 80 % em meios formulados apenas com HD e contendo até 70 g.L⁻¹ de etanol. Nos experimentos de caracterização, as células evoluídas apresentaram desempenho superior à linhagem parental em todos os aspectos avaliados. Valores de rendimento, produtividade e viabilidade de 0,42 g.g⁻¹; 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹ e 90%, respectivamente, foram obtidos em cultivo em YPX suplementado com 60 g.L⁻¹ de etanol (DO₆₀₀ inicial de 0,1). Para DO₆₀₀ inicial 3, foi alcançada produtividade de 3,18 g.L⁻¹.h⁻¹ em meio xilose 120 g.L⁻¹, correspondendo ao triplo da observada com a linhagem parental na mesma condição. A tolerância ao etanol foi avaliada por meio da incubação de suspensões de células parentais ou evoluídas na presença de 60 g.L⁻¹ de etanol. A linhagem evoluída apresentou alta viabilidade por até 60 horas de incubação, enquanto a linhagem parental sofreu elevada perda de viabilidade a partir de 20 horas de exposição. Desta forma, além da obtenção de uma linhagem mais apta para fermentações industriais, o presente trabalho contribuiu para o desenvolvimento de uma metodologia de Evolução Adaptativa de fácil aplicação e acompanhamento, que permite a manutenção de condições fermentativas em cada batelada.

Palavras chave: Levedura recombinante; Tolerância à etanol; Hidrolisado de hemicelulose; Evolução Adaptativa.

Abstract

The utilization of the hemicellulosic fraction of the biomass is important for the economic viability of the industrial production process for second generation bioethanol. Wild strains of *Saccharomyces cerevisiae* do not metabolize xylose, but there are recombinant strains of this yeast which are capable of efficiently assimilating this sugar under fermentative conditions are available. However, the implementation of an industrial process for the production of 2G ethanol using recombinant strains depends on the development of fermentation strategies suitable for obtaining ethanol at high concentrations from concentrated hemicellulose hydrolysates containing inhibitor compounds. The objective of this study was to use Evolutionary Engineering techniques to adapt the genetically modified strain of *S. cerevisiae* MDS 130, under fermentative conditions, to a culture medium containing detoxified hemicellulose (DH) hydrolysate and ethanol concentrations higher than 50 g.L⁻¹. The chosen experimental strategy comprised 3 main steps. In Step 1, the parental lineage was characterized in relation to its tolerance towards ethanol and inhibitors. In Step 2, the Adaptive Evolution experiments were performed using the methodology of successive transfers to media gradually enriched with ethanol and DH. In Step 3, the characterization of the evolved strain was performed in experiments which were similar to those carried out in Step 1. The experiments were followed by the loss of mass associated with CO₂ release. The suspension obtained at the end of each fermentation was characterized in terms of optical density (600 nm) and cell viability. The concentrations of sugars and products present in the filtered samples were determined by high performance liquid chromatography. The results of characterization of the MDS 130 parent strain showed 60 and 50% reduction in ethanol productivity when it was cultured in DH formulated medium and in YPX medium (yeast extract, peptone and xylose) supplemented with 40 g.L⁻¹ of ethanol, respectively. After 4 months and 200 generations, the Adaptive Evolution experiments were completed. The obtained evolved population presented better tolerance to ethanol and inhibitors, maintaining final viability of 80% in media formulated with DH only and containing up to 70 g.L⁻¹ of ethanol. In the characterization experiments, evolved cells showed superior performance in all evaluated aspects. Values of yield, productivity and viability of 0.42 g.g⁻¹; 0.11 g.L⁻¹.h⁻¹ e 90%, respectively, were achieved in cultivation using YPX medium supplemented with 60 g.L⁻¹ of initial ethanol OD₆₀₀ of 0.1. For initial OD₆₀₀ 3 a productivity as high as 3.18 g.L⁻¹.h⁻¹ from xylose 120 g.L⁻¹, which corresponds to 3-fold the value observed with the parental strain at the same condition. The ethanol tolerance was accessed by incubating the suspensions of parental or evolved cells in the presence of 60 g.L⁻¹. The evolved strain presented high viability up to 60 hours of incubation, while the parental strain suffered from intense viability loss after 20 hours. Thus, in addition to obtaining a strain that is more suitable for industrial fermentations, the present work contributed to the development of an Adaptive Evolution methodology that is easy to apply and follow, allowing the maintenance of fermentative conditions in each batch.

Key words: Recombinant yeast; Ethanol tolerance; Hemicellulose hydrolysate; Adaptive Evolution.

Índice de Ilustrações

Figura 1. Imagens da cana-de-açúcar e seus coprodutos, componentes da biomassa lignocelulósica.	23
Figura 2. Estrutura lignocelulósica, evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose.	24
Figura 3. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina após pré-tratamento.	25
Figura 4. Diagrama de fluxo de processo para a conversão da biomassa de cana em etanol 2G.	27
Figura 5. Representação esquemática da estrutura da hemicelulose.	28
Figura 6. Diagrama esquemático de duas possíveis vias metabólicas para o metabolismo da xilose.	30
Figura 7. Imagem ilustrativa da obtenção de células evoluídas após técnica de evolução adaptativa.	35
Figura 8. Imagens dos hidrolisados de hemicelulose: Bruto (a) e Destoxificado (b).	45
Figura 9. Micro-reatores utilizados para os experimentos.	46
Figura 10. Cultura de células MDS 130 ativada em placa com meio YPXA 2%.	51
Figura 11. Esquema de transferências utilizado no processo de Evolução Adaptativa.	55
Figura 12. Variação da densidade ótica versus massa de gás carbônico liberada normalizada para cultivos realizados em meio YPX 2% em micro-reator. DO ₀ : 0,1; T: 35 °C, estático.	62
Figura 13. Massa de gás carbônico liberada versus conversão de substrato no decorrer do processo fermentativo.	63
Figura 14. Variação da concentração de etanol versus variação da concentração de substrato, para determinação do rendimento em produto.	64
Figura 15. Massa de CO ₂ liberada na fermentação com a linhagem parental para os três meios empregados: HB, HD e YPDX. DO ₀ : 0,1, T: 35°C, estático.	65
Figura 16. Massa de CO ₂ em função do tempo de fermentação, com a linhagem parental, para experimentos conduzidos com meio YPX suplementado com diferentes concentrações de etanol. DO ₀ : 0,1, T: 35°C, estático.	68
Figura 17. Massa de CO ₂ versus tempo de cultivo para as bateladas repetidas 1, 2 e 3 realizadas na concentração de 20 g.L ⁻¹ de etanol. B1- Batelada 1; B2- Batelada 2; B3- Batelada 3. DO ₀ : 0,1, T: 35°C, estático.	69

Figura 18. Densidades ótica inicial e final para cada condição da evolução adaptativa (a e b).	74
Figura 19. Relação entre concentração de etanol final e número de gerações cumulativo durante a evolução. Linhas verticais referentes ao início de cada nova condição de cultivo.....	75
Figura 20. Velocidade de crescimento (h^{-1}) versus concentração de etanol final ($g.L^{-1}$) para cada condição de evolução adaptativa.	76
Figura 21. Concentração de etanol produzido ($g.L^{-1}$) versus massa de gás carbônico liberada (g) para cada condição de fermentação da evolução adaptativa.	78
Figura 22. Concentração de açúcares redutores consumidos versus massa de gás carbônico liberada (g) e % de hidrolisado destoxificado para cada condição da evolução adaptativa.	78
Figura 23. Dados de viabilidade, com os respectivos desvios padrão, em função do número de gerações cumulativo durante a evolução.	80
Figura 24. Correlação entre o número de células viáveis. mL^{-1} estimado por contagem de unidade formadora de colônia e pela câmara de Neubauer.	81
Figura 25. Placas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) contendo meio YPX 2% suplementado com etanol.	82
Figura 26. Concentração de ácidos nucleicos ($mg/L/DO_f$) e concentração final de etanol ($g.L^{-1}$) em função do tempo total de evolução.	84
Figura 27. Rendimento global em etanol versus concentração final de etanol ($g.L^{-1}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em etanol ($Y_{EtOH/S}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.	90
Figura 28. Rendimento global em glicerol versus concentração final de etanol ($g.L^{-1}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em glicerol ($Y_{gliOH/S}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.	91
Figura 29. Rendimento global em xilitol versus concentração final de etanol ($g.L^{-1}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em xilitol ($Y_{xilOH/S}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.	91
Figura 30. Massa de CO_2 em função do tempo de fermentação para as quatro suplementações de meio analisadas com a linhagem evoluída. DO_0 : 0,1, estático.	94
Figura 31. Repetição da Figura 16: Massa de CO_2 em função do tempo de fermentação para experimentos conduzidos com meio YPX suplementado com diferentes concentrações de etanol na linhagem parental. DO_0 : 0,1, estático.	94

Figura 32. Dados de massa de CO ₂ em função do tempo de fermentação para as cinco suplementações de meio analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b) DO ₀ : 5, estático.	96
Figura 33. Massa de CO ₂ em função do tempo de fermentação para as cinco concentrações de xilose analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b). Meio YPX, DO ₀ : 3, estático. ..	99
Figura 34. Massa de CO ₂ em função do tempo de fermentação para as cinco concentrações de glicose analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b). Meio YPD, DO inicial de 3.	102
Figura 35. Experimentos simultâneos em solução hidro alcoólica com as cepas evoluída (a) e parental (b).....	105
Figura 36. Viabilidade versus tempo de exposição a solução hidro alcoólica para as linhagens parental e evoluída.....	105
Figura 37. Densidade ótica celular viável versus tempo de incubação em solução hidro alcoólica.....	107

Índice de Tabelas

Tabela 1. Principais aplicações da engenharia evolutiva em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
Tabela 2. Dados selecionados de parâmetros para linhagens antes e após processo de evolução.	42
Tabela 3. Caracterização do hidrolisado de hemicelulose: Açúcares e inibidores.	44
Tabela 4. Condições de cultivo para a evolução adaptativa e estimativa do número de transferências sucessivas realizadas em cada uma.	53
Tabela 5. Concentrações de açúcar, etanol e subprodutos (g.L^{-1}) e densidade ótica (DO_{600}) durante a fermentação.	63
Tabela 6. Caracterização dos hidrolisados bruto e destoxificado quanto aos açúcares glicose e xilose e contaminantes furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético (g.L^{-1}) e compostos fenólicos totais (grama equivalente de ácido gálico - gEAG.L^{-1}).	64
Tabela 7. Concentrações de Açúcares, ácido acético, etanol, glicerol e xilitol no final das fermentações (g.L^{-1}).	66
Tabela 8. Dados das condições iniciais e finais dos experimentos de evolução adaptativa. As condições <i>Boost</i> são referentes a etapa de enriquecimento da população de células adaptadas, descrita no tópico 4.4.6.	71
Tabela 9. Concentração celular (número de células. mL^{-1}) e seus respectivos desvios padrão, estimados por contagem de unidade formadora de colônia, para as 3 últimas condições de adaptação.	81
Tabela 10. Concentração de ácidos nucleicos, desvio padrão e tempo de evolução referente à cada condição.	82
Tabela 11. Concentrações (g.L^{-1}) de açúcares e produtos metabólicos ao final dos cultivos. .	86
Tabela 12. Rendimento global em etanol, glicerol e xilitol para cada condição de evolução adaptativa.	88
Tabela 13. Densidade ótica final (DO_{600}), produtividade, conversão (X) e rendimento para a cepa evoluída cultivada em meio YPX 2% suplementado com diferentes concentrações de etanol, DO_0 : 0,1.	95
Tabela 14. Concentrações de etanol, glicerol, ácido acético e xilitol, produtividade, conversão (X), rendimento e DO_{600} final para as cepas parental e evoluída cultivadas em diferentes concentrações de xilose.	101

Tabela 15. Concentrações de etanol, glicerol, ácido acético e xilitol, produtividade, conversão (X), rendimento e DO ₆₀₀ final para as cepas parental e evoluída em diferentes concentrações de glicose.....	104
Tabela 16. Velocidade de crescimento e número de geração para cada batelada sucessiva. .	128
Tabela 17. Viabilidade, concentração celular (número de células.mL ⁻¹) e referentes desvios padrão para cada condição de evolução adaptativa.	130

Lista de Abreviaturas e Siglas

HB	Hidrolisado Bruto
HD	Hidrolisado Destoxificado
HMF	Hidroximetilfurfural
CFT	Compostos fenólicos totais
EAG	Equivalente de ácido gálico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
XI	Xilose isomerase
XR	Xilose redutase
XDH	Xilitol desidrogenase
DO ₆₀₀	Densidade ótica no comprimento de onda de 600 nm
C _{AN}	Concentração de ácidos nucleicos
C _{EtOH}	Concentração de etanol
C _{glicose}	Concentração de glicose
C _{xilose}	Concentração de xilose
C _{glicerol}	Concentração de glicerol
C _{xilitol}	Concentração de xilitol
EDTA	Ácido etilenodiamino-tera-acético
rpm	Rotações por minuto
μ_{max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
μ_c	Taxa de crescimento constante (h^{-1})
$Y_{EtOH S}$	Rendimento global em etanol
$Y_{GliOH S}$	Rendimento global em glicerol
$Y_{XilOH S}$	Rendimento global em xilitol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
X	Conversão de substrato em produto (%)
C _x	Concentração de células ($g.L^{-1}$)
C _S	Concentração de substrato ($g.L^{-1}$)
a, b e c	Coefficientes de correlação
mCO ₂	Massa de gás carbônico (g)
t _d	Tempo de duplicação (h)
t _{cultivo}	Tempo de cultivo (h)
η_{ger}	Número de gerações

Sumário

1	Introdução.....	16
2	Objetivos	20
2.1	Geral.....	20
2.2	Específicos	20
3	Revisão Bibliográfica.....	21
3.1	Bioetanol.....	21
3.2	Resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar.....	23
3.2.1	Hidrolisado ácido hemicelulósico	27
3.3	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a produção de bioetanol	29
3.3.1	Tolerância ao Etanol.....	33
3.4	Evolução Adaptativa.....	35
3.4.1	Desenvolvimento de cepas tolerantes.....	36
4	Materiais e Métodos	43
4.1	Microrganismo.....	43
4.2	Meios de cultivo.....	43
4.2.1	Meios complexos preparados com xilose e/ou glicose P.A.	43
4.2.2	Meios complexos preparados com hidrolisado de hemicelulose	44
4.3	Métodos Analíticos	46
4.3.1	Acompanhamento da produção de CO ₂	46
4.3.2	Crescimento celular (Densidade ótica- DO ₆₀₀).....	47
4.3.3	Viabilidade e Contagem de células	47
4.3.4	Quantificação de ácidos nucleicos.....	49
4.3.5	Determinação da concentração de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores.....	49
4.4	Procedimento Experimental.....	50
4.4.1	Preparação da cultura estoque	50

4.4.2	Ativação da cepa em meio sólido.....	51
4.4.3	Inóculo.....	51
4.4.4.	Avaliação das condições de fermentação em micro-reator e da metodologia de acompanhamento por liberação de CO ₂	51
4.4.5.	Experimentos preliminares.....	52
4.4.6.	Evolução Adaptativa.....	53
4.4.7.	Caracterização da linhagem evoluída.....	56
4.5	Procedimentos de cálculo.....	57
4.5.1	Determinação da velocidade específica de crescimento celular.....	57
4.5.2	Determinação do número de gerações.....	60
4.5.3	Determinação dos coeficientes de rendimento de substrato em células e em produtos	60
4.5.4	Cálculo da conversão de substrato.....	61
5	Resultados e Discussão.....	62
5.1	Avaliação das condições de fermentação em micro-reator e da metodologia de acompanhamento por liberação de CO ₂	62
5.2	Experimentos Preliminares.....	64
5.2.1	Escolha do hidrolisado para os experimentos da Evolução Adaptativa.....	64
5.2.2	Escolha da concentração inicial de etanol para os experimentos de Evolução Adaptativa.....	68
5.3	Evolução Adaptativa.....	70
5.3.1	Caracterização da estratégia de evolução adaptativa.....	70
5.3.2	Isolamento e seleção dos mutantes com maior aptidão.....	79
5.3.3	Viabilidade e Morte celular.....	79
5.3.4	Rendimento global em produtos metabólicos.....	85
5.3.5	Importância da aplicação da Etapa de enriquecimento da população de células adaptadas (<i>Boost</i>).....	93
5.4	Caracterização da linhagem Evoluída.....	94

5.4.1	Inibição pelo Etanol.....	94
5.4.2	Assimilação dos substratos.....	99
5.4.3	Efeito letal do etanol.....	105
6	Conclusões	108
7	Referências	111
8	Anexos.....	118
8.1	Anexo A.....	118
8.1.1	Gráficos de variação de massa de CO ₂ versus tempo de cultivo (h) para os experimentos de evolução adaptativa.....	118
8.2	Anexo B	128
8.2.1	Tabelas.....	128

1 Introdução

As leveduras têm contribuído notoriamente na economia devido à capacidade que certas espécies possuem de efetuar uma rápida e eficiente conversão de açúcares em etanol, características que as definem como grupo mais importante de microrganismos comercialmente explorado pelo homem (BLOUNT; WEENINK; ELLIS, 2012). Para um processo biotecnológico eficaz, é importante utilizar cepas que atendam às necessidades requeridas. No caso da indústria de bioetanol, por exemplo, é desejada rápida taxa de fermentação, alto rendimento em etanol e tolerância ao produto formado, substratos e inibidores (PASHA; KUHAD; RAO, 2007).

Com foco na indústria sucroalcooleira, a fermentação alcoólica das hexoses (como glicose e frutose) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um processo consolidado para a produção de etanol de primeira geração (Etanol 1G). Linhagens industriais da levedura como PE-2 e CAT-1 (BASSO et al., 2008) disponíveis no mercado, são amplamente utilizadas nas usinas devido a robustez, tolerância a altas concentrações de açúcar e etanol e elevado rendimento em produto (ZHANG et al., 2010).

Entretanto, há inúmeros estudos sobre novas estratégias para incrementar a produção de etanol, como, por exemplo, a partir da fermentação de resíduos lignocelulósicos. Esses resíduos podem ser submetidos a pré-tratamento e hidrólise para obtenção de açúcares monoméricos, destinados à produção do etanol de segunda geração (Etanol 2G), apresentando potencial para aumentar significativamente o montante total de biocombustível produzido a partir diversas fontes de biomassa vegetal (RADECKA et al., 2015; ZHAO et al., 2018).

No contexto do Brasil, um dos resíduos lignocelulósicos mais adequados ao processo de produção de etanol é o proveniente da cana-de-açúcar, composto por bagaço e palha. Essa biomassa é rica em açúcares, sendo a pentose xilose o segundo mais abundante, o que torna sua utilização um importante desafio industrial, pois a *S. cerevisiae* em sua forma selvagem não metaboliza pentoses eficientemente. Superar essa dificuldade é fundamental para o desenvolvimento de processos de produção de biocombustível economicamente viáveis (FERREIRA et al., 2011; JANSEN et al., 2017; JEFFRIES; JIN, 2004; LI et al., 2017).

Para que *S. cerevisiae* assimile xilose são necessários transportadores não específicos. Dentro da célula, a xilose pode ser convertida em xilulose tanto pela via oxidorrredutiva como pela via de isomerização, mas ambas as vias estão ausentes nesta levedura (DIAO et al., 2013a). Visando superar essas limitações, progresso considerável no desenvolvimento de linhagens

recombinantes, capazes de metabolizar a xilose, vem sendo realizado na última década (GONÇALVES et al., 2014; HECTOR et al., 2011; JO et al., 2016). Uma das principais modificações genéticas envolve a introdução da enzima xilose isomerase (XI, EC 5.3.1.5), que é preferida em relação à introdução do complexo xilose redutase e xilose desidrogenase (XR+XDH), caracterizado por problemas no balanceamento de cofatores (VAN MARIS et al., 2007).

Dentre os vários estudos publicados, abordando o desenvolvimento de linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes, merece destaque o trabalho desenvolvido pelo Grupo de Pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Johan M. Thevelein, no laboratório de biologia molecular celular (VIB - Centro de microbiologia) da K U Leuven (Bélgica), pelo esforço na obtenção de linhagens geneticamente modificadas com potencial para aplicação industrial. No estudo de Demeke et al. (2013a), genes de XI de *Clostridium phytofermentans* foram inseridos na levedura Ethanol Red (cepa de *S. cerevisiae* utilizada industrialmente na produção de etanol 1G). Por meio de técnicas de análise poligênica e evolução adaptativa, foi desenvolvida a levedura GSE16, a qual foi capaz de fermentar xilose rapidamente.

Porém, tem-se observado menor robustez nessas cepas modificadas, como menor tolerância ao etanol e aos inibidores normalmente presentes em hidrolisados de hemicelulose (BÜCKER, 2014). No caso particular da levedura GSE16, por exemplo, as modificações genéticas necessárias para a expressão da enzima xilose isomerase a tornaram menos tolerante a inibidores do metabolismo microbiano, como o etanol e o ácido acético (DEMEKE et al., 2013b).

No trabalho de Milessi (2017), a cepa GSE16-T18 HAA1, desenvolvida por melhoria da GSE16, foi imobilizada em alginato e empregada em fermentações contínuas realizadas em reator de leito fixo. Resultados promissores foram obtidos em termos de rendimento e produtividade em etanol ($0,45 \text{ g.g}^{-1}$ e $4,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente) assim como de seletividade ($31 \text{ g etanol/g xilitol}$), para alimentação contendo 60 g.L^{-1} de xilose (meio definido). Porém, para concentrações de xilose na alimentação superiores a 60 g.L^{-1} , só foi possível manter o estado estacionário por poucos tempos de residência devido à queda na conversão, associada às maiores concentrações de etanol presentes no reator e ao efeito desse composto sobre a viabilidade celular.

Tendo em vista a disponibilidade atual de várias linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de assimilar xilose eficientemente, o desafio tecnológico se desloca para a

obtenção de linhagens mais robustas, capazes de fermentar hidrolisados de hemicelulose e apresentar tolerância aos inibidores presentes.

O licor de hemicelulose é obtido através do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, que pode ser por realizado por diferentes métodos. A hidrólise ácida é um dos mais empregados por sua eficiência na liberação de açúcares fermentescíveis. Contudo, a degradação dos monômeros solubilizados devido à severidade das condições empregadas intensifica a formação de inibidores do crescimento microbiano, como furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos (ALMEIDA et al., 2007). Logo, cepas robustas com alta tolerância aos inibidores presentes, são necessárias para os processos fermentativos baseados em hidrolisados (RADECKA et al., 2015). A formação desses inibidores está diretamente ligada à composição do material lignocelulósico e ao pré-tratamento escolhido, assim, é aconselhável que hidrolisados obtidos por hidrólise ácida passem por etapas de destoxificação antes de serem utilizados como meio de fermentação (MILESSI, 2017).

Além dos compostos presentes nos hidrolisados, o etanol é amplamente reconhecido como um potente inibidor do crescimento microbiano, fator positivo contra as contaminações no processo. Porém, estudos relataram que a exposição ao etanol pode causar danos ao DNA mitocondrial das células de levedura, dificultando a absorção de glicose e outros nutrientes (IBEAS; JIMENEZ, 1997; MOON et al., 2012). Segundo Bucker (2014) e Thomas et al. (1978), esse efeito inibitório pode ser modulado alterando a composição lipídica da membrana plasmática, o que indica a interferência do etanol sobre os mecanismos de transporte de membrana.

Uma levedura “etanol-tolerante” permitiria, hipoteticamente, reduzir o tempo de fermentação, levando a um aumento na produtividade de etanol (JONES; GREENFIELD, 1987). No entanto, a elucidação dos mecanismos genéticos associados à tolerância ao etanol em células de levedura é muito difícil, tendo em vista que mais de 200 genes podem estar envolvidos nas respostas fisiológicas que a caracterizam (KUBOTA et al., 2004). Neste sentido, estudos baseados na Evolução Adaptativa oferecem uma alternativa mais rápida para obter linhagens com maior tolerância ao etanol. E vêm sendo largamente empregados para contornar problemas de toxicidade e inibição (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

As estratégias de adaptação permitem impor uma certa pressão seletiva sobre a população, favorecendo o aparecimento de mutantes e a seleção de fenótipos melhorados, que são mais aptos a se desenvolver em um ambiente hostil. A Evolução Adaptativa é usada como

complemento da Engenharia Metabólica racional para acelerar o desenvolvimento de cepas otimizadas (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

Saccharomyces cerevisiae é um dos microrganismos mais empregados nas estratégias evolutivas (PORTNOY; BEZDAN; ZENGLER, 2011). Além do trabalho de Demeke et al., (2013b) mencionado anteriormente, Diao e colaboradores (2013) construíram uma linhagem recombinante de *S. cerevisiae* capaz de assimilar xilose e, empregando a estratégia de evolução adaptativa por transferências sucessivas em bateladas conduzidas em condições aeróbias, selecionaram uma linhagem evoluída que produziu 54 g.L⁻¹ de etanol em meio complexo contendo 80 g.L⁻¹ de glicose e 40 g.L⁻¹ de xilose em apenas 24 h. A avaliação do desempenho da linhagem evoluída em hidrolisados não foi realizada.

Realizando revisão da literatura, observou-se que os estudos de evolução adaptativa raramente são conduzidos em condições fermentativas, fator de extrema importância para o desenvolvimento de processos industriais eficientes e robustos de produção de etanol 2G. Logo, necessita-se de uma levedura recombinante capaz de assimilar os açúcares presentes em hidrolisados, em condições fermentativas e com elevada tolerância ao etanol.

A obtenção de linhagem de levedura com as características requeridas para processos industriais mencionados acima, por meio da aplicação de uma abordagem inovadora da metodologia de Engenharia Evolutiva, é a principal contribuição do presente trabalho, que se insere no subprojeto “Etanol 2G a partir de biomassa de cana de açúcar: processamento da fração C5 em reator de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF)” do projeto temático FAPESP “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas” (Processo 2016/10.636-8) e na patente "Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2G a partir de xilana/oligômeros de xilose", depositada em 2014 sob o registro BR 10 2014 023395 4 (GIORDANO, R.L.C. et al., 2014).

2 Objetivos

2.1 Geral

Utilizar técnicas de Evolução Adaptativa para adaptar a levedura recombinante *S. cerevisiae* MDS 130 a meios de cultivo contendo hidrolisado de hemicelulose e concentrações de etanol superiores a 50 g.L⁻¹ e contribuir para o desenvolvimento de processos industriais mais produtivos para a obtenção de etanol 2G.

2.2 Específicos

- Desenvolver procedimento experimental para aplicar a metodologia de Evolução Adaptativa em condições fermentativas;
- Avaliar o hidrolisado bruto e destoxificado como meio de fermentação;
- Caracterizar a linhagem recombinante parental em termos de limites de tolerância ao etanol;
- Obter linhagem evoluída apta à fermentação de hidrolisado hemicelulósico e tolerante ao etanol;
- Comparar a linhagem recombinante parental e evoluída em termos de velocidade específica de crescimento, consumo de xilose e glicose, rendimento, produtividade em etanol e em termos de tolerância ao etanol e inibição pelo etanol.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Bioetanol

A utilização de combustíveis fósseis é uma das principais causas de efeitos indesejáveis sobre o meio ambiente, como danos à atmosfera (efeito estufa) e degradação ambiental (BORRION; MCMANUS; HAMMOND, 2012). Como consequência, o aquecimento global é um dos principais problemas que devem ser solucionados com urgência. Medidas em conjunto entre países têm sido adotadas para contornar esse desafio, como as adotadas na conferência realizada em Paris em 2015 (COP 21- Conference of the Parties), que estipulou metas para redução da emissão de gases poluentes (como o CO₂). Para isso, os 195 países membros se comprometeram em adotar medidas adequadas ao objetivo, como a busca por energias mais limpas, visando também que a temperatura do planeta não ultrapasse 2°C de aumento até 2020 (ONUBR, 2015).

A intensificação das mudanças climáticas estimularam a busca por combustíveis alternativos, caracterizados como não fósseis e renováveis, como é o caso do bioetanol, obtido através do processamento de fontes de açúcares fermentescíveis (AGARWAL, 2007; CONAB, 2018) como a cana-de-açúcar, milho, beterraba, trigo, madeira, entre outras (JOHN et al., 2011).

Atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, graças às suas grandes áreas cultiváveis e condições climáticas favoráveis ao plantio. A cultura é considerada uma das alternativas mais promissoras para o setor de biocombustíveis por seu potencial na produção de bioetanol, tendo grande importância para o agronegócio do país. Além disso, suas unidades de produção têm buscado operar com maior eficiência, inclusive com geração de energia elétrica, auxiliando na redução dos custos e contribuindo para a sustentabilidade da atividade. A produção estimada para a safra 2018/19 é de 625,96 milhões de toneladas de cana (CONAB, 2018).

O aumento da demanda mundial por combustíveis renováveis motivou a realização de pesquisas em diversas áreas para viabilizar o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos, fonte de biomassa mais abundante na natureza. Usualmente, eles são destinados à produção de energia em processos industriais de produção de biocombustíveis (ÖZDENKÇI et al., 2017; RAELE et al., 2014; ZHAO et al., 2018).

Esses resíduos lignocelulósicos são constituídos em grande parte por celulose e hemicelulose, polímeros renováveis abundantes, que podem ser convertidos em fontes de carbono fermentescíveis para o crescimento de microrganismos (KUMAR; SHARMA, 2017;

WI et al., 2015). Outra vantagem associada ao seu uso é o fato de não estarem diretamente relacionados à produção de alimentos, permitindo a obtenção de bioetanol sem a necessidade de empregar vastas extensões de terras cultiváveis férteis para a produção de culturas exclusivamente dedicadas à transformação em bioenergia (WI et al., 2015).

Especificamente no cenário brasileiro, as principais fontes de biomassa vegetal são o bagaço e a palha da cana, excedentes do processo de queima para geração de energia na indústria sucroalcooleira e também nos canaviais após o corte da planta. Ambos integram a denominada biomassa lignocelulósica, assim classificados por serem resíduos agroindustriais e matéria orgânica provenientes diretamente de fontes vegetais ou resultantes de seu processamento. Eles podem ser convertidos a etanol após etapas de pré-tratamento e/ou hidrólise enzimática. O etanol produzido a partir destas biomassas é comumente chamado de segunda geração (Etanol 2G) (RAELE et al., 2014).

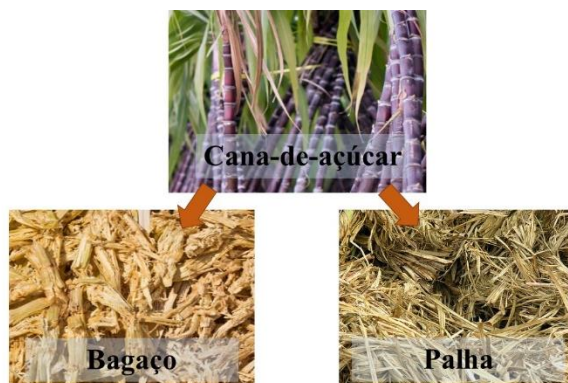
A tecnologia Etanol 2G tem o potencial para aumentar a produção do biocombustível em até 50% sem aumento da área plantada, só por meio da conversão dos coprodutos da cana-de-açúcar, a palha e o bagaço. Segundo ZHANG (2008), um bilhão de toneladas de biomassa seca produziria entre 80-130 bilhões de galões de etanol celulósico. Além disso, o etanol de segunda geração tem o potencial de reduzir em até 90% a emissão de gases de efeito estufa gerados pelos combustíveis fósseis, através da reutilização de resíduos da indústria sucroalcooleira (CTC, 2018; RABELO et al., 2011). Assim, considerando que um excedente de 10% da biomassa de cana-de-açúcar seria destinado à produção de etanol 2G, um adicional de aproximadamente 17 bilhões de litros do produto poderia ser obtido na safra brasileira 2018/2019.

Pesquisas sobre bioetanol estão em constante expansão. O biocombustível é visto como uma das fontes de bioenergia mais promissoras e como alternativa para a obtenção de intermediários normalmente produzidos a partir do refino de combustíveis fósseis. Embora o processo de produção de etanol de primeira geração a partir de materiais sacarinos e amiláceos esteja bem consolidado, o processamento do etanol de segunda geração ainda apresenta alguns desafios que devem ser superados para torná-lo viável economicamente (HAQ et al., 2016; ZHAO et al., 2018).

3.2 Resíduos lignocelulósicos da cana-de-açúcar

A utilização da cana-de-açúcar para produção de etanol de primeira geração fornece dois principais resíduos lignocelulósicos, o bagaço, que é a fração residual da moenda da cana, e a palha, parte seca que fica nos canaviais após o corte da planta. Ambos os coprodutos (Figura 1), são normalmente incinerados nas indústrias para fornecer energia ao processo. Porém, como já descrito no Item 3.1, sua utilização para a produção de etanol lignocelulósico aumentaria significativamente o rendimento do biocombustível por hectare de cana-de-açúcar processada, sem expandir as áreas cultiváveis que competiriam com o cultivo destinado à alimentação (CANILHA et al., 2012). Além disso, a maior parte desses resíduos está disponível no próprio local de processamento, não envolvendo ônus adicional de transporte, o que resulta em um custo comparativamente menor em relação a outras matérias-primas (DA CRUZ, 2008).

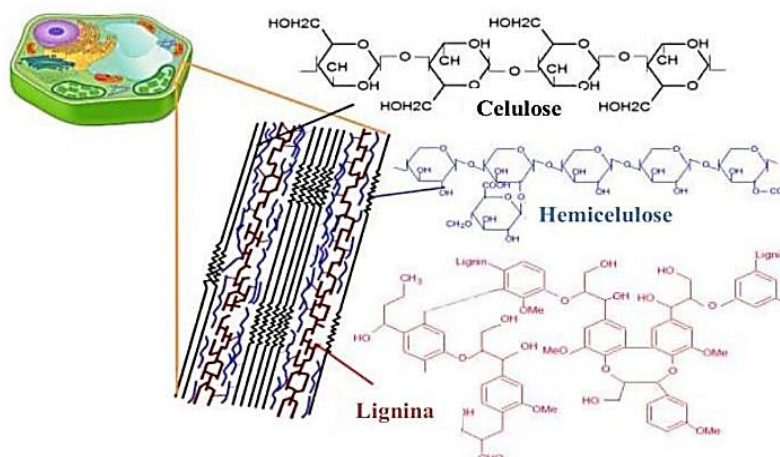
Figura 1. Imagens da cana-de-açúcar e seus coprodutos, componentes da biomassa lignocelulósica.



Fonte: Acervo pessoal.

O bagaço e a palha da cana são quimicamente compostos principalmente pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, que representam aproximadamente 70% da massa seca, e por lignina, uma macromolécula composta por álcoois aromáticos. A composição genérica da biomassa lignocelulósica é de aproximadamente: 50% de celulose, 25% de hemicelulose e 25% de lignina (PANDEY et al., 2000). A estrutura química de cada componente e sua localização na biomassa lignocelulósica estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura lignocelulósica, evidenciando a distribuição da lignina, hemicelulose e celulose.



Fonte: ZAMPIERI, 2015.

Entre os diferentes tipos de biomassa lignocelulósica, a palha e o bagaço da cana se destacam como fonte energética, apresentando grande potencial para geração de calor, eletricidade e produção de etanol lignocelulósico (SANTOS et al., 2012). Ao produzir açúcar e álcool, são gerados, para cada tonelada de cana-de-açúcar, 280 kg de bagaço e 280 kg de palha, em base úmida (DA CRUZ, 2008). Assim, seu aproveitamento deverá ocupar um lugar de destaque como matéria-prima para a produção de bioetanol (DA CRUZ, 2008).

Uma das áreas de atuação da Engenharia Química moderna é no processamento ecológico para conversão de biomassa. No entanto, a estrutura complexa de sua parede celular, conhecida como recalcitrância da biomassa, é considerada um dos principais desafios na liberação eficiente de açúcares da matriz lignocelulósica para a produção de etanol de segunda geração, encontrando-se entre as prioridades mais importantes e imediatas nas áreas de pesquisa e desenvolvimento do etanol 2G (RUBIN et al., 2007; ZHANG, 2008; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

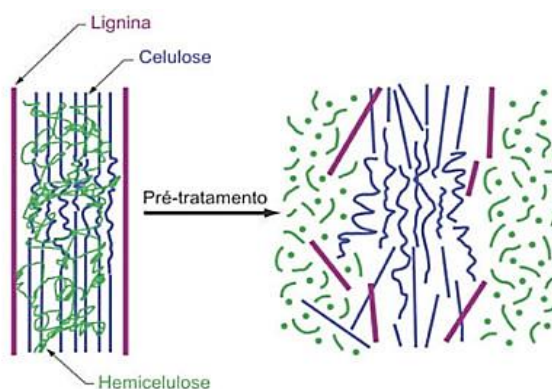
Para efetivar a produção de bioetanol a partir da biomassa, é necessário que os seus polissacarídeos sejam convertidos em açúcares fermentescíveis, como a glicose, que está majoritariamente presente na fração sólida celulósica e a pentose xilose, que provém da fração líquida hemicelulósica. Assim, ambas as frações podem ser utilizadas na fermentação (CANILHA et al., 2012).

Entretanto, a principal dificuldade na obtenção desses monômeros fermentescíveis da biomassa lignocelulósica é a presença da lignina, que está fortemente unida aos polissacarídeos por ligações covalentes e pontes de hidrogênio, dificultando a hidrólise química e enzimática dos polímeros de celulose e hemicelulose. Uma maneira de tornar os componentes da biomassa

mais acessíveis para as etapas posteriores é a realização de um pré-tratamento, visando desintegrar a lignina, aumentar a área superficial do material, solubilizar a hemicelulose, diminuir a cristalinidade da celulose, entre outros objetivos (KUMAR; SHARMA, 2017; WI et al., 2015).

O efeito do pré-tratamento sobre a estrutura lignocelulósica está apresentado ilustrativamente na Figura 3.

Figura 3. Alterações estruturais do complexo celulose-hemicelulose-lignina após pré-tratamento.



Fonte: MOSIER et al., 2005.

O pré-tratamento tem o potencial para aumentar a eficiência da conversão da biomassa lignocelulósica em açúcares redutores fermentescíveis por meio da separação das frações ricas em lignina e hemicelulose, da redução da cristalinidade da celulose e do aumento da porosidade do material (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; SUN; CHENG, 2002).

Algumas estratégias conseguem solubilizar a hemicelulose mais facilmente, como a hidrólise ácida, levando à formação de hidrolisados contendo pentoses e hexoses, além de ácidos alifáticos (principalmente ácido acético, ácido fórmico e ácido levulínico) e aldeídos de furano, como o 5-hidroximetilfurfural (HMF) e furfural. Normalmente após a hidrólise dos polissacarídeos da hemicelulose, a lignina ainda permanece como constituinte do resíduo sólido final, juntamente com a celulose. Somente uma pequena parte da lignina é degradada em fenólicos e outros compostos aromáticos em pré-tratamentos mais brandos (JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013).

Para que o processo de pré-tratamento seja considerado efetivo, deve apresentar as seguintes características: i) formação de açúcares fermentescíveis de forma direta ou por subsequente hidrólise; ii) perda e degradação mínimas dos açúcares formados; iii) formação limitada de produtos inibidores e iv) demanda reduzida de energia (SARKAR et al., 2012).

Existem diferentes métodos de pré-tratamento, que podem ser divididos em quatro grandes grupos: físicos, químicos, físico-químicos e biológicos ou ainda uma combinação destes (SARKAR et al., 2012). Considerando-se particularmente a hidrólise da fração hemicelulósica, o pré-tratamento hidrotérmico (ou auto-hidrólise) e a utilização de ácido diluído (SARKAR et al., 2012) são os métodos mais comumente empregados.

O pré-tratamento hidrotérmico consiste em expor a biomassa à combinação de alta temperatura e pressão (150-240 °C; 1-3.5 MPa), sendo alcançadas altas taxas de remoção da fração hemicelulósica (ROCHA et al., 2017). Como nenhum ácido ou outro produto químico é requerido, este é um método atraente do ponto de vista ambiental e econômico (SARKAR et al., 2012).

Já o pré-tratamento ácido, ou hidrólise ácida, é considerado um dos mais importantes para obtenção altos rendimentos de açúcares a partir da lignocelulose, solubilizando as hemiceluloses, principalmente xilana e convertendo-as em açúcares fermentescíveis (ALVIRA et al., 2010; SARKAR et al., 2012). O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído tem sido um dos métodos mais estudados por apresentar baixo custo de aplicação e resultados promissores de rendimento de processo, sendo um dos mais adequados para aplicação industrial (ALVIRA et al., 2010). Empregado em temperaturas moderadas, esse método tem se mostrado bastante adequado para a recuperação da fração hemicelulósica, promovendo menor decomposição dos açúcares solúveis do que os que utilizam combinação de alta temperatura e concentração de ácido (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Entretanto, esses processos contribuem para a formação de compostos tóxicos no hidrolisado, que podem ter forte efeito inibitório sobre o metabolismo dos microrganismos quando os mesmos são empregados como meio para fermentação, diminuindo o desempenho desta etapa (ALVIRA et al., 2010; CANILHA et al., 2012; KUMAR; SHARMA, 2017; SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Geralmente os compostos inibitórios são classificados em três categorias, aldeídos de furano como furfural e 5- hidroximetilfurfural (HMF), provenientes da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente; ácidos orgânicos fracos (ácido fórmico, ácido acético e ácido levulínico) resultantes da hidrólise do grupo acetil ou oxidação de furanos; e compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, 4-hidroxibenzaldeído), originados na decomposição parcial de componentes da lignina. O ácido acético é formado principalmente pela desacetilação da fração hemicelulósica da biomassa, devido à hidrólise de grupos acetila da hemicelulose

(JÖNSSON; ALRIKSSON; NILVEBRANT, 2013; SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

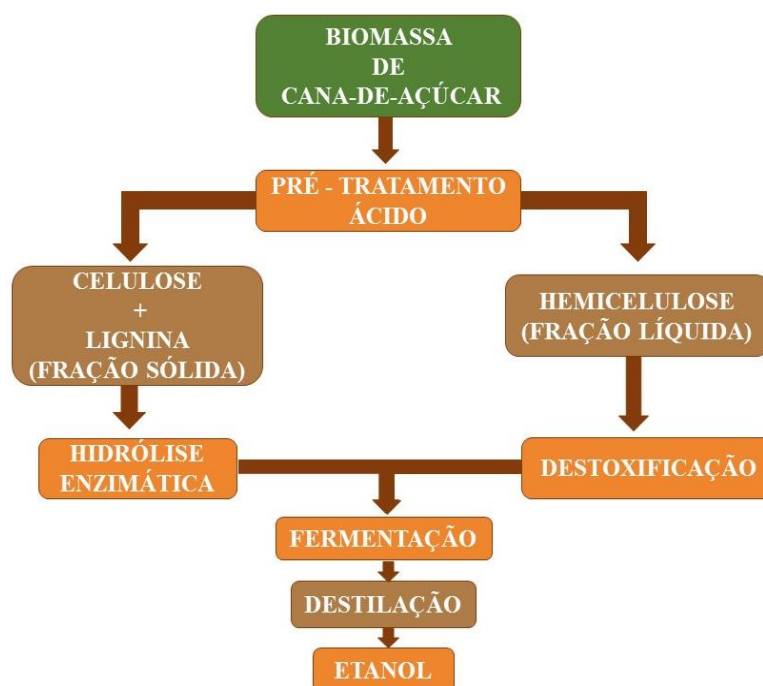
Um outro fator de impacto sobre o pré-tratamento é o custo atrelado a esta etapa, que normalmente representa mais de 30% dos custos de operação de biorrefinaria (BALA; SINGH, 2019). Por ser de suma importância para o processo de produção de biocombustíveis, a escolha do método de pré-tratamento ideal deve levar em consideração os aspectos ambiental, econômico e de rendimento, assim como características desejadas no produto final em termos da composição em açúcares fermentescíveis.

3.2.1 Hidrolisado ácido hemicelulósico

Com características favoráveis a aplicação em processos industriais (ALVIRA et al., 2010), o hidrolisado hemicelulósico obtido pelo pré-tratamento ácido foi empregado no presente trabalho, sendo o foco deste tópico.

O hidrolisado hemicelulósico ou licor hemicelulósico corresponde à fração líquida obtida após pré-tratamento ácido da biomassa lignocelulósica, como se observa no fluxograma apresentado na Figura 4. Esta fração se refere à hemicelulose, composta majoritariamente pela pentose xilose.

Figura 4. Diagrama de fluxo de processo para a conversão da biomassa de cana em etanol 2G.

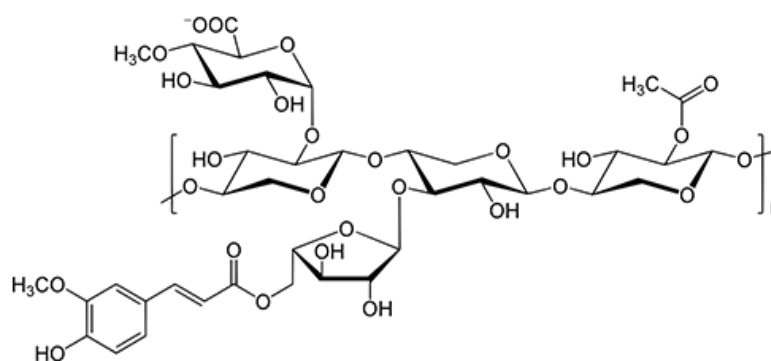


Fonte: Adaptado de CANILHA et al., 2012.

As hemiceluloses são heteropolissacarídeos complexos compostos por unidades monoméricas de D-xilose, D-glucose, D-galactose, D-manose, L-arabinose, ácido D-glucurônico e ácido 4-O-metil-glucurônico. Estruturalmente são mais semelhantes à celulose do que à lignina, apresentando ramificações em sua estrutura que interagem facilmente com o polissacarídeo, o que confere estabilidade e flexibilidade ao agregado. Porém, seu arranjo aleatório e amorfo provê pouco equilíbrio quando comparado à estrutura da celulose, permitindo que seja mais suscetível à hidrólise ácida (DUTTON, 2018).

A representação esquemática da estrutura da hemicelulose, composta majoritariamente por um agregado de açúcares, está apresentada na Figura 5.

Figura 5. Representação esquemática da estrutura da hemicelulose.



Fonte: DUTTON, 2018.

Como já descrito no Item 3.2, a formação de compostos inibitórios ao metabolismo microbiano, decorrente da degradação dos componentes da biomassa, como furfural e HMF, é uma das principais desvantagens relacionadas ao pré-tratamento ácido. A necessidade de maior severidade no tratamento para obter alto rendimento de extração (acesso a frações mais internas de hemicelulose) implica a degradação dos monômeros solubilizados, gerando os contaminantes (CANILHA et al., 2012). Devido à baixa quantidade de hexoses disponível no hidrolisado ácido hemicelulósico, o HMF, formado pela decomposição deste açúcar, é encontrado em baixa concentração. E também é considerado menos tóxico que o furfural (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Assim, além da presença majoritária de pentoses no hidrolisado de hemicelulose, deve-se levar em conta a presença dos inibidores formados durante o pré-tratamento em função do seu uso nos processos fermentativos. A inclusão de uma etapa de destoxificação é uma alternativa para viabilizar o aproveitamento do hidrolisado obtido no pré-tratamento ácido, pois permite a remoção de grande parte dos compostos inibidores presentes. Uma grande variedade

de métodos vem sendo estudados para a eficiente destoxificação do hidrolisado lignocelulósico, entre eles: evaporação, uso de membranas, uso de resina de troca iônica, adsorção por carvão ativado, extração com solvente, alteração de pH e alguns métodos biológicos (CANILHA et al., 2012; CANILHA; CARVALHO; SILVA, 2006).

Logo, a produção industrial economicamente viável do bioetanol não requer apenas um microrganismo capaz de fermentar todos os monossacarídeos fermentescíveis do hidrolisado, mas que também apresente tolerância aos diversos tipos de inibidores existentes no meio (como os formados pela hidrólise ácida) e a altas concentrações de etanol, decorrentes da fermentação (DEMEKE et al., 2013b).

3.3 Levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a produção de bioetanol

A levedura *S. cerevisiae* é o microrganismo mais explorado e utilizado em processos fermentativos industriais, como a fabricação de bebidas alcoólicas, etanol e alguns alimentos fermentados. Porém, as características distintas das várias linhagens existentes dessa espécie afetam significativamente o desempenho das fermentações (CHEN; XU, 2014).

Como responsável pela conversão dos substratos em processos biotecnológicos, é importante que a *S. cerevisiae* seja capaz de metabolizar eficientemente todos os açúcares presentes no meio. Para o etanol de segunda geração, hexoses e pentoses são as fontes de carbono presentes nos hidrolisados de resíduos lignocelulósicos. Entretanto, em sua forma selvagem, a levedura *S. cerevisiae* não é capaz de assimilar xilose eficientemente, o principal constituinte dos hidrolisados hemicelulósicos, havendo necessidade de recorrer a recursos alternativos, como a inserção de vias metabólicas específicas em seu metabolismo, por meio de Engenharia Genética, que possibilitem a conversão desses açúcares (DA CRUZ, 2008; KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009; MA et al., 2012; SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

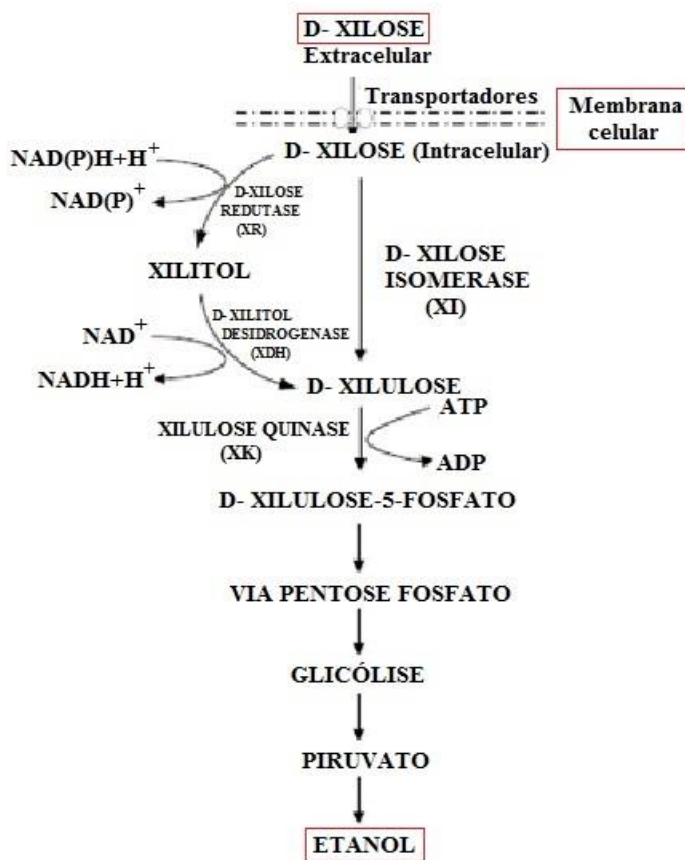
Há ainda a possibilidade de utilizar cepas que fermentam a xilose naturalmente, como algumas leveduras dos gêneros *Scheffersomyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* e *Pachysolen*. Porém, costuma-se optar pela conhecida *S. cerevisiae*, principalmente por sua robustez sob condições industriais de fermentação. Por isso, são encontrados muitos estudos dedicados ao projeto de cepas dessa levedura que sejam capazes de metabolizar xilose (KWAK; JIN, 2017; MUSSATTO et al., 2012).

Naturalmente, para que haja assimilação da xilose, é necessário que ela seja convertida em xilulose e subsequentemente fosforilada em xilulose-5-fosfato, componente de entrada para a via metabólica das pentoses fosfato (KWAK; JIN, 2017). Posteriormente, segue para a glicólise e se tem a produção de etanol pelas vias fermentativas (DIAO et al., 2013a).

A modificação genética geralmente leva à obtenção de cepas de organismos geneticamente modificados (OGMs) tanto cisgênicos (contendo somente DNA da própria espécie, extra ou modificado, que possam ser cruzados naturalmente) quanto transgênicos (contendo DNA heterólogo) (DEPARIS et al., 2017). Duas vias diferentes de assimilação de xilose já foram introduzidas por expressão heteróloga em *S. cerevisiae*. A via xilose isomerase (XI) e a via xilose redutase/ xilitol desidrogenase (XR/ XDH). Ambas catalisam a conversão da D-xilose a D-xilulose, porém a última é uma reação de dois passos, comumente encontrada em leveduras e fungos, na qual a D-xilose é primeiramente reduzida a D-xilitol, que é então oxidado em D-xilulose (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

O diagrama esquemático dessas vias metabólicas está apresentado na Figura 6.

Figura 6. Diagrama esquemático de duas possíveis vias metabólicas para o metabolismo da xilose.



Fonte: Adaptado de LI et al., 2016.

Há inúmeros estudos sobre a introdução de vias metabólicas específicas responsáveis pela assimilação de xilose, como a via da oxidoredutase de *Scheffersomyces stipitis* (*Pichia*) (codificada por xyl1, xyl2 e xyl3) e a via xilose isomerase de *Piromyces sp* (codificada por xylA) (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

Kötter e colaboradores, em 1990, obtiveram uma linhagem de *S. cerevisiae* recombinante capaz de crescer aerobiamente em xilose. Para isso, utilizaram uma abordagem de engenharia metabólica, transferindo para a levedura os genes responsáveis pela via de utilização da xilose em *Pichia stipitis*, envolvendo as enzimas xilose redutase (XYL1) e xilitol desidrogenase (XYL2).

Entretanto, essa via (XR/ XDH) apresenta uma desvantagem referente ao desequilíbrio redox, sendo preferida atualmente a inserção da via XI. A XR catalisa a redução da xilose em xilitol usando preferencialmente NADPH, enquanto a XDH catalisa a oxidação do xilitol em xilulose estritamente usando NAD⁺, o que leva ao acúmulo de xilitol e consequente redução do rendimento de etanol (LI et al., 2016b).

Assim como a via para obtenção da xilulose, várias outras etapas têm sido identificadas como gargalos no metabolismo da xilose, incluindo sua lenta assimilação e conversão à xilulose e o fluxo reduzido característico da via Pentose Fosfato (DIAO et al., 2013b). Modificações genéticas comumente presentes nas linhagens recombinantes incluem a super-expressão de enzimas que catalisam etapas limitantes na via pentose fosfato, como a xiluloquinase, visando acelerar a fermentação, assim como a sub-expressão da XDH para minimizar a formação do subproduto xilitol (DIAO et al., 2013a).

Além da dificuldade da inserção de uma via metabólica adequada, para viabilizar a utilização industrial da *S. cerevisiae* na produção de Etanol 2G, é necessário que o processo fermentativo ocorra na ausência de oxigênio (anaerobiose) ou em condições microaerófilas (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Atualmente, as cepas transgênicas são as principais candidatas à fermentação hemicelulósica de etanol. No entanto, considerando diferentes aspectos em relação ao uso de organismos geneticamente modificados (OGMs), como a percepção pública e regulamentações para sua aplicação em larga escala, linhagens não transgênicas podem ser preferidas (WANG et al., 2011). Mas independentemente da estratégia utilizada para melhorar as leveduras, é essencial desenvolver linhagens com alto desempenho de fermentação sob condições relevantes para a indústria (SÀNCHEZ NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Além das manipulações genéticas, tem-se empregado a Engenharia Evolutiva (isoladamente ou em associação com a Engenharia Genética) para obter cepas com as características desejadas (SONDEREGGER; SAUER, 2003), conforme será detalhado no tópico 3.4.

Demeke e colaboradores (2013a) inseriram genes de XI de *Clostridium phytofermentans* na levedura Ethanol Red, que é uma cepa de *S. cerevisiae* utilizada industrialmente na produção de etanol 1G (principalmente na Europa e Estados Unidos). Por meio de técnicas de análise poligênica e adaptação evolutiva, desenvolveram a levedura GSE16, que apresentou maior eficiência na utilização de xilose e aumento na taxa de crescimento aeróbio comparada a GS1.11-26 (parental), além de manter alta tolerância a inibidores.

Com os contínuos esforços para a obtenção de cepas adequadas aos processos industriais, tem sido observado um fator negativo na utilização de células recombinantes: as vias metabólicas introduzidas artificialmente tendem a ser mais sensíveis as condições de estresse que as vias intrínsecas a esses microrganismos. Em estudos da co-fermentação de glicose e xilose para produção de etanol de segunda geração, notou-se que o processo de fermentação de xilose, permitido por introdução de via artificial em *S. cerevisiae*, é mais sensível a inibidores como ácido acético que a fermentação utilizando glicose como única fonte de carbono (BELLISSIMI et al., 2009).

No caso particular da levedura GSE16, por exemplo, as modificações genéticas necessárias para a expressão da enzima xilose isomerase prejudicaram a robustez da levedura parental, que passou a ser menos tolerante a inibidores do metabolismo microbiano, como o etanol e o ácido acético (DEMEKE et al., 2013a). Assim, a linhagem foi submetida a mais etapas de adaptação evolutiva em parceria com a Praj Industries (Índia), sendo obtida a cepa GSE16-T18, com rápida taxa de fermentação de xilose em etanol e tolerância melhorada a inibidores.

Meijnen et al. (2016) identificaram o gene HAA1, por análise poligênica, como responsável pela tolerância ao ácido acético e numa tentativa de contornar o problema, inseriram duas cópias deste gene na levedura GSE16-T18, gerando a linhagem GSE16-T18 HAA1, que apresentou melhoria na fermentação de açúcares, mesmo na presença de ácido acético, e redução significativa da fase lag.

Há uma vasta gama de informações sobre genes determinantes da tolerância a fatores específicos de estresse. Porém, ainda há pouco conhecimento sobre os fatores genéticos que

podem ser modificados (por superexpressão ou por mutagênese específica) para aumentar essa tolerância (DEPARIS et al., 2017).

3.3.1 Tolerância ao Etanol

As células de leveduras são expostas a muitos tipos de estresses durante bioprocessos industriais, tais como oxidativo, congelamento-descongelamento, alta temperatura, variações de pH e concentração de etanol. Logo, dispor de linhagens robustas, que são resistentes a múltiplos estresses, é altamente desejável para melhor eficiência do processo e rendimento em produto (ÇAKAR et al., 2012).

Saccharomyces cerevisiae é descrita como uma das espécies de levedura mais tolerantes ao etanol, atributo que foi obtido a aproximadamente 100 milhões de anos atrás, quando o rápido redesenho da via metabólica do carbono permitiu que a linhagem suprimisse o metabolismo respiratório e, com isso, acumulasse etanol (RADECKA et al., 2015). Segundo Maiorella et al. (1983), a inibição por etanol nas células de *S. cerevisiae* selvagem começa quando a concentração atinge cerca de 25 g.L⁻¹ no fermentado e é total para concentrações acima de 95 g.L⁻¹.

Os genes responsáveis pelas características de tolerância ao etanol nas leveduras têm atraído muita atenção. Entretanto, quase toda a pesquisa é realizada com cepas de laboratório, que apresentam menor tolerância ao composto do que as cepas naturais e industriais (PAIS et al., 2013).

O etanol é um dos principais responsáveis por efeitos negativos sobre o metabolismo das células de levedura durante os bioprocessos (CHEN; XU, 2014). Seu efeito inibitório é complexo e considerado uma das principais razões para lentidão nas fermentações e consumo incompleto das fontes de carbono presentes no meio (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001). Em altas concentrações é altamente tóxico para o crescimento e metabolismo das células, sendo capaz de desnaturar as proteínas celulares, alterar a permeabilidade da membrana plasmática e até inibir a função mitocondrial. Esses fatores reduzem o crescimento celular e o rendimento em etanol (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; MOON et al., 2012).

Estudos demonstraram que os fosfolipídios da membrana plasmática desempenham um papel importante para a tolerância ao etanol. Aumentando a quantidade de ácidos graxos insaturados na membrana e a suplementação dos meios de crescimento com ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas, observou-se aumento da tolerância ao etanol. Já o aumento da temperatura, pressão osmótica e quantidade de etanol intracelular contribuem para uma

menor tolerância (D'AMORE; STEWART, 1987). O efeito favorável do aumento do grau de insaturação de ácidos graxos dos lipídeos da membrana de *S. cerevisiae* é atribuído à menor fluidez da membrana, que compensa os efeitos de fluidização causados pelo etanol (YOU; ROSENFELD; KNIPPLE, 2003).

Outras pesquisas abordam diferentes aspectos do efeito do etanol sobre o metabolismo celular em bioprocessos. Ansanay-Galeote e colaboradores, em 2001, observaram que o etanol desempenha um papel importante com relação à taxa de fermentação. Simulando a produção natural de etanol por meio de adição progressiva do composto, os autores observaram uma correlação direta entre a taxa de fermentação e a concentração de etanol no meio com as duas cepas utilizadas no estudo. A observação de que o etanol afeta a taxa de fermentação de forma linear aponta para a hipótese de que a diminuição da taxa de fermentação observada é devida à inibição dos transportadores de hexose por etanol, ou seja, se deve a um componente único.

Lam e colaboradores, em 2014, analisando a relação entre a viabilidade das células e a concentração de etanol, sugeriram um modelo de toxicidade no qual o álcool afeta a viabilidade não em concentrações próximas àsquelas requeridas para solubilizar as bicamadas lipídicas, mas em concentrações mais baixas, que aumentam a permeabilidade da membrana plasmática.

A utilização de cepas robustas nos processos fermentativos, com melhor tolerância a inibidores e compostos tóxicos, é uma abordagem eficaz para superar efeitos inibitórios. Foram desenvolvidas diferentes estratégias para obtenção deste tipo de cepas, entre elas, a evolução adaptativa, que é um método clássico e poderoso baseado na seleção de propriedades celulares vantajosas através da diversificação genética iterativa, por mutação espontânea ou induzida, e uso de pressão seletiva para seleção natural (SAUER, 2001). Os mutantes obtidos podem apresentar uma propriedade altamente melhorada sob as condições específicas requeridas, mas também ter taxas de crescimento significativamente inferiores às alcançadas pela linhagem parental selvagem (ÇAKAR et al., 2012).

Ao se integrar com sequenciamento global, bioinformática, genética clássica e técnicas de edição de genoma, a engenharia evolutiva se tornou uma poderosa metodologia para identificação e engenharia reversa de mecanismos moleculares implícitos a características industrialmente relevantes, sendo uma estratégia complementar de melhoria de linhagens, que será melhor descrita no próximo tópico (MANS; DARAN; PRONK, 2018).

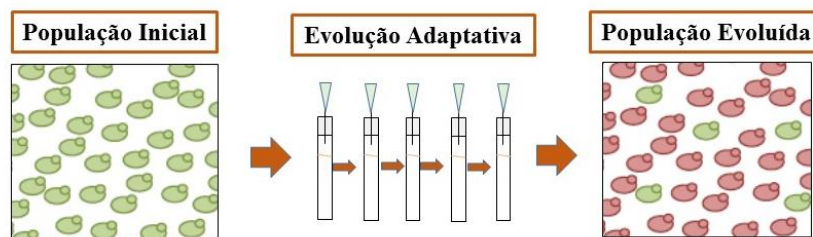
3.4 Evolução Adaptativa

A Evolução adaptativa, Engenharia evolutiva ou também conhecida como Adaptive Laboratory Evolution (ALE) é uma tecnologia utilizada para a seleção de fenótipos melhorados após mutação por seleção natural (MOHAMED et al., 2017). O procedimento tem sido adotado como uma ferramenta valiosa para a seleção de microrganismos. Inspirado pela evolução natural, ele explora os princípios evolutivos para melhorar as propriedades microbianas em um contexto biotecnológico. Através do acúmulo de mutações espontâneas sob pressão de seleção definida, obtém-se células adaptadas às condições ambientais as quais foram expostas (GUIMARÃES et al., 2008; QIN et al., 2016).

Como uma abordagem de engenharia metabólica inversa, a engenharia evolutiva pode ser facilmente aplicada para melhorar propriedades microbianas diversas e complexas, tais como a utilização de diferentes substratos industrialmente adequados, formação de produtos de alto valor agregado e melhoria na resistência ao estresse (ÇAKAR et al., 2012).

Uma ilustração exemplificando a obtenção de fenótipos melhorados após a evolução adaptativa está apresentada na Figura 7.

Figura 7. Imagem ilustrativa da obtenção de células evoluídas após técnica de evolução adaptativa.



Fonte: Adaptado de MANS; DARAN; PRONK, 2018.

Para ser aplicada, a técnica requer apenas um procedimento bem projetado de seleção, sem necessidade de compreensão detalhada das ações inibitórias sobre o metabolismo e genes responsáveis pela evolução. Normalmente não se têm conhecimento dos mecanismos relevantes relacionados ao processo de transformação (ALMEIDA et al., 2007). Assim, a evolução é facilitada quando o microrganismo já apresenta características requeridas naturalmente, sem necessidade da inserção de um gene recombinante em seu metabolismo (ÇAKAR et al., 2012).

Entretanto, o procedimento vem ganhando relevância como estratégia complementar à engenharia metabólica, para o desenvolvimento de linhagens otimizadas ou ainda como

ferramenta para elucidar a base molecular dos fenótipos desejados (DETTMAN et al., 2012; SAUER, 2001), que normalmente são complexos e envolvem muitos genes ou mais de um operon, fazendo com que estratégias evolutivas para a seleção de fenótipos possam ser mais vantajosas que a utilização de engenharia genética (ÇAKAR et al., 2012).

A associação da evolução adaptativa com a engenharia metabólica de células microbianas tem como objetivo conferir melhorias adicionais às cepas, visando introduzir uma característica não existente no microrganismo e aprimorá-la (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013). As metodologias de análise genômica possibilitam a avaliação e identificação da base genética do fenótipo desejado, permitindo a transferência de uma via inexistente às células. Fazendo uso de procedimentos de engenharia evolutiva sobre as cepas recombinantes após essa etapa, pode-se melhorar significativamente a eficiência do processo. Logo, utilizar essa combinação de estratégias facilitaria a obtenção da linhagem desejada (ÇAKAR et al., 2012).

Com relação à execução da ALE, as células microbianas oferecem vantagens importantes para os estudos com essa técnica. A maioria tem requerimentos simples de nutrientes, podendo ser facilmente cultivadas em laboratório, além de normalmente se multiplicarem com rapidez, o que permite que passem por centenas de gerações, entretanto é comum que demore semanas ou meses para que a melhoria desejada seja alcançada. Em contrapartida, a execução de alterações pela via genômica apresenta dificuldades distintas, como a busca do gene responsável pela característica requerida (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013; HARDISON, 2003).

Geralmente, a estratégia é realizada com cultivos em batelada, nos quais se costuma aumentar progressivamente o estresse ao qual as células são submetidas, a fim de obter aquelas que apresentam características de tolerância mais relevantes ao processo. Cultiva-se o microrganismo sob condições claramente definidas por períodos prolongados de tempo, na faixa de semanas a anos. Os cultivos são normalmente realizados por cultura de tubos, frascos e placas, podendo estar ou não sobre agitação. Independente da estratégia, o processo é trabalhoso e demorado (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013; MOHAMED et al., 2017).

3.4.1 Desenvolvimento de cepas tolerantes

Como uma das espécies industriais mais utilizadas atualmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem que superar uma variedade de estresses presentes durante o processo para que seja empregada na produção de bioetanol de segunda geração. Esses estresses

afetam o metabolismo celular e conseqüentemente, reduzem o rendimento de etanol e a taxa de fermentação (RADECKA et al., 2015).

A engenharia evolutiva é uma abordagem de grande potencial para a obtenção de cepas com a tolerância desejada para a rota dos biocombustíveis, tendo amplo uso na melhoria de propriedades da *S. cerevisiae* e outros microrganismos importantes industrialmente. A robustez das cepas microbianas não se deve a um ou dois genes, mas sim a um sistema complexo de tolerância. Neste sentido, a utilização de técnicas de evolução é uma forma de obter melhorias no fenótipo com investimento reduzido em comparação com as alternativas envolvendo procedimentos de Biologia Molecular (ÇAKAR et al., 2012; WANG; SUN; YUAN, 2018).

A busca pela obtenção de cepas mais tolerantes consiste em permitir que o microrganismo cresça em ambiente contendo inibidores e desenvolva tolerância gradual aos mesmos. Assim, podem ocorrer mutações aleatórias de genes relevantes gerando, por exemplo, uma estirpe estável com fermentabilidade melhorada a etanol (QURESHI; ZHANG; BAO, 2015).

Entretanto, a estratégia frequentemente revela *trade-offs* entre uma característica selecionada e outros aspectos da fisiologia da levedura (MANS; DARAN; PRONK, 2018). A eficiência de adaptação de uma certa variedade de microrganismo depende muito do ambiente específico onde será usada. Uma cepa bem adaptada com alto desempenho de fermentação em um hidrolisado específico, pode não ser adequada para outro meio de cultivo em termos de diferentes tipos de alimentação, métodos de pré-tratamento, condicionamento (destoxificação) ou condições de hidrólise, devido à variação no tipo e concentração dos inibidores. Cepas adaptadas podem ser extremamente específicas (QURESHI; ZHANG; BAO, 2015).

Neste contexto, para fins biotecnológicos, o melhor fenótipo não é necessariamente aquele com maior aptidão em uma determinada condição, mas o que apresenta bom desempenho mesmo em outras condições ambientais (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

Outros fatores importantes para a implementação eficiente da ALE na obtenção de cepas evoluídas são o tempo necessário para acumular fenótipos melhorados e o maior grau de aptidão que pode ser alcançado (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

Além disso, é importante notar que o aumento da aptidão em função do número total de gerações não é linear. Enquanto o aumento da aptidão física é geralmente rápido nas primeiras 100 a 500 gerações, ele diminui consideravelmente durante o curso da ALE. Fator crítico para a biotecnologia, pois a seleção prolongada, que excede a primeira fase de adaptação evolutiva,

não necessariamente levará a fenótipos significativamente melhorados. Ambientes de cultivo complexos podem depender de estratégias avançadas de seleção para compensar um baixo potencial adaptativo e o cessar do ganho de aptidão durante a ALE (BARRICK et al., 2009; DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

Atualmente, inúmeras linhagens com maior tolerância ao estresse têm sido obtidas empregando estratégia adaptativa, incluindo *Escherichia coli* (MUNDHADA et al., 2017), *Saccharomyces cerevisiae* (KOPPRAM; ALBERS; OLSSON, 2012), *Zymomonas mobilis* (MOHAGHEGHI et al., 2015), *Corynebacterium glutamicum* (WANG et al., 2018) e *Cryptocodium cohnii* (LI et al., 2017).

Na Tabela 1, estão apresentados alguns trabalhos realizados, com distintos objetivos, visando a evolução da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabela 1. Principais aplicações da engenharia evolutiva em *Saccharomyces cerevisiae*.

Aplicações da Engenharia evolutiva	Referências Seleccionadas	Condições de cultivo	Principais Resultados
Crescimento anaeróbio em xilose	SONDEREGGER; SAUER, 2003	Meio mínimo; quimiostato; 30°C; 300 rpm; pH 5	460 gerações; Cultura estável em condições anaeróbias; Utiliza xilose e glicose simultaneamente; Crescimento deficiente em glicose.
Melhor tolerância a compostos inibidores presentes nos hidrolisados lignocelulósicos	WRIGHT et al., 2011	Xilose 2% (m/v); quimiostato; 30°C; 800 rpm (N ₂ : 0,5 L.min ⁻¹); pH 4; Ácido Acético (0- 6g.L ⁻¹)	400 gerações; Crescimento em xilose, pH <4, com 6 e 5 g.L ⁻¹ de ácido acético; Perdeu características evoluídas após armazenamento.
	SMITH; VAN RENSBURG; GÖRGENS, 2014	Licor de pré-tratamento à vapor 60% (v/v); quimiostato; 30°C; D: 0,05h ⁻¹ ; 200 rpm; pH 5	100 gerações; Menor taxa de crescimento que parental; Melhor tolerância e conversão de inibidores.
Melhor tolerância ao etanol	STANLEY et al., 2010	YEPD; quimiostato; 110 rpm; EtOH 7% (v/v)	486 gerações; Taxa de sobrevivência melhorada (C _{EtOH} letais); Maior taxa de consumo de glicose; Células evoluídas produziram mais glicerol.
	CHEN; XU, 2014	Vinho de arroz; frascos; 30°C; Estático; pH 4,1	200 gerações; Maior tolerância ao etanol, Temperatura e pressão osmótica; Maior conversão de açúcares que a parental.
Melhor resistência Multi estresse	ÇAKAR et al., 2005	YMM glicose 2%; tubos; Estresses: Etanol e congelamento/descongelamento 30°C; 200 rpm; pH 5,5	Resistência melhorada ao congelamento-descongelamento, temperatura, etanol e estresse oxidativo.

Como observado na Tabela 1, a engenharia evolutiva tem sido intensivamente aplicada com o intuito de melhorar diferentes características, como a tolerância ao estresse, a velocidade de consumo de substrato e as taxas de formação de produtos. A estratégia das transferências em série tem gerado estirpes de levedura melhoradas, mais tolerantes ao estresse provocado por elevadas concentrações de produto e inibidor, elevadas temperaturas ou baixos pHs, além de melhores taxas de consumo de substrato e/ou formação de produtos (MANS; DARAN; PRONK, 2018).

Um cuidado que deve ser tomado ao obter cepas evoluídas desenvolvidas para tolerância ao estresse, é que nem sempre as mesmas expressam o fenótipo adquirido quando a pressão seletiva é aliviada (MANS; DARAN; PRONK, 2018), sendo necessário mantê-las sob a condição para a qual foram adaptadas.

Wright e colaboradores em 2011 relataram que, após utilizar a cepa evoluída adaptada ao ácido acético em meio sem estresse causado pelo composto, as células perderam a capacidade de crescer em altas concentrações de ácido acético. Embora as cepas tolerantes adaptadas fossem geneticamente estáveis, o fenótipo como maior tolerância à inibidores só era exibido sob cultivo contínuo em presença de inibidor. Os resultados demonstraram que o aumento a tolerância da cepa evoluída pode não ser constitutivo, mas requer a indução do estresse.

Em 2016, Gonzalez-Ramos et al. utilizaram evolução adaptativa e técnicas de mutagênese para obter cepas de *S. cerevisiae* com maior tolerância ao ácido acético. Após observarem que as células adaptadas perdiam sua evolução rapidamente quando expostas à crescimento em ausência do composto inibidor, introduziram a técnica denominada *on-off* no processo de evolução. A estratégia consiste em alternar o meio de cultivo das bateladas repetidas, com e sem presença do composto inibidor, visando acrescentar uma pressão seletiva contra as mutações que resultam em diminuição da aptidão durante a fase *off-off* (ausência de inibidor). É provável que a técnica *on-off* possa ser aplicada à seleção de fenótipos tolerantes a uma variedade de estresses, especialmente em situações nas quais os microrganismos já possuam mecanismos de tolerância induzíveis nativos, potencializando a aplicabilidade industrial da cepa (GONZALEZ-RAMOS et al., 2016).

Um outro aspecto importante referente à evolução de linhagens de microrganismo é a escolha da fase de crescimento celular para a transferência sucessiva, uma vez que a mesma desempenha um papel significativo na obtenção de vantagens de crescimento na adaptação da cultura, bem como na definição do sucesso de um experimento de engenharia evolutiva. Lee e

colaboradores em 2014, constataram que a transferência de células na fase exponencial foi a estratégia de adaptação mais eficaz durante o processo de adaptação de sua cultura em batelada, visando obter vantagens em relação ao crescimento celular.

Em experimentos utilizando técnica de evolução adaptativa em 2014, Chen e Xu obtiveram, após 200 gerações, linhagens evoluídas de *S. cerevisiae* com melhor tolerância ao etanol em relação as linhagens parentais, no ambiente estressante de fermentação de vinho de arroz chinês. As cepas de levedura evoluídas também mostraram tolerância aumentada a altas pressões osmóticas e de temperatura.

O alto nível de estresse causado pelo etanol durante o processo de fermentação do vinho de arroz chinês foi utilizado como pressão seletiva para a evolução. A hipótese dos pesquisadores foi de que, em concentrações estressantes de etanol, as variantes tolerantes ao composto viveriam mais do que as menos tolerantes e, portanto, iriam dominar o mosto de fermentação durante o cultivo a longo prazo. Uma fermentação em escala de laboratório, confirmou a melhor tolerância ao etanol da cepa G85X-8 em comparação com a parental (CHEN; XU, 2014).

Já Koppram e colaboradores (2012), utilizaram *S. cerevisiae* recombinante TMB3399, assimiladora de xilose, em estudos para aumentar sua tolerância aos inibidores presentes no hidrolisado de abeto. Foram empregadas duas abordagens de Engenharia Evolutiva: Bateladas repetidas em meio definido contendo xilose e coquetel de inibidores (reproduzindo os encontrados no hidrolisado de abeto); e quimiostatos usando hidrolisado de abeto. Foram obtidas três estirpes evoluídas, apresentando melhor tolerância aos inibidores, menor tempo de fermentação e maior velocidade específica de crescimento. Porém, apenas uma delas foi capaz de assimilar xilose em condições fermentativas, já que os experimentos de Engenharia Evolutiva foram conduzidos em condições aeróbias. O rendimento em etanol alcançado foi de $0,44 \text{ g.g}^{-1}$, a partir de hidrolisado de abeto contendo 9 g.L^{-1} de xilose e 18 g.L^{-1} de glicose, na presença de inibidores ($3,4 \text{ g.L}^{-1}$ de hidroximetilfurfural; $1,1 \text{ g.L}^{-1}$ de furfural; $6,3 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético, dentre outros).

A ocorrência de poucos estudos de evolução adaptativa em condições fermentativas é um aspecto que merece destaque. Como ilustra a Tabela 1, quase todos os estudos foram conduzidos sob agitação. Levando-se em conta que o organismo selecionado será cultivado em condições fermentativas, é importante que essa condição se faça presente já nas etapas de transferências sucessivas da evolução adaptativa.

Durante a evolução adaptativa, certas características mudam e estão associadas a um aumento da aptidão, como um fenótipo ou propriedade melhorados. No entanto, para a biotecnologia, parâmetros como taxa de crescimento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$), taxas de sobrevivência em concentrações tóxicas de certos compostos químicos e rendimento em biomassa são critérios mais apropriados para caracterizar a evolução (DETTMAN et al., 2012; DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

A Tabela 2 apresenta alguns estudos selecionados que utilizaram como fator determinante de evolução a taxa de crescimento máxima $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1}).

Tabela 2. Dados selecionados de parâmetros para linhagens antes e após processo de evolução.

Autores	Cepa Evoluída	Condições de Cultivo	Substrato	$\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	$\mu_{m\acute{a}x}$ Evoluída (h^{-1})
Li et al., 2016	<i>S. cerevisiae</i> O7E15	30 °C - 180 rpm	Xilose 2%	0,018	0,153
dos Santos et al., 2016	<i>S. cerevisiae</i> LVY34.4	30 °C - 200 rpm	Xilose 4%	-	0,213
Ho et al., 2017	<i>S. cerevisiae</i> PW-2	30 °C - 200 rpm	Glicerol 6% (v/v)	-	0,127

Observa-se que, após passarem pelo processo de evolução adaptativa, as células apresentaram maior velocidade de crescimento específica nas condições requeridas (Tabela 2), destacando-se que em dois dos estudos não havia crescimento nenhum no substrato em questão antes do processo de adaptação.

Avanços em técnicas de sequenciamento, análise e edição de genomas de leveduras transformaram a engenharia evolutiva de uma simples estratégia aleatória de melhoria de cepas em um recurso inestimável para a compreensão das fábricas celulares de levedura (MANS; DARAN; PRONK, 2018). No entanto, o mecanismo de evolução para cepas com XI ainda não é bem compreendido, pois não há relatos focados nas alterações transcricionais do genoma completo referente a essa via antes e após a evolução (LI et al., 2017). Assim como o mecanismo referente a tolerância ao etanol, que mesmo após inúmeros estudos ainda não é totalmente conhecido.

4 Materiais e Métodos

4.1 Microrganismo

Todos os experimentos foram conduzidos com a linhagem geneticamente modificada da levedura *S. cerevisiae* MDS 130 gentilmente cedida pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Johan M. Thevelein, da K U Leuven, Bélgica.

A linhagem MDS130 apresenta desempenho superior ao da linhagem GSE16-T18 HAA1 (MILESSI, 2017) em hidrolisados lignocelulósicos, além da expressão da xilose isomerase, superexpressão da xiluloquinase e outras modificações genéticas usualmente presentes nas leveduras recombinantes de última geração para produção de etanol 2G (DEMEKE et al., 2013c). A linhagem MDS130 foi obtida a partir de linhagens anteriores, construídas pelo grupo do Dr. Thevelein e detalhadamente descritas nos trabalhos de Demeke et al. (2013a,b) e Meijnen *et al.* (2016), sendo comercializada pela empresa GlobalYeast (<http://www.globalyeast.com/>). A cultura estoque é armazenada em criotubos (Tópico 4.4.6) com 30% v/v de glicerol e mantida em ultra freezer à -80°C.

4.2 Meios de cultivo

A composição dos diferentes meios, sólidos e líquidos, utilizados no presente estudo é descrita a seguir.

4.2.1 Meios complexos preparados com xilose e/ou glicose P.A.

Para ativação das células armazenadas em criotubos foi utilizado meio sólido YPXA com a seguinte composição: 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Sigma); 20 g.L⁻¹ de peptona de soja (Kerry); 20 g.L⁻¹ de D-xilose (Sigma-Aldrich) e 1,5% (m/v) de ágar bacteriológico (Acumedia).

O meio YPXA foi esterilizado por autoclavagem (15 min a 121°C). Após foi adicionado ao meio 0,2 uL.mL⁻¹ de ampicilina (100 mg.mL⁻¹). Os açúcares, neste caso xilose, sempre foram autoclavados separado da peptona e do extrato de levedura.

Nos experimentos em micro-reator foram utilizados meios líquidos complexos de composição descrita a seguir.

YPX 2%: 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Sigma), 20 g.L⁻¹ de peptona de soja (Kerry) e 20 g.L⁻¹ de D-xilose (Sigma-Aldrich).

YPDX: 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Sigma), 20 g.L⁻¹ de peptona de soja (Kerry) e açúcares (xilose e glicose- Sigma-Aldrich) na mesma concentração quantificada no hidrolisado de hemicelulose bruto, descrita no item 4.4.2.

Também foram preparadas variações dos meios descritos acima, como o YPX e YPD com diferentes concentrações de xilose e glicose, respectivamente; e o meio YPX 2% suplementado com diferentes concentrações iniciais de etanol.

Todos os meios tiveram seu pH corrigido para 5,6 através da adição de solução de ácido sulfúrico (2M) ou hidróxido de sódio (2M) quando necessário. Os meios foram ainda suplementados com 0,2 uL.mL⁻¹ do antibiótico ampicilina (100 mg.mL⁻¹) antes da utilização.

4.2.2 Meios complexos preparados com hidrolisado de hemicelulose

O hidrolisado de hemicelulose foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do Prof. Silvio Silvério da Silva e do Prof. Júlio Santos, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena- Universidade de São Paulo (USP). Ele foi obtido por pré-tratamento ácido e posteriormente concentrado em rotaevaporador. O procedimento de obtenção do hidrolisado concentrado está descrito em Milessi e colaboradores (2013).

A caracterização do hidrolisado foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As concentrações de açúcares e ácido acético obtidas estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Caracterização do hidrolisado de hemicelulose: Açúcares e inibidores.

COMPONENTE	CONCENTRAÇÃO (g.L ⁻¹)
Glicose	9,27
Xilose	60,63
Arabinose	7,80
Ácido Acético	11,16
HMF	0,21
Furfural	0,24

A partir do hidrolisado de hemicelulose fornecido foram preparados 2 derivados utilizados nas formulações dos meios de cultivo: hidrolisado bruto (HB) e hidrolisado destoxificado (HD).

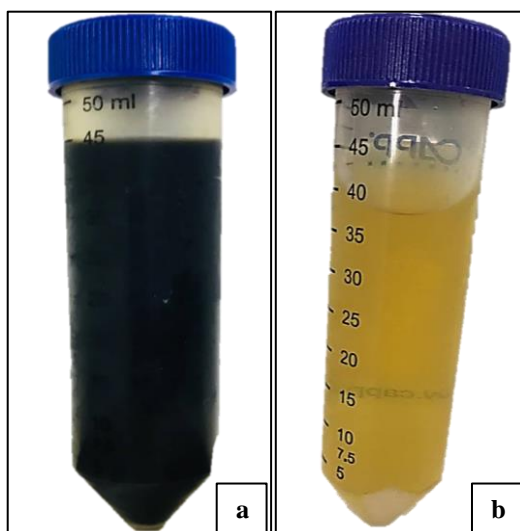
Para a preparação do HB, o hidrolisado concentrado foi previamente homogeneizado e filtrado em papel filtro qualitativo (gramatura $80\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$). Posteriormente foi suplementado com $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de extrato de levedura (Sigma) e $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de peptona de soja (Kerry) e teve seu pH corrigido para 5,6. Fez-se nova filtração em papel filtro qualitativo para remoção dos precipitados e por fim, o HB obtido foi esterilizado por filtração em membrana estéril ($0,22\text{ }\mu\text{m}$) antes da utilização como meio de cultivo.

O HD foi obtido a partir do processo de destoxificação descrito a seguir. A destoxificação é caracterizada por uma sequência de tratamentos cuja finalidade é diminuir a concentração dos compostos tóxicos presentes nos hidrolisados, favorecendo a eficiência das fermentações a partir de matérias-primas lignocelulósicas (WANG et al., 2018). Assim, para redução dos contaminantes, o hidrolisado de hemicelulose bruto foi destoxificado segundo metodologia descrita por Alves e colaboradores (1998).

Primeiramente, o hidrolisado teve seu pH inicial, de aproximadamente 0,5, aumentado para 10 com adição de óxido de cálcio (CaO) sob agitação contínua. A suspensão resultante foi filtrada em um sistema composto por kitasato, papel filtro qualitativo ($3\text{ }\mu\text{m}$), funil de Buchner e bomba a vácuo. O filtrado obtido teve seu pH corrigido novamente, para 5,5, com ácido fosfórico (H_3PO_4). Em seguida, a suspensão resultante foi novamente filtrada.

A próxima etapa foi a adição de carvão ativado 2,5% (m/v), com posterior incubação a 200 rpm, 30°C por 1 hora (incubadora shaker- Superohm). Após esse tempo, a solução foi filtrada e autoclavada, por 15 minutos a 110°C , resultando no hidrolisado destoxificado (HD), apresentado na Figura 8.

Figura 8. Imagens dos hidrolisados de hemicelulose: Bruto (a) e Destoxificado (b).



Fonte: Acervo pessoal.

Assim como o HB, o meio formulado a partir do HD foi suplementado com 10 g.L⁻¹ de extrato de levedura (Sigma) e 20 g.L⁻¹ de peptona de soja (Kerry). Seu pH foi ajustado para 5,6. A solução obtida foi filtrada em membrana estéril (0,22 µm).

4.3 Métodos Analíticos

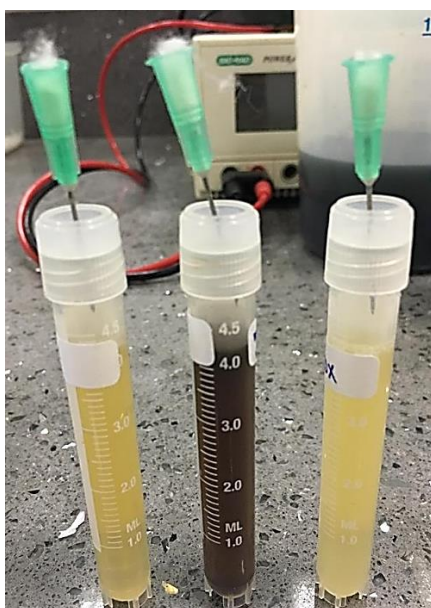
4.3.1 Acompanhamento da produção de CO₂

Visando o acompanhamento dos cultivos com mínima interferência nas condições fermentativas, foi usado o método descrito por Milessi (2017), baseado no acompanhamento da produção de CO₂. Para tanto, foram confeccionados os micro-reatores mostrados na Figura 9, que foram utilizados em todos os experimentos realizados.

Cada micro-reator consiste de um criotubo com vedação, de volume 5 mL, dotado de saída de gás para o ambiente (MILESSI, 2017). Foi preenchido com 4 mL de meio referente ao respectivo experimento e fechado após a inoculação, visando a manutenção de condições anaeróbias durante o cultivo.

O sistema (Figura 9) permite que gases escapem quando ocorre um aumento de pressão interna. Como a pressão externa é aproximadamente constante e se torna menor que a interna, somente gases de dentro do micro-reator são expelidos, caracterizando, para a fermentação, o gás carbônico produzido durante o processo.

Figura 9. Micro-reatores utilizados para os experimentos.



Fonte: Acervo pessoal.

A produção de gás carbônico (CO₂) ao longo da fermentação foi acompanhada pela pesagem dos micro-reatores. A variação de massa medida em cada tempo é descontada da variação referente ao micro-reator controle, que contém somente o meio de cultivo fresco referente a condição em questão, para quantificar a perda de massa por evaporação.

O cálculo está apresentado na equação 1.

$$m_{CO_2}(g) = (m_{0exp} - m_{texp}) - (m_{0controle} - m_{tcontrole}) \quad (1)$$

Sendo,

$m_{CO_2}(g)$: Massa cumulativa de CO₂ liberada até o tempo da medida.

$m_{0exp}(g)$: Massa do micro-reator inoculado no tempo zero.

$m_{texp}(g)$: Massa do micro-reator inoculado no tempo da medida.

$m_{0controle}$: Massa do controle no tempo zero.

$m_{tcontrole}$: Massa do controle no tempo da medida.

4.3.2 Crescimento celular (Densidade ótica- DO₆₀₀)

O crescimento celular foi acompanhado por meio de medidas da densidade ótica (DO₆₀₀) das suspensões de células ao final das fermentações. A leitura foi feita em espectrofotômetro (Thermo Scientific Genesys) ajustado ao comprimento de onda de 600 nm.

4.3.3 Viabilidade e Contagem de células

A viabilidade da levedura foi avaliada por coloração das células com azul de metileno. Foram utilizadas soluções de sal di-sódico EDTA (0,1 mol.L⁻¹) como agente desaglomerador e de azul de metileno (0,02% de azul de metileno com 2% de citrato de sódio) como colorante para as células não viáveis, incapazes de manter a seletividade da membrana celular.

Uma alíquota, adequadamente diluída, da suspensão preparada foi adicionada sobre a câmara de Neubauer e observada em microscópio (Leica- DM 3000) com ampliação de 400 vezes. As imagens foram capturadas e armazenadas para posterior análise.

O cálculo de viabilidade é definido como a razão entre células viáveis e totais (viáveis e não viáveis) computadas num espaço definido da câmara de contagem (SILVA, 2013). É utilizada a equação 2.

$$\text{Viabilidade}(\%) = \left(\left(\frac{\bar{x}}{y} \right) \pm DP \right) \cdot 100 \quad (2)$$

Onde:

x: número de células viáveis presentes em um espaço definido da câmara de Neubauer de i (para i variando de 1 até 5)

y: número de células totais presentes no mesmo espaço definido da câmara de Neubauer de i (para i variando de 1 até 5)

$\frac{\bar{x}}{y}$: Média da viabilidade dos 5 campos da câmara de Neubauer.

DP: desvio padrão

A determinação da concentração de células (n° células.mL⁻¹) ao final das fermentações foi feita pela contagem em câmara de Neubauer e por contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), através de diluição seriada.

A metodologia de UFC foi feita somente para as três últimas condições de evolução, visando comparar com os valores obtidos através da contagem em câmara de Neubauer.

O procedimento consistiu em transferir um volume de 0,1 mL das suspensões adequadamente diluídas, sobre placas preparadas com meio YPXA 2% (Item 4.1.4) suplementado com etanol (na concentração inicial de cada condição de cultivo) e espalhar a suspensão com alça de drigalski. Em seguida, as placas foram armazenadas em incubadora (Tecnal/ B.O.D. TE-371) a 35°C, por tempo suficiente para observar formação das colônias.

O cálculo da concentração celular (UFC) foi realizado levando em consideração o volume de amostra transferido e dado em n° células.mL⁻¹:

$$C_{UFC} = \frac{\text{médias(células contadas).diluição}}{V_{\text{amostra}}} \pm DP \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}^{-1}} \right) \quad (3)$$

Onde:

V_{amostra}: volume de amostra utilizado para inocular a placa (0,1 mL).

Diluição: diluição utilizada para a placa referente a contagem.

Na câmara de Neubauer, é obtido o número de células por 0,1 mm³. Para a concentração em n° células.mL⁻¹ é utilizada a equação 4.

$$C_{\text{celular}} = \left(\frac{\text{média (células)} \cdot 25}{0,0001} \right) \cdot \text{diluição} \pm DP \left(\frac{\text{células}}{\text{mL}^{-1}} \right) \quad (4)$$

4.3.4 Quantificação de ácidos nucleicos

Para avaliar se houve lise celular durante a evolução adaptativa, foi quantificada a concentração de ácidos nucleicos nas amostras ao final de cada batelada sucessiva.

A metodologia escolhida foi de leitura da absorbância. As amostras, adequadamente diluídas, foram analisadas num comprimento de onda de 260 nm. O valor obtido foi multiplicado por 50, que corresponde à concentração de ácidos nucleicos em mg.L⁻¹ em uma unidade de absorbância (HEPTINSTALL; RAPLEY, 2000).

O cálculo para obter a concentração de ácidos nucleicos está apresentado na Equação 5.

$$C_{AN} = 50 * \text{Absorbância} \quad (5)$$

Onde:

C_{AN}: Concentração de ácidos nucleicos (mg.L⁻¹);

Absorbância: Absorbância em espectrofotômetro num comprimento de onda de 260 nm.

4.3.5 Determinação da concentração de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores

Os carboidratos e ácidos orgânicos dos meios frescos e das suspensões finais, foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi utilizado o cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, empregando detector de índice de refração modelo RID-10A e UV-visível. Para separação dos compostos, foi utilizada a coluna RezexTM ROA organic acid H⁺, com fase móvel ácido sulfúrico 5mM, fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de 45 °C.

Para a determinação dos inibidores, o cromatógrafo Shimadzu SPD-10, com detector de UV-visível, foi equipado com a coluna SunFire C18. Como fase móvel foi utilizada solução de acetonitrila com água ultrapura, na proporção de 1:8 e 1% de ácido acético, vazão de 0,8 mL.min⁻¹ e temperatura do forno de 40 °C.

Os compostos detectados nas análises de carboidratos, ácidos orgânicos e contaminantes foram: glicose, xilose, etanol, glicerol, xilitol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

As amostras que possuíam derivados de lignina e outros produtos de degradação provenientes do pré-tratamento foram devidamente filtradas em filtro Sep-Pak® C-18 (Waters) e posteriormente em membranas de 0,22 µm, antes de serem analisadas no cromatógrafo. Sem a presença dos contaminantes, foi feita somente a última filtração.

Os compostos fenólicos foram quantificados segundo a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999).

4.4 Procedimento Experimental

- A execução da parte experimental do trabalho foi distribuída em 4 etapas. Inicialmente, na Etapa 1, avaliou-se a metodologia de acompanhamento das fermentações proposta (pela quantificação da liberação de CO₂) e as condições iniciais de cultivo empregadas no micro-reator. Em seguida, na Etapa 2, foram realizados experimentos preliminares, para a caracterização da cepa recombinante parental *Saccharomyces cerevisiae* MDS 130 quanto à tolerância ao etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico.

A partir da análise dos perfis fermentativos em hidrolisado bruto, destoxificado e em YPD_X (meio complexo utilizado como referência livre de inibidores) obtidos na Etapa 2 foi possível identificar o meio mais adequado para condução dos ensaios de evolução adaptativa.

A Etapa 3 foi dedicada aos estudos de Evolução Adaptativa. E, finalmente, na Etapa 4, foram realizados os experimentos para a caracterização das linhagens evoluída e parental em termos de assimilação de xilose, glicose e tolerância ao etanol e aos inibidores, para posterior comparação de desempenho entre ambas. Para a identificação do limite de tolerância a etanol da cepa recombinante, os cultivos foram realizados em meios suplementados inicialmente com 0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹ do composto.

Todos os experimentos foram efetuados no Laboratório de Fábricas Celulares (LaFac) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos -UFSCar. Os procedimentos experimentais adotados em todas as etapas são descritos a seguir.

4.4.1 Preparação da cultura estoque

A levedura MDS 130 cedida pela KU Leuven estava na forma de células retidas em membrana de filtração. Foi, portanto, necessário realizar a reativação para sua posterior armazenagem em criotubos.

O processo de reativação consistiu em esfregar a membrana sobre duas placas contendo meio YPDA 2% (composição descrita em 4.2.1, porém com a fonte de açúcar dextrose) e então armazená-las em incubadora (Tecnal/ B.O.D. TE-371) à 35°C, por tempo suficiente até ser observada a formação de colônias isoladas.

Uma colônia isolada da placa foi adicionada à 30 mL de meio YPX 2% (composição descrita em 4.2.1), em erlenmeyer de 300 mL. O inóculo foi mantido em incubadora shaker (Superohm) com agitação de 300 rpm à 30°C, até atingir densidade ótica (DO₆₀₀) de 2,5, relativa à fase exponencial de crescimento. Então um volume pré calculado da suspensão foi transferido

para criotubos com o agente crioprotetor glicerol (50%), visando uma concentração final de 30% v/v. Os criotubos foram identificados e estocados em ultra freezer a -80°C.

4.4.2 Ativação da cepa em meio sólido

A cultura estoque, armazenada em criotubos, foi reativada em placas contendo meio sólido YPXA 2% (Item 4.2.1). O mesmo criotubo foi utilizado até o limite de quatro vezes.

Para a ativação, o estoque de células é estriado sobre a placa, que posteriormente é mantida em incubadora (Tecnal/ B.O.D. TE-371), como descrito no tópico 4.4.1.

A Figura 10 apresenta a foto de uma placa com células ativadas da cepa MDS 130.

Figura 10. Cultura de células MDS 130 ativada em placa com meio YPXA 2%.



Fonte: Acervo pessoal.

4.4.3 Inóculo

Uma colônia isolada, da placa previamente incubada (Item 4.4.2), foi adicionada a 30 mL de meio YPX 2% (composição descrita em 4.2.1), em erlenmeyer de 300 mL. O inóculo foi mantido em incubadora shaker (Superohm) com agitação de 300 rpm à 35°C, até atingir densidade ótica (DO_{600}) de 2,5, relativa à fase exponencial de crescimento. Em seguida, um volume pré-calculado da suspensão (para DO inicial desejada), foi transferido para os micro-reatores, preenchidos com meio com a composição desejada.

4.4.4. Avaliação das condições de fermentação em micro-reator e da metodologia de acompanhamento por liberação de CO₂

Na Etapa 1 do trabalho, avaliou-se a viabilidade de acompanhar as fermentações pela liberação de massa de gás carbônico e de utilizar o micro-reator proposto para conduzir as fermentações. Essa avaliação foi baseada no estabelecimento de uma relação entre a densidade

ótica da suspensão e a massa de gás carbônico liberada (Item 4.3.1) no decorrer do processo fermentativo.

Esse estudo, foi conduzido em oito micro-reatores, sendo sete inoculados com densidade ótica inicial 0,1, a partir de inóculo preparado conforme descrito em 4.4.3. Cada micro-reator continha 4 mL de meio YPX 2% (composição descrita em 4.2.1). Um dos micro-reatores foi usado como controle para a perda de massa por evaporação e, portanto, não foi inoculado. Todos os micro-reatores foram mantidos em incubadora (Superohm) em condição estática à 35°C.

Para não perturbar as condições fermentativas do meio e dado que todos os micro-reatores se encontravam em igual condição, cada um deles foi retirado da incubadora em intervalos de tempo pré-determinados, até o final da fermentação. Primeiramente, foi medida a massa do micro-reator para determinação da massa de CO₂ liberada (item 4.3.1) e então a suspensão final foi caracterizada quanto à densidade ótica (Item 4.3.2) e à composição em açúcares e produtos (Item 4.3.5).

4.4.5. Experimentos preliminares

Na Etapa 2 do trabalho, o desempenho da linhagem *S. cerevisiae* MDS 130 nos meios preparados com os hidrolisados bruto (HB) e destoxificado (HD) assim como no meio YPX 2%, suplementado com diferentes concentrações iniciais de etanol, foi avaliado. O principal objetivo dessa etapa foi identificar o tipo de hidrolisado e a concentração inicial de etanol mais adequados para conduzir os experimentos de Evolução Adaptativa.

Todas as fermentações foram conduzidas nos micro-reatores de 5 mL dotados de saída para o CO₂ (Figura 9), incubados a 35°C em condição estática. Foi transferido volume previamente calculado do inóculo, de forma que a densidade ótica inicial fosse 0,1 em todos os frascos, para 4 mL de cada meio em questão. Para os experimentos com os diferentes hidrolisados, os meios foram preparados conforme descrito em 4.2. Já para os experimentos de avaliação da tolerância ao etanol, as células de levedura recombinante foram cultivadas em meio YPX 2% (Item 4.2.1) suplementado com etanol nas concentrações iniciais de 0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹. As bateladas repetidas foram realizadas a partir da transferência das células centrifugadas (5 min, 4°C, 10000 rpm) para meio de cultivo fresco. Nos experimentos com etanol, a esterilização foi feita por filtração em membrana de 0,22 µm. Para acompanhar a massa de CO₂ perdida por evaporação, foi mantido um micro-reator controle durante todo o processo (Item 4.3.1).

Os hidrolisados utilizados nos experimentos foram caracterizados previamente com relação aos contaminantes furfural e hidroximetilfurfural, por CLAE (Item 4.3.5). E a concentração de compostos fenólicos totais foi determinada segundo metodologia proposta por Singleton e colaboradores (1999).

Todas as fermentações foram acompanhadas através de medidas da massa de CO₂ liberado (Item 4.3.1). As suspensões obtidas ao final das fermentações foram caracterizadas em termos de densidade ótica (Item 4.3.2), viabilidade (Item 4.3.3) e concentrações de açúcares consumidos e produtos formados (Item 4.3.5).

4.4.6. Evolução Adaptativa

Partindo da levedura geneticamente modificada MDS 130, aplicou-se a metodologia de evolução adaptativa (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013) para obter uma cepa evoluída capaz de utilizar o hidrolisado de hemicelulose destoxificado (Item 4.2.2), selecionado a partir dos resultados obtidos na Etapa 2, e tolerar concentrações de etanol superiores a 50 g.L⁻¹.

Visando aumentar gradualmente a exposição das células ao etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado, utilizou-se a combinação de dois meios líquidos distintos, em proporções variáveis para cada condição sucessiva de evolução (Tabela 4).

- **Meio (I):** YPX 2% (Item 4.2.1);
- **Meio (II):** Hidrolisado de hemicelulose destoxificado (HD), suplementado com extrato de levedura 10 g.L⁻¹, peptona 20 g.L⁻¹ e etanol 50 g.L⁻¹.

O pH inicial foi ajustado para 5,6 em todas as condições.

Tabela 4. Condições de cultivo para a evolução adaptativa e estimativa do número de transferências sucessivas realizadas em cada uma.

Condição	Composição do meio	Nº de micro-reatores
A	100% (I)	1
B	20% (II) + 80% (I)	~10
C	30% (II) + 70% (I)	~10
D	45% (II) + 55% (I)	~10
E	62% (II) + 38% (I)	~10
F	80% (II) + 20% (I)	~10
G	100% (II)	~10

A Tabela 4 também apresenta uma estimativa do número de transferências realizadas numa mesma condição, representada pelo número de micro-reatores.

A combinação de porcentagens de meios em cada condição de evolução foi definida a partir do observado na etapa anterior. Assim, cada nova condição foi preparada objetivando a continuação do processo evolutivo, evitando expor as células a uma concentração de etanol superior àquela que tenha sido exposta no final da última batelada.

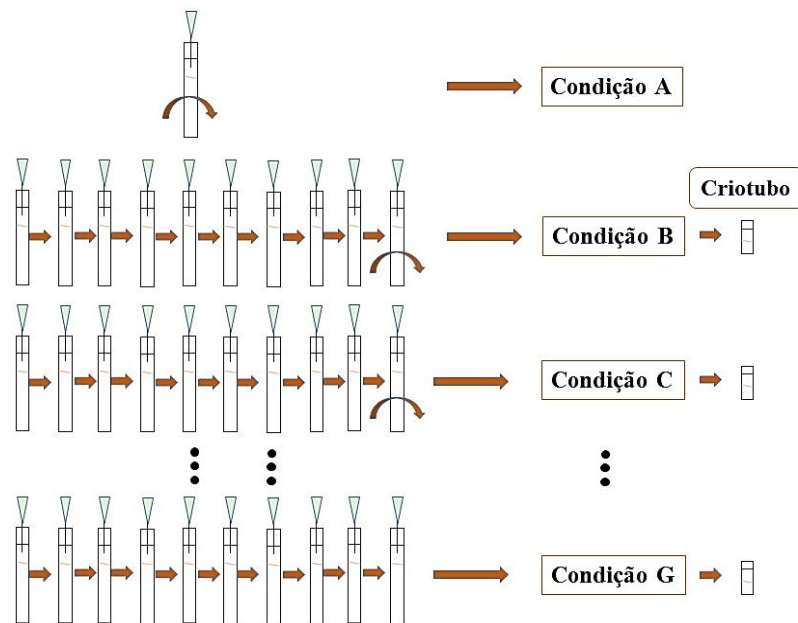
O experimento foi iniciado transferindo volume de inóculo (4.4.3) adequado para obter DO inicial 0,1 no micro-reator, contendo 4 mL de meio fresco referente à condição A (Tabela 4). Um outro micro-reator, contendo o mesmo volume de meio fresco, foi preparado sem adição do inóculo, para controle da perda de massa por evaporação. Ambos foram incubados estaticamente à 35°C (Incubadora Superohm).

O acompanhamento do cultivo foi feito através da pesagem dos micro-reatores (Item 4.3.1). As transferências para meio fresco foram realizadas na fase estacionária de crescimento, visando maior conversão dos açúcares fermentescíveis do meio, mesmo que a taxa de fermentação seja menor, o que torna o processo de evolução mais lento.

A partir da condição C, a conversão de 65 % foi estipulada como requisito mínimo para a transferência das células, visando manter a população apta a converter os açúcares disponíveis mesmo em concentrações mais baixas. Para transferir as células à nova condição de meio, com maior pressão seletiva, adotou-se como critério mínimo a exigência de que ocorressem três fermentações consecutivas, na mesma condição, com características similares, demonstrando homogeneidade da população.

O esquema ilustrativo das transferências sucessivas está apresentado na Figura 11.

Figura 11. Esquema de transferências utilizado no processo de Evolução Adaptativa.



Fonte: Acervo pessoal.

O processo de transferência para meio fresco consistiu em transferir uma alíquota previamente calculada a partir da leitura da DO final da suspensão da condição anterior, de forma que a densidade ótica inicial fosse 0,1 no próximo frasco.

A partir da condição F1, a fermentação começou a ficar extremamente lenta, alcançando baixos valores de densidade ótica final. Por isso, introduziu-se uma estratégia inspirada na proposta por Gonzalez e colaboradores em 2016, intitulada *on-off*. No caso dos nossos estudos, foi incorporada uma etapa intermediária para enriquecimento da população de células adaptadas através do cultivo em meio com a composição da condição D (Tabela 4), denominada como *Boost*. Para o primeiro *boost* (*Boost 1*) toda a suspensão fermentada da condição F1 foi centrifugada a 10000 rpm, 4°C por 5 minutos e transferida, em partes iguais, para dois microreatores com meio referente à condição D, contendo menor quantidade de etanol. Ao final das 2 fermentações paralelas realizadas no *Boost 1*, as suspensões foram centrifugadas e todas as células obtidas foram ressuspensas no meio F, dando início à condição F2. O procedimento de *boost* foi repetido sempre que se observou uma diminuição da velocidade fermentativa, envolvendo a transferência das células em evolução novamente para micro-reatores contendo o meio D. O número de micro-reatores utilizados em cada *boost* variou entre 2 a 4, dependendo do efeito da pressão seletiva sobre a população de células. Os detalhes sobre cada etapa de *boost*

aplicada ao longo da Evolução Adaptativa serão discutidos no tópico de resultados. O procedimento de *boost* foi mantido até a condição final de adaptação G.

Para todas as fermentações realizadas na etapa de Evolução Adaptativa, as suspensões finais obtidas ao final de cada fermentação (antes da transferência) foram caracterizadas em termos de DO₆₀₀ (4.3.2) e viabilidade (4.3.3). Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado (0,22 µm) e armazenado para posterior análise de compostos por CLAE (4.3.5).

A partir da suspensão coletada na última fermentação de cada condição, foram preparados criotubos para armazenamento das culturas gradualmente evoluídas.

Para o preparo dos criotubos, uma alíquota do meio fermentado foi coletada e transferida para um eppendorf estéril de 2 mL. Centrifugou-se o mesmo a 10000 rpm, 4°C por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensionado em meio fresco com a mesma composição da condição em estudo, com metade do volume inicial centrifugado.

Como agente crioprotetor foi utilizado glicerol 50%, em volume adequado para obter uma suspensão final de células contendo 30% v/v de glicerol.

Os criotubos foram identificados e estocados em ultrafreezer a -80°C.

4.4.7. Caracterização da linhagem evoluída

Na Etapa 4, foi feita a caracterização da linhagem evoluída obtida ao final dos ensaios de evolução adaptativa.

Foram executados experimentos em diferentes condições, com distintas finalidades. A tolerância ao etanol foi analisada similarmente aos cultivos da etapa preliminar, em meio YPX 2% com diferentes suplementações iniciais do composto. Para caracterizar a capacidade fermentativa da nova cepa, foram conduzidos cultivos em meios contendo xilose ou glicose, em diferentes concentrações iniciais. E, por fim, realizou-se um estudo da integridade das células quando mantidas em suspensão contendo 60 g.L⁻¹ de etanol com o intuito de verificar o efeito da exposição prolongada ao etanol.

Todas as fermentações foram conduzidas nos micro-reatores de 5 mL dotados de saída para o CO₂ (Figura 9), incubados a 35°C em condição estática. Foi transferido volume previamente calculado do inóculo, de forma que a densidade ótica inicial desejada fosse alcançada em todos os frascos, para 4 mL de cada meio em questão.

Nos experimentos para avaliar a tolerância ao etanol, as células evoluídas foram cultivadas em meio YPX 2% (item 4.2.1) suplementado com etanol nas concentrações iniciais

de 0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹ para DO₆₀₀ inicial: 0,1 e 0, 20, 40, 80 e 90 g.L⁻¹ para DO₆₀₀ inicial 5. O etanol foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm.

Para os ensaios com variação da concentração inicial de substrato, a DO₆₀₀ inicial de inoculação foi 3. Utilizou-se meio YP (Item 4.2.1) com concentrações iniciais de 30, 60, 90, 120 e 150 g.L⁻¹ de glicose e xilose, separadamente. Os testes foram realizados paralelamente com a linhagem parental.

O experimento para avaliar a resistência da estirpe evoluída ao etanol em solução hidroalcoólica (60 g.L⁻¹ de etanol), foi conduzido com DO₆₀₀ inicial igual a 10. A suspensão foi mantida em incubadora a 35°C estaticamente pelo tempo necessário para observar a totalidade das células se tornar inviável. Alíquotas da suspensão foram coletadas em intervalos de tempo pré-determinados e analisadas quanto à viabilidade (Item 4.3.3) e concentração de ácidos nucleicos (Item 4.3.4). A linhagem parental também foi testada sob as mesmas condições, visando comparabilidade.

Todas as fermentações foram conduzidas nos micro-reatores de 5 mL dotados de saída para o CO₂ (Figura 9), incubados a 35°C em condição estática. Foi transferido volume previamente calculado do inóculo, de forma que a densidade ótica inicial desejada fosse alcançada em todos os frascos, para 4 mL de cada meio em questão.

As fermentações foram acompanhadas por medidas de massa de CO₂ liberado, sendo mantido um micro-reator controle durante todo o processo (Item 4.3.1) para acompanhar a massa perdida por evaporação do meio. Os meios fermentados foram caracterizados em termos de densidade ótica (Item 4.3.2), viabilidade (Item 4.3.3) e concentração de substrato e metabólitos (Item 4.3.5).

4.5 Procedimentos de cálculo

4.5.1 Determinação da velocidade específica de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento foi definida através de balanço de massa em reator batelada (SHULER, M.; KARGI, 2002), como mostra a Equação 6.

$$\frac{d(C_x \cdot V)}{dt} = \mu \cdot C_x \cdot V \quad (6)$$

Onde,

C_x= concentração de células (g.L⁻¹);

µ= taxa de crescimento celular (h⁻¹);

V= volume de meio (L);

Considerando volume constante, a velocidade específica de crescimento pode ser isolada, como mostra a Equação (7).

$$\mu = \left(\frac{1}{C_x}\right) \frac{dC_x}{dt} \quad (7)$$

Rearranjando:

$$\mu \cdot dt = \frac{dC_x}{C_x} \quad (8)$$

Quando a velocidade específica de crescimento é constante, $\mu = \mu_c$ (constante), a equação 8 pode ser integrada, resultando em:

$$\mu_c = \frac{\ln(C_x/C_{x0})}{t} \quad (9)$$

Rearranjando:

$$\ln(C_x) = \mu_c \cdot t + \ln(C_{x0}) \quad (10)$$

A velocidade específica de crescimento constante é normalmente observada na fase exponencial de crescimento e identificada como velocidade máxima específica de crescimento. Porém, em fermentações na presença de inibidores e sob limitação por oxigênio, a velocidade permanece constante durante um longo período de cultivo, embora as células não estejam na fase exponencial de crescimento ilimitado (SHULER, M.; KARGI, 2002).

Como os experimentos foram acompanhados pela liberação de massa de gás carbônico, a concentração celular C_x presente na Equação (10), diretamente relacionada com a densidade ótica, foi estimada a partir da massa de CO_2 produzida, conforme descrito a seguir (Equações 11 a 16).

Sabendo que:

$$DO = f(m_{CO_2} \text{ produzida})$$

E que:

$$C_x = a \cdot DO \text{ (curva de calibração)} \quad (11)$$

$$m_x = a \cdot DO \cdot V \text{ (V constante)} \quad (12)$$

Onde:

a: coeficiente de correlação.

A partir de uma correlação obtida entre a variação da densidade ótica celular e a massa de gás carbônico produzida normalizada (Item 5.1), é possível obter os valores de DO₆₀₀ referentes à massa de CO₂ liberada em cada intervalo de tempo acompanhado.

O cálculo das massas de CO₂ produzido normalizadas foram realizados segundo a equação 13.

$$m_{\text{CO}_2\text{norm}} = \frac{m_{\text{CO}_2(t)}}{m_{\text{CO}_2\text{final}}} \quad (13)$$

Onde:

$m_{\text{CO}_2\text{norm}}$: Massa de gás carbônico liberada normalizada (g);

$m_{\text{CO}_2\text{final}}$: Massa máxima de gás carbônico liberada (g);

$m_{\text{CO}_2}(t)$: Massa de gás carbônico liberada em cada intervalo de tempo (g).

A correlação empírica que representa a variação da densidade ótica em função da massa de CO₂ produzido é dada pela função polinômio de 2ª ordem, conforme mostra a Equação (14):

$$\Delta \text{DO} = b. (m_{\text{CO}_2\text{norm}})^2 + c. m_{\text{CO}_2\text{norm}} \quad (14)$$

Sendo,

b e c: coeficientes de correlação.

Finalmente, o valor de DO foi estimado pela Equação (15):

$$\text{DO}(t) = \text{DO}_0 + \Delta \text{DO} \quad (15)$$

Onde:

DO₀: Densidade ótica inicial da batelada.

Rearranjando a equação 10 em relação a DO, tem-se:

$$\ln(\text{DO}) = \mu_c \cdot t + \ln(\text{DO}_0) \quad (16)$$

A partir dos dados de DO (t) obtidos pela equação 15 é possível representar graficamente a equação 16 e encontrar μ_c , referente à inclinação da reta.

Os valores estimados para μ_c foram utilizados para os cálculos posteriores de tempo de geração e conseqüentemente número de gerações da evolução adaptativa.

4.5.2 Determinação do número de gerações

Para determinar o número de gerações, é necessário conhecer o tempo de duplicação (t_d), ou seja, tempo necessário para que a concentração celular dobre.

O número de gerações (η_{ger}) é dado pela equação 17 (SHULER, M.; KARGI, 2002).

$$\eta_{ger} = \frac{t_{cultivo}}{t_d} \quad (17)$$

Sendo:

$t_{cultivo}$: Tempo de duração da fase de crescimento a velocidade constante (μ_c).

Ao longo do processo de evolução, pode ser calculado o número de gerações ao final de cada fermentação, dado pela equação 18.

$$\eta_{ger_{ferm}} = \sum \eta_{ger_{exp}} \quad (18)$$

Onde:

“ $\eta_{ger_{ferm}}$ ”: Número de gerações ao final de cada fermentação.

O número cumulativo de gerações ao longo da evolução adaptativa é obtido somando-se os valores de $\eta_{ger_{ferm}}$.

Para encontrar o valor de t_d , utiliza-se a equação 8 reescrita em termos da duplicação:

$$\ln\left(\frac{2 \cdot C_{x0}}{C_{x0}}\right) = \mu_c \cdot t_d \quad (19)$$

Rearranjando em termos de t_d :

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_c} = \frac{0,693}{\mu_c} \quad (20)$$

Substituindo a equação 20 na 17, tem-se número de gerações alcançado em cada fermentação.

4.5.3 Determinação dos coeficientes de rendimento de substrato em células e em produtos

Para os experimentos realizados nas Etapas 2 e 3 (Itens 4.4.5 e 4.4.6), a partir do cálculo de consumo xilose e glicose presentes nos diferentes meios e da produção de etanol, glicerol e xilitol correspondente ao final de cada fermentação, é possível calcular o valor do coeficiente global de rendimento em produto ($Y_{p/s}$), conforme detalhado na Equação 21.

O coeficiente global de rendimento nos produtos ($Y_{p/s}$) é dado pela Equação 21.

$$Y_{p/s} = \frac{(C_{pf} - C_{pi})}{(C_{si} - C_{sf})} \quad (21)$$

Onde:

$(C_{pf} - C_{pi})$: Corresponde à diferença entre a concentração de produto final e inicial no fermentado;

$(C_{si} - C_{sf})$: Corresponde à diferença entre a concentração inicial e final de substrato no fermentado.

Já para os experimentos realizados na Etapa 1 (item 4.4.4), foi possível calcular os coeficientes de rendimento em etanol na fase exponencial de crescimento, conforme definidos na teoria, pelo método da tangente (SHULER e KARGI, 2002).

4.5.4 Cálculo da conversão de substrato

Para determinar a conversão de substrato (X) alcançada ao final de cada batelada, foi realizado o cálculo descrito na equação (22).

$$X (\%) = \left(\frac{C_{si} - C_{sf}}{C_{si}} \right) \cdot 100 \quad (22)$$

5 Resultados e Discussão

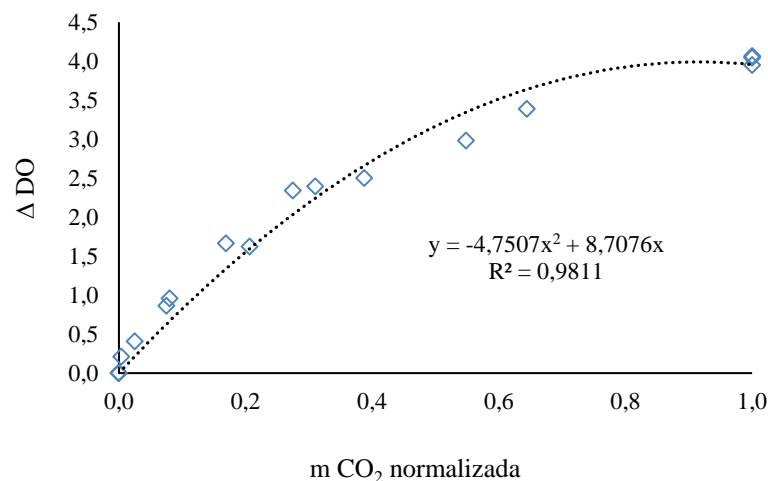
5.1 Avaliação das condições de fermentação em micro-reator e da metodologia de acompanhamento por liberação de CO₂

Para avaliar a metodologia proposta de acompanhamento do processo fermentativo por liberação de gás carbônico, foi realizado experimento, em triplicata, no qual tanto a densidade ótica (DO₆₀₀) quanto a massa de CO₂ liberada durante a fermentação foram acompanhados (Item 4.4.4).

Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 12, correlacionados por um ajuste polinomial de segunda ordem, estimado a partir dos dados da triplicata de experimentos, representado pela equação 23. Como esperado é possível obter uma relação entre o aumento da densidade ótica e a massa de CO₂ produzido.

O ajuste pode ser utilizado para estimar o crescimento celular no decorrer do processo fermentativo a partir da massa de CO₂ liberada. A metodologia proposta é confiável e viabiliza o acompanhamento da fermentação sem perturbar as condições de anaerobiose. Além disso, os riscos de contaminação são reduzidos por não exigir a abertura e retirada de volume dos frascos no decorrer do processo.

Figura 12. Variação da densidade ótica versus massa de gás carbônico liberada normalizada para cultivos realizados em meio YPX 2% em micro-reator. DO₀: 0,1; T: 35 °C, estático.



$$\Delta DO_{600} = (-4,75 \pm 0,44) \cdot (m \text{ CO}_2 \text{ norm})^2 + (8,71 \pm 0,39) \cdot m \text{ CO}_2 \text{ norm} \quad (23)$$

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados de quantificação dos compostos presentes no meio fresco e nas suspensões finais para cada micro-reator acompanhado (Item 4.3.5). Esses

dados são referentes a análise dos compostos presentes nas suspensões finais de apenas uma das replicatas.

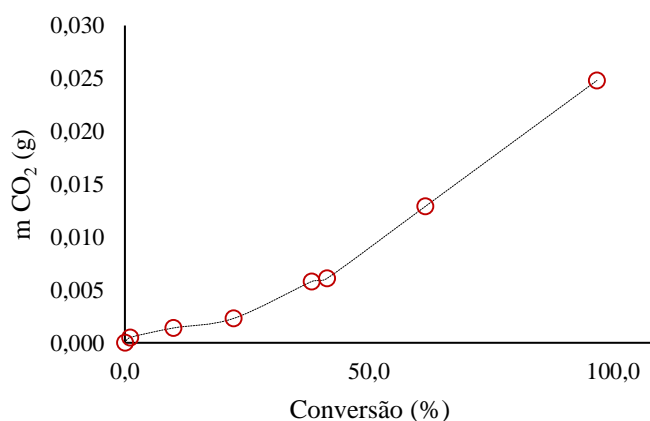
Tabela 5. Concentrações de açúcar, etanol e subprodutos (g.L^{-1}) e densidade ótica (DO_{600}) durante a fermentação.

t (h)	DO_{600}	Xilose	Ácido Acético	Etanol	Glicerol	Xilitol
-	-	19,61	3,23	0,00	0,34	-
0	0,10	20,63	3,44	0,00	0,31	0,00
6	0,31	20,41	3,52	0,72	0,37	0,00
12	0,96	18,58	3,56	1,37	0,43	0,39
18	1,72	16,04	3,57	2,73	0,51	0,48
24	2,15	12,73	3,77	4,18	0,61	0,52
28	2,26	12,08	3,94	4,51	0,64	0,63
34	2,78	7,93	4,58	6,32	0,78	0,67
46,5	4,05	0,68	4,07	9,74	0,91	0,72

De posse dos dados apresentados na Tabela 5, é possível correlacionar a produção mássica de gás carbônico com a conversão do substrato (Figura 13).

A variação de massa produzida, referente à conversão de 96% do substrato, foi de aproximadamente 0,027 g para a composição de meio utilizada neste cultivo. Este valor é menor que o estequiométrico (0,036 g), o que pode ser justificado pelo excedente de CO_2 produzido que fica retido no micro-reator, sem pressão suficiente para escoar através do sistema de saída de gás. Ou seja, aproximadamente 25 % do CO_2 produzido não é quantificado pela metodologia proposta por ficar retido no micro-reator. Essa informação é útil para prever a massa máxima de CO_2 que será liberada nos experimentos conduzidos em diferentes concentrações de substrato.

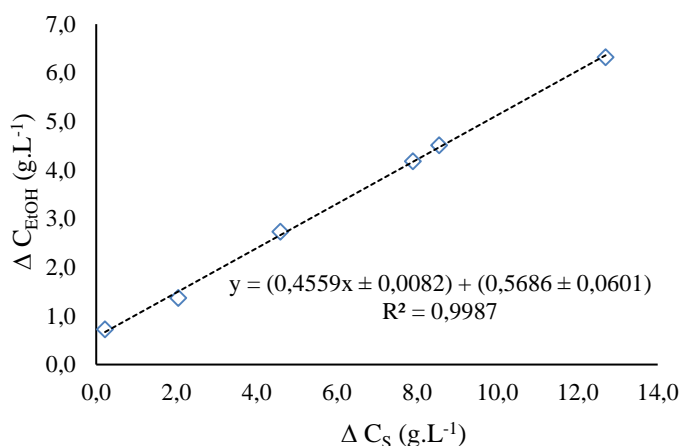
Figura 13. Massa de gás carbônico liberada versus conversão de substrato no decorrer do processo fermentativo.



A partir dos dados da Tabela 5, foi estimado o rendimento em produto para a fermentação, conforme mostrado na Figura 14. O rendimento em etanol foi de $0,456 \pm 0,008$ g etanol.g substrato⁻¹, que corresponde a 89 % do esperado teórico (0,51 g etanol.g substrato⁻¹).

A conversão quase total do substrato em aproximadamente 48 h de cultivo (Tabela 5), o elevado rendimento em etanol e o baixo rendimento em células, comprovam que o micro-reator proposto oferece condições adequadas para a realização dos estudos fermentativos.

Figura 14. Variação da concentração de etanol versus variação da concentração de substrato, para determinação do rendimento em produto.



5.2 Experimentos Preliminares

5.2.1 Escolha do hidrolisado para os experimentos da Evolução Adaptativa

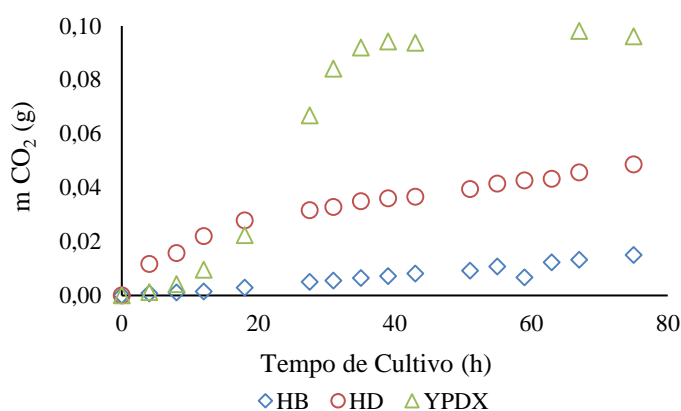
Para avaliação do desempenho da levedura *S. cerevisiae* MDS130 nos hidrolisados, os meios foram preparados previamente, conforme a metodologia descrita em 4.2.2, e então caracterizados quanto à composição dos inibidores (Item 4.3.5): ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e compostos fenólicos totais (CFT). Os resultados de caracterização estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Caracterização dos hidrolisados bruto e destoxificado quanto aos açúcares glicose e xilose e contaminantes furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético (g.L⁻¹) e compostos fenólicos totais (grama equivalente de ácido gálico - gEAG.L⁻¹).

HIDROLISADO	FURFURAL (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	CFT (gEAG.L ⁻¹)	ÁCIDO ACÉTICO (g.L ⁻¹)	GLICOSE (g.L ⁻¹)	XILOSE (g.L ⁻¹)
BRUTO	0,243	0,208	2,956	11,160	9,270	60,630
DESTOXIFICADO	0,034	0,016	0,585	9,550	9,270	53,490

Após o processo de destoxificação, houve diminuição de 86; 92 e 80 % na concentração dos inibidores furfural, HMF e CFT, respectivamente (Tabela 6). Por essa razão, a velocidade de fermentação no meio HD foi superior à observada em HB, como mostra a Figura 15. Porém, as fermentações conduzidas em meios contendo hidrolisado são visivelmente mais lentas que a conduzida em meio YPDX. Apesar da diminuição no teor de inibidores graças à destoxificação, as concentrações de furfural, HMF ou CFT remanescentes ainda afetam o metabolismo da levedura.

Figura 15. Massa de CO₂ liberada na fermentação com a linhagem parental para os três meios empregados: HB, HD e YPDX. DO₀: 0,1, T: 35°C, estático.



Deve-se destacar ainda que, além dos inibidores relacionados na Tabela 6, concentrações de ácido acético da ordem de 10 g.L⁻¹ ou mais foram observadas ao final das fermentações (Tabela 7). O ácido acético é um conhecido inibidor do metabolismo (ALMEIDA et al., 2007). Esse ácido orgânico já estava presente em HB e HD, como subproduto do pré-tratamento ácido. Mas, pela Tabela 7, observa-se que ele também é formado como subproduto durante a fermentação.

É relatado que concentrações entre 2 e 5 g.L⁻¹ de ácido acético tem efeito inibitório sobre a levedura *S. cerevisiae*. Os efeitos negativos ocorrem principalmente pela acidificação que o composto causa ao citosol celular, o que gera desequilíbrio nas condições fisiológicas das células (VERDUYN et al., 1990; ZHENG et al., 2011).

Com relação aos compostos HMF e furfural, sua toxicidade é referida como dependente da quantidade em que está presente no meio fermentativo, resultado geralmente na inibição de enzimas glicolíticas e fermentativas (WANG; SUN; YUAN, 2018). Estudos realizados por Boyer e colaboradores (1992) indicam que a taxa de crescimento específico diminui com o

aumento da concentração de furfural (0- 2g.L⁻¹), porém o composto não afeta os coeficientes de manutenção celular.

Entretanto, apesar da baixa quantidade dos compostos HMF e furfural quantificados no hidrolisado ácido (Tabela 6), não se descarta a influência de outros inibidores que podem estar presentes no HD e que não foram quantificados. São relatados inúmeros compostos que se formam após etapas de pré-tratamento em biomassa lignocelulósica e que nem sempre são removidos com um único e específico processo de destoxificação. Entre tantos, tem-se os ácidos alifáticos de cadeia curta (ácido fórmico, ácido acético e ácido levulínico); aldeídos de furano (HMF e furfural); compostos fenólicos como ácidos (ácido ferúlico, ácidos vanílicos, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido gálico), álcoois (guaiacol, catecol e álcool vanílico) e aldeídos (vanilina e 4-hydroxylbenzaldehyde) e líquidos iônicos (WANG; SUN; YUAN, 2018).

Ao final da fermentação com os hidrolisados, obteve-se apenas 65 % de células viáveis em meio HB, confirmando o forte impacto dos inibidores. Para os experimentos realizados com o meio YPDX ou com o HD, a viabilidade final foi de 80 e 99 %, respectivamente. A menor viabilidade observada no meio YPDX pode estar associada ao longo período de cultivo na ausência de nutrientes, já que as fontes de carbono provavelmente se esgotaram após 40 h de cultivo (Figura 15) e a medida foi feita somente ao final das quase 80 h de fermentação.

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações de açúcares e subprodutos quantificadas no final das fermentações.

Tabela 7. Concentrações de Açúcares, ácido acético, etanol, glicerol e xilitol no final das fermentações (g.L⁻¹).

Meio	Glicose	Xilose	Ácido Acético	Etanol	Glicerol	Xilitol
HB	5,55	46,71	10,62	3,49	0,53	0,00
HD	0,00	43,39	19,90	9,89	1,08	1,73
YPDX	0,00	0,00	8,81	28,76	2,68	3,71

Como esperado, no experimento realizado com o meio YPDX, os açúcares presentes inicialmente foram totalmente consumidos, gerando, conseqüentemente, mais etanol do que as fermentações realizadas com os hidrolisados. Nas fermentações com HB, a conversão de xilose foi de apenas 27 % e a de glicose 42 %. Já com HD, a glicose inicialmente presente foi totalmente consumida, frente a 34% de xilose. Os rendimentos globais em etanol foram 40 % (YPDX), 30 % (HD) e 17 % (HB). E as DO₆₀₀ finais: 9,89; 2,36 e 1,35 para os meios YPDX,

HD e HB, respectivamente, reforçando a influência negativa dos inibidores sobre o processo fermentativo.

Avaliando a metodologia de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtido por hidrólise ácida (ALVES et al., 1998), esses autores atribuíram a capacidade de remoção parcial dos compostos tóxicos aos microrganismos, ocorrida durante a etapa de precipitação, aos íons cálcio presente no meio após o ajuste de pH do hidrolisado com o reagente.

Marton (2002), ao avaliar a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço-de-cana, também obtido por hidrólise ácida, pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado, constatou que este procedimento reduziu a concentração de compostos fenólicos, porém propiciou a remoção, também, de xilose. Segundo o mesmo autor, a condição de maior remoção de compostos tóxicos não coincidiu com a de maior fermentabilidade do hidrolisado. Foi estabelecido neste trabalho, como a melhor condição para a destoxificação de hidrolisado de bagaço de cana, a combinação do ajuste de pH do hidrolisado pela sua elevação para 7,0, com óxido de cálcio e redução para pH 2,5 com ácido fosfórico seguida da adsorção em carvão vegetal ativado (1% m/v), sob agitação de 100 rpm, a 60°C durante 30 minutos. Nestas condições de tratamento, foi obtida a redução de 76% de fenóis, porém, perda de 22% de xilose.

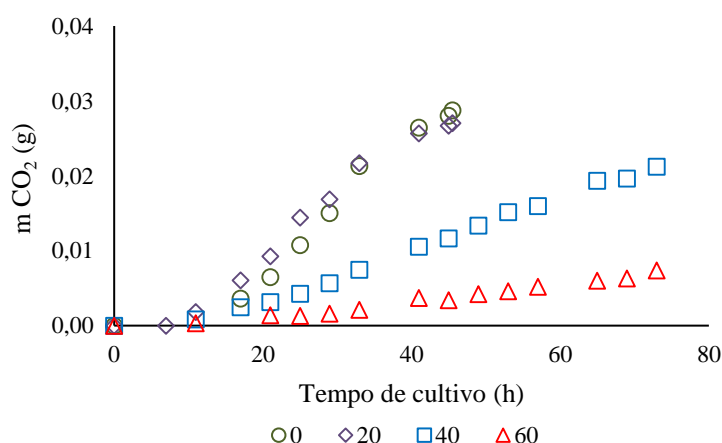
A partir dos resultados apresentados na Figura 15, definiu-se que os experimentos de Evolução Adaptativa seriam realizados com o hidrolisado destoxificado. Essa escolha se deve principalmente à baixíssima velocidade de fermentação observada no HB, o que poderia requerer a condução dos experimentos de Evolução Adaptativa por muitos meses, inviabilizando a conclusão dessa etapa no Mestrado. E apesar da utilização do hidrolisado destoxificado acrescentar uma etapa ao processo fermentativo, ela se mostrou mais plausível, frente ao desafio proposto de adaptar a população de células de levedura *S. cerevisiae* simultaneamente a altas concentrações de etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado. Assim, a evolução adaptativa realizada em meio HD ainda contempla o desafio de melhorar a cepa em relação a inibidores, porém, em menor quantidade que a presente no hidrolisado bruto, mas que, como visto nos resultados apresentados, ainda influenciam no desempenho da fermentação.

5.2.2 Escolha da concentração inicial de etanol para os experimentos de Evolução Adaptativa

Poucos estudos têm se preocupado com a tolerância das linhagens recombinantes a altas concentrações de etanol. A maioria tem focado na eficiência da assimilação de xilose e glicose e na tolerância aos inibidores presentes nos hidrolisados (JO et al., 2016; KOPPRAM; ALBERS; OLSSON, 2012; MANS; DARAN; PRONK, 2018; SHEN et al., 2012; SMITH; VAN RENSBURG; GÖRGENS, 2014; YANG et al., 2018). Como os resultados apresentados na literatura são obtidos em experimentos realizados com baixa concentração de substrato, o impacto do aumento da concentração de etanol sobre o desempenho da levedura vem sendo negligenciado.

A Figura 16 apresenta os dados de massa de gás carbônico liberada em função do tempo de fermentação. Observa-se que a velocidade de produção de CO₂ dos experimentos suplementados com 40 e 60 g.L⁻¹ de etanol é bem menor que a observada no experimento contendo inicialmente 20 g.L⁻¹ ou do meio YPX isento do álcool. Segundo Ansanay-Galeote (2001), esse comportamento ocorre porque o etanol, em altas concentrações, pode desnaturar proteínas celulares, alterar a permeabilidade da membrana plasmática e inibir a função mitocondrial, fatores que consequentemente prejudicam o processo fermentativo.

Figura 16. Massa de CO₂ em função do tempo de fermentação, com a linhagem parental, para experimentos conduzidos com meio YPX suplementado com diferentes concentrações de etanol. DO₀: 0,1, T: 35°C, estático.



Consequências da adição do etanol ao meio de cultivo também podem ser observadas através dos resultados de produtividade em etanol calculados a partir dos dados da Figura 16. Para os cultivos YPX isento de etanol ou suplementado com 20, 40 e 60 g.L⁻¹, obtiveram-se produtividades de 0,189; 0,180; 0,092 e 0,0302 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente. Portanto, os valores

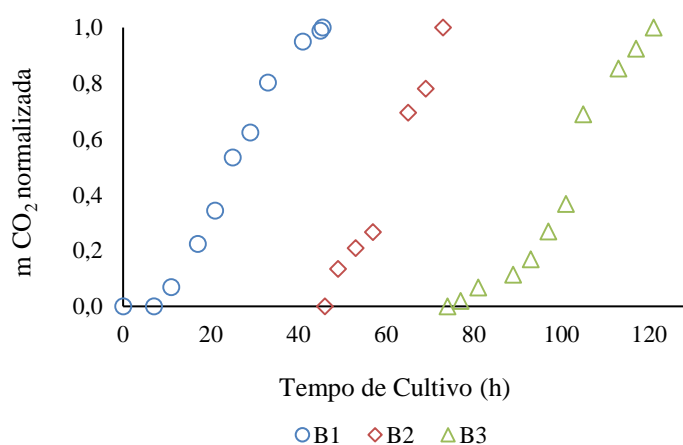
decrecem significativamente para os meios contendo mais etanol. É importante ressaltar que para as bateladas com 40 e 60 g.L⁻¹ de etanol somente 80 e 25% dos açúcares foram consumidos, respectivamente, apresentando rendimentos de 0,359, 0,366 g.g⁻¹ de etanol nessas duas condições, frente aos rendimentos 0,450 e 0,399 g.g⁻¹ para os meios com 0 e 20 g.L⁻¹ do composto.

Li et al. (2017) obtiveram 0,271 g.L⁻¹.h⁻¹ de produtividade, para a levedura *S. cerevisiae* O7E15 em meio YPX 4%, valor superior ao encontrado no presente estudo para o meio YPX 2% sem etanol, porém seus experimentos foram realizados em condições microaeróbias, sob 120 rpm de agitação. Bücker (2014) analisou a influência de diferentes concentrações de etanol na velocidade de crescimento da linhagem recombinante de *S. cerevisiae* ABH-4 em meio YPS (2%) e observou que a mesma é afetada pelo composto, com a cessação do crescimento na presença de 10% (v/v) de etanol no meio.

A comparação entre os perfis de liberação de CO₂ na fermentação conduzida no meio contendo a menor concentração de etanol e no meio YPX sem etanol sugere que as células apresentam tolerância ao etanol na concentração de 20 g.L⁻¹ (Figura 16).

Assim, para avaliar o efeito da exposição prolongada ao composto na concentração de 20 g.L⁻¹, foi conduzido um experimento em três bateladas repetidas (Figura 17), com duração total de 120 h. Os dados de massa de CO₂ liberada são apresentados na forma normalizada em relação ao valor máximo obtido ao final da fermentação para facilitar a visualização da inclinação das curvas.

Figura 17. Massa de CO₂ versus tempo de cultivo para as bateladas repetidas 1, 2 e 3 realizadas na concentração de 20 g.L⁻¹ de etanol. B1- Batelada 1; B2- Batelada 2; B3- Batelada 3. DO₀: 0,1, T: 35°C, estático.



As bateladas repetidas permitiram observar que mesmo com a exposição mais prolongada ao etanol, o perfil da velocidade de fermentação não sofreu mudanças significativas (Figura 17), concluindo-se que a presença do composto no meio em concentrações inferiores a 20 g.L⁻¹ não atua de forma inibitória ou tóxica sobre o metabolismo celular. Adicionalmente, os resultados de produtividade para as bateladas 1, 2 e 3 dessa condição foram 0,180; 0,175; 0,171 g.L⁻¹.h⁻¹, respectivamente, entre os quais não se observa grandes variações.

A viabilidade celular ao final dos cultivos foi de 98 % para o meio YPX sem adição de etanol e 97, 88 e 33% para 20, 40 e 60 g.L⁻¹, respectivamente. As densidades óticas finais também demonstraram a diminuição da concentração de células em suspensão com o aumento da concentração do etanol, sendo 3,10; 2,32; 2,08 e 0,30 em ordem crescente de adição de etanol ao meio. Desta forma, tanto os dados de viabilidade como de densidade ótica confirmam o efeito nocivo do etanol em concentração mais elevada sobre as células.

A operação dos fermentadores em alta concentração de substrato e, conseqüentemente, elevadas concentrações de etanol é fundamental para a viabilidade de um processo industrial de produção de etanol 2G. A partir dos resultados apresentados neste tópico optou-se por suplementar o meio HD, selecionado no tópico anterior, com 50 g.L⁻¹ de etanol, de forma a expor as células a condições de fermentação compatíveis com as industriais.

5.3 Evolução Adaptativa

5.3.1 Caracterização da estratégia de evolução adaptativa

Para obter uma linhagem de levedura recombinante com maior tolerância a etanol e inibidores, a cepa *Saccharomyces cerevisiae* MDS 130 foi submetida à técnica de evolução adaptativa (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

As condições de meio utilizadas durante o experimento estão descritas na Tabela 4, mostrando a estratégia usada na evolução, que consistiu em expor as células ao aumento gradual de concentração de etanol e hidrolisado destoxificado.

Na Tabela 8, estão apresentadas as principais informações referentes às condições iniciais e finais de cada batelada da evolução adaptativa: densidade ótica (DO₆₀₀), concentração de etanol (C_{EtOH}), glicose (C_{glicose}) e xilose (C_{xilose}) (g.L⁻¹), % de hidrolisado destoxificado (HD) no meio, massa de gás carbônico produzida (mCO₂- g), conversão de substrato alcançada (X) e tempo de fermentação (t_{fermentação}- h).

Tabela 8. Dados das condições iniciais e finais dos experimentos de evolução adaptativa. As condições *Boost* são referentes a etapa de enriquecimento da população de células adaptadas, descrita no tópico 4.4.6.

Condição	Condições iniciais					Condições finais					
	DO ₆₀₀	C _{EtOH} (g.L ⁻¹)	HD (%)	C _{glicose} (g.L ⁻¹)	C _{xilose} (g.L ⁻¹)	X (%)	DO ₆₀₀	mCO ₂ (g)	C _{EtOH} (g.L ⁻¹)	C _{Etanol produzido} (g.L ⁻¹)	t _{fermentação} (h)
A1	0,10	0,00	0	0,00	20,00	69,68	4,12	0,018	7,25	7,25	30,5
B1	0,10	9,11	20	2,01	26,55	55,39	3,79	0,024	18,47	9,36	24,0
B2	0,10	9,11	20	2,01	26,55	73,91	4,23	0,024	21,02	11,91	21,8
B3	0,10	9,11	20	2,01	26,55	48,95	3,51	0,019	16,92	7,81	27,5
B4	0,10	9,11	20	2,01	26,55	47,95	3,93	0,024	16,96	7,85	24,0
B5	0,10	9,11	20	2,01	26,55	49,51	2,85	0,020	17,18	8,07	31,0
B6	0,10	9,11	20	2,01	26,55	62,55	5,00	0,025	19,36	10,25	23,5
B7	0,10	9,11	20	2,01	26,55	59,03	3,65	0,023	17,79	8,68	22,0
B8	0,10	9,11	20	2,01	26,55	56,76	4,12	0,024	17,65	8,54	23,2
B9	0,10	9,11	20	2,01	26,55	69,47	4,06	0,027	19,27	10,16	23,0
B10	0,10	9,11	20	2,01	26,55	58,93	3,78	0,027	17,71	8,60	23,5
C1	0,10	15,61	30	1,99	29,35	71,98	3,05	0,037	26,21	10,60	46,5
C2	0,10	15,61	30	1,99	29,35	75,30	2,97	0,040	28,13	12,52	58,0
C3	0,10	15,61	30	1,99	29,35	63,83	3,42	0,037	26,22	10,61	34,5
C4	0,10	15,61	30	1,99	29,35	67,49	3,13	0,041	26,38	10,77	42,0
C5	0,10	15,61	30	1,99	29,35	54,88	3,07	0,047	24,15	8,54	35,0
C6	0,10	15,61	30	1,99	29,35	73,96	3,26	0,045	27,50	11,89	47,5
C7	0,10	15,61	30	1,99	29,35	79,04	2,96	0,047	27,84	12,23	56,0
D1	0,10	22,66	45	4,41	33,56	87,56	3,62	0,054	38,72	16,07	44,0
D2	0,10	22,66	45	4,41	33,56	72,62	2,45	0,049	36,05	13,40	59,5
D3	0,10	22,66	45	4,41	33,56	85,32	3,14	0,053	37,89	15,23	43,5
D4	0,10	22,66	45	4,41	33,56	75,30	1,57	0,048	35,98	13,33	84,5
D5	0,10	22,66	45	4,41	33,56	64,72	1,58	0,038	33,71	11,05	70,0
D6	0,10	22,66	45	4,41	33,56	68,84	2,16	0,046	35,92	13,27	48,5
D7	0,10	22,66	45	4,41	33,56	72,00	3,23	0,045	35,78	13,12	34,5
D8	0,10	22,66	45	4,41	33,56	73,02	2,00	0,051	35,42	12,76	73,0
D9	0,10	22,66	45	4,41	33,56	72,19	2,06	0,050	34,61	11,96	72,7
D10	0,10	22,66	45	4,41	33,56	80,43	3,24	0,053	37,67	15,02	50,0
E1	0,10	32,10	62	5,86	37,01	69,43	1,00	0,051	43,76	11,66	136,0

Tabela 8 cont. Dados das condições iniciais e finais dos experimentos de evolução adaptativa. As condições *Boost* são referentes a etapa de enriquecimento da população de células adaptadas, descrita no tópico 4.4.6.

Condição	Condições iniciais					Condições finais					
	DO ₆₀₀	C _{E_tOH} (g.L ⁻¹)	HD (%)	C _{glicose} (g.L ⁻¹)	C _{xilose} (g.L ⁻¹)	X (%)	DO ₆₀₀	mCO ₂ (g)	C _{E_tOH} (g.L ⁻¹)	C _{Etanol produzido} (g.L ⁻¹)	t _{fermentação} (h)
E2	0,43	32,10	62	5,86	37,01	41,84	1,50	0,062	37,05	4,95	71,5
E3	0,50	32,10	62	5,86	37,01	72,29	1,44	0,056	44,70	12,60	109,0
E4	0,92	32,10	62	5,86	37,01	75,45	1,56	0,058	47,83	15,73	118,0
E5	1,30	32,10	62	5,86	37,01	78,57	1,96	0,055	44,72	12,62	128,0
F1	0,63	41,76	80	7,45	42,37	35,96	0,92	0,029	46,49	4,73	163,5
<i>Boost1_1</i>	0,42	22,66	80	4,41	33,56	71,78	2,64	0,047	35,89	13,23	77,0
<i>Boost1_2</i>	0,42	22,66	45	4,41	33,56	79,33	2,93	0,052	38,17	15,52	77,0
F2	4,86	41,76	45	7,45	42,37	73,47	4,66	0,064	55,36	13,60	47,5
F3	4,06	41,76	80	7,45	42,37	72,18	3,61	0,062	57,15	15,39	71,0
F4	3,15	41,76	80	7,45	42,37	30,49	3,18	0,009	46,03	4,27	39,0
<i>Boost 2_1</i>	0,73	22,66	45	4,41	33,56	70,16	2,93	0,048	37,02	14,36	87,5
<i>Boost 2_2</i>	0,73	22,66	45	4,41	33,56	63,59	3,02	0,039	35,23	12,57	87,5
<i>Boost 2_3</i>	0,73	22,66	45	4,41	33,56	91,08	4,42	0,063	40,78	18,13	87,5
<i>Boost 2_4</i>	0,73	22,66	45	4,41	33,56	65,77	3,58	0,056	35,90	13,24	87,5
F5	11,2 0	41,76	80	7,45	42,37	75,64	6,77	0,061	52,93	11,17	13,5
F6	6,25	41,76	80	7,45	42,37	62,68	6,83	0,061	55,14	13,38	16,5
F7	5,95	41,76	80	7,45	42,37	47,87	4,29	0,060	51,41	9,65	21,0
G1	3,74	51,67	100	9,27	51,29	63,60	2,49	0,067	67,47	15,80	91,0
<i>Boost 3_1</i>	0,57	22,66	45	4,41	33,56	76,42	3,26	0,047	37,68	15,02	101,5
<i>Boost 3_2</i>	0,57	22,66	45	4,41	33,56	65,25	3,29	0,041	35,73	13,07	101,5
<i>Boost 3_3</i>	0,57	22,66	45	4,41	33,56	91,36	3,48	0,055	40,93	18,27	101,5
<i>Boost 3_4</i>	0,57	22,66	45	4,41	33,56	76,78	3,53	0,051	37,47	14,81	101,5
G2	11,8 1	51,67	100	9,27	51,29	81,60	10,06	0,074	67,17	15,50	24,0
G3	9,29	51,67	100	9,27	51,29	71,19	7,21	0,075	70,32	18,65	28,0
G4	6,66	51,67	100	9,27	51,29	67,50	5,13	0,058	68,32	16,65	36,5
<i>Boost 4_1</i>	1,18	22,66	45	4,41	33,56	69,88	3,83	0,045	36,83	14,18	32,0
<i>Boost 4_2</i>	1,18	22,66	45	4,41	33,56	77,72	3,52	0,050	37,93	15,28	32,0
<i>Boost 4_3</i>	1,18	22,66	45	4,41	33,56	86,88	5,86	0,062	39,58	16,93	22,5
<i>Boost 4_4</i>	1,18	22,66	45	4,41	33,56	77,66	5,60	0,049	38,33	15,67	32,0

Tabela 8 cont. Dados das condições iniciais e finais dos experimentos de evolução adaptativa. As condições *Boost* são referentes a etapa de enriquecimento da população de células adaptadas, descrita no tópico 4.4.6.

Condição	Condições iniciais					Condições finais					
	DO ₆₀₀	C _{EtOH} (g.L ⁻¹)	HD (%)	C _{glicose} (g.L ⁻¹)	C _{xilose} (g.L ⁻¹)	X (%)	DO ₆₀₀	mCO ₂ (g)	C _{EtOH} (g.L ⁻¹)	C _{Etanol produzido} (g.L ⁻¹)	t _{fermentação} (h)
G5	15,9 1	51,67	100	9,27	51,29	88,72	9,53	0,083	67,35	15,68	14,5
G6	8,80	51,67	100	9,27	51,29	74,42	8,69	0,072	71,43	19,76	22,5
G7	8,25	51,67	100	9,27	51,29	70,45	6,78	0,068	67,15	15,48	35,5
<i>Boost 5_I*</i>	1,56	22,66	45	4,41	33,56	95,92	4,20	0,059	38,41	15,76	22,0
<i>Boost 6_I*</i>	1,56	22,66	45	4,41	33,56	92,78	4,56	0,055	37,64	14,99	28,0
<i>Boost 7_I*</i>	1,56	22,66	45	4,41	33,56	80,75	3,50	0,050	35,56	12,91	38,5
<i>Boost 8_I*</i>	1,56	22,66	45	4,41	33,56	93,82	5,39	0,058	37,86	15,20	38,5
G 8.1	3,88	51,67	100	9,27	51,29	73,17	4,56	0,074	69,76	18,09	21,5
G 8.1.2	4,09	51,67	100	9,27	51,29	79,78	4,72	0,072	72,29	20,62	31,5
G 8.1.3	4,24	51,67	100	9,27	51,29	64,39	3,04	0,070	68,68	17,01	66,5
G 8.2	4,09	51,67	100	9,27	51,29	75,92	3,99	0,075	70,56	18,89	35,5
G 8.3	3,14	51,67	100	9,27	51,29	66,70	2,48	0,074	67,18	15,51	59,5
G 8.4	4,83	51,67	100	9,27	51,29	78,28	4,18	0,079	61,96	10,29	49,0

Os perfis de liberação de CO₂ ao longo de cada batelada, para todos os experimentos realizados na etapa de Evolução Adaptativa, estão disponíveis no Anexo A.

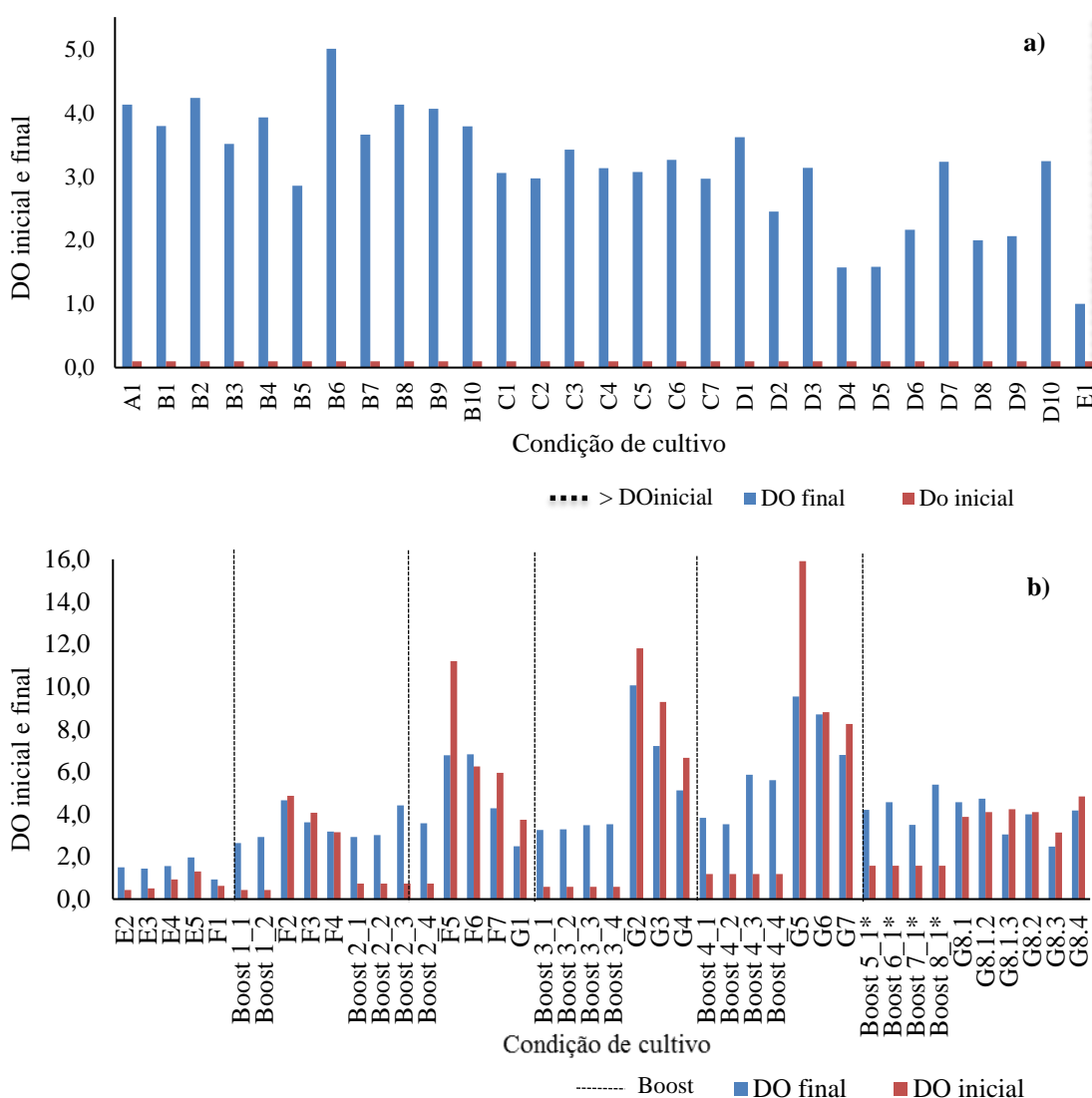
A DO₆₀₀ inicial de inoculação para as bateladas sucessivas foi mantida em 0,1 até a condição E1, na qual o tempo de fermentação começou a se prolongar muito, chegando a 136 horas (Tabela 8). Então, a densidade ótica inicial começou a ser aumentada, com transferência de maior volume de suspensão ao meio. A quantidade de suspensão a ser transferida era limitada pelo volume de fermentado presente no micro-reator, que ao final da fermentação também era utilizado para análises de subprodutos, medida de densidade ótica e viabilidade.

Constatado que as fermentações eram cada vez mais longas à medida que a concentração inicial de etanol aumentava, foi introduzida uma nova estratégia para obtenção de DO₆₀₀ iniciais mais altas e populações enriquecidas nas células mais aptas, denominada *Boost* (Item 4.4.6). A metodologia consistiu em diminuir a pressão seletiva das células repentinamente, transferindo-as para o meio D entre bateladas de uma mesma condição, para obter mais biomassa ao final do cultivo *Boost*. Essas transferências estão representadas na Tabela 8 por *Boost*, seguido do número referente à respectiva batelada, e ocorreram entre os cultivos nas condições F e G.

Para melhor visualização das variações de densidade ótica ao início e final das fermentações (Tabela 8), é apresentado um gráfico (Figura 18) que relaciona esses valores às correspondentes condições de evolução.

Na Figura 18-**a**, foram representados os dados de DO inicial e final até a condição E1. A partir de E2, quando começaram a ser utilizadas DO₆₀₀ iniciais mais altas para a inoculação dos micro-reatores, os dados estão mostrados na Figura 18-**b**, com a indicação das fermentações *Boost* pelas linhas verticais.

Figura 18. Densidades ótica inicial e final para cada condição da evolução adaptativa (a e b).

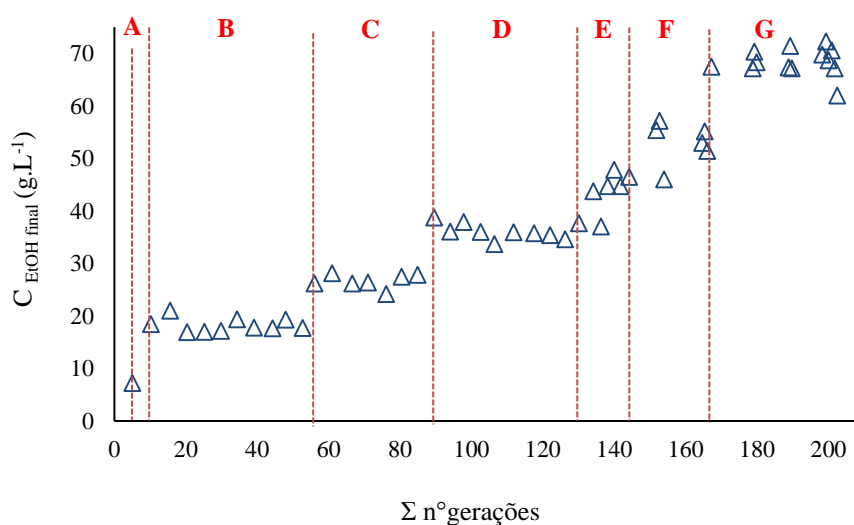


A linha vertical tracejada em preto (Figura 18- **a**), representa o momento em que a DO₆₀₀ inicial começou a ser aumentada, na condição E2.

Após a condição F1 (Figura 18- b), começou a ser aplicada a metodologia *Boost*. A suspensão F1 foi transferida para a condição D, previamente à sua transferência para a F2. Essa etapa de alívio de pressão seletiva foi feita com 2 micro-reatores, visando obter maior quantidade de células, que depois foram centrifugadas e ressuspensas em um só micro-reator (F2), que se destaca pelo grande aumento de DO_{600} inicial (Figura 18). O mesmo procedimento foi repetido conforme a necessidade, cada vez mais frequente no decorrer dos últimos estágios da evolução, dada a maior pressão seletiva apresentada no meio.

A introdução da estratégia de enriquecimento da população de células adaptadas (*Boost*) acelerou o processo de isolamento de linhagens mais adaptadas aos inibidores e à alta concentração de etanol. A Figura 19 mostra claramente os resultados obtidos com a estratégia de seleção de linhagens evoluídas empregada. Destaca-se que as últimas 30 gerações (condições F5 a G8, Tabela 8) foram expostas a concentrações finais de etanol acima de 60 g.L^{-1} e cultivadas em meio preparado apenas com HD. Nas condições G5 a G7, por exemplo, as células foram mantidas por até 35 h em fermentações que alcançaram concentrações finais de etanol superiores a 67 g.L^{-1} (Tabela 8), com viabilidade final superior a 80 % (Anexo B, Tabela 17). Esse resultado sugere tolerância ao etanol significativamente superior à da linhagem parental, já que no experimento da Etapa 2 (item 5.2.1), conduzido em meio YPX suplementado com etanol (60 g.L^{-1}), a viabilidade foi de apenas 33 % após aproximadamente 80 h de fermentação. O cálculo do número de gerações foi realizado a partir das equações 6 a 20 e está disponível no anexo B (Tabela 16).

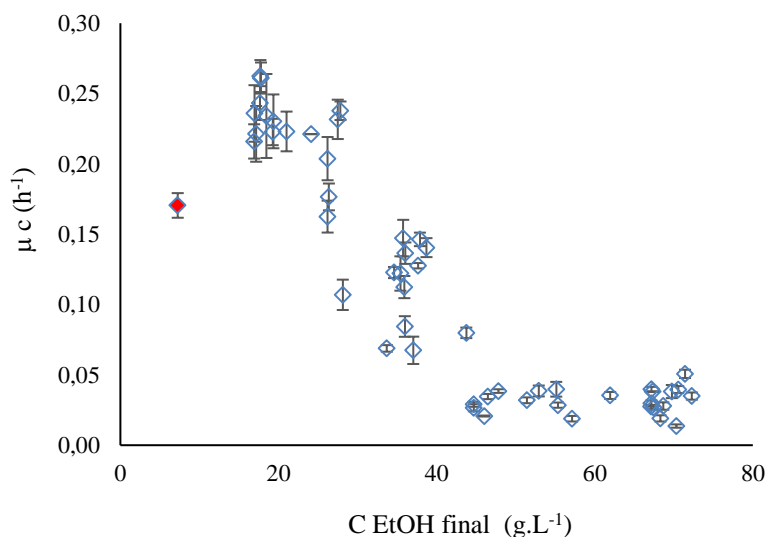
Figura 19. Relação entre concentração de etanol final e número de gerações cumulativo durante a evolução. Linhas verticais referentes ao início de cada nova condição de cultivo.



Para avaliar o efeito das elevadas concentrações de etanol sobre o crescimento das células ao longo da evolução, as velocidades específicas de crescimento (μ_c) foram estimadas a partir das equações apresentadas no Tópico 4.5.1 e representadas na Figura 20 em função da concentração final de etanol em cada fermentação. Os valores estimados para μ_c e para o número de gerações estão apresentados na Tabela 16 do Anexo B.

A Figura 20 mostra que, no início da adaptação (até condição C7, correspondente a 85 gerações e concentrações de etanol final de até 30 g.L⁻¹ e 30 % de HD), a evolução apresentou o comportamento esperado, observando-se o aumento de μ_c , que passou de 0,17 h⁻¹ (Condição A, sem etanol) para 0,23 h⁻¹ (Condição C7). O aumento da velocidade específica de crescimento durante a Evolução Adaptativa é frequentemente relatado na literatura (DOS SANTOS et al., 2016; HO et al., 2017; LI et al., 2016) e é indicador da adaptação das células às condições adversas às quais estão sendo expostas. Porém, nas Condições D e E, os valores de μ_c diminuem continuamente à medida que a concentração de etanol aumenta devido à forte inibição exercida pelo etanol sobre o crescimento. Essa tendência, no entanto, é revertida a partir da Condição F, quando os valores de μ_c passam a oscilar em torno de 0,03 h⁻¹, mesmo para crescentes concentrações de etanol. Esses resultados mostram que a estratégia de adaptação proposta foi efetiva em gerar uma população estável, tolerante a altas concentrações de etanol.

Figura 20. Velocidade de crescimento (h⁻¹) versus concentração de etanol final (g.L⁻¹) para cada condição de evolução adaptativa.



As oscilações positivas e negativas nos valores de μ_c ao final da adaptação (65 últimas gerações) (Figura 20) podem estar relacionadas tanto à heterogeneidade da população quanto a

erros experimentais na determinação da massa de CO₂ ou ainda à metodologia de cálculo de μ_c proposta, que se baseia na correlação dada pela Equação 23 para estimar a variação da densidade ótica em função da massa de CO₂ produzida. Essa correlação foi gerada a partir dados coletados em experimentos realizados em meio YPX, contendo 20 g.L⁻¹ de xilose e foi assumido que a mesma é válida para representar o crescimento nas diversas condições de cultivo impostas ao longo da adaptação, o que pode ser questionável. O número de gerações, que depende de μ_c , conseqüentemente, refletiu as mudanças na velocidade específica de crescimento ao longo da evolução. Na primeira condição foram obtidas aproximadamente 5 gerações, já na condição G8.1, esse número não chegou nem a 0,5.

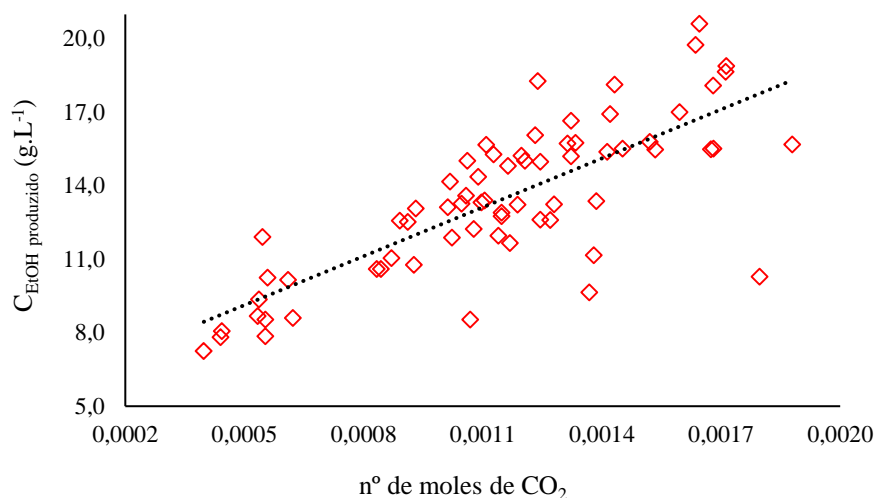
Oscilações no número de gerações foram relatadas por Barrick e colaboradores em 2009 e ressaltadas por Dragosits e Mattanovich em 2013. Segundo estes autores, o aumento da aptidão em função do número total de gerações não é linear. Geralmente pode ser rápido nas primeiras 100 a 500 gerações, diminuindo consideravelmente durante o curso da evolução (BARRICK et al., 2009; DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013).

A Figura 19 também fornece a informação do número de gerações total alcançado, que foi aproximadamente 200. Um experimento tradicional de evolução adaptativa geralmente alcança de 100 a 2000 gerações (DRAGOSITS; MATTANOVICH, 2013). O número de gerações relativamente baixo alcançado é inerente à estratégia adotada, que preserva as condições fermentativas durante a evolução e impõe uma elevada pressão seletiva. Valores elevados para o número de gerações dependem de um baixo tempo de geração, que só é observado em condições de cultivo que favorecem a formação de biomassa, ou seja, em cultivos aeróbios (KUTYNA et al., 2012). Já os menores valores de número de gerações relatados na literatura ocorrem quando em cultivos em condições fermentativas, sob inibição ou quando a fonte de carbono é de lenta assimilação pelas células (AVRAHAMI-MOYAL et al., 2012; ÇAKAR et al., 2012).

Outros resultados interessantes, que demonstram a consistência da metodologia experimental empregada, são mostrados nas Figuras 21 e 22. Refletindo a estequiometria dos processos fermentativos, a Figura 21 mostra que produção de etanol é diretamente proporcional à liberação de gás carbônico no meio.

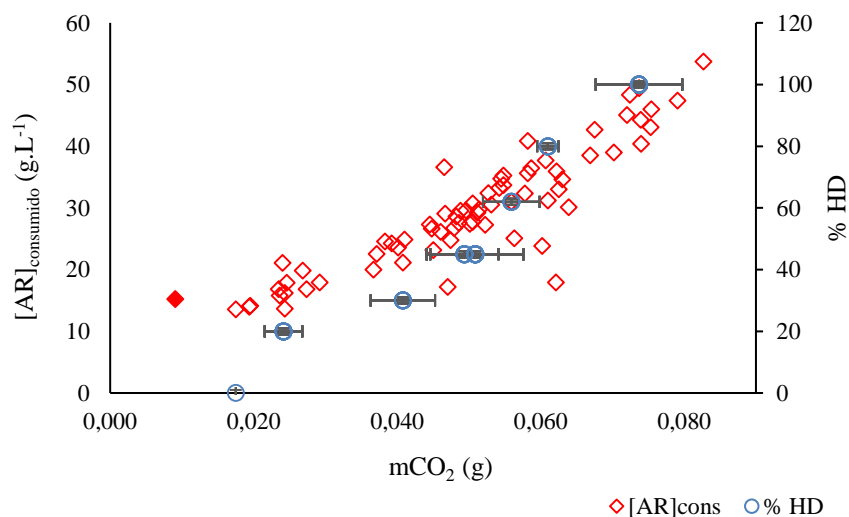
A massa de CO₂ liberada variou de 0,02 g para a condição A1 até 0,08 g na condição G (Figura 21), que possuía maior quantidade de substrato e conseqüentemente gerou mais etanol e gás carbônico.

Figura 21. Concentração de etanol produzido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) versus massa de gás carbônico liberada (g) para cada condição de fermentação da evolução adaptativa.



Na Figura 22, o consumo de açúcares redutores fornecidos e a porcentagem de hidrolisado destoxificado em cada condição de evolução são mostrados em função da massa de gás carbônico liberada.

Figura 22. Concentração de açúcares redutores consumidos versus massa de gás carbônico liberada (g) e % de hidrolisado destoxificado para cada condição da evolução adaptativa.



Legenda: Concentração de açúcares redutores consumidos ($[\text{AR}]_{\text{cons}}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado em cada condição (% HD).

Sabe-se que a produção de gás carbônico é diretamente proporcional a porcentagem de HD disponível no meio se o consumo de açúcares e a conversão em cada batelada forem altos, pois a suplementação com o hidrolisado fornece aumento gradual do substrato disponível (Tabela 4).

5.3.2 Isolamento e seleção dos mutantes com maior aptidão

Com o intuito de diminuir a heterogeneidade da população evoluída e identificar os mutantes com melhor desempenho, após finalizar a batelada G7, foi feita diluição seriada da suspensão obtida, para cultivo em placas contendo meio YPXA 2% suplementado com etanol na concentração referente a condição G (Tabela 4).

As placas foram mantidas em incubadora a 35 °C e quantificadas quanto à UFC, seguindo o procedimento descrito no item 4.3.3. Foram selecionadas as quatro maiores colônias observadas. Para continuidade da seleção, cada uma delas foi inoculada em um micro-reator com 4 mL da condição D, denominados *Boost 5_1**, *Boost 6_1**, *Boost 7_1** e *Boost 8_1** (Tabela 8), para obter maior concentração de biomassa (*Boost*). Ao final dos cultivos de enriquecimento, as suspensões foram centrifugadas e transferidas para outros quatro micro-reatores contendo meio G, identificados como G8.1, G8.2, G8.3 e G8.4 (Tabela 8).

A comparação dos resultados dessas 4 fermentações permitiu identificar o mutante G8.1 como aquele que apresentou o maior valor de μ_c (0,0371 h⁻¹), conforme mostra o Anexo B, Tabela 16. Essa batelada também foi a única a apresentar densidade ótica final (4,56) maior que a inicial (3,88) (Tabela 8 e Figura 18-b), o que não vinha ocorrendo nos experimentos da condição G. O aumento da densidade ótica ao longo da batelada indica que a parcela da população que conseguiu crescer nas condições de cultivo adversas impostas superou a parcela da população que morreu, conforme será discutido a seguir

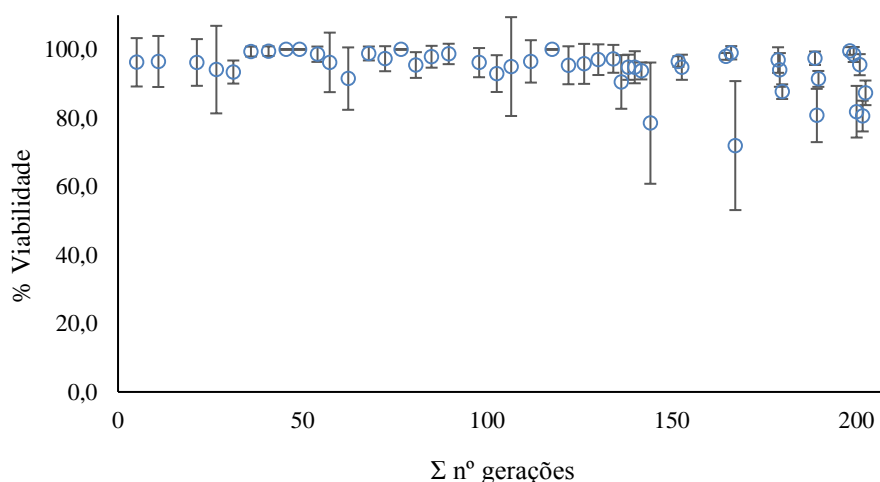
Logo, o processo de adaptação foi continuado com essa população celular por mais duas bateladas sucessivas. Até a condição G8.1.3, que marcou a finalização da etapa de evolução adaptativa e seleção da linhagem evoluída, como pretendido.

5.3.3 Viabilidade e Morte celular

A viabilidade celular foi uma das análises realizadas durante a evolução adaptativa (Item 4.3.3), feita ao final de cada batelada sucessiva, a fim de verificar a influência das mudanças de condição de meio sobre a população celular em mutação.

Uma correlação entre os dados de viabilidade e o número de gerações cumulativo está apresentada na Figura 23.

Figura 23. Dados de viabilidade, com os respectivos desvios padrão, em função do número de gerações cumulativo durante a evolução.



Apesar do aumento gradativo da pressão seletiva e da elevada concentração de etanol presente nas fermentações das condições F e G, a viabilidade se manteve alta na maioria das condições da evolução adaptativa (Figura 23), com exceção daquelas que apresentaram muita dificuldade de adaptação, com conseqüente exposição prolongada ao etanol do meio (F1). Entretanto, a densidade ótica final, nas condições de maior pressão seletiva, começou a ser menor que a inicial, mesmo que as células se mantivessem viáveis (Figura 18-b). Essa discrepância entre a viabilidade e a diminuição da densidade ótica poderia ser causada por algum problema com a metodologia de coloração com o azul de metileno ou ainda ser atribuída à ocorrência de morte celular e lise de parte da população de células, que não apareceriam, portanto, nem como células viáveis nem como mortas.

Para avaliar a existência de algum problema na metodologia de coloração com azul de metileno, em algumas fermentações a população de células viáveis na suspensão também foi quantificada pelo método de contagem de UFC (Item 4.3.3), em placas, a partir de diluições seriadas da suspensão final.

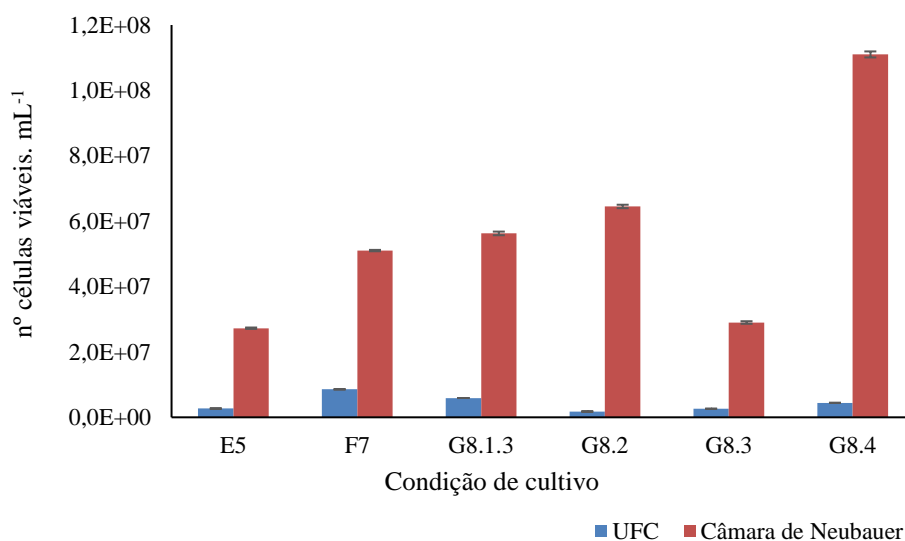
Os resultados estão apresentados na Tabela 9, com os respectivos desvios padrão.

Tabela 9. Concentração celular (número de células.mL⁻¹) e seus respectivos desvios padrão, estimados por contagem de unidade formadora de colônia, para as 3 últimas condições de adaptação.

Unidade Formadora de Colônia (UFC)		
Condição	N° células.mL ⁻¹	Desvio padrão
E5	2,68E+06	1,41E+01
F7	8,55E+06	8,49E+01
G8.1.3	5,90E+06	1,27E+01
G8.2	1,77E+06	1,06E+01
G8.3	2,62E+06	9,19E+00
G8.4	4,43E+06	0,00E+00

A comparação entre as contagens das células viáveis por câmara de Neubauer e por UFC é apresentada na Figura 24.

Figura 24. Correlação entre o número de células viáveis.mL⁻¹ estimado por contagem de unidade formadora de colônia e pela câmara de Neubauer.

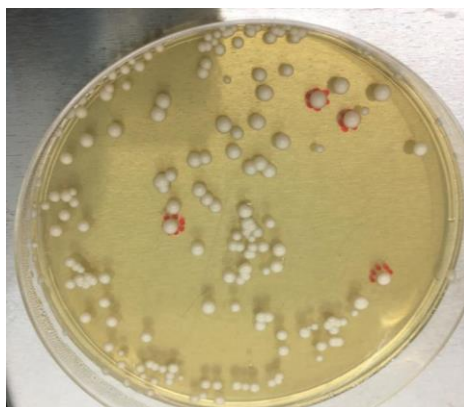


A concentração celular estimada por contagem em câmara de Neubauer foi maior que a obtida através das unidades formadoras de colônia (Figura 24), o que sugere a presença de grande quantidade de células inativas, porém viáveis, nos meios de cultivo durante a evolução. Essas células aparecem como integras na visualização em microscópio e são identificadas como viáveis pela metodologia de coloração com azul de metileno. Porém, correspondem à parcela da população que tolera o etanol, mas não consegue crescer (não formam colônias nas placas suplementadas com etanol), sugerindo a ocorrência de paralisia metabólica (ou ausência de

atividade metabólica devido à intensa inibição por etanol), o que as impediu de fermentar nas condições de pressão seletiva aplicadas.

A Figura 25 apresenta a imagem de uma das placas cultivadas para contagem de UFC. Sendo esta, referente a uma diluição de 10000 vezes para um cultivo na condição G.

Figura 25. Placas para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) contendo meio YPX 2% suplementado com etanol.



Para tentar elucidar a ocorrência de lise, foram feitas análises para determinar a concentração de ácidos nucleicos (mg.L^{-1}) presente nos sobrenadantes das suspensões finais.

Os valores apresentados na Tabela 10 foram corrigidos em relação ao valor da concentração de ácidos nucleicos no meio fresco, referentes ao extrato de levedura.

Tabela 10. Concentração de ácidos nucleicos, desvio padrão e tempo de evolução referente à cada condição.

Condição	Tempo (dias)	C_{AN} (mg/L/DO_t)	Desvio padrão
A1	1,27	15,76	0,50
B1	2,27	6,86	0,58
B2	3,18	7,56	-
B3	4,33	1,99	-
B4	5,33	0,00	-
B5	6,62	2,98	-
B6	7,60	3,10	-
B7	8,51	2,60	-
B8	9,48	1,33	-
B9	10,44	0,62	-

Tabela 10 cont. Concentração de ácidos nucleicos, desvio padrão e tempo de evolução referente à cada condição. ND: Valor não detectado.

Condição	Tempo (dias)	C_{AN} (mg/L/DO_t)	Desvio padrão
B10	11,42	1,85	-
C1	13,35	ND	-
C2	15,77	1,01	-
C3	17,21	ND	-
C4	18,96	ND	-
C5	20,42	ND	-
C6	22,40	ND	-
C7	24,73	ND	-
D1	26,56	8,85	0,44
D2	29,04	23,30	-
D3	30,85	4,78	-
D4	34,38	35,65	-
D5	37,29	41,11	-
D6	39,31	28,69	-
D7	40,75	14,55	-
D8	43,79	39,58	-
D9	46,82	45,12	-
D10	48,90	84,92	-
E1	54,57	29,62	0,72
E2	57,55	61,50	-
E3	62,09	74,95	-
E4	67,01	62,22	-
E5	72,34	44,41	-
F1	79,15	54,89	0,40
F2	84,34	9,44	-
F3	87,30	20,50	-
F4	88,93	37,17	-
F5	93,13	9,31	-
F6	93,82	9,524	-
F7	94,70	1,634	-
G1	98,49	111,200	0,247

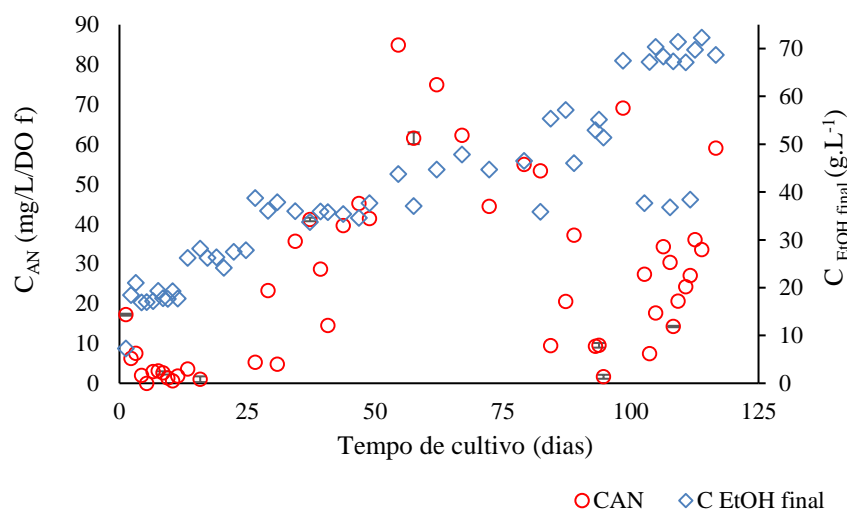
Tabela 10 cont. Concentração de ácidos nucleicos, desvio padrão e tempo de evolução referente à cada condição.

Condição	Tempo (dias)	C_{AN} (mg/L/ DO_f)	Desvio padrão
G2	103,72	17,891	-
G3	104,88	32,173	-
G4	106,40	54,770	-
G5	108,34	25,260	-
G6	109,28	32,735	-
G7	110,76	39,743	-
G8.1	112,57	59,088	0,176
G8.1.2	113,88	55,761	-
G8.1.3	116,65	93,555	-

Observa-se maior concentração de ácidos nucleicos principalmente nas condições que enfrentaram longos tempos de cultivo e naquelas que obtiveram DO_{600} final menor que a inicial, evidenciando a ocorrência de lise durante o processo evolutivo.

Para melhor visualização dos resultados da Tabela 10, foi representada na Figura 26 a razão entre a concentração de ácidos nucleicos (C_{AN}) e a densidade óptica final (DO_f) do meio com o tempo de cultivo e a concentração de etanol ao final de cada batelada ($C_{EtOH\ final}$).

Figura 26. Concentração de ácidos nucleicos (mg/L/ DO_f) e concentração final de etanol ($g.L^{-1}$) em função do tempo total de evolução.



Os dados apresentam diferentes tendências no decorrer da evolução adaptativa (Figura 26). Nos primeiros 25 dias, até a condição C, aparentemente as condições de cultivo não eram

estressantes o suficiente para provocar lise, refletindo na baixa concentração de ácidos nucleicos liberados no meio. As células se mantinham íntegras e até conseguiam se multiplicar, como mostra a DO_{600} final para essas primeiras condições (Figura 18-a). Passado esse tempo, a partir da condição D, a razão C_{AN}/DO foi aumentando significativamente, sugerindo ruptura ou permeabilização das células, que estavam expostas a maiores concentrações de etanol (Figura 26).

A partir dos 60 dias de evolução, meados da condição E (Tabela 10), o comportamento dos dados começa a apresentar uma nova tendência (Figura 26). A razão C_{AN}/DO decresce até 100 dias de evolução e então volta a aumentar novamente durante toda a condição G. Esse aumento na liberação de ácidos nucleicos pode ser atribuído à presença de muitas etapas de *boost* ao longo da adaptação na condição G (Tabela 8). Após a etapa de *boost*, uma maior população de células é reintroduzida na condição G. Como já discutido, parte das células que compõem essa população lisa ou se permeabiliza na presença da alta concentração de etanol, liberando ácidos nucleicos. Como a DO final é geralmente menor que a DO inicial, a razão C_{AN}/DO aumenta.

Analisando de forma integrada os resultados apresentados nas Figuras 23, 24 e 26, identificam-se evidências da ocorrência do processo de adaptação e de seleção. Como mostram as Figuras 23 e 24, apenas a parcela da população de células que evoluiu e se adaptou consegue crescer na condição G. O restante da população, que não se adaptou, sofre lise (evidenciada pela liberação de ácidos nucleicos no meio, Figura 26) ou permanece íntegra, mas inativa, portanto vai sendo gradativamente eliminada.

5.3.4 Rendimento global em produtos metabólicos

Na Tabela 11 estão apresentadas as concentrações de xilose e produtos metabólitos (etanol, glicerol e xilitol) obtidas ao final dos cultivos, quantificadas por CLAE (Item 4.3.5). A glicose foi totalmente consumida ao final das fermentações e por isso sua concentração não está apresentada (Tabela 11).

Tabela 11. Concentrações (g.L⁻¹) de açúcares e produtos metabólicos ao final dos cultivos.

Condição	C Xilose (g.L ⁻¹)	C Etanol (g.L ⁻¹)	C Etanol produzido (g.L ⁻¹)	C Glicerol (g.L ⁻¹)	C Xilitol (g.L ⁻¹)
A1	7,105	7,250	7,250	0,795	0,515
B1	13,325	18,470	9,360	0,610	0,695
B2	7,955	21,020	11,910	0,770	0,680
B3	15,120	16,920	7,810	0,520	0,470
B4	15,390	16,960	7,850	0,520	0,400
B5	14,955	17,175	8,065	0,545	0,550
B6	11,195	19,355	10,245	0,640	0,495
B7	12,700	17,790	8,680	0,550	0,760
B8	13,360	17,650	8,540	0,530	0,690
B9	9,800	19,270	10,160	0,620	0,830
B10	12,720	17,710	8,600	0,530	0,690
C1	9,710	26,210	10,600	0,610	1,530
C2	8,680	28,130	12,520	0,730	1,340
C3	11,830	26,215	10,605	0,665	0,695
C4	10,695	26,375	10,765	0,700	0,810
C5	14,665	24,150	8,540	0,610	0,665
C6	8,691	27,495	11,885	0,765	0,930
C7	7,140	27,840	12,230	0,735	1,020
D1	5,235	38,720	16,065	0,995	1,300
D2	0,000	36,050	13,395	0,840	1,725
D3	0,000	37,885	15,230	0,965	1,280
D4	9,920	35,980	13,325	0,950	1,495
D5	14,040	33,705	11,050	0,860	1,310
D6	12,355	35,920	13,265	0,860	1,095
D7	11,155	35,775	13,120	0,890	1,030
D8	10,805	35,415	12,760	0,895	1,450
D9	11,115	34,610	11,955	0,785	1,460
D10	7,950	37,670	15,015	0,880	1,340
E1	13,715	43,755	11,655	0,960	2,185
E2	25,750	37,045	4,945	0,810	1,015

Tabela 11 cont. Concentrações (g.L⁻¹) de açúcares e produtos metabólicos ao final dos cultivos.

Condição	C Xilose (g.L ⁻¹)	C Etanol (g.L ⁻¹)	C Etanol produzido (g.L ⁻¹)	C Glicerol (g.L ⁻¹)	C Xilitol (g.L ⁻¹)
E3	12,420	44,695	12,595	1,215	2,050
E4	11,050	47,825	15,725	1,460	2,625
E5	9,710	44,715	12,615	1,360	2,760
F1	32,756	46,492	4,732	0,885	1,320
F2	13,723	55,356	15,517	1,330	2,335
F3	14,380	57,145	15,385	1,795	2,790
F4	38,220	46,025	4,265	0,775	0,475
F5	12,655	52,925	11,165	1,560	0,000
F6	19,105	55,135	13,375	1,505	1,985
F7	26,490	51,410	9,650	1,280	1,175
G1	22,640	67,465	15,795	1,520	2,788
G2	11,625	67,165	15,495	1,142	1,802
G3	17,940	70,320	18,650	1,058	1,632
G4	20,200	68,320	16,650	1,05	1,77
G5	7,340	67,350	15,680	1,144	1,666
G6	16,045	71,425	19,755	1,128	1,916
G7	18,495	67,150	15,480	1,242	1,692
G 8.1	16,720	69,755	18,085	1,246	2,134
G 8.1.2	12,710	72,285	20,615	1,374	1,676
G8.1.3	22,320	68,675	17,005	1,280	1,644
G8.2	15,055	70,560	18,890	0,980	1,904
G8.3	21,410	67,180	15,510	1,102	1,358
G8.4	14,245	61,960	10,290	1,156	0,934

A partir das informações apresentadas na Tabela 11, foram calculados os valores de rendimento global em produtos metabólicos (etanol, glicerol e xilitol), utilizando as equações apresentadas no Item 4.5.3.

Os resultados estão exibidos na Tabela 12.

Tabela 12. Rendimento global em etanol, glicerol e xilitol para cada condição de evolução adaptativa.

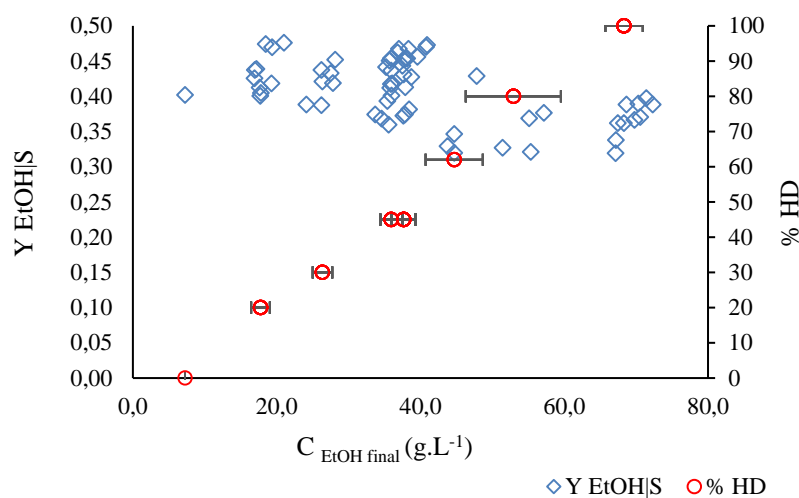
Condição	Y_{EtOH} S	Y_{GHOH} S	Y_{XlHOH} S
A1	0,402	0,062	0,040
B1	0,474	0,040	0,046
B2	0,476	0,037	0,033
B3	0,426	0,039	0,035
B4	0,437	0,039	0,030
B5	0,439	0,040	0,040
B6	0,469	0,037	0,029
B7	0,405	0,035	0,048
B8	0,412	0,035	0,045
B9	0,418	0,033	0,044
B10	0,400	0,033	0,044
C1	0,387	0,028	0,071
C2	0,452	0,032	0,059
C3	0,437	0,034	0,036
C4	0,421	0,034	0,039
C5	0,388	0,037	0,040
C6	0,433	0,034	0,041
C7	0,419	0,030	0,042
D1	0,427	0,030	0,040
D2	0,418	0,022	0,045
D3	0,413	0,025	0,034
D4	0,401	0,034	0,053
D5	0,374	0,036	0,055
D6	0,436	0,034	0,043
D7	0,412	0,033	0,038
D8	0,393	0,033	0,053
D9	0,368	0,029	0,054
D10	0,431	0,029	0,045
E1	0,329	0,033	0,075
E2	0,172	0,047	0,059
E3	0,346	0,040	0,067
E4	0,429	0,046	0,083

Tabela 12 cont. Rendimento global em etanol, glicerol e xilitol para cada condição de evolução adaptativa.

Condição	Y_{EtOH} S	Y_{GHOH} S	Y_{XiOH} S
E5	0,319	0,041	0,083
F1	0,160	0,052	0,077
F2	0,321	0,037	0,065
F3	0,376	0,051	0,079
F4	0,158	0,067	0,041
F5	0,247	0,042	0,000
F6	0,369	0,049	0,065
F7	0,327	0,055	0,050
G1	0,362	0,039	0,100
G2	0,276	0,047	0,023
G3	0,389	0,050	0,025
G4	0,362	0,059	0,026
G5	0,257	0,021	0,039
G6	0,397	0,025	0,056
G7	0,319	0,029	0,053
G 8.1	0,366	0,028	0,064
G 8.1.2	0,388	0,028	0,045
G 8.1.3	0,388	0,033	0,058
G 8.2	0,370	0,021	0,054
G 8.3	0,338	0,027	0,046
G 8.4	0,178	0,024	0,025

Para melhor análise dos resultados obtidos (Tabela 12), foram plotados gráficos que relacionam o rendimento global em etanol, glicerol e xilitol, com a concentração de etanol final e a porcentagem de hidrolisado destoxificado presente em cada condição, apresentados respectivamente nas Figuras 27, 28 e 29.

Figura 27. Rendimento global em etanol versus concentração final de etanol (g.L^{-1}) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em etanol ($Y_{\text{EtOH/S}}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.



Os valores de rendimento em etanol passaram por oscilações à medida que a concentração de etanol final alcançada aumentava, terminando em torno de 0,40 (Figura 27), correspondendo a 78% do rendimento estequiométrico ($0,51 \text{ g.g}^{-1}$).

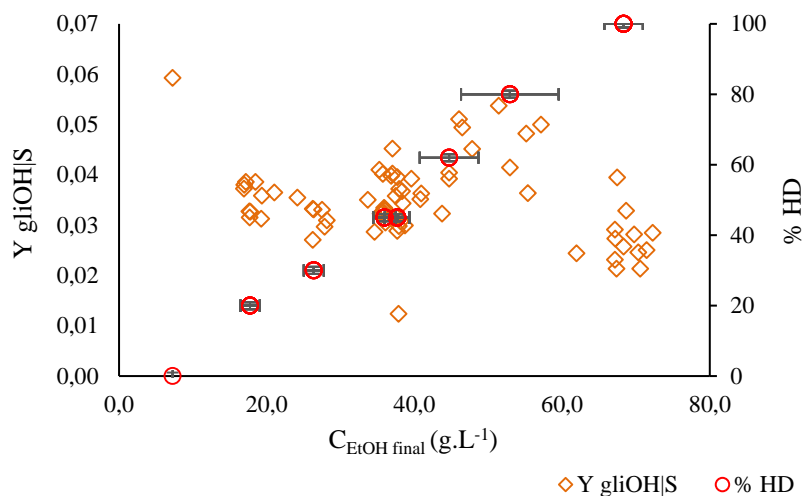
Com relação ao rendimento global em glicerol (Figura 28), a tendência dos dados é contrária ao do etanol, aumentando gradualmente com a concentração de etanol final. Porém, também se observa uma maior dispersão dos valores.

O comportamento dos dados apresentados nas Figuras 27 e 28 reflete o processo evolutivo, que conferiu novas características à população celular no decorrer da adaptação, levando, ao final, a uma linhagem com o rendimento em etanol ligeiramente inferior, mas capaz de tolerar altas concentrações de etanol.

Como forma de balancear desequilíbrios sofridos durante o processo evolucionário, a levedura começa a ativar outras vias metabólicas. Tanto o etanol quanto o glicerol, são essenciais para manter o equilíbrio redox intracelular, entre o NADH e o NAD^+ (IDA et al., 2013).

Esses compostos, sob condições fermentativas, são produzidos pela *S. cerevisiae* para fazer a regulação de seu metabolismo, mantendo a regulação osmótica e o equilíbrio redox intracelular (BAKKER et al., 2001; DIJKEN; SCHEFFERS, 1986; GUO et al., 2011). Mas o glicerol, principalmente, atua como um protetor contra a lise das células, pois serve como um soluto compatível com alta osmolaridade extracelular (LARSSON; ANSELL; ERIKSSON, 1993).

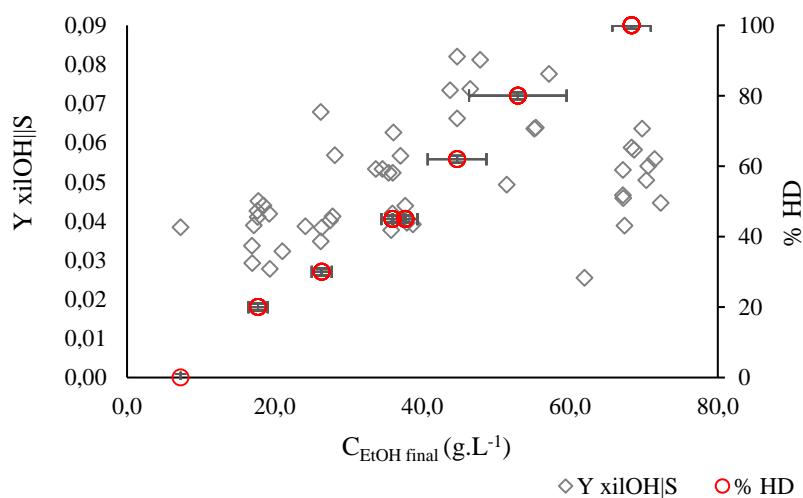
Figura 28. Rendimento global em glicerol versus concentração final de etanol (g.L^{-1}) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em glicerol ($Y_{\text{gliOH|S}}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.



Na Figura 29 estão apresentados os dados de rendimento global em xilitol, que foi produzido em quantidades tão baixas quanto o glicerol.

É possível observar que o rendimento em xilitol apresenta, inicialmente, um aumento com o avanço das bateladas sucessivas, mas ao final da evolução adaptativa, nas fermentações da condição G, apresentou uma tendência de queda (Figura 29).

Figura 29. Rendimento global em xilitol versus concentração final de etanol (g.L^{-1}) e porcentagem de hidrolisado destoxificado. Legenda: Rendimento global em xilitol ($Y_{\text{xilOH|S}}$) e porcentagem de hidrolisado destoxificado (% HD) em cada condição.



A baixa produção de xilitol (Figura 29) é característica de algumas linhagens recombinantes, como a parental MDS 130 utilizada neste estudo. Linhagens anteriores a essa

já haviam passado por modificações genéticas que resultaram na sub expressão da produção do composto (DEMEKE et al., 2013c).

Em estudo realizado por Milessi e colaboradores (2018) utilizando levedura de panificação imobilizada em gel de alginato para produção de etanol a partir de xilose em um processo SIF, foi observada significativa formação de xilitol, com seletividade etanol/xilitol de 2.42 ± 0.01 , já a partir dos resultados apresentados na Tabela 11, tem-se seletividade praticamente total para o etanol frente ao xilitol. Essa é a principal diferença entre o uso de cepa selvagem ou recombinante de *S. cerevisiae* para a produção de etanol 2G a partir da xilose. As recombinantes, como citado anteriormente, podem contar com características melhoradas que minimizam esse produto, beneficiando o rendimento em etanol.

5.3.5 Importância da aplicação da Etapa de enriquecimento da população de células adaptadas (*Boost*)

A introdução das etapas *Boost* se mostrou uma estratégia adequada para a continuação do processo de evolução, que começou a apresentar dificuldades de progresso a partir da condição E (Tabela 4), na qual as células estavam expostas à concentração inicial de aproximadamente 35 g.L⁻¹ de etanol. A associação de baixas DO₆₀₀ iniciais com baixa velocidade de fermentação, levava à lenta assimilação de açúcares e consequente baixa produção de gás carbônico nos cultivos (Tabela 8). Em alguns casos, era difícil distinguir a perda de massa devido à liberação de CO₂ da perda por evaporação.

Conforme o aumento da porcentagem de hidrolisado, e consequentemente, etanol no meio, observou-se que as células apresentavam menor capacidade de multiplicação, o que fazia com que a suspensão terminasse com uma densidade celular muitas vezes mais baixa que a inicial. Assim, a alternativa de utilização de transferências alternadas para o meio D (45 % de HD suplementado com etanol) possibilitou a obtenção de uma carga celular mais alta para dar continuidade ao processo de evolução nas condições de alta pressão seletiva.

Essa melhora se deve ao alívio de estresse repentino ao qual as células foram submetidas, que possibilitou multiplicação e consequente aumento da população. Entretanto, dada a provável heterogeneidade da suspensão, ao retornar à condição de maior estresse, somente as células evoluídas foram capazes de se manter viáveis, com maior concentração celular que antes do *Boost*, o que funcionou como um padrão de seleção de fenótipos melhorados durante a evolução. Os resultados dessa medida seletiva foram observados durante a caracterização do conteúdo de ácidos nucleicos presentes no meio, que aumentou progressivamente com a evolução, mais evidentemente no período de aplicação da metodologia *Boost* (Item 5.3.3).

Como relatado por Fletcher e colaboradores (2017), a exposição de longo prazo a ambientes definidos permite que sejam adquiridas mutações chave para alterar processos biológicos associados a diferentes estresses. A forma como essas melhorias serão alcançadas deve ser conduzida com estratégias bem elaboradas, como a utilizada neste trabalho (*Boost*), inspirada em Gonzalez-Ramos et al., 2016. Assim, a metodologia possibilitou a obtenção de células aptas a tolerar o etanol presente no meio, sob exposição contínua e por longo período de tempo, apesar de ter sido observada grande dificuldade de multiplicação celular no decorrer da fermentação, que se deve à inibição enfrentada.

5.4 Caracterização da linhagem Evoluída

5.4.1 Inibição pelo Etanol

Baixa densidade ótica inicial ($DO_{600} - 0,1$):

A linhagem evoluída foi caracterizada em relação à inibição pelo etanol similarmente aos experimentos preliminares, como descrito no item 4.4.7.

Os perfis fermentativos obtidos para os experimentos com DO_{600} inicial 0,1, em meio com suplementações de etanol inicial de 0, 20, 40 e 60 $g.L^{-1}$, estão apresentadas na Figura 30.

Figura 30. Massa de CO_2 em função do tempo de fermentação para as quatro suplementações de meio analisadas com a linhagem evoluída. DO_0 : 0,1, estático.

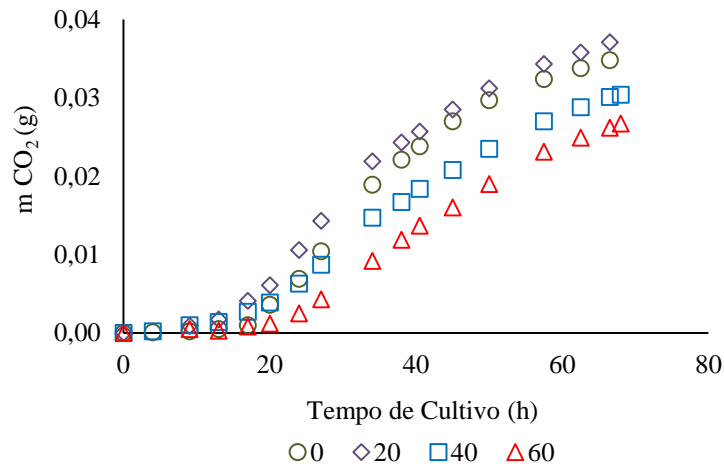
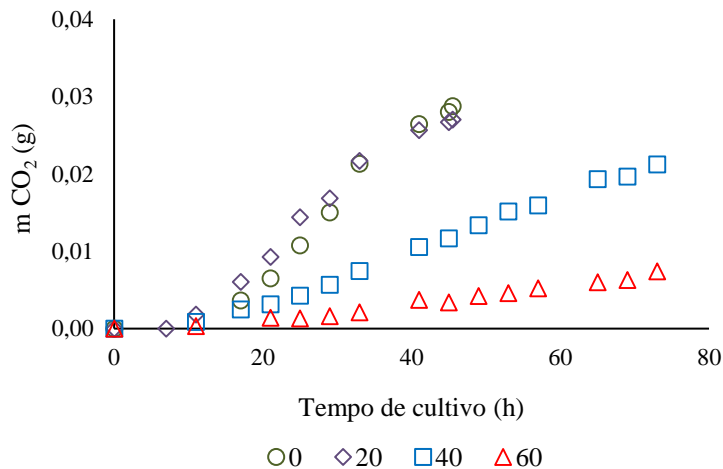


Figura 31. Repetição da Figura 16: Massa de CO_2 em função do tempo de fermentação para experimentos conduzidos com meio YPX suplementado com diferentes concentrações de etanol na linhagem parental. DO_0 : 0,1, estático.



É nítida a melhora no perfil fermentativo da linhagem evoluída (Figura 30) ante sua parental *S. cerevisiae* MDS 130 (Figura 31), o que refletiu nos resultados quantitativos obtidos.

A porcentagem de células viáveis ao final de cada um dos ensaios (aproximadamente 70 horas) foi quase total. Sendo de 99, 97, 99 e 90% para os meios com 0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹ de etanol inicial, respectivamente. Lembrando que a linhagem parental apresentou somente 33% de viabilidade final após quase 80 horas de cultivo no meio suplementado com 60 g.L⁻¹ de etanol, e conversão de apenas 25% do açúcar disponível, frente ao consumo de 84% pela linhagem evoluída na mesma condição.

Na Tabela 13 estão apresentados os valores obtidos de densidade ótica final (DO₆₀₀), produtividade (g/L.h), rendimento em etanol (%) e conversão de açúcares (%), para cada condição de suplementação de etanol.

Tabela 13. Densidade ótica final (DO₆₀₀), produtividade, conversão (X) e rendimento para a cepa evoluída cultivada em meio YPX 2% suplementado com diferentes concentrações de etanol, DO₀: 0,1.

C_{EtOH} (g/L)	DO₆₀₀	Produtividade (g/L.h)	Rendimento (%)	X (%)
0	7,81	0,14	96,08	99,69
20	6,92	0,15	94,12	96,01
40	5,88	0,12	84,31	91,09
60	2,89	0,11	82,35	84,48

A densidade ótica final das suspensões também foi maior que na cepa parental, diminuindo em ordem crescente de suplementação de etanol (Tabela 13), o que reflete a maior dificuldade da multiplicação das células frente a concentrações elevadas do composto, como já relatado nos experimentos de evolução adaptativa. Com foco na última condição testada, em comparação com a linhagem parental, a densidade ótica final do experimento preliminar só tinha alcançado 3 vezes a inicial (0,1), refletindo a grande toxicidade e inibição que o composto apresentava sobre as células originais, que após a evolução conseguiram se multiplicar em 28 vezes no meio suplementado com 60 g.L⁻¹ de etanol. O aumento da concentração de etanol, como principal produto da fermentação e também suplementado no meio, influencia na fluidez da membrana celular, sendo tóxico para as proteínas, o que leva à inibição do crescimento e até à morte (DING et al., 2009).

As produtividades e os rendimentos finais para as suplementações de 0, 20, 40 e 60 g.L⁻¹ foram: 0,14; 0,15; 0,12; 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,49; 0,48; 0,43; 0,42 g etanol. g substrato⁻¹ (Tabela

13), respectivamente, sendo estes referentes a 96, 94, 84 e 82% do estequiométrico ($0,51 \text{ g.g}^{-1}$).

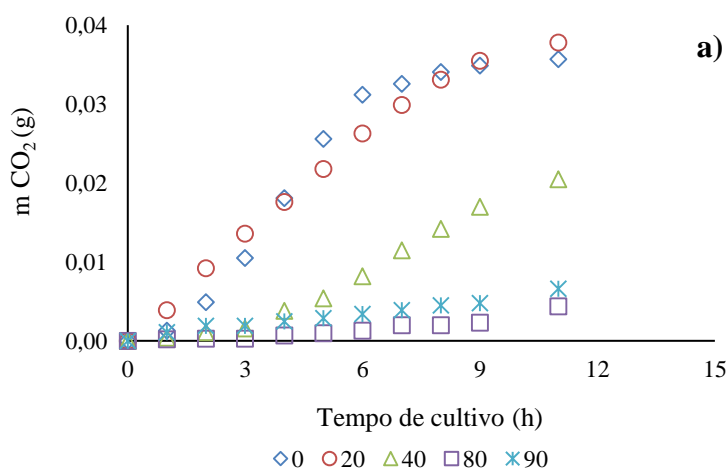
A linhagem parental, em experimento no meio YPX suplementado com 60 g.L^{-1} de etanol, apresentou velocidade de crescimento constante de $0,139 \pm 0,011 \text{ h}^{-1}$, valor similar ao estimado para as células evoluídas na mesma condição, que foi de $0,124 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$. A metodologia utilizada para o cálculo da taxa de crescimento considera as células viáveis durante a fermentação, não sendo prevista a lise que elas sofrem durante o longo tempo de exposição ao etanol, aproximadamente 70 horas. Assim, apesar da similaridade desses resultados, a linhagem evoluída alcançou densidade ótica final 10 vezes maior que sua parental, além de características melhoradas em relação ao rendimento e a produtividade em etanol.

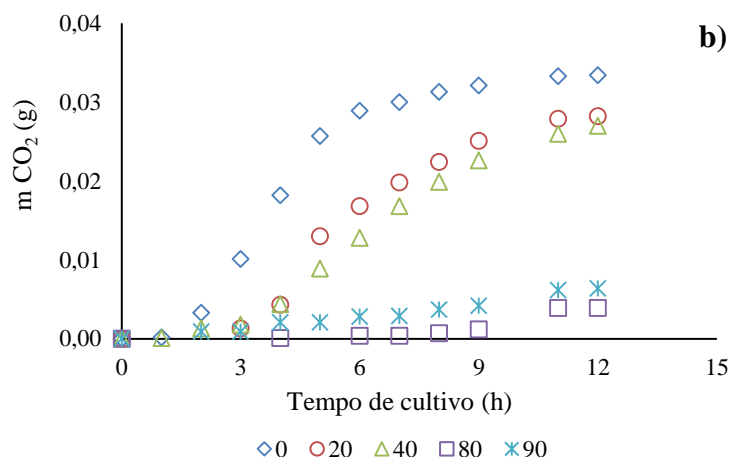
Alta concentração celular inicial (DO₆₀₀ - 5):

Visando analisar o progresso de cultivos realizados com alta concentração celular inicial sob estresse por etanol, foram conduzidos experimentos com as linhagens evoluída e parental em meios com suplementação de 0, 20, 40, 80 e 90 g.L^{-1} de etanol e DO₆₀₀ inicial 5.

Os perfis de variação de massa de gás carbônico com o tempo de cultivo estão apresentados na Figura 32, para as linhagens evoluída e parental, respectivamente.

Figura 32. Dados de massa de CO₂ em função do tempo de fermentação para as cinco suplementações de meio analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b) DO₀: 5, estático.





Como apresentado na Figura 32- a e b, as fermentações foram interrompidas quando a condição controle (meio YPX sem etanol) esgotou seus nutrientes, cessando liberação de gás carbônico. Observa-se que a alta concentração de células permitiu um bom desenvolvimento do processo para ambas cepas até a concentração de 60 g.L⁻¹. A partir daí, houve queda brusca da taxa fermentativa. Entretanto, a linhagem evoluída se apresentou mais lenta do que sua parental, tendo sido finalizado o experimento antes que todo o substrato fosse consumido nas condições de 40, 80 e 90 g.L⁻¹. Apesar de sua menor taxa fermentativa, é possível notar que os perfis de liberação estavam ascendentes no momento de parada do experimento, significando a continuidade da fermentação caso não tivesse sido interrompida.

Assim, ao final das 12 horas de cultivo (Figura 32- a e b), obteve-se produtividades de: 0,75; 0,63; 0,60; 0,09 e 0,14 g.L⁻¹.h⁻¹ para a *S. cerevisiae* MDS 130 e 0,81; 0,92; 0,50; 0,11 e 0,16 g.L⁻¹.h⁻¹ para a evoluída. Portanto, valores maiores de produtividade foram observados para a linhagem evoluída nas condições sem suplementação e com 20 g.L⁻¹ de etanol, enquanto nas demais condições ambas as linhagens apresentaram valores semelhantes. Com relação à viabilidade, para ambas linhagens todos os cultivos apresentaram mais de 90% de células viáveis ao final do processo.

Em termos de desempenho das linhagens evoluída e parental, os resultados apresentados nas Figuras 32 (a, b) assim como os valores de produtividade e viabilidade, referentes aos experimentos conduzidos com DO inicial de 5, são bastante diferentes dos obtidos nos experimentos realizados com DO inicial de 0,1 (Figuras 30 e 31). Em relação à produtividade, é esperado que os valores da mesma sejam superiores em condições de alta carga de célula. Mas as diferenças na influência de diferentes concentrações de etanol para DO₆₀₀ mais altas e mais baixas podem ser ainda atribuídas a outros fatores, que são analisados a seguir.

A concentração inicial de células presente no micro-reator é proporcional à densidade óptica inicial. Considerando que o fluxo de entrada de etanol no interior das células (no caso dos experimentos suplementados com etanol) é definido pela razão entre o gradiente de concentração de etanol e a concentração celular (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU; NIELSEN, 1998), o fluxo de etanol ao qual as células estavam expostas nos experimentos com DO inicial de 5 (Figura 32) é muito menor do que o fluxo nos experimentos com DO inicial de 0,1 (Figuras 30 e 31), para a mesma concentração de etanol no meio. Como os fluxos através das vias metabólicas são influenciados pelos fluxos que entram nas células, é natural que a célula apresente respostas diferentes para os diferentes fluxos de entrada, resultando em menor ou até ausência de inibição pelo etanol em fluxos mais baixos do mesmo. Isso pode ter ocorrido no experimento conduzido em DO 5, no qual células evoluídas e parentais apresentaram desempenho parecido mesmo nas concentrações mais altas de etanol avaliadas.

O tempo de exposição a alta concentração de etanol também é outro fator que pode influenciar o seu efeito sobre as células. Em estudo realizado por Nagodawithana e Steinkraus (1976), estes concluíram que em fermentações rápidas (aproximadamente 48 horas), o etanol adicionado ao meio é muito menos letal que a mesma quantidade do composto, ou menos, produzida pelo próprio microrganismo. Assim, no caso dos cultivos realizados com alta concentração celular inicial, o curto tempo de duração (Figura 32) contribuiu para a alta viabilidade das estirpes. Já nos experimentos realizados em DO inicial de 0,1 (Figuras 30 e 31), que se prolongaram por mais de 70 h, observou-se maior perda de viabilidade, particularmente para a linhagem parental.

As DO_{600} finais foram: 11,26; 7,32; 6,66, 5,28 e 6,83 para a parental e 9,53; 9,75; 8,16; 5,11 e 5,18 para a evoluída. Portanto, ocorreu novamente o mesmo efeito observado nos ensaios de evolução adaptativa: nas concentrações mais altas de etanol inicial, as células têm seu crescimento inibido pelo composto, mantendo sua densidade óptica próxima à inicial (DO_{600} : 5).

Ambos experimentos, tanto em DO_{600} baixa quanto elevada, não apresentaram produção significativa dos subprodutos glicerol, ácido acético e xilitol.

Os resultados discutidos neste tópico ressaltam a importância de operar reatores industriais em alta carga de células não só para garantir maior produtividade, mas também por contribuir para preservação da viabilidade das células. No caso da viabilidade e de outras mudanças no metabolismo relacionadas à concentração celular, experimentos adicionais e específicos são necessários para avaliar a validade das hipóteses apresentadas acima e também outras hipóteses.

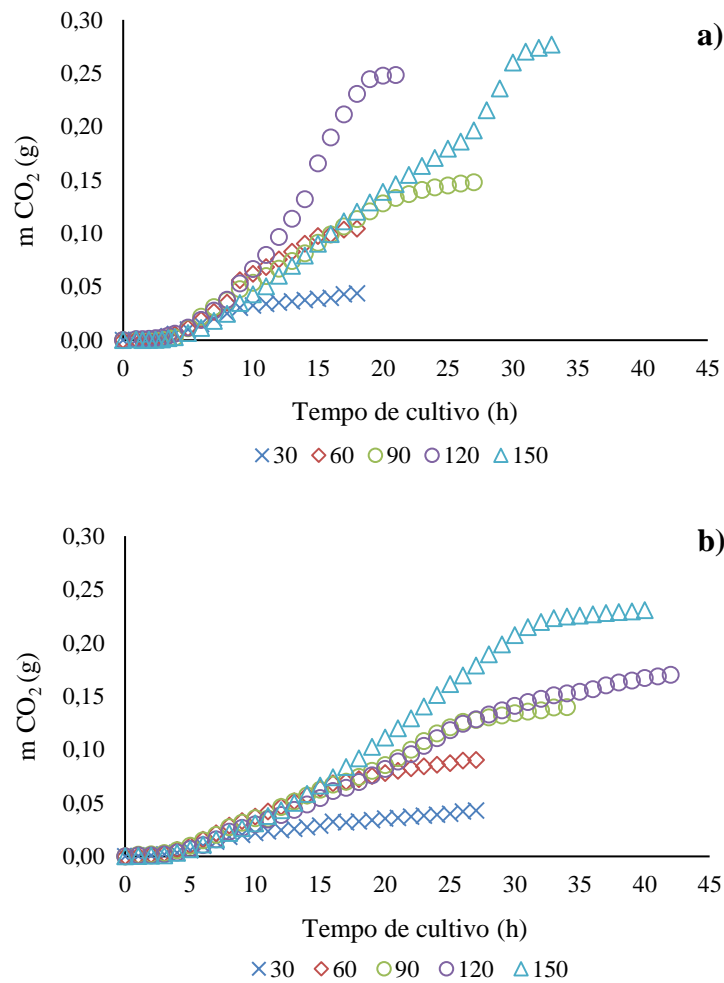
5.4.2 Assimilação dos substratos

Com o intuito de avaliar e comparar a assimilação de substratos pelas linhagens evoluída e parental, foram conduzidas fermentações em meios contendo xilose ou glicose 30, 60, 90, 120 e 150 g.L⁻¹. Os cultivos foram conduzidos até cessar a liberação de gás carbônico, caracterizando o esgotamento do substrato disponível.

5.4.2.1 Xilose:

Na Figura 33- **a** e **b** estão apresentados os dados de massa de gás carbônico versus tempo para a linhagem evoluída e parental, respectivamente, em meio complexo contendo diferentes concentrações de xilose.

Figura 33. Massa de CO₂ em função do tempo de fermentação para as cinco concentrações de xilose analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b). Meio YPX, DO₀: 3, estático.



Os perfis fermentativos em xilose (livre de inibidores) são similares para as linhagens parental e evoluída (Figura 33- **a** e **b**), com ligeira superioridade na nova cepa. Ainda para a linhagem evoluída, os dados sugerem a ocorrência de inibição por substrato para a concentração inicial de xilose de 150 g.L^{-1} , o que não se observa para a linhagem parental.

Para facilitar a comparação das duas linhagens em termos de assimilação de xilose, tem-se na Tabela 14 os valores calculados de produtividade em etanol, conversão e rendimento em etanol para esses cultivos.

Nota-se que ambas linhagens alcançaram altas conversões de xilose. A manutenção dessa característica, associada à capacidade de direcionar o catabolismo de uma linhagem recombinante, como a *S. cerevisiae*, para o produto desejado, são requisitos fundamentais para a produção eficiente de biocombustíveis a partir de materiais lignocelulósicos (LEE; JELLISON; ALPER, 2012).

Com relação à produtividade, observa-se que a cepa evoluída apresentou melhor desempenho que a parental, sendo os valores em média 1,5 vezes maiores (Tabela 14). Já seu rendimento se manteve similar nas quatro primeiras condições, apresentando queda de apenas 9% no cultivo com maior concentração de xilose (150 g.L^{-1}). Os valores de rendimento foram comparados estatisticamente por teste de Tukey (Tabela 14). Zhang e Geng (2012), em linhagem modificada de *S. cerevisiae* com genes de *P. stipitis*, observaram que a partir de 100 g.L^{-1} de xilose inicial no meio começa a haver queda no rendimento em etanol. Essa queda no rendimento pode ser atribuída à repressão causada pelo etanol, em concentração superior a 30 g.L^{-1} , sobre as enzimas responsáveis pela conversão da xilose.

Observação importante está relacionada a produção de xilitol, que foi duas vezes maior na cepa parental que na evoluída para a condição de 150 g.L^{-1} de açúcar, podendo ser devido a algum desvio de via metabólica. Já a produção de glicerol não teve grande distinção entre as variantes.

Tabela 14. Concentrações de etanol, glicerol, ácido acético e xilitol, produtividade, conversão (X), rendimento e DO₆₀₀ final para as cepas parental e evoluída cultivadas em diferentes concentrações de xilose.

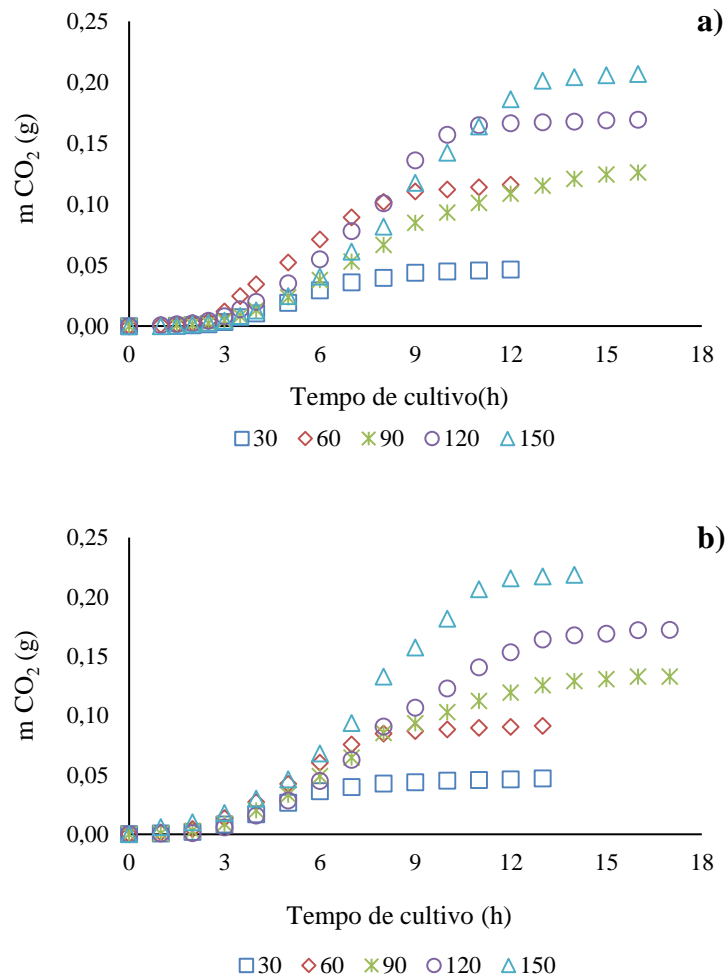
PARENTAL								
Xilose (g.L ⁻¹)	X (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	DO ₆₀₀	Etanol (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Xilitol (g.L ⁻¹)
30	92,10	0,43	0,40 ^d	6,06	14,97	1,84	1,80	0,80
60	98,32	0,90	0,47 ^{abc}	13,10	29,39	2,58	3,03	2,29
90	96,20	1,10	0,46 ^{bc}	9,88	41,25	0,81	3,78	3,22
120	97,22	1,09	0,48 ^a	13,67	55,84	1,59	4,27	3,67
150	99,43	1,55	0,44 ^c	10,06	68,98	0,57	5,43	5,95
EVOLUÍDA								
Xilose (g.L ⁻¹)	X (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	DO ₆₀₀	Etanol (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)	Xilitol (g.L ⁻¹)
30	93,34	0,65	0,39 ^d	7,03	14,77	0,45	1,73	0,00
60	99,33	1,56	0,47 ^{ab}	7,28	29,80	1,55	2,83	0,92
90	98,40	1,47	0,47 ^{abc}	11,10	43,35	0,00	3,56	1,42
120	99,76	3,18	0,45 ^{bc}	14,87	53,65	0,51	4,65	1,97
150	96,32	2,25	0,38 ^d	13,20	57,34	0,00	5,69	2,84

^{a, b, c, d} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas com um nível de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

5.4.2.2 Glicose:

Na Figura 34- **a** e **b** estão apresentados os dados de massa de gás carbônico versus tempo para a linhagem evoluída e parental, respectivamente, em meio complexo contendo diferentes concentrações iniciais de glicose.

Figura 34. Massa de CO₂ em função do tempo de fermentação para as cinco concentrações de glicose analisadas com a linhagem evoluída (a) e parental (b). Meio YPD, DO inicial de 3.



Assim como nos experimentos em xilose, os perfis para as duas linhagens nas fermentações em glicose foram similares, com esgotamento da fonte de carbono entre 12 e 18 horas de cultivo. As análises quantitativas desses experimentos estão apresentadas na Tabela 15.

Observa-se que a produtividade da cepa evoluída também foi maior que a da parental, similarmente ao constatado para a xilose, caracterizando a superioridade da nova linhagem. Já

o rendimento apresentou valores similares, que foram comparados estatisticamente por teste de Tukey (Tabela 15).

Ainda, observa-se que a fonte de açúcar foi consumida mais rapidamente que nos experimentos com xilose, o que pode ser explicado pela capacidade de assimilação da hexose, que é de uma a duas vezes mais rápida que a de pentoses, utilizando o mesmo transportador (ALMEIDA et al., 2007; DEMEKE et al., 2013a).

Como informação adicional, a produção de glicerol foi crescente de acordo com o aumento da concentração de substrato para as duas cepas, alcançando um máximo de aproximadamente 5 g.L⁻¹ para 150 g.L⁻¹ de glicose (Tabela 15), indicando um desvio da via metabólica de produção de etanol (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Tabela 15. Concentrações de etanol, glicerol, ácido acético e xilitol, produtividade, conversão (X), rendimento e DO₆₀₀ final para as cepas parental e evoluída em diferentes concentrações de glicose.

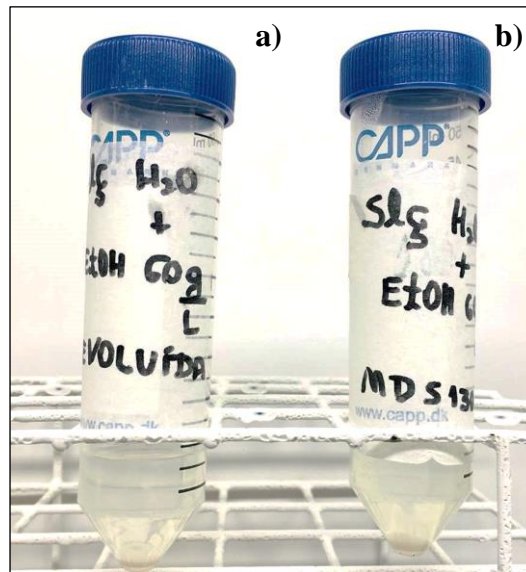
PARENTAL							
Glicose (g.L ⁻¹)	X (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	DO ₆₀₀	Etanol (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)
30	99,47	0,97	0,43 ^{bc}	6,94	15,33	1,50	1,76
60	99,12	1,88	0,43 ^{bc}	11,63	29,04	1,80	2,62
90	99,87	2,10	0,45 ^{ab}	14,58	42,66	0,00	1,51
120	99,25	2,72	0,44 ^{bc}	11,08	51,67	1,51	3,81
150	98,68	4,19	0,48 ^a	13,41	66,58	2,00	4,66
EVOLUÍDA							
Glicose (g.L ⁻¹)	X (%)	Produtividade (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Rendimento (g.g ⁻¹)	DO ₆₀₀	Etanol (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Glicerol (g.L ⁻¹)
30	99,44	1,04	0,42 ^c	7,44	14,94	0,99	1,60
60	98,84	2,60	0,41 ^c	9,12	27,93	1,96	2,45
90	99,72	2,12	0,43 ^c	11,23	40,87	1,92	3,08
120	99,29	2,84	0,43 ^{bc}	10,68	50,59	0,00	4,00
150	100,0	3,47	0,45 ^{ab}	13,51	64,34	0,00	4,68

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas com um nível de confiança de 95% (p-valor < 0,05).

5.4.3 Efeito letal do etanol

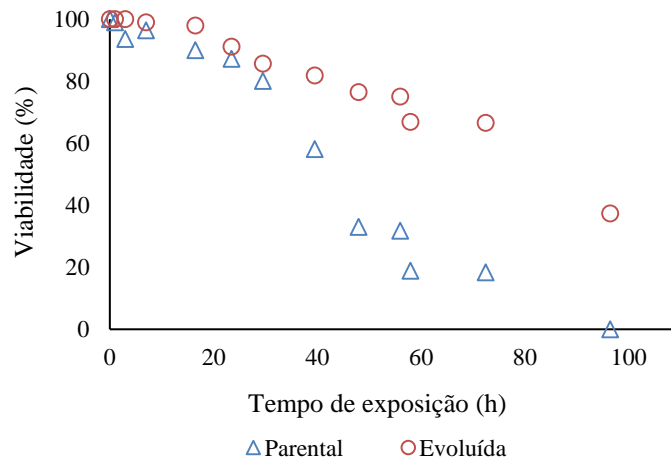
Para caracterizar o efeito letal do etanol sobre as células parentais e evoluídas, foi preparada uma solução hidro alcoólica (Item 4.4.7) com 60 g.L^{-1} de etanol, à qual foi adicionada quantidade de células para obtenção de DO_{600} inicial 10. Os experimentos com as duas cepas foram conduzidos simultaneamente, como apresentado na Figura 34.

Figura 35. Experimentos simultâneos em solução hidro alcoólica com as cepas evoluída (a) e parental (b).



A Figura 36 apresenta os dados obtidos de viabilidade em relação ao tempo de exposição das células à solução hidro alcoólica.

Figura 36. Viabilidade versus tempo de exposição a solução hidro alcoólica para as linhagens parental e evoluída.



É nítida a maior resistência ao etanol pela cepa evoluída frente à linhagem parental (Figura 36). As células evoluídas sofreram perda de viabilidade de forma mais gradativa, mantendo-se altamente viáveis (aproximadamente 70%) mesmo após 80 h de exposição à alta concentração de etanol. Já a linhagem parental contava com menos de 15% de células viáveis após mesmo período de tempo.

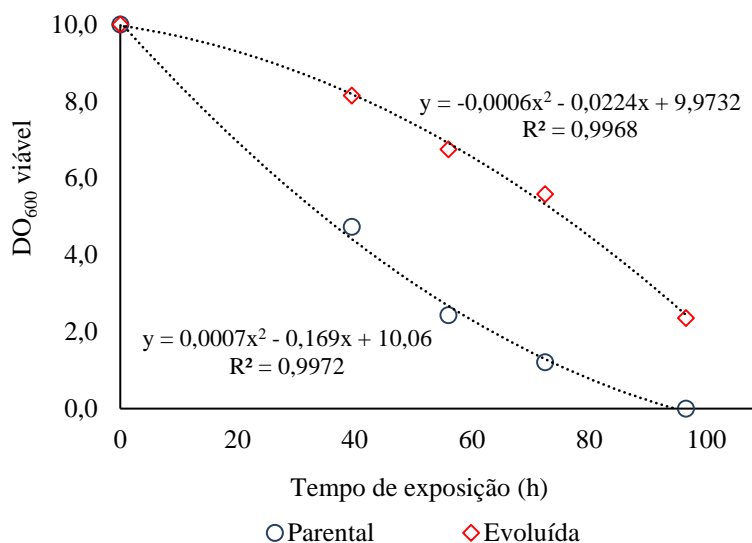
Mizoguchi e Hara (1998) relataram em seus estudos que células cultivadas em meio suplementado com etanol, como o processo de evolução adaptativa realizado no presente trabalho, desenvolvem características em sua membrana que reduzem os efeitos tóxicos do composto, garantindo maior viabilidade celular. Essas características foram relacionadas às proteínas ATPases, que seriam sintetizadas durante a multiplicação celular em meios com alta concentração de etanol, reduzindo os efeitos negativos sobre a membrana celular.

Quanto à concentração celular, a DO_{600} após quase 100 horas de exposição caiu de 10 (inicialmente) para 5,3 na cepa parental e 6,3 na evoluída. Essa diminuição da DO comprova o efeito de lise celular promovido pelo etanol, que foi sugerido no item 5.3.3 em função da presença de ácidos nucleicos no sobrenadante das bateladas realizadas durante a evolução adaptativa.

Apesar de as células evoluídas terem apresentado concentração celular maior no final do tempo de exposição, a diferença não foi tão grande quanto a esperada. Porém, deve-se lembrar que a medida de densidade ótica não distingue células viáveis de não viáveis. Portanto, a concentração de células viáveis seria proporcional à densidade ótica medida e à viabilidade correspondente (Figura 36), resultando em valores bem menores de concentração de células viáveis para a linhagem parental.

A velocidade de morte apresentou características diferentes para as 2 linhagens (Figura 37). A linhagem parental apresentou variação mais abrupta da densidade ótica viável, indicando uma queda mais rápida da viabilidade das células. Já a população evoluída manteve um declínio mais suave, mantendo sua DO_{600} viável próxima a inicial durante as primeiras 40 horas.

Figura 37. Densidade ótica celular viável versus tempo de incubação em solução hidro alcoólica.



Com relação à quantificação da concentração de ácidos nucleicos presentes nas suspensões, inicialmente, a concentração quantificada para cepa parental e evoluída foi de 8,6 e 11,8 $mg.L^{-1}$ respectivamente e ao final do processo foi 60,2 e 58,5 $mg.L^{-1}$. Portanto, constatou-se novamente o aumento da presença de material genético no meio no decorrer da exposição, que caracteriza a lise do núcleo celular. Além disso, com 72 horas de exposição, a razão $C_{AN}/DO_{viável}$ calculada é muito menor para a linhagem evoluída (4,27) do que para a linhagem parental (35,50), o que comprova a maior resistência da população selecionada ao final da evolução adaptativa aos efeitos letais do etanol.

6 Conclusões

Em relação aos objetivos propostos, pode-se concluir que:

Desenvolvimento de metodologia para Evolução Adaptativa em condições fermentativas.

O micro-reator proposto e o acompanhamento da produção de CO₂ viabilizaram os estudos de evolução adaptativa por bateladas sucessivas com perturbações mínimas das condições fermentativas, em experimentos de execução simples e fácil monitoramento. De fato, apenas nos procedimentos de transferência para a batelada seguinte as células foram expostas ao oxigênio ao longo de todo o processo de evolução. Porém, informações importantes sobre o crescimento não são acessíveis diretamente e precisam ser estimadas.

Caracterização da linhagem MDS 130.

Com relação à caracterização da linhagem MDS 130, os resultados obtidos em termos de velocidade de formação de CO₂, consumo de açúcares, concentração final de etanol e viabilidade mostraram que os inibidores presentes no hidrolisado afetam as células das leveduras. E os efeitos são amenizados, mas não eliminados, pelo tratamento de destoxificação.

Constatou-se a expressiva influência do etanol sobre as células de *S. cerevisiae* MDS 130. Com um limite de tolerância extremamente baixo, em torno de 20 g.L⁻¹ (experimentos realizados com baixa concentração celular inicial) a levedura recombinante se mostrou suscetível aos efeitos nocivos do etanol.

Evolução Adaptativa:

A estratégia convencional de transferências sucessivas não se mostrou adequada para a evolução adaptativa em condições fermentativas, devido à diminuição da velocidade de crescimento e intensificação do efeito letal do etanol à medida que sua concentração no meio aumentava. A modificação dessa estratégia, com a inclusão de etapa de cultivo em condições de menor pressão seletiva para enriquecimento da população em adaptação (*boost*) foi fundamental para o sucesso da metodologia. Juntamente com o procedimento de cultivo desenvolvido (micro-reatores e acompanhamento da fermentação de forma não invasiva pela liberação de CO₂), a concepção da etapa de *boost* é uma das principais contribuições do presente trabalho para futuros estudos de evolução adaptativa em condições fermentativas.

Como resultado do sucesso da metodologia desenvolvida, obteve-se uma cepa capaz de tolerar concentrações de etanol superiores a 50 g.L⁻¹.

Caracterização da linhagem evoluída:

Por meio da caracterização das linhagens evoluída e parental em termos de inibição pelo etanol, assimilação de substratos e resistência ao efeito letal do etanol, foi possível constatar o potencial da linhagem evoluída.

Quando cultivada em meio suplementado com 60 g.L⁻¹ de etanol inicial, para DO₆₀₀ inicial de 0,1, a linhagem evoluída foi capaz de consumir todo o substrato disponível, mantendo valores de rendimento, produtividade e viabilidade ao final de 80 h de cultivo (0,42 g.g⁻¹; 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹ e 90%, respectivamente) significativamente superiores aos alcançados pela linhagem original (0,36 g.g⁻¹; 0,03 g.L⁻¹.h⁻¹ e 33 %). A baixa produtividade, de 0,11 g.L⁻¹.h⁻¹, alcançada é consequência principalmente da baixa DO₆₀₀ inicial empregada. De fato, este valor é similar à produtividade observada na fermentação conduzida na ausência de etanol (0,14 g.L⁻¹.h⁻¹), o que mostra que a evolução adaptativa foi efetiva na atenuação da inibição pelo etanol.

Da mesma forma, a evolução adaptativa contribuiu para a obtenção de uma linhagem mais resistente ao efeito letal exercido pelo etanol. Ao final de aproximadamente 100 horas de exposição das células à concentração de etanol de 60 g.L⁻¹, a linhagem evoluída ainda apresentava quase 40% de viabilidade, enquanto que a parental já tinha sofrido morte total.

Como esperado, a evolução adaptativa melhorou a conversão de xilose, o principal açúcar presente no hidrolisado, em etanol, atingindo-se produtividade de 3,18 g.L⁻¹.h⁻¹, em fermentação realizada com DO₆₀₀ 3 e 120 g.L⁻¹ de xilose como condições iniciais. Esse valor é o dobro da mais alta produtividade obtida com a linhagem parental, para 150 g.L⁻¹ de xilose presente inicialmente. Tal melhora também foi observada em relação a seletividade, sendo que para as mesmas condições citadas anteriormente, a cepa evoluída apresentou seletividade de 27,30, enquanto sua parental apenas 11,59 g_{etanol}. g_{xilitol}⁻¹.

A conversão de glicose em etanol também se tornou mais eficiente na linhagem evoluída, levando a uma produtividade em etanol de 2,60 g.L⁻¹.h⁻¹ (DO₆₀₀ 3 e 60 g.L⁻¹ de glicose como condições iniciais) em comparação com 1,88 g.L⁻¹.h⁻¹ nas mesmas condições iniciais para a linhagem parental. Outro aspecto melhorado, foi a seletividade etanol.glicerol⁻¹.

Os testes com elevada densidade ótica inicial mostraram que o processo de evolução adaptativa permitiu a seleção de células capazes de consumir eficientemente o substrato presente em meio composto integralmente por hidrolisado destoxificado, e produzir etanol com

rendimento próximo do máximo teórico. A alta tolerância ao etanol, aliada à operação em alta carga mediante a imobilização das células, por exemplo, tornariam a linhagem evoluída em levedura muito promissora para futuro emprego em biorreatores de leito fixo operados em batelada repetida ou de modo contínuo, utilizando hidrolisados concentrados, contribuindo para o desenvolvimento de um processo industrial de produção de etanol 2G mais viável e produtivo.

- **Sugestões para trabalhos futuros:**

Realizar a verificação das melhoras alcançadas na cepa evoluída com relação aos inibidores do hidrolisado destoxificado. Esse estudo pode ser conduzido em experimento similar ao realizado na Etapa 1, expondo as células evoluídas aos meios complexos HD, HB e YPDX (como base), em baixa concentração celular inicial (DO_{600} de 0,1).

Outro aspecto a ser analisado nas células evoluídas é a eficácia do processo fermentativo em maior escala, para melhor representatividade das características industriais. Como sugestão para condução dos experimentos, tem-se a utilização da linhagem evoluída de forma imobilizada, o que fornece alta carga celular ao bioprocessos. Assim, o estudo seria conduzido em biorreator, visando um scale-up do processo.

7 Referências

- AGARWAL, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 33, n. 3, p. 233–271, 2007.
- ALMEIDA, J. R. et al. Mini-Review Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. May, p. 340–349, 2007.
- ALVES, L. A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 70–72, p. 89–98, 1998.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010.
- ANSANAY-GALEOTE, V. et al. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 9, p. 677–681, 2001.
- AVRAHAMI-MOYAL, L. et al. Turbidostat culture of *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A under selective pressure elicited by ethanol selects for mutations in *SSD1* and *UTH1*. p. 1–13, 2012.
- BAKKER, B. M. et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. v. 25, 2001.
- BALA, A.; SINGH, B. Development of an environmental-benign process for efficient pretreatment and saccharification of *Saccharum* biomasses for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 130, p. 12–24, 2019.
- BARRICK, J. E. et al. Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. **Nature**, v. 461, n. 7268, p. 1243–1247, 2009.
- BASSO, L. C. et al. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.
- BELLISSIMI, E. et al. Effects of acetic acid on the kinetics of xylose fermentation by an engineered, xylose-isomerase-based *saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Research**, v. 9, n. 3, p. 358–364, 2009.
- BLOUNT, B. A.; WEENINK, T.; ELLIS, T. Construction of synthetic regulatory networks in yeast. **FEBS Letters**, v. 586, n. 15, p. 2112–2121, 2012.
- BORRION, A. L.; MCMANUS, M. C.; HAMMOND, G. P. Environmental life cycle assessment of lignocellulosic conversion to ethanol: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4638–4650, 2012.
- BOYER, L. J. et al. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces Cerevisiae* in batch culture. **Biomass and Bioenergy**, v. 3, n. 1, p. 41–48, 1992.
- BÜCKER, A. **ENGENHARIA GENÔMICA DE LINHAGEM INDUSTRIAL DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE VISANDO MELHORAR A TOLERÂNCIA AO ETANOL**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina para, 2014.
- ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 5, n. 6–7, p. 569–578, 2005.
- ÇAKAR, Z. P. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 2, p. 171–182, 2012.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.

2012, p. 1–15, 2012.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. E. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 2, p. 1371–1376, 2006.

CHEN, S.; XU, Y. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced ethanol tolerance for Chinese rice wine fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 173, n. 7, p. 1940–1954, 2014.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento - Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>. Acesso em: 26 jun. 2018.

CTC. **Centro de Tecnologia Canavieira - Etanol lignocelulósico**. Disponível em: <<http://new.ctc.com.br/etanol-celulosico/>>. Acesso em: 27 jun. 2018.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol tolerance of yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 6, p. 322–330, 1987.

DA CRUZ, S. H. Bagaço e palha da cana são fontes de celulose para gerar álcool. **Visão Agrícola**, v. 8, p. 13–14, 2008.

DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2013a.

DEMEKE, M. M. et al. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2013b.

DEMEKE, M. M. et al. Development of a D-xylose fermenting and inhibitor tolerant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain with high performance in lignocellulose hydrolysates using metabolic and evolutionary engineering. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 89, jun. 2013c.

DEPARIS, Q. et al. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 4, p. 1–17, 2017.

DETTMAN, J. R. et al. Evolutionary insight from whole-genome sequencing of experimentally evolved microbes. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 9, p. 2058–2077, 2012.

DIAO, L. et al. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC Biotechnology**, v. 13, 2013a.

DIAO, L. et al. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 110, 2013b.

DIJKEN, J. P. VAN; SCHEFFERS, W. A. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. v. 32, p. 199–224, 1986.

DING, J. et al. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 253–263, 2009.

DOS SANTOS, L. V. et al. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Scientific Reports**, v. 6, n. August, p. 1–14, 2016.

DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Adaptive laboratory evolution – principles and applications for biotechnology TL - 12. **Microbial Cell Factories**, v. 12 VN-r, n. 1, p. 64, 2013.

DUTTON, J. **Alternative Fuels from Biomass Sources**. Disponível em: <<https://www.education.psu.edu/egee439/node/664>>. Acesso em: 11 jul. 2018.

FERREIRA, A. D. et al. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest. **Yeast**

- (Chichester, England), v. 28, p. 547–554, 2011.
- FLETCHER, E. et al. Evolutionary engineering reveals divergent paths when yeast is adapted to different acidic environments. **Metabolic Engineering**, v. 39, n. November 2016, p. 19–28, 2017.
- GIORDANO, R.L.C. GIORDANO, R.C. ZANGIROLAMI, T.C. TARDIOLI, P. W. et al. **Sistema Catalítico e Processo de Obtenção de Bioetanol 2G a Partir de Xilana/Oligômeros de Xilose. Patente: Privilégio de Inovação, BR102014023394, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, 2014.
- GONÇALVES, D. L. et al. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p. 13–20, set. 2014.
- GONZALEZ-RAMOS, D. et al. A new laboratory evolution approach to select for constitutive acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of causal mutations. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, 2016.
- GUIMARÃES, P. M. R. et al. Adaptive evolution of a lactose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* recombinant. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1748–1756, 2008.
- GUO, Z. et al. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 49–59, 2011.
- HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 147–177, 2007.
- HAQ, F. et al. Recent progress in bioethanol production from lignocellulosic materials: A review. **International Journal of Green Energy**, v. 13, n. 14, p. 1413–1441, 2016.
- HARDISON, R. C. Comparative genomics. **PLoS Biology**, v. 1, n. 2, p. 156–160, 2003.
- HECTOR, R. E. et al. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism requires gluconeogenesis and the oxidative branch of the pentose phosphate pathway for aerobic xylose assimilation. **Yeast**, v. 28, n. 9, p. 645–660, set. 2011.
- HEPTINSTALL, J.; RAPLEY, R. Spectrophotometric Analysis of Nucleic Acids. **RAPLEY, R. The nucleic acid protocols handbook**, n. 1, p. 57–60, 2000.
- HO, P. W. et al. The sole introduction of two single-point mutations establishes glycerol utilization in *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK derivatives. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–15, 2017.
- IBEAS, J. I.; JIMENEZ, J. Mitochondrial DNA Loss Caused by Ethanol in *Saccharomyces Flor* Yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 7–12, 1997.
- IDA, Y. et al. Utilization of *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain incapable of both ethanol and glycerol biosynthesis for anaerobic bioproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 11, p. 4811–4819, 2013.
- JANSEN, M. L. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 5, p. 1–20, 2017.
- JEFFRIES, T. W.; JIN, Y. S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 5, p. 495–509, 2004.
- JO, S. et al. Microaerobic conversion of xylose to ethanol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SX6 MUT expressing cofactor-balanced xylose metabolic enzymes and deficient in ALD6. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 72–78, 2016.
- JOHN, R. P. et al. Bioresource Technology Micro and macroalgal biomass : A renewable source for bioethanol. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 1, p. 186–193, 2011.
- JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. Ethanol and the fluidity of the yeast plasma membrane.

Yeast, v. 3, n. 4, p. 223–232, 1987.

JÖNSSON, L. J.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. O. Bioconversion of lignocellulose: Inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2013.

KOPPRAM, R.; ALBERS, E.; OLSSON, L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, p. 1–12, 2012.

KÖTTER, P. et al. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylytol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current Genetics**, v. 18, n. 6, p. 493–500, 1990.

KUBOTA, S. et al. Effect of Ethanol on Cell Growth of Budding Yeast: Genes That Are Important for Cell Growth in the Presence of Ethanol. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 968–972, 22 jan. 2004.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, 2017.

KUMAR, A.; SINGH, L. K.; GHOSH, S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 13, p. 3293–3297, 2009.

KUTYNA, D. R. et al. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 3, p. 1175–1184, 2012.

KWAK, S.; JIN, Y. S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: A review and perspective. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

LAM, F. H. et al. Engineering alcohol tolerance in yeast. **Science**, v. 346, n. 6205, p. 71–75, 2014.

LARSSON, K.; ANSELL, R.; ERIKSSON, P. **A gene encoding sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD ^) complements an osmosensitive mutant of Saccharomyces cerevisiae.** [s.l: s.n.].

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5708–5716, 2012.

LEE, S. M.; JELLISON, T.; ALPER, H. S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–8, 2014.

LI, H. et al. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 3, n. 1, p. 51, 2016.

LI, Y. C. et al. Transcriptome changes in adaptive evolution of xylose-fermenting industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains with δ -integration of different *xylA* genes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 20, p. 7741–7753, 2017.

MA, T. Y. et al. An improved method of xylose utilization by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 10, p. 1477–1486, 2012.

MAIORELLA, B.; BLANCH, H. W.; WILKE, C. R. By-product inhibition effects on ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 25, n. 1, p. 103–21, 1983.

MANS, R.; DARAN, J. M. G.; PRONK, J. T. Under pressure: evolutionary engineering of yeast strains for improved performance in fuels and chemicals production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 47–56, 2018.

MEIJNEN, J.-P. et al. Polygenic analysis and targeted improvement of the complex trait of high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**,

v. 9, n. 1, p. 5, 6 dez. 2016.

MILESSI, T. S. et al. Biomass and Bioenergy Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, n. March, p. 277–283, 2018.

MILESSI, T. S. S. **Produção de Etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2017.

MILESSI, T. S. S. et al. Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioethanol**, v. 1, p. 1–8, 2013.

MIZOGUCHI, H.; HARA, S. Permeability barrier of the Yeast Plasma Membrane induced by ethanol. **Journal of fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 1, p. 25–29, 1998.

MOHAGHEGHI, A. et al. Improving a recombinant *Zymomonas mobilis* strain 8b through continuous adaptation on dilute acid pretreated corn stover hydrolysate. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2015.

MOHAMED, E. T. et al. Generation of a platform strain for ionic liquid tolerance using adaptive laboratory evolution. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.

MOON, M. H. et al. Enhancement of stress tolerance and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by heterologous expression of a trehalose biosynthetic gene from *Streptomyces albus*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 17, n. 5, p. 986–996, 2012.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. v. 96, p. 673–686, 2005.

MUNDHADA, H. et al. Increased production of L-serine in *Escherichia coli* through Adaptive Laboratory Evolution. **Metabolic Engineering**, v. 39, n. October 2016, p. 141–150, 2017.

MUSSATTO, S. I. et al. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, v. 92, p. 763–768, 2012.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes : a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1–10, 2004.

NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in “rapid fermentation”. **Applied and environmental microbiology**, v. 31, n. 2, p. 158–62, 1976.

ONUBR. **Conferência das nações unidas sobre mudança climática**. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/cop21/>>. Acesso em: 11 jan. 2019.

ÖZDENKÇI, K. et al. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. 2017.

PAIS, T. M. et al. Comparative Polygenic Analysis of Maximal Ethanol Accumulation Capacity and Tolerance to High Ethanol Levels of Cell Proliferation in Yeast. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 6, p. e1003548, 6 jun. 2013.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69–80, 2000.

PASHA, C.; KUHAD, R. C.; RAO, L. V. Strain improvement of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS3 strain for better utilization of lignocellulosic substrates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, n. 5, p. 1480–1489, 2007.

PORTNOY, V. A.; BEZDAN, D.; ZENGLER, K. Adaptive laboratory evolution — harnessing the power of biology for metabolic engineering. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 4, p. 590–594, 2011.

QIN, D. et al. An auto-inducible *Escherichia coli* strain obtained by adaptive laboratory evolution for fatty acid synthesis from ionic liquid-treated bamboo hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 375–384, 2016.

QURESHI, A. S.; ZHANG, J.; BAO, J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Bioresource Technology**, v. 189, p. 399–404, 2015.

RABELO, S. C. et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pretreated with lime and alkaline hydrogen peroxide. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 7, p. 2600–2607, 2011.

RADECKA, D. et al. Looking beyond *Saccharomyces*: The potential of non-conventional yeast species for desirable traits in bioethanol fermentation. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. 1–13, 2015.

RAELE, R. et al. Scenarios for the second generation ethanol in Brazil. **Technological Forecasting and Social Change**, v. 87, p. 205–223, 2014.

ROCHA, M. S. R. DOS S. et al. Bioresource Technology A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 176–185, 2017.

RUBIN, E. M. et al. Biomass Recalcitrance : **Nature**, v. 454, n. February, p. 804–807, 2007.

SÀNCHEZ NOGUÉ, V.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 4, p. 761–772, 2015.

SANTOS, F. A. et al. Revisão. **Quim. Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

SARKAR, N. et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, n. 1, p. 19–27, 2012.

SAUER, U. Evolutionary Engineering of Industrially Important Microbial Phenotypes. In: [s.l.: s.n.]. v. 73p. 129–169.

SHEN, Y. et al. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 4, p. 1079–1091, 2012.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2^a ed. [s.l.] Upper Saddle River. Prentice – Hall, 2002.

SILVA, C. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1999.

SMITH, J.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. **BMC Biotechnology**, v. 14, p. 1–17, 2014.

SONDEREGGER, M.; SAUER, U. Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1990–1998, 2003.

STANLEY, D. et al. Generation and characterisation of stable ethanol-tolerant mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 139–149, 2010.

STEPHANOPOULOS, G.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. **Metabolic Engineering: Principles and Methodologies**. 1. ed. [s.l.: s.n.].

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production : a review q. v. 83, p. 1–11, 2002.

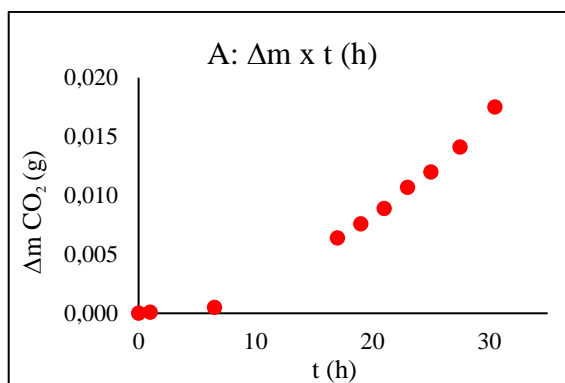
- THOMAS, D. S.; HOSSACK, J. A.; ROSE, A. H. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 117, p. 239–245, 1978.
- VAN MARIS, A. J. A. et al. Development of Efficient Xylose Fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*: Xylose Isomerase as a Key Component. In: [s.l.: s.n.]. p. 179–204.
- VERDUYN, C. et al. Energetics of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic glucose-limited chemostat cultures. **Journal of General Microbiology**, v. 136, p. 405–412, 1990.
- WANG, S.; SUN, X.; YUAN, Q. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. **Bioresource Technology**, v. 258, n. March, p. 302–309, 2018.
- WANG, X. et al. Tolerance improvement of *Corynebacterium glutamicum* on lignocellulose derived inhibitors by adaptive evolution. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 377–388, 2018.
- WANG, Y. et al. Adaptive evolution of nontransgenic *Escherichia coli* KC01 for improved ethanol tolerance and homoethanol fermentation from xylose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1371–1377, 2011.
- WI, S. G. et al. Lignocellulose conversion for biofuel: A new pretreatment greatly improves downstream biocatalytic hydrolysis of various lignocellulosic materials. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.
- WRIGHT, J. et al. Batch and continuous culture-based selection strategies for acetic acid tolerance in xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 11, n. 3, p. 299–306, 2011.
- YANG, Y. et al. Progress and perspective on lignocellulosic hydrolysate inhibitor tolerance improvement in *Zymomonas mobilis*. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 6, 2018.
- YOU, K. M.; ROSENFELD, C.; KNIPPLE, D. C. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1499, 2003.
- ZAMPIERI, D. **Expressão gênica e atividades de celulases, β -glicosidases, xilanases e swoleninas de *Penicillium echinulatum* S1M29**. [s.l.] Universidade de Caxias do Sul, 2015.
- ZHANG, T. et al. Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp. W0. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8166–8170, 2010.
- ZHANG, W.; GENG, A. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. **Biotechnology for Biofuels**, v. 5, n. 1, p. 46, 2012.
- ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367–375, 2008.
- ZHAO, X. et al. The fate of lignin during atmospheric acetic acid pretreatment of sugarcane bagasse and the impacts on cellulose enzymatic hydrolyzability for bioethanol production. **Renewable Energy**, v. 128, p. 200–209, 2018.
- ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 465–482, 2012.
- ZHENG, D.-Q. et al. Drug resistance marker-aided genome shuffling to improve acetic acid tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 38, p. 415–422, 2011.

8 Anexos

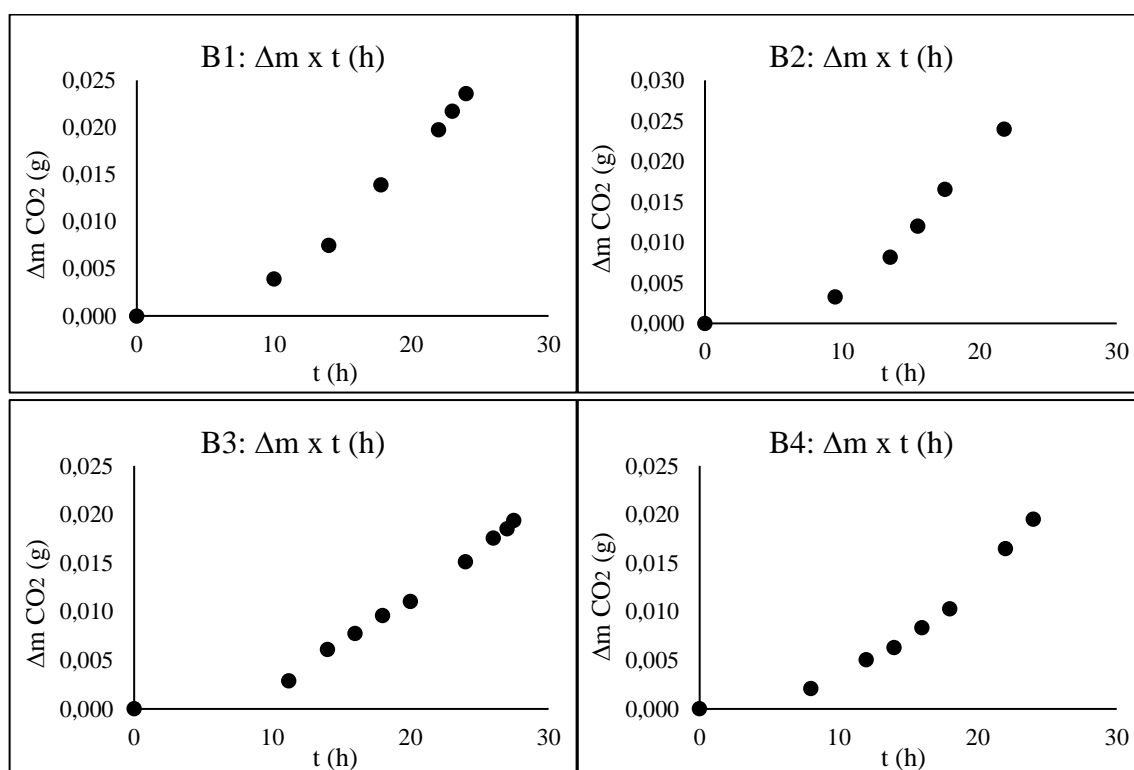
8.1 Anexo A

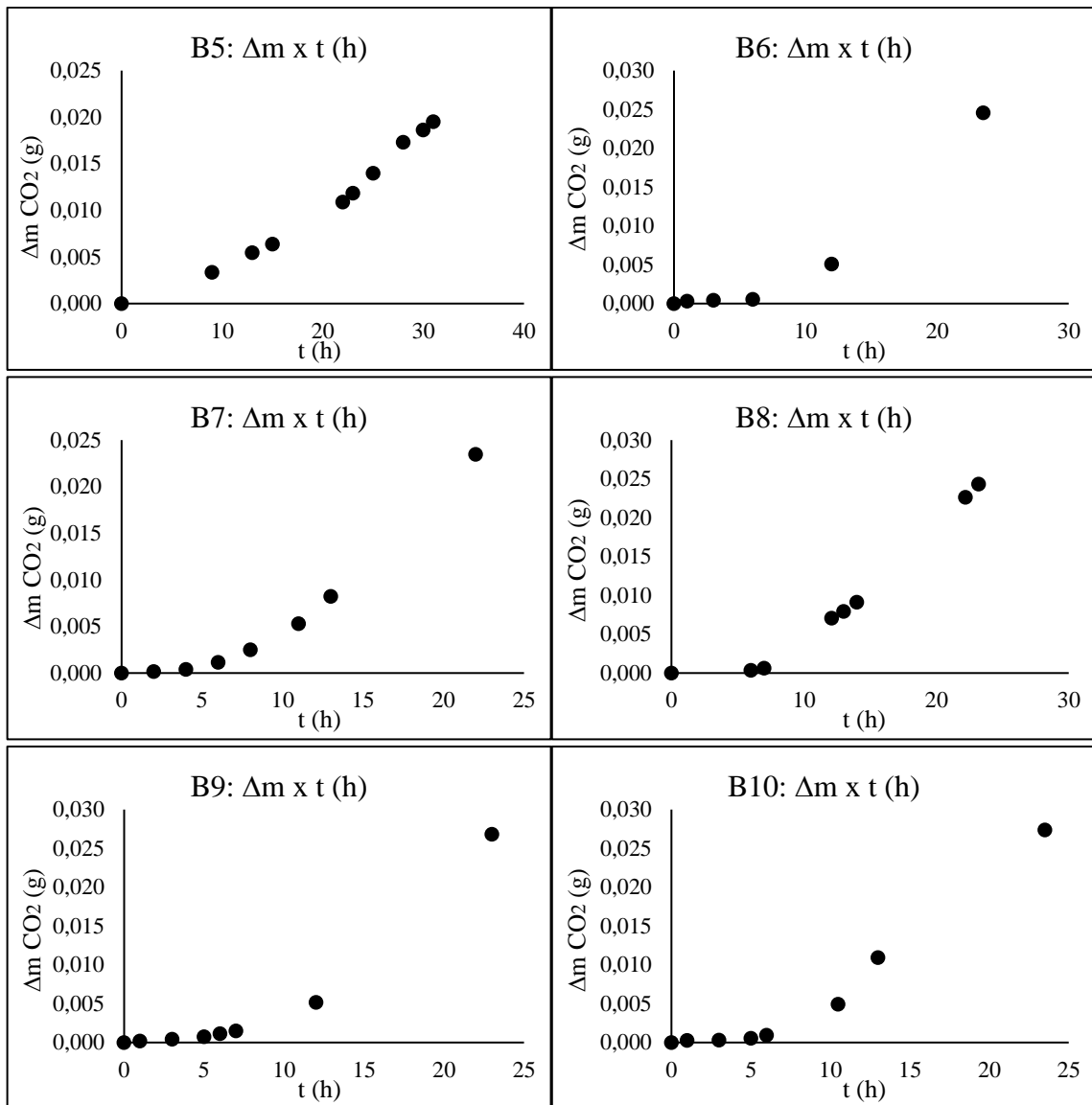
8.1.1 Gráficos de variação de massa de CO₂ versus tempo de cultivo (h) para os experimentos de evolução adaptativa.

Condição A:

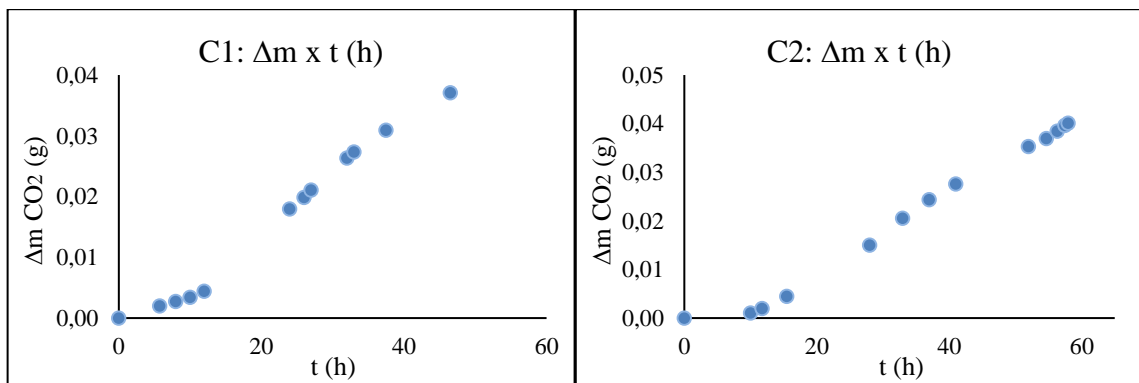


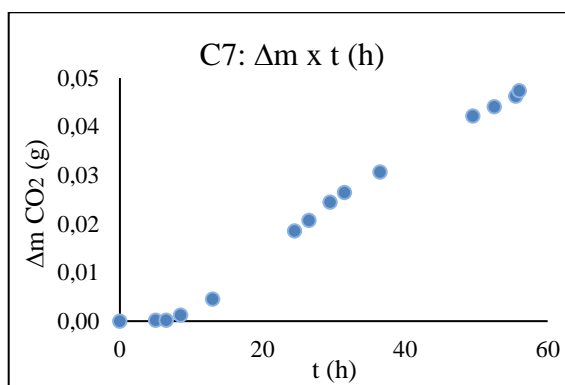
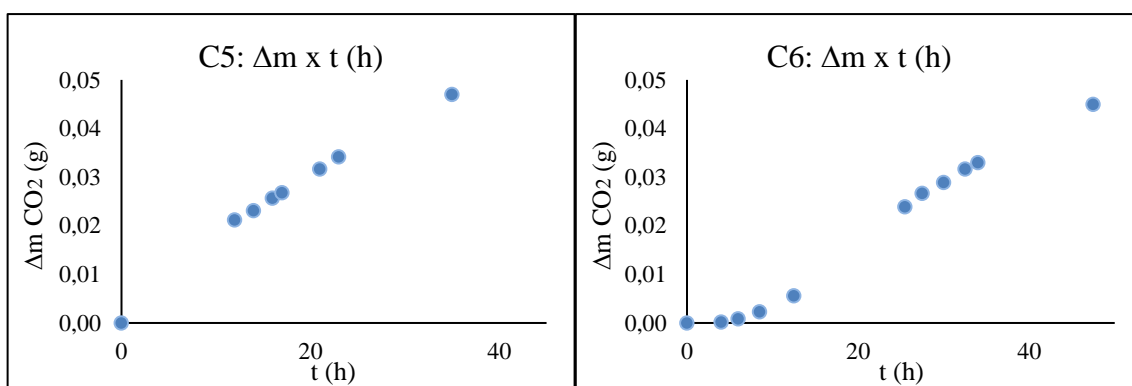
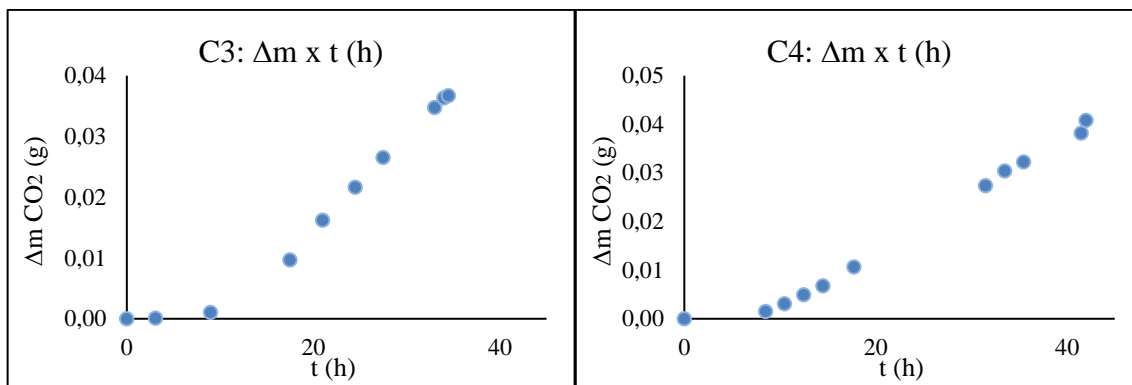
Condição B:



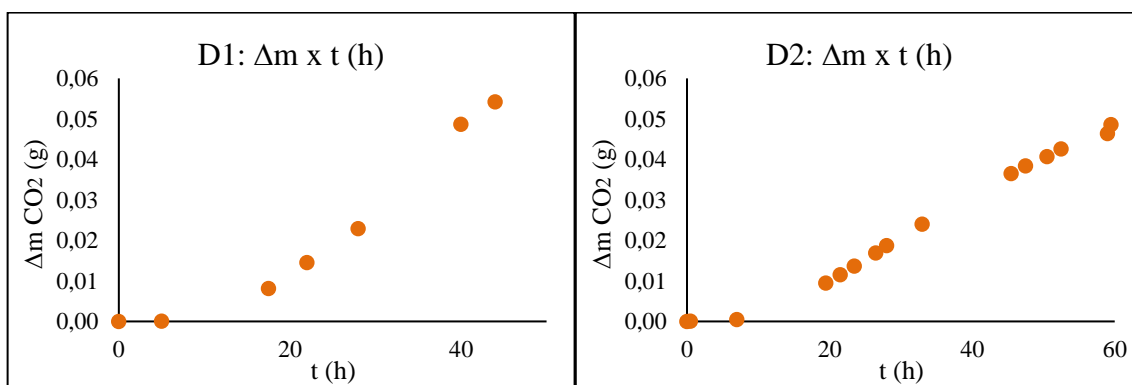


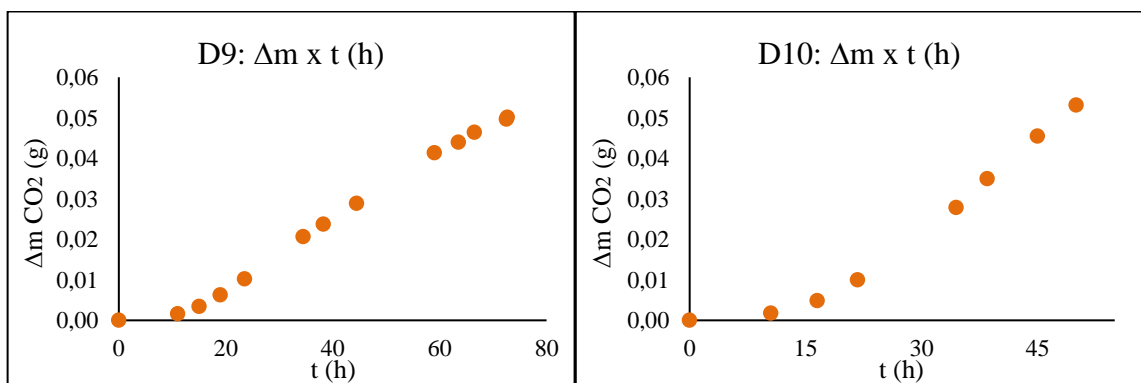
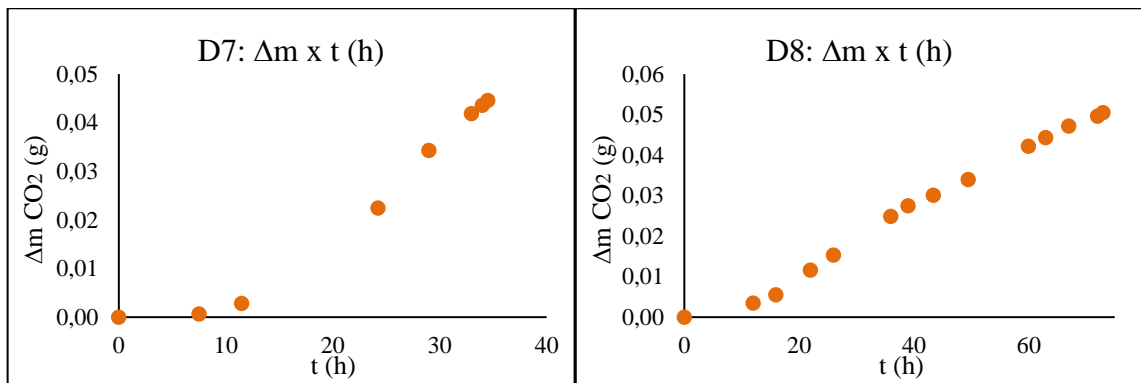
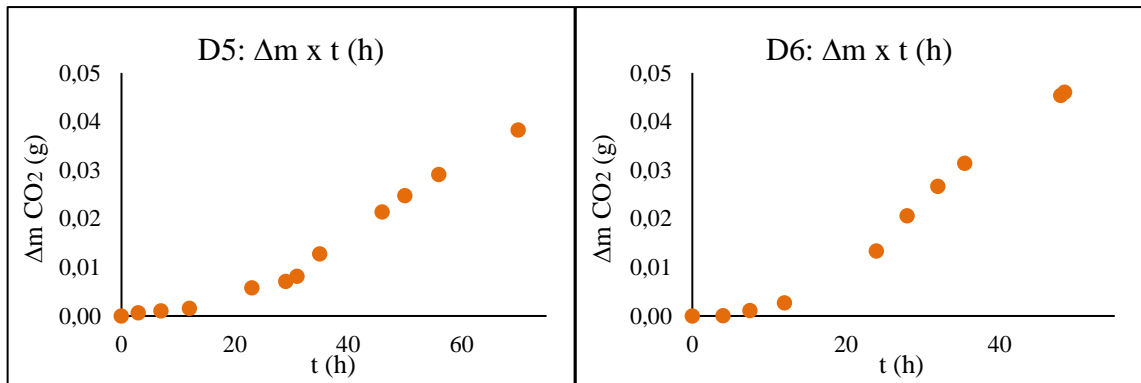
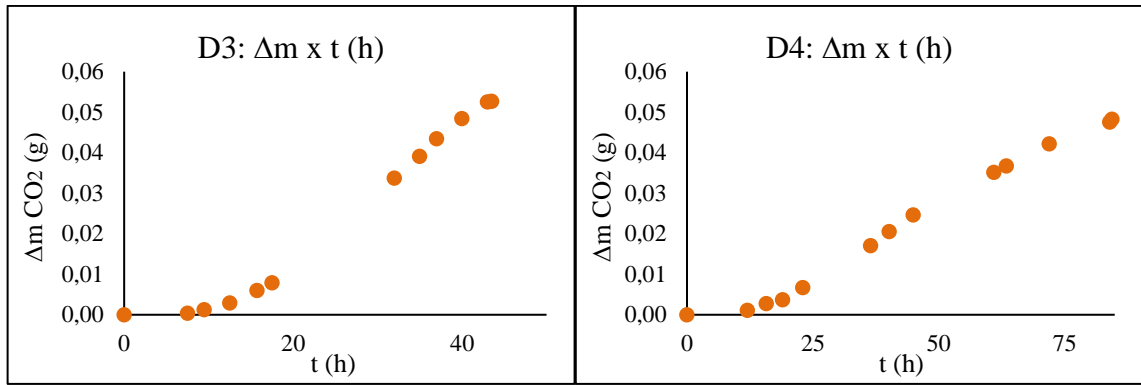
Condição C:



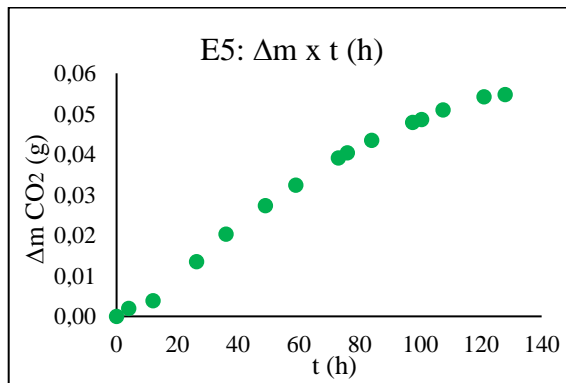
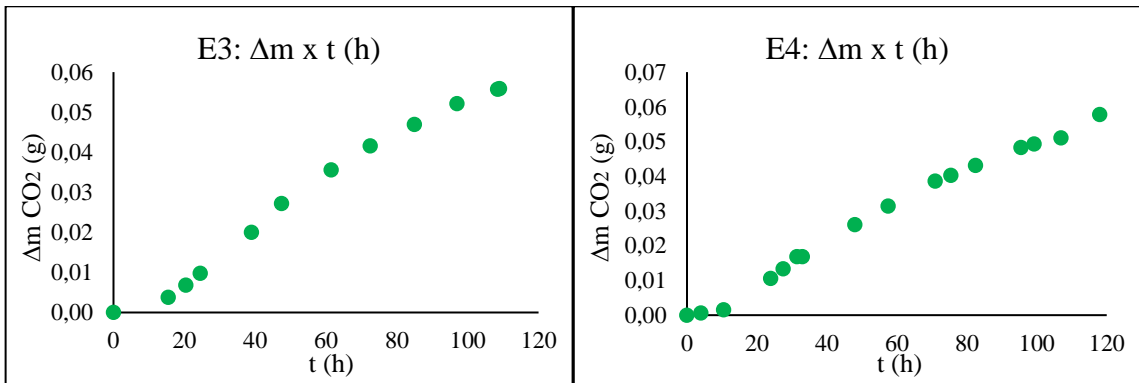
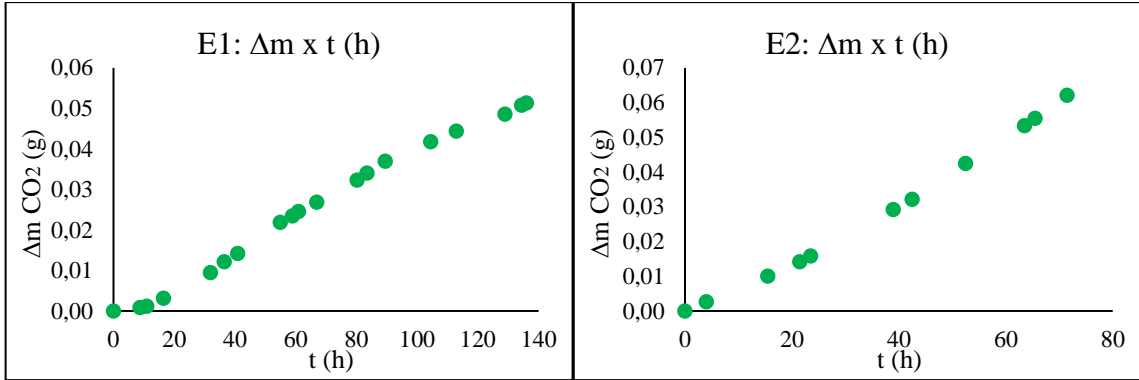


Condição D:

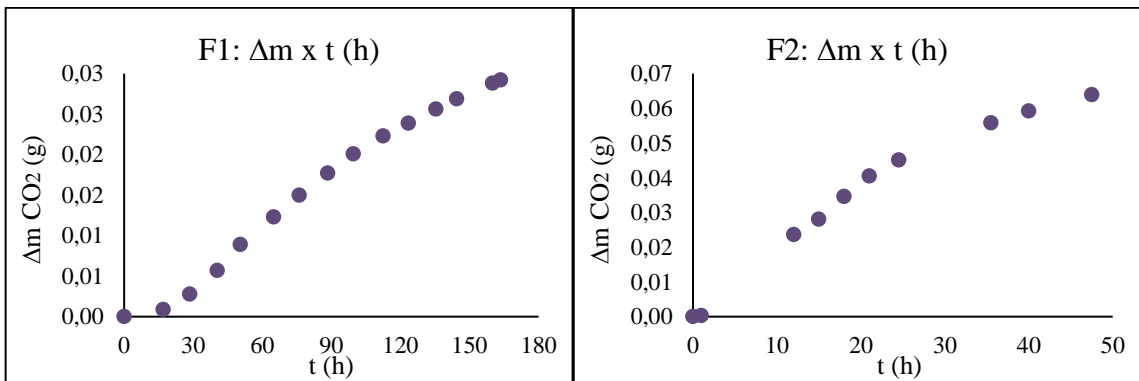


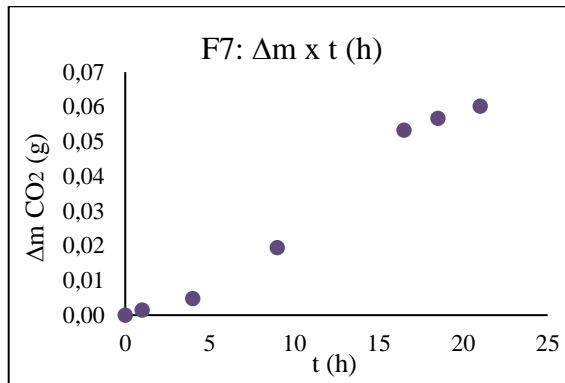
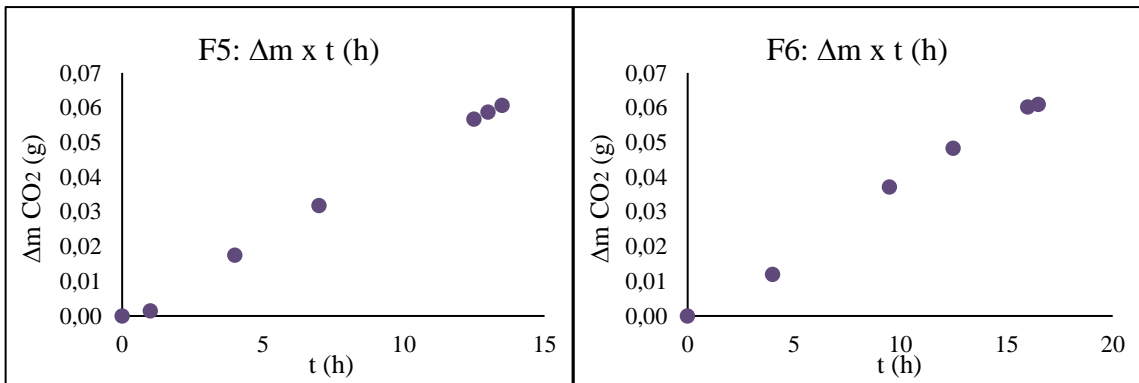
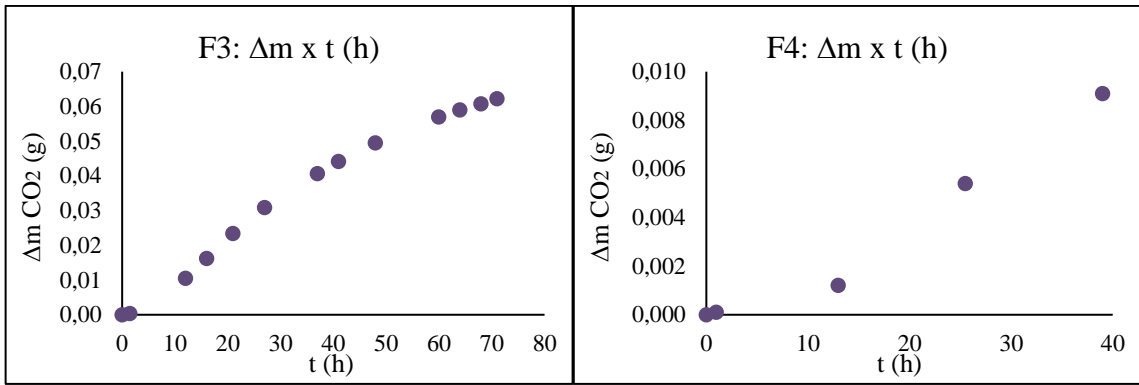


Condição E:

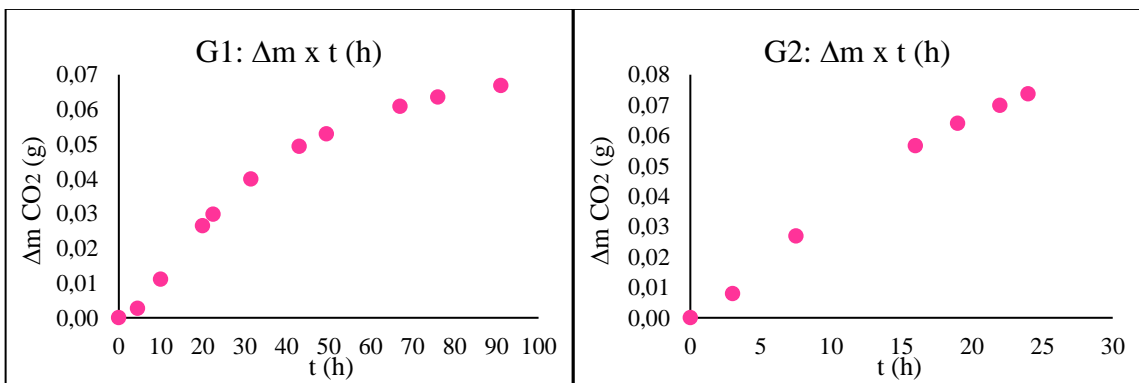


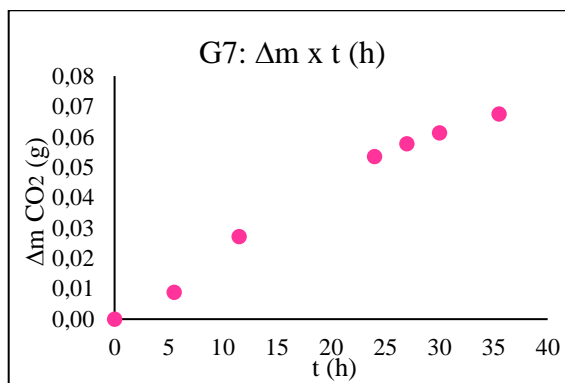
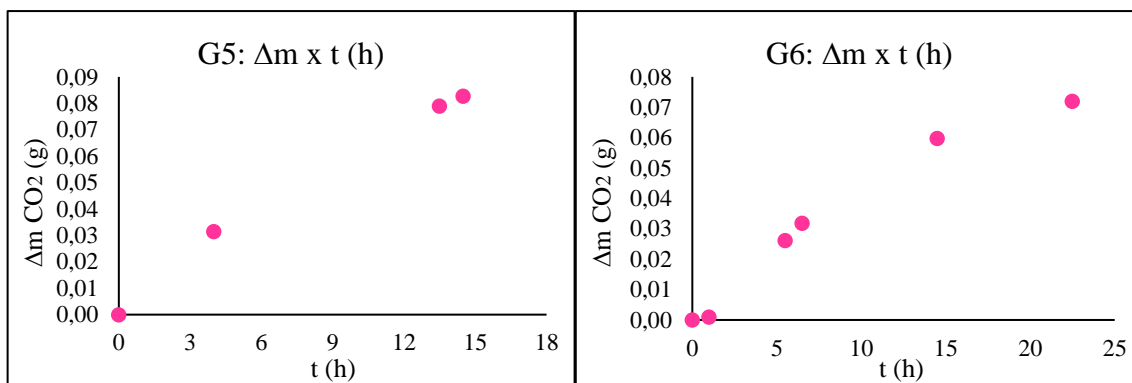
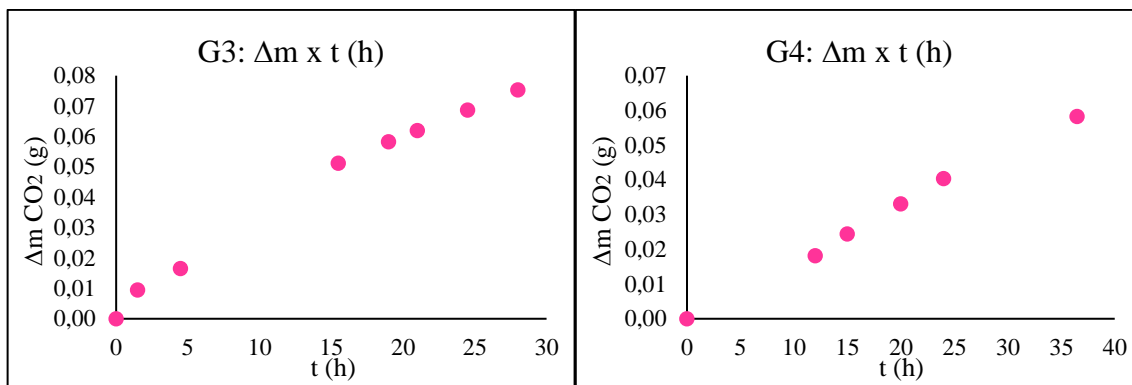
Condição F:



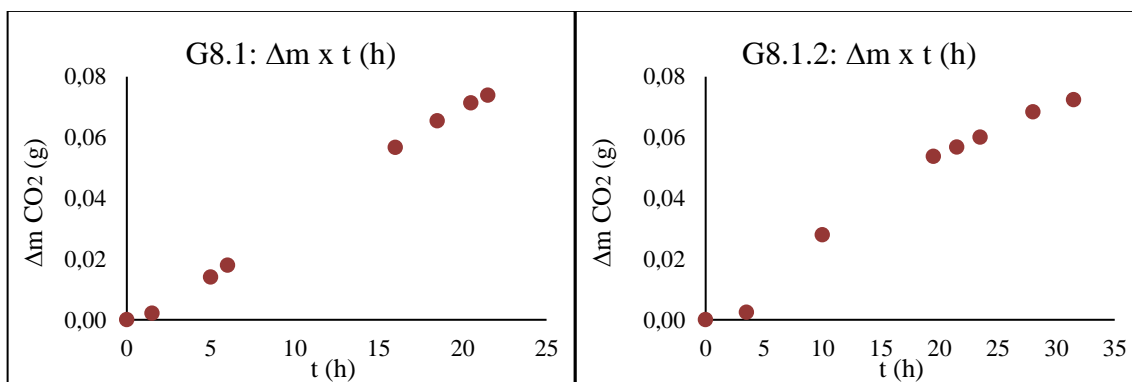


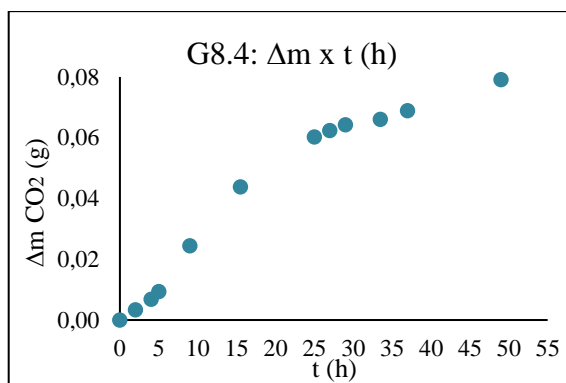
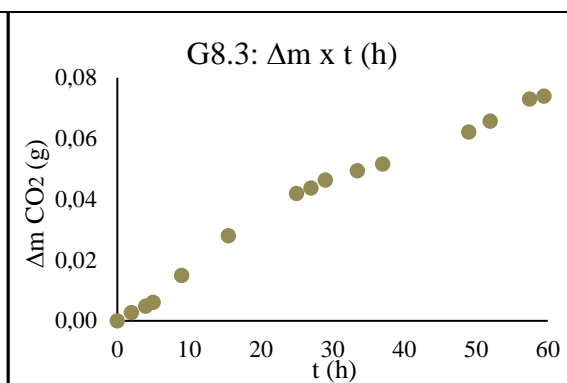
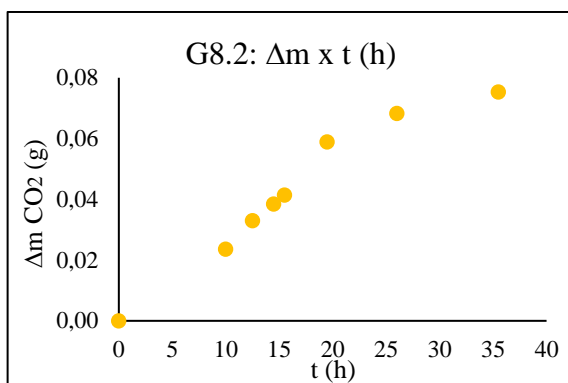
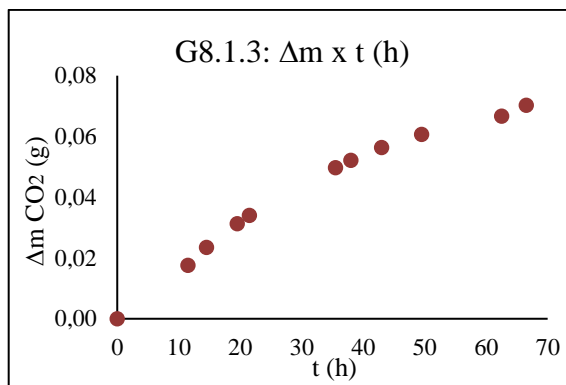
Condição G:



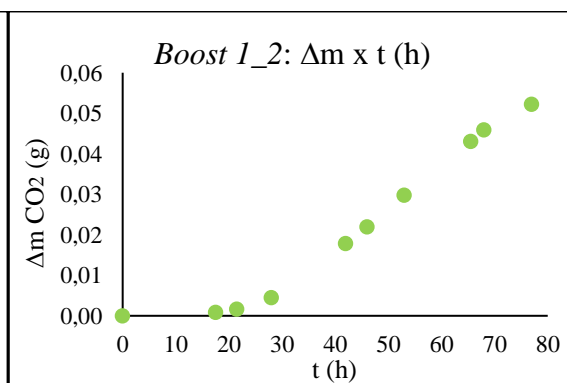
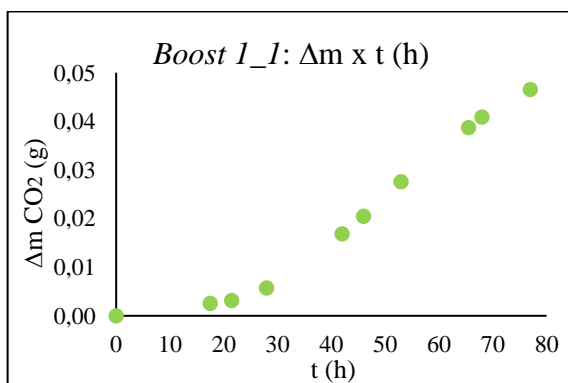


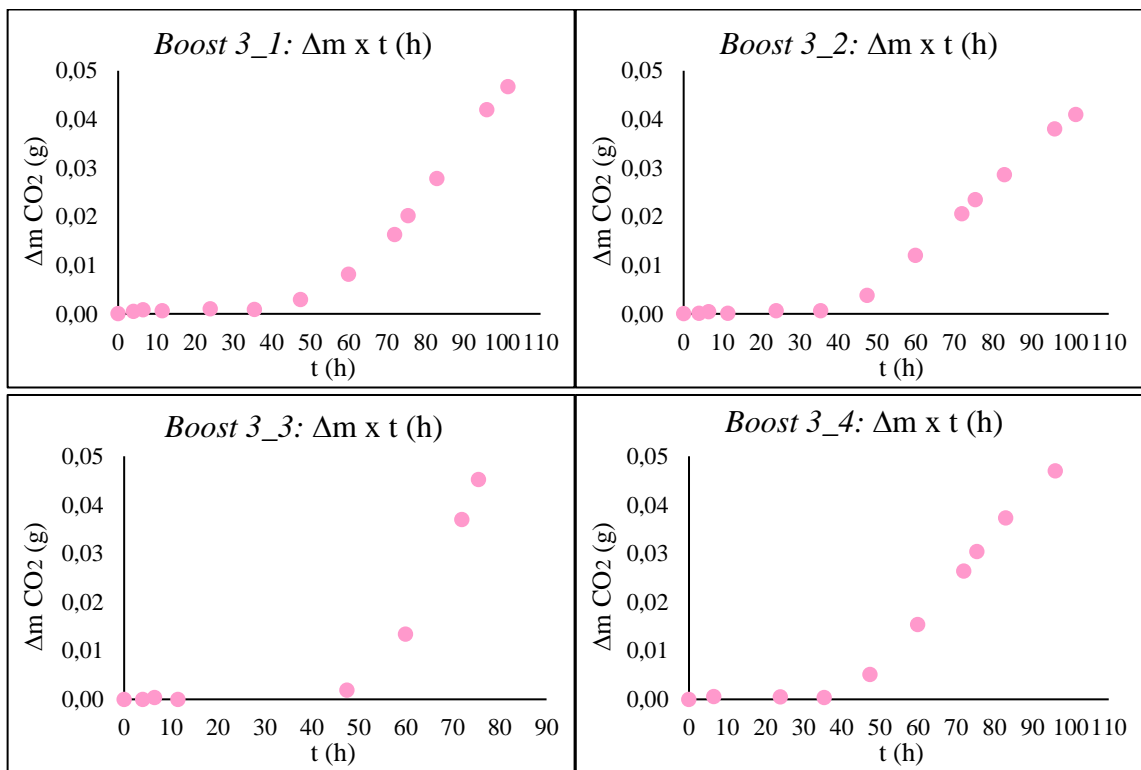
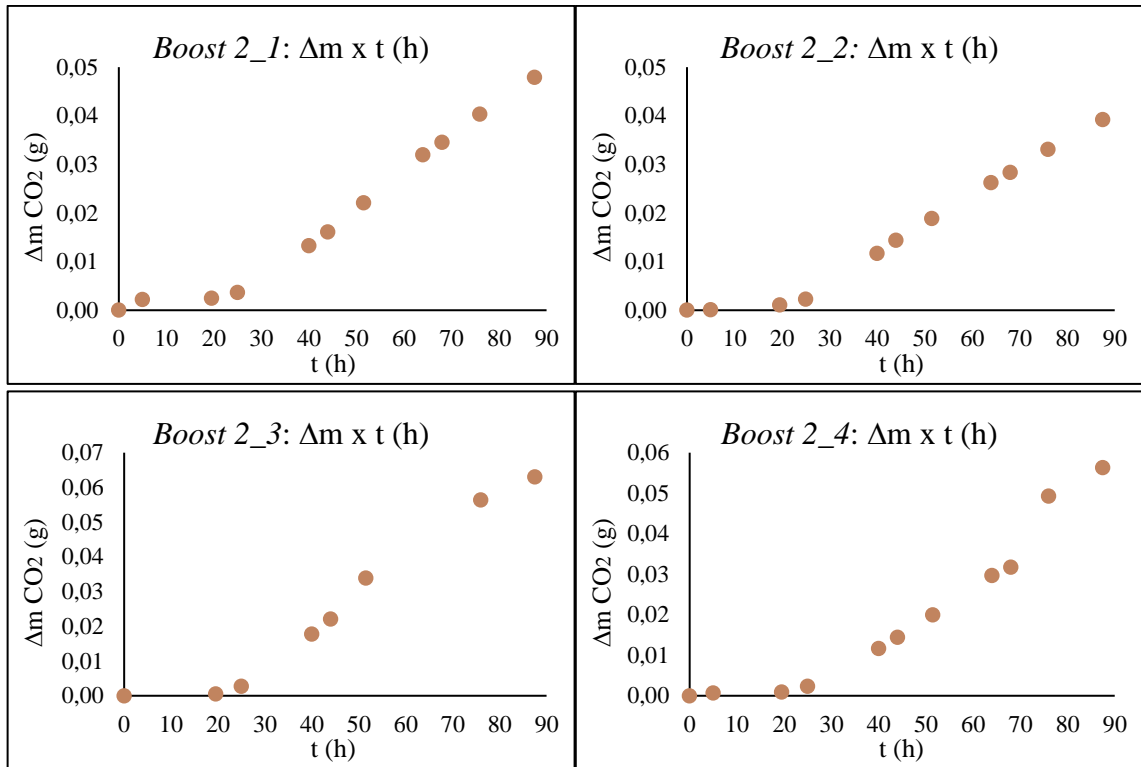
Seleção de melhor colônia - Condição G:

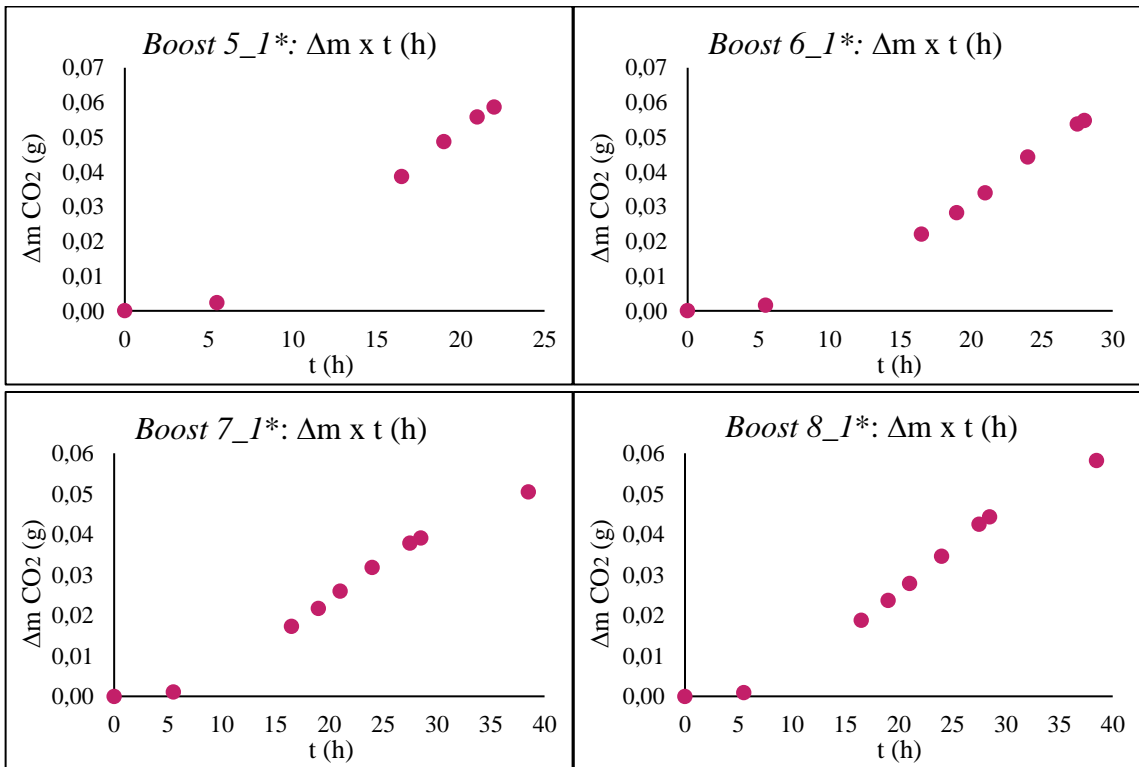
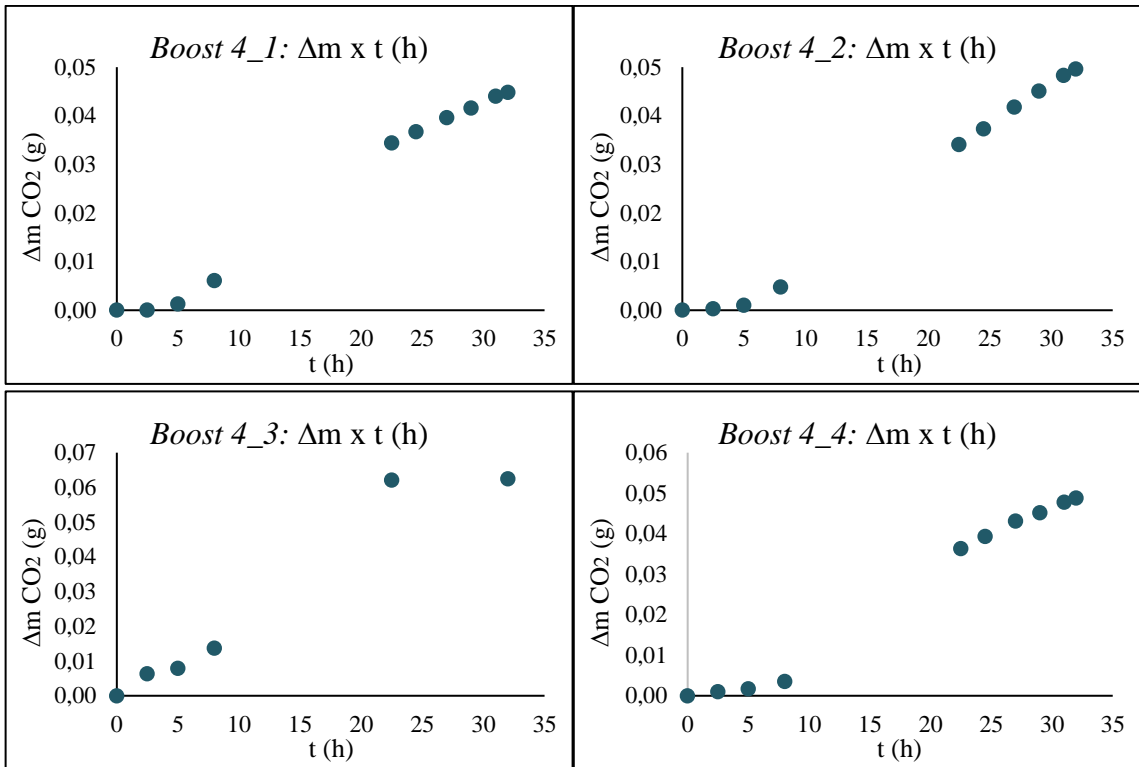




Estratégia Boost:







8.2 Anexo B

8.2.1 Tabelas

Tabela 16. Velocidade de crescimento e número de geração para cada batelada sucessiva.

Condição	μ_c (h ⁻¹)	Erro	t geração	N° de gerações	Σ N° de gerações
A1	0,1705	0,0088	4,066	5,164	5,164
B1	0,2340	0,0299	2,962	6,078	11,242
B2	0,2231	0,0141	3,107	5,632	16,873
B3	0,2160	0,0122	3,209	4,985	21,859
B4	0,2358	0,0201	2,939	5,444	27,303
B5	0,2213	0,0198	3,132	4,790	32,093
B6	0,2302	0,0191	3,011	4,983	37,075
B7	0,2610	0,0111	2,655	4,896	41,971
B8	0,2432	0,0120	2,850	4,913	46,883
B9	0,2227	0,0094	3,113	3,855	50,738
B10	0,2625	0,0113	2,641	4,922	55,661
C1	0,2037	0,0154	3,402	3,527	59,188
C2	0,1069	0,0108	6,483	5,090	64,278
C3	0,1625	0,0114	4,265	5,744	70,023
C4	0,1765	0,0095	3,927	4,584	74,606
C5	0,2212	0,0000	3,134	4,467	79,073
C6	0,2317	0,0140	2,992	4,178	83,251
C7	0,2378	0,0066	2,915	4,459	87,710
D1	0,1405	0,0067	4,935	4,458	92,168
D2	0,1365	0,0076	5,077	4,629	96,797
D3	0,1463	0,0048	4,737	3,695	100,491
D4	0,0844	0,0073	8,212	4,895	105,386
D5	0,0688	0,0023	10,073	3,475	108,861
D6	0,1124	0,0079	6,166	5,190	114,051
D7	0,1473	0,0130	4,707	5,152	119,203
D8	0,1221	0,0122	5,679	4,579	123,782
D9	0,1227	0,0039	5,647	4,427	128,209
D10	0,1276	0,0019	5,432	4,050	132,259
E1	0,0799	0,0037	8,676	4,207	136,465
E2	0,0675	0,0097	10,274	2,287	138,753

Tabela 16 cont. Velocidade de crescimento e número de geração para cada batelada sucessiva.

Condição	μ_c (h ⁻¹)	Erro	t geração	N° de gerações	Σ N° de gerações
E3	0,0291	0,0018	23,835	1,993	140,746
E4	0,0385	0,0013	18,005	1,833	142,578
E5	0,0266	0,0025	26,016	1,883	144,462
F1	0,0346	0,0019	20,031	2,521	146,983
Boost 1_1	0,0451	0,0014	15,357	3,451	150,434
Boost 1_2	0,0577	0,0037	12,006	3,498	153,933
F2	0,0285	0,0019	24,333	1,007	154,939
F3	0,0189	0,0020	36,765	1,006	155,946
F4	0,0207	0,0004	33,408	1,167	157,113
Boost 2_1	0,0339	0,0026	20,472	2,516	159,629
Boost 2_2	0,0463	0,0039	14,975	2,671	162,300
Boost 2_3	0,0526	0,0034	13,181	2,655	164,955
Boost 2_4	0,0428	0,0025	16,180	2,781	167,736
F5	0,0386	0,0039	17,976	0,556	168,293
F6	0,0398	0,0052	17,426	0,717	169,010
F7	0,0319	0,0021	21,706	0,783	169,793
G1	0,0268	0,0016	25,897	1,216	171,010
Boost 3_1	0,0325	0,0028	21,358	2,809	173,819
Boost 3_2	0,0472	0,0042	14,686	2,724	176,543
Boost 3_3	0,0574	0,0039	12,085	3,310	179,852
Boost 3_4	0,0459	0,0043	15,096	2,650	182,502
G2	0,0297	0,0021	23,327	0,429	182,931
G3	0,0136	0,0012	50,841	0,472	183,403
G4	0,0191	0,0022	36,352	0,660	184,063
Boost 4_1	0,0648	0,0047	10,704	2,289	186,352
Boost 4_2	0,0642	0,0035	10,792	2,270	188,622
Boost 4_3	0,0574	0,0095	12,078	1,863	190,485
Boost 4_4	0,0646	0,0031	10,733	2,096	192,581
G5	0,0381	0,0000	18,193	0,550	193,131
G6	0,0507	0,0030	13,668	0,512	193,643
G7	0,0274	0,0013	25,315	0,474	194,117

Tabela 16 cont. Velocidade de crescimento e número de geração para cada batelada sucessiva.

Condição	μ_c (h ⁻¹)	Erro	t geração	N° de gerações	Σ N° de gerações
<i>Boost 5_I*</i>	0,0727	0,0081	9,529	1,994	196,111
<i>Boost 6_I*</i>	0,0586	0,0042	11,838	2,027	198,139
<i>Boost 7_I*</i>	0,0557	0,0041	12,452	1,927	200,066
<i>Boost 8_I*</i>	0,0507	0,0043	13,676	1,755	201,821
G 8.1	0,0381	0,0047	18,171	1,018	202,839
G8.1.2	0,0349	0,0026	19,838	1,084	203,923
G8.1.3	0,0279	0,0026	24,887	0,864	204,787
G8.2	0,0396	0,0025	17,502	0,886	205,672
G8.3	0,0397	0,0018	17,472	0,887	206,559
G8.4	0,0354	0,0025	19,601	0,791	207,350
TOTAL DE GERAÇÕES				207,35	

Tabela 17. Viabilidade, concentração celular (número de células.mL⁻¹) e referentes desvios padrão para cada condição de evolução adaptativa.

Condição	Viabilidade (%)	Desvio padrão	N° células totais. mL ⁻¹	Desvio padrão	N° células viáveis. mL ⁻¹	Desvio padrão
A1	96,25	7,06	2,67E+07	4,27E+05	2,58E+07	4,12E+05
B1	96,49	7,45	1,90E+07	1,61E+05	1,83E+07	1,63E+05
B2	-	-	-	-	-	-
B3	96,20	6,82	2,63E+07	4,12E+05	2,53E+07	4,15E+05
B4	94,12	12,78	1,13E+07	2,64E+05	1,07E+07	2,69E+05
B5	93,41	3,37	3,03E+07	5,19E+05	2,83E+07	4,67E+05
B6	99,39	1,44	5,43E+07	3,90E+05	5,40E+07	3,96E+05
B7	99,50	1,40	6,70E+07	5,21E+05	6,68E+07	5,39E+05
B8	100,00	0,00	3,60E+07	1,92E+05	3,60E+07	1,92E+05
B9	100,00	0,00	2,63E+07	4,12E+05	2,63E+07	4,12E+05
B10	98,61	2,24	2,40E+07	5,09E+05	2,37E+07	4,97E+05
C1	96,23	8,69	1,77E+07	2,69E+05	1,70E+07	2,76E+05
C2	91,49	9,11	1,57E+07	2,34E+05	1,43E+07	2,29E+05
C3	98,82	2,03	2,83E+07	3,59E+05	2,80E+07	3,44E+05
C4	97,30	3,65	2,47E+07	1,97E+05	2,40E+07	1,98E+05
C5	100,00	0,00	1,77E+07	1,30E+05	1,77E+07	1,30E+05

Tabela 17 cont. Viabilidade, concentração celular (número de células.mL⁻¹) e referentes desvios padrão para cada condição de evolução adaptativa.

Condição	Viabilidade (%)	Desvio padrão	Nº células totais. mL⁻¹	Desvio padrão	Nº células viáveis. mL⁻¹	Desvio padrão
C6	95,46	3,76	2,20E+07	5,58E+04	2,10E+07	5,96E+04
C7	97,87	3,19	1,57E+07	2,03E+05	1,53E+07	1,79E+05
D1	98,68	2,98	2,53E+07	2,76E+05	2,50E+07	2,79E+05
D2	-	-	-	-	-	-
D3	96,15	4,26	1,73E+07	4,15E+05	1,67E+07	3,59E+05
D4	92,96	5,37	4,27E+07	1,51E+05	1,98E+07	1,92E+05
D5	95,00	14,43	1,33E+07	2,36E+05	1,27E+07	2,43E+05
D6	96,51	6,19	1,23E+07	1,95E+05	1,19E+07	1,92E+05
D7	100,00	0,00	1,29E+07	3,50E+04	1,29E+07	3,50E+04
D8	95,39	5,54	9,29E+06	1,23E+05	8,85E+06	1,29E+05
D9	95,79	5,84	1,36E+07	1,54E+05	1,30E+07	1,70E+05
D10	97,02	4,48	1,91E+07	1,80E+05	1,86E+07	1,65E+05
E1	97,26	4,07	1,04E+07	1,56E+05	1,02E+07	1,38E+05
E2	90,52	7,84	1,66E+07	1,60E+05	1,50E+07	1,62E+05
E3	94,81	3,67	1,93E+07	2,89E+05	1,83E+07	2,78E+05
E4	94,81	4,68	2,02E+07	2,55E+05	1,89E+07	2,62E+05
E5	93,73	2,48	5,78E+07	1,48E+05	2,73E+07	2,15E+05
F1	78,48	17,70	9,88E+06	5,97E+04	7,75E+06	1,02E+05
F2	96,49	1,55	7,48E+07	1,42E+05	7,23E+07	1,61E+05
F3	94,81	3,67	3,85E+07	5,77E+05	3,65E+07	5,56E+05
F4	-	-	-	-	-	-
F5	97,97	0,99	1,48E+08	5,44E+05	1,45E+08	541602,6
F6	-	-	-	-	-	-
F7	99,03	1,94	5,15E+07	2,30E+05	5,10E+07	2,07E+05
G1	71,93	18,83	4,11E+07	6,95E+05	3,08E+07	6,40E+05
G2	96,91	3,73	4,85E+07	7,57E+05	4,70E+07	7,40E+05
G3	94,02	4,92	1,17E+08	8,17E+05	1,10E+08	7,48E+05
G4	87,68	2,14	6,90E+07	4,51E+05	6,05E+07	3,83E+05
G5	97,44	1,96	1,76E+08	1,15E+06	1,71E+08	1,01E+06
G6	80,72	7,78	4,15E+07	8,17E+05	3,35E+07	7,13E+05
G7	91,40	2,32	4,65E+07	3,36E+05	4,25E+07	3,08E+05

Tabela 17 cont. Viabilidade, concentração celular (número de células.mL⁻¹) e referentes desvios padrão para cada condição de evolução adaptativa.

Condição	Viabilidade (%)	Desvio padrão	Nº células totais. mL⁻¹	Desvio padrão	Nº células viáveis. mL⁻¹	Desvio padrão
G8.1	99,55	1,12	1,12E+08	1,13E+06	1,12E+08	1,15E+06
G8.1.2	98,53	2,19	7,56E+07	6,78E+05	7,45E+07	6,73E+05
G8.1.3	81,82	7,54	6,88E+07	7,40E+05	5,63E+07	5,59E+05
G8.2	95,56	3,08	6,75E+07	5,74E+05	6,45E+07	5,26E+05
G8.3	80,56	4,49	3,60E+07	4,56E+05	2,90E+07	3,91E+05
G8.4	87,34	3,59	1,27E+08	1,22E+06	1,11E+08	9,20E+05