

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

CAROLINE LOPES PEREZ

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM REATOR DE
LEITO FIXO E POR BIOPROCESSAMENTO
CONSOLIDADO UTILIZANDO LEVEDURAS DE
ALTA PERFORMANCE**

SÃO CARLOS - SP

2021

CAROLINE LOPES PEREZ

**PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM REATOR DE LEITO FIXO E POR
BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO UTILIZANDO LEVEDURAS DE
ALTA PERFORMANCE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de Doutora em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

Co-orientadora: Profa. Dra. Thais Suzane Milessi

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Caroline Lopes Perez, realizada em 06/05/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (UFSCar)

Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves (UNIFEI)

Profa. Dra. Fernanda Marisa da Cunha (Purdue)

Prof. Dr. Edgard Valdomiro Charles Belo (Angel Yeast)

Profa. Dra. Fernanda Perpétua Casciotori (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Para meus pais, Renata e Danilo;

Minha irmã Rebeca

E minhas avós: Vó Lucia (*in memoriam*) e Vó Ignêz.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por me guiarem, protegerem e iluminarem meus caminhos.

À profa. Dra. Teresa Zangirolami, orientadora desta tese, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa, por todo conhecimento compartilhado, pelo apoio em todas as etapas deste trabalho, pela paciência e dedicação.

À profa. Dra. Thais Milessi, co-orientadora desta tese, pela confiança, pelo aprendizado, paciência e disponibilidade, e por todas as vezes que me ajudou com muita calma, sabedoria e rapidez.

Aos meus pais Danilo e Renata, pelo suporte e estímulo, pelo exemplo de esforço, honestidade e dedicação, e principalmente por estarem sempre presentes, me dando forças e acalmando meu coração.

À minha irmã Rebeca, por ser minha melhor amiga, por estar sempre comigo, me apoiando, incentivando, cuidando de mim e, principalmente, sendo meu exemplo e inspiração. Obrigada também por toda a parte de *design* das minhas apresentações.

Às minhas vovicas Maria Lúcia (*in memoriam*) e Maria Ignêz, pelas orações e ligações diárias, pelo carinho, amor e apoio. Essa saudade nunca vai passar.

Aos meus amigos de laboratório e da vida, Ju e Thiago, que foram meu ponto de apoio e aconchego e pela troca de conhecimento e discussões em que tanto aprendi. Também por toda a ajuda nos experimentos e análises de resultados. Levo vocês sempre comigo.

Aos meus amigos da UFSCar muito queridos: Taiseira, Monize, Manu, Edi, Lelê, Alan, Josi, Gui e tantos outros que serão sempre lembrados. Agradecimento especial ao Renato Guimarães do LabEnz, que me ajudou muito na parte final deste trabalho, à Laís que participou dos ensaios em Biorreator e à Bru Pratto por tantas informações valiosas compartilhadas.

Às minhas amigas de infância, Tata, Ci e Lau, pelo apoio e amizade ao longo de todos esses anos.

À minha amiga de muay que levo pra vida, Carolzita, que me acompanhou em muitos momentos dessa jornada.

Ao prof. Dr. Johan Thevelein por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na KU Leuven e me ter permitido trabalhar com uma levedura tão especial. Ao Gert pelo acolhimento dentro do laboratório e ao Arne pela paciência e colaboração.

Às minhas amigas da Bélgica, Nuria e Nati, por terem dividido comigo momentos de alegria e descontração.

Às técnicas e funcionários do DEQ, principalmente à Alyne, que me ajudou muito com o HPLC em especial na fase final deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGEQ-UFSCar) e aos órgãos financiadores Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2016/10.636-8).

“If you can dream it, you can do it”

Walt Disney

RESUMO

Para viabilizar a produção industrial de etanol de segunda geração (2G), o desenvolvimento de processos com alta produtividade utilizando hidrolisados de material lignocelulósico contendo elevada quantidade de inibidores, com redução na carga de enzima empregada devido ao seu impacto no custo total do processo, são alguns dos principais desafios a serem superados. Dessa forma, pesquisas em engenharia genética têm sido direcionadas para a obtenção de cepas de levedura mais resistentes aos inibidores presentes nos hidrolisados e ao etanol produzido, bem como de cepas com capacidade de produzir e secretar enzimas, além de fermentar pentoses e hexoses. A imobilização das células em alginato de cálcio contribui para protegê-las do efeito dos inibidores, além de permitir a utilização de elevadas densidades celulares, facilitar a recuperação dos produtos e a reutilização dos biocatalisadores. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de processo de produção de etanol 2G de alta produtividade a partir de hidrolisados de hemicelulose utilizando células de leveduras recombinantes de alta performance. Na primeira parte do trabalho, após a constatação de efeitos tóxicos e irreversíveis às células imobilizadas causadas pelo uso de meio fermentativo composto por hidrolisado de hemicelulose concentrado durante fermentação contínua, experimentos em mini-reatores revelaram o forte efeito sinérgico entre a alta carga de inibidores presentes no meio fermentativo e o etanol produzido durante a fermentação, associados ainda ao tempo de exposição e à linhagem da levedura utilizada. Os resultados direcionaram o trabalho para a busca de cepas mais robustas e promissoras, além de meios fermentativos com carga reduzida de inibidores. Três cepas de leveduras (*S. cerevisiae* T18, HAA1 e MDS130) geneticamente modificadas para assimilar xilose, gentilmente cedidas pelo Prof. Johan Thevelein (KU Leuven e NovolYeast®, Bélgica), foram avaliadas em distintos meios fermentativos industriais formulados com hidrolisado bruto concentrado (HC), hidrolisado destoxificado (HD) e hidrolisado bruto suplementado com melão (MHB). Os melhores resultados foram obtidos utilizando a cepa MDS130 e meio MHB, combinação que foi selecionada para os ensaios em biorreator de leito fixo (BLF). Resultados promissores em produtividade (de até 20 g/L/h) e rendimento em etanol (de até 100 % do teórico), além de elevada conversão de açúcares ao longo dos 20 ciclos realizados foram alcançados com o BLF. Esses dados confirmam a viabilidade da aplicação industrial do processo de produção de etanol 2G a partir de meios formulados com hidrolisados hemicelulósicos e melão utilizando leveduras recombinantes. Na segunda parte do trabalho, uma nova cepa de levedura *S. cerevisiae* AC14, com capacidade de secretar 7 enzimas hidrolíticas, foi avaliada para produção de etanol 2G em um sistema de bioprocessamento consolidado (BPC). Ensaios preliminares indicaram que células livres em alta carga favorecem a hidrólise e posterior fermentação de componentes presentes nos meios avaliados: celobiose, xilana de sabugo de milho e licor hidrotérmico (LH). Experimentos complementares revelaram que as etapas de hidrólise e fermentação tanto de meios sintéticos, como de meio preparado utilizando as frações sólida (BTH) e líquida (LH) obtidas após pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar ocorreu em menos de 10 horas na presença de elevada carga de células (densidade ótica de 100), ultrapassando as produtividades obtidas utilizando biocatalisadores formulados a partir de coquetéis enzimáticos industriais. Apesar da hidrólise dos oligômeros presentes no LH não ter sido completa, os resultados obtidos são promissores, de modo que a cepa AC14 tem grande potencial para emprego em BPC, viabilizando a produção de etanol 2G por hidrólise e fermentação simultâneas a partir da biomassa pré-tratada.

Palavras-chave: Leveduras recombinantes, etanol 2G, biorreator de leito fixo, hidrolisados hemicelulósicos, enzimas hidrolíticas, bioprocessamento consolidado.

ABSTRACT

In order to enable the industrial production of second generation (2G) ethanol, the development of processes with high productivity using hydrolysates of lignocellulosic material containing high concentration of inhibitors, with minimum enzymes concentration due to its impact on the total cost of the process, are some of the main challenges to be overcome. In this sense, researches in genetic engineering have been working towards obtaining yeast strains that are more tolerant to inhibitors present in hydrolysates and to the ethanol produced, as well as strains presenting capacity to produce and secrete enzymes, in addition to ferment pentoses and hexoses. The immobilization of cells in calcium alginate contributes to protect cells from the harmful effects of inhibitors, besides allowing the use of high cell densities, facilitating the recovery of products and the reuse of biocatalysts. Thus, the present work aimed to contribute to the development of a high productivity 2G ethanol production process using hemicellulose hydrolysates and superior recombinant yeast cells. At the first step of the research, after toxic and irreversible effects to the immobilized cells caused by the use of fermentative medium composed by concentrated hemicellulose hydrolysate during continuous fermentation were evidenced, experiments in mini-reactors unveiled the strong and synergistic effects between the high inhibitors load in fermentative medium and ethanol produced during fermentation, associated to the exposure time and the yeast strain characteristics. The results led the study to searching more robust and promising yeast strains, along with fermentative media presenting reduced inhibitors' load. Three superior recombinant yeasts (*S. cerevisiae* T18, HAA1 and MDS130) modified for xylose consumption, kindly donated by Prof. Johan Thevelein (KU Leuven and NovelYeast®, Belgium), were evaluated in different fermentative media formulated with concentrated crude hydrolysate (HC), detoxified hydrolysate (HD) and crude hydrolysate supplemented with molasses (MHB). The most encouraging results were achieved by the use of MDS130 strain and MHB medium, being this combination selected for further scale up in fixed bed bioreactors (BLF). Promising data regarding ethanol productivity (up to 20 g/L/h) and yield (up to 100% of the theoretical), besides high sugar conversion during the 20 recycles performed were reached with BLF. These results confirm the feasibility of the industrial application of the 2G ethanol production process from hemicellulose hydrolysate and molasses using recombinant yeast. In the second step of the present study, the superior recombinant yeast strain *S. cerevisiae* AC14, with capacity to secrete 7 hydrolytic enzymes, was evaluated for 2G ethanol production in a Consolidated Bioprocessing (BPC) system. Preliminary studies showed that free cells in high load enabled the hydrolysis and sequential fermentation of substrates such as cellobiose, corncob xylan and hydrothermal liquor (LH). Complementary experiments revealed that hydrolysis and fermentation steps from synthetic medium and solid (BTH) and liquid (LH) fractions obtained after hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse occurred in less than 10 hours in the presence of high cell load (optical density of 100), surpassing productivities from industrial enzymatic cocktails. Although the hydrolysis of the oligomers present in LH was not complete, the results here obtained are promising, indicating that the AC14 strain has potential of being used in BPC, enabling the 2G ethanol production from pretreated biomass.

Keywords: recombinant strain, 2G ethanol, fixed bed reactor, hemicellulosic hydrolysates, enzyme, consolidated bioprocessing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 Visão geral da produção de etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica	19
Figura 3.2 Estrutura da biomassa lignocelulósica formada por celulose, hemicelulose e lignina.....	20
Figura 3.3 : Esquema indicando as rotas principais de formação de inibidores e o composto do qual derivam.....	26
Figura 3.4 Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose	27
Figura 3.5 Mecanismo de ação das enzimas necessárias para hidrólise total da xilana	29
Figura 3.6 Configurações de bioprocessos disponíveis para conversão de biomassa lignocelulósica a produtos	32
Figura 3.7 Diferentes métodos de imobilização celular	35
Figura 4.1 (A) Mini-reatores utilizados para as fermentações com levedura recombinante imobilizada nos experimentos realizados no LaFaC – UFSCar e (B) Mini-reatores utilizados para as fermentações com levedura recombinante nos experimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular – KU-Leuven	41
Figura 5.1 Perfis de concentrações de xilose residual e de etanol produzido em função do número de tempos de residência (Θ) para diferentes condições de fermentação contínua por <i>S. cerevisiae</i> HAA1 imobilizada em biorreator de leito fixo (DO = 100) e alimentação utilizando MM composto por distintas concentrações de xilose: (A) 40 g/L, (B) 60 g/L, (C) 80 g/L e (D) 120 g/L. Os tempos de residência foram 3,6; 5,4; 7,3 e 10,9 h para cada concentração de xilose na alimentação, respectivamente. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2	53
Figura 5.2 Perfis de conversão de xilose por <i>S. cerevisiae</i> HAA1 imobilizada em função do número de tempos de residência (Θ) durante fermentações contínuas realizadas em reator de leito fixo (DO = 100) em MM composto por concentrações iniciais de xilose de 40, 60, 80 e 120 g/L. Tempos de residência são equivalentes a 3,6; 5,4; 7,3 e 10,9 h para as distintas concentrações de xilose na alimentação, respectivamente. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2.....	55
Figura 5.3 Produção contínua de etanol em biorreator de leito fixo a partir de xilose utilizando <i>S. cerevisiae</i> HAA1 (DO = 100) em MM (Milessi, 2017) e YPX 80 g/L xilose ($\tau = 7,3$ h), e meio YPHC-I contendo 54 g/L ART ($\tau = 4,34$). Perfis de conversão de ART (A), Produtividade em etanol (B) e rendimento em etanol (C). Etapas de lavagem estão indicadas por símbolos preenchidos. Quadrados pretos (MM), círculos vermelhos (YPX), triângulos azuis (YPHC-I). Condições fermentativas: 35 °C, pH 5.2	57
Figura 5.4 Perfis de concentrações de xilose residual e de etanol produzido para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por <i>S. cerevisiae</i> HAA1 em reator de leito fixo contendo 80 g/L de xilose ($\tau = 7,3$) até 44 tempos de residência. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. A etapa de lavagem é indicada pelos símbolos preenchidos.....	58
Figura 5.5 Perfis de concentração de xilose residual e de etanol produzido para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por <i>S. cerevisiae</i> HAA1	

imobilizada em reator de leito fixo contendo meio YPX 80 g/L de xilose ($\tau = 7,3$) até 54 tempos de residência. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. As etapas de lavagem são indicadas pelos símbolos preenchidos.	60
Figura 5.6 Perfis de consumo de açúcares e produção de etanol para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por <i>S. cerevisiae</i> HAA1 em reator de leito fixo utilizando meio YPHC-I ($\tau = 5,4$). Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. A etapa de lavagem está indicada pelos símbolos preenchidos.....	62
Figura 5.7 Fermentação em bateladas repetidas em mini-reatores pela levedura imobilizada HAA1 utilizando diferentes meios. (A) YPDX (B) YPDX suplementado com etanol, (C) YPHC-II e (D) YPHC-II suplementado com etanol. Bateladas distintas são representadas por símbolos diferentes e identificadas pelo número de referência (#) na legenda. Símbolos preenchidos representam meios suplementados com etanol. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2.....	64
Figura 6.1 Reator de leito fixo em operação contendo 40 mL de células de <i>S. cerevisiae</i> MDS130 imobilizadas em alginato de Cálcio e 40 mL de meio MH2. Condições fermentativas: pH 5,6 e 35 °C.....	74
Figura 6.2 Viabilidade das células de levedura T18, HAA1 e MDS 130 imobilizadas em alginato de cálcio em função do tempo de exposição em solução hidroalcolica contendo 60 g/L de etanol. Condição: 35 °C	76
Figura 6.3 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPDX pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 104,9 g/L açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6, estático. Cada curva distinta representa um reciclo.....	78
Figura 6.4 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPDX para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais para parâmetros em um mesmo reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança	79
Figura 6.5 Acompanhamento da conversão de açúcares fermentescíveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPHC pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 95,9 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6, estático. Cada curva representa um reciclo.....	82
Figura 6.6 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPHC para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.....	83
Figura 6.7 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPHD pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 106,4 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo	89
Figura 6.8 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPHD para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com	

relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.....	90
Figura 6.9 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPXDHB pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 98,1 g/L de açúcares iniciais, Do = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo	96
Figura 6.10 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPXDHB para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança	97
Figura 6.11 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB1 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 94 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo	100
Figura 6.12 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio MHB1 para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.....	101
Figura 6.13 (A) Perfis de conversão de ART ao longo das 20 bateladas repetidas por células imobilizadas de MDS130 utilizando meio MHB2 como meio fermentativo industrial. Cada nova curva representa um novo reciclo. (B) Concentrações iniciais e finais de etanol em cada batelada e (C) Rendimentos e produtividades em etanol em cada reciclo fermentativo. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,6, DO = 100 e 1:1 $V_{células}/V_{meio}$	104
Figura 7.1 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPX pelas leveduras MD4 e AC14. Condições fermentativas: T = 35 °C, pH = 5,6, 200 rpm, DO = 100. Cada curva representa um reciclo fermentativo	113
Figura 7.2 Performance fermentativa das leveduras MD4 e AC14 imobilizadas em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de sabugo de milho em diferentes pH's (T = 35 °C, estático, DO = 100). Massa total de CO ₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g (AC14); 0,098 (MD4).....	115
Figura 7.3 Concentrações finais de etanol (A) e celobiose (B) após fermentação utilizando as leveduras AC14 e MD4 em diferentes pH's. Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14); 10,22 g/L (MD4). Letras iguais no mesmo gráfico indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança.....	117

Figura 7.4 Performance fermentativa das leveduras MD4 e AC14 em sua forma livre e em diferentes concentrações celulares em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de espiga de milho em diferentes pH's. (T = 35 °C, 200 rpm) (A) pH 4,5; (B) pH 5,5 e (C) pH 6,0. Massa total de CO ₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g (AC14); 0,098 (MD4).....	118
Figura 7.5 Concentrações finais de etanol e celobiose após fermentação utilizando as leveduras AC14 (A) e MD4 (B) em diferentes pH's. Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14); 10,22 g/L (MD4). Letras iguais no mesmo gráfico indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações de etanol de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança	119
Figura 7.6 Viabilidades celulares finais das células de AC14 e MD4 nas diferentes condições avaliadas	120
Figura 7.7 (A) Performance fermentativa da levedura AC14 em sua forma livre e imobilizada (com e sem agitação) em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de espiga de milho. (T = 35 °C, pH = 6, 300 rpm) e (B) concentrações finais de etanol e celobiose. Massa total de CO ₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14)	122
Figura 7.8 Ensaios fermentativos utilizando meio composto por xilose, glicose, xilana de sabugo de milho e celobiose (20 g/L cada) e células livres de AC14 em alta carga (DO ₆₀₀ =100) em modo estático ou agitado (250 rpm). Condições fermentativas: T=35 °C, pH 5,6.	124
Figura 7.9 Imagens das células de AC14 após 28 horas de processo estático (A) e agitado (250 rpm) (B). Condições fermentativas: T = 35 °C, pH 5,6.....	125
Figura 7.10 Performance fermentativa das leveduras AC14 e MD4 em suas formas livres em alta carga (DO ₆₀₀ = 100) em meio sintético composto por xilose, glicose, celobiose e xilana de sabugo de milho. Condições fermentativas: T = 35 °C, pH = 5,6, estático.....	126
Figura 7.11 Ensaios fermentativos utilizando meio composto por xilose, glicose, xilana de sabugo de milho e celobiose e células livres em alta carga (DO ₆₀₀ =100). Condições fermentativas: T=35 °C, pH 5,6, estático. (A) Acompanhamento das concentrações ao longo do processo utilizando células de AC14 e (B) Concentrações iniciais (t = 0 h) e finais (t = 30h) utilizando células de MD4.....	127
Figura 7.12 Performance fermentativa das leveduras AC14 e MD4 em suas formas livres em alta carga (DO ₆₀₀ = 100) em meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após tratamento hidrotérmico (LH e BTH). Condições fermentativas: T = 35 °C, pH = 5,6, estático.....	131
Figura 7.13 Ensaios fermentativos utilizando meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após tratamento hidrotérmico e células livres em alta carga (DO ₆₀₀ = 100). Condições fermentativas: T = 35 °C, pH 5,6, estático. (A) AC14 e (B) MD4....	131
Figura 7.14 Imagens das frações sólidas obtidas após 43,5 horas de processo utilizando as cepas recombinantes de MD4 e AC14 após remoção do sobrenadante e filtração para remoção das células em suspensão.....	134

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 Caracterização do meio hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado (HC-I) utilizado para fermentação contínua. Compostos fenólicos totais são apresentados em função de gramas equivalentes de ácido gálico.....	51
Tabela 5.2 Caracterização dos meios YPDX, hidrolisado hemicelulósico bruto (HC-II) utilizados para fermentações complementares em mini-reatores	52
Tabela 5.3 - Índices de performance obtidos durante o estado estacionário de fermentações contínuas utilizando distintas concentrações xilose inicial em MM e levedura recombinante imobilizada HAA1 (DO = 100) em reator de leito fixo. Condições fermentativas: 35°C, pH 5,2.....	54
Tabela 5.4 Viabilidades celulares finais, concentrações iniciais e finais de etanol, rendimento e produtividade volumétrica em etanol durante fermentações em bateladas repetidas utilizando meio sintético e industrial, suplementados ou não com etanol e utilizando células imobilizadas de HAA1. Os valores representam a média de replicatas, com menos de 5 % de desvio	65
Tabela 6.1 Presença de hidrolisado ou melaço em cada meio industrial utilizado nas fermentações (A), composição dos meios utilizados para formulação do meio MHB (B) e composição detalhada dos distintos meios industriais e meios de referência utilizados na avaliação da performance fermentativa das cepas T18, HAA1 e MDS130 (C). Essas concentrações foram determinadas antes da adição de meio às células imobilizadas de levedura	73
Tabela 6.2 Pontuações obtidas para cada linhagem de levedura avaliada nos meios industriais estudados. As comparações foram realizadas entre as 3 leveduras em cada um dos ciclos baseadas no teste de Tukey (95% de confiança)	103
Tabela 7.1 As sete enzimas secretadas pela cepa AC14, os organismos dos quais foram clonados os genes para integração genômica, atividades enzimáticas específicas e temperatura e pH's ótimos das mesmas	110
Tabela 7.2 Índices de desempenho durante os ciclos em meio YPX utilizando células imobilizadas das leveduras MD4 e AC14. Condições fermentativas: pH = 5,6, 35 °C, 200 rpm, DO = 100)	114
Tabela 7.3 Composição das frações sólida (BTH) e líquida (LH) obtidas após pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (195 °C e 10 min, 1:10 sólido/líquido).....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2G: Segunda geração;

ART: Açúcares redutores totais;

AXE: Acetil-xilano esterase;

BGL: β -glicosidase;

BLF: Biorreator de leito fixo;

BPC: Bioprocessamento consolidado;

BTH: Bagaço de cana tratado hidrotermicamente.

BXL: β -xilosidase;

CBH: Celobiohidrolase;

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência;

D: Glicose;

DO: Desidade ótica;

EG: Endoglucanase;

EtOH: Etanol;

[EtOH]₀: Concentração inicial de etanol, g/L;

[EtOH]_F: Concentração final de etanol, g/L;

HB: Hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado;

HC: Hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado;

HD: Hidrolisado hemicelulósico destoxificado;

HMF: Hidroximetilfurfural;

LH: Licor hidrotérmico;

M: Melaço;

MM: Meio mínimo;

ms: Massa seca;

P: Peptona;

Q_p: Produtividade em etanol, g/L/h;

q_p: Produtividade específica em etanol, mg/g_{ms}/h;

SHF: Hidrólise seguida de fermentação;

SHIF: Sacarificação, hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas;

SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultâneas;

SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas;

X: Xilose;

X₂: Xilobiose;

X₃: Xilotriose;

X₄: Xilotetraose;

X₅: Xilopentaose;

XOS: Xilooligossacarídeos;

XYL: Xilanase;

Y: Extrato de levedura;

Y_{P/S}: Rendimento em etanol, g_{E_tOH}/g_{ART};

SUMÁRIO

Capítulo 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
Capítulo 2 OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE.....	16
Capítulo 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 Produção de etanol de segunda geração.....	18
3.2 Materiais lignocelulósicos	19
3.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos	21
3.3.1 Pré-tratamento ácido	23
3.3.2 Pré-tratamento hidrotérmico	24
3.4 Inibidores gerados durante a etapa de pré-tratamento da biomassa.....	25
3.5 Hidrólise enzimática	26
3.6 <i>S. cerevisiae</i> recombinantes fermentadoras de xilose.....	29
3.7 Configurações de processos de hidrólise enzimática e fermentação	31
3.7.1 Bioprocessamento Consolidado (BPC).....	32
3.8 Imobilização de células.....	34
3.9 Modos de operação de reatores de leito fixo para produção de etanol 2G	36
Capítulo 4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS	38
4.1 Pré inóculo e inóculo	38
4.2 Imobilização.....	38
4.3 Meios fermentativos	39
4.3.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado (HB)	39
4.3.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado (HC).....	39
4.3.3 Preparo do hidrolisado destoxificado (HD)	39
4.3.4 Preparo do hidrolisado hidrotérmico.....	40
4.3.5 Preparo e caracterização dos meios de cultivo.....	40
4.4 Ensaios fermentativos e ciclos de células em mini-reatores.....	41
4.5 Métodos Analíticos	43
4.5.1 Medida da concentração de células.....	43
4.5.2 Medida da concentração de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores.....	43
4.5.3 Viabilidade celular	44
4.6 Definições e procedimentos de cálculo	44
4.6.1. Ensaios em bateladas simples ou repetidas	44
4.6.2 Ensaios contínuos.....	45

Capítulo 5 PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL 2G A PARTIR DE XILOSE UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E LEVEDURA RECOMBINANTE SUPERIOR IMOBILIZADA EM REATOR DE LEITO FIXO ...	47
5.1 Introdução	47
5.2 Materiais e métodos específicos	50
5.2.1 Estratégia experimental	50
5.2.2 Quantificação de compostos fenólicos	50
5.2.3 Fermentações contínuas	50
5.2.4 Experimentos em bateladas repetidas	52
5.3 Resultados e discussão	52
5.3.1 Resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa:	52
5.3.2 Estratégias para melhorar a estabilidade operacional do reator de leito fixo.....	56
5.3.3 Efeitos tóxicos do etanol e do hidrolisado hemicelulósico contendo inibidores sobre a performance fermentativa da levedura recombinante HAA1	61
5.4 Conclusões	68
Capítulo 6 SELEÇÃO DE MEIO FERMENTATIVO E DE LINHAGEM DE LEVEDURA SUPERIOR PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM REATOR DE LEITO FIXO	69
6.1 Introdução	69
6.2 Materiais e métodos específicos	72
6.2.1 Ensaio em biorreator de leito fixo	74
6.3 Resultados e Discussão	75
6.3.1 Caracterização geral das diferentes linhagens de levedura <i>S. cerevisiae</i> recombinantes.....	75
6.3.2 Tolerância a etanol	76
6.3.3 Performance das leveduras em meio YPD	77
6.3.4 Performance das linhagens de <i>S. cerevisiae</i> recombinante em meios industriais	81
6.3.4.1 Fermentação de meio hidrolisado bruto concentrado (HC).....	81
6.3.4.2 Fermentação de meio hidrolisado destoxificado (HD)	88
6.3.5 Fermentação de meios formulados com hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado (HB)	95
6.4 Integração da produção de etanol 1G e 2G: Bateladas repetidas em biorreator de leito fixo	103
6.5 Conclusões	107
Capítulo 7 PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM BIOPROCESSO CONSOLIDADO UTILIZANDO LEVEDURA RECOMBINANTE SUPERIOR COM SECREÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS	108

7.1.	Introdução	108	
7.2.	Metodologia específica	109	
7.2.1	Métodos analíticos.....	111	
7.2.1.1	Hidrólise ácida total	111	
7.2.1.2Cálculo da xilose potencial	112	112
7.2.1.3	Cálculo da glicose potencial	112	
7.3	Resultados e discussões	112	
7.3.1	Ensaio de referência.....	112	
7.3.2	Ensaio fermentativo utilizando leveduras imobilizadas.....	114	
7.3.3	Ensaio fermentativo utilizando leveduras livres	117	
7.3.4	Avaliação da influência da agitação na difusão de enzimas	121	
7.3.5	Avaliação do perfil de consumo de celobiose e xilana de sabugo de milho e produção de etanol por células livres de AC14 (DO=100)	123	
7.3.6	Avaliação de bioprocessamento consolidado em meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar.....	129	
7.4	Conclusão.....	134	
	Capítulo 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	136	
	Capítulo 9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	138	
	Referências	140	

Capítulo 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento de sistemas energéticos sustentáveis a partir de matérias-primas renováveis é um tópico mundialmente difundido. O uso de biomassa vegetal em processos tecnológicos é crucial para o desenvolvimento de biorrefinarias, que incorporam uma gama de tecnologias capazes de separar biomassa lignocelulósica em suas frações constituintes, de modo a serem convertidas em uma elevada variedade de produtos, como energia, compostos químicos (por exemplo: xilitol, sorbitol, glicerol, ácido levulínico, ácido glucárico) e biocombustíveis (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010; EL-DALATONY et al., 2016), visando a sustentabilidade ambiental (ADITIYA et al., 2016)

O tema é tão importante que é pauta mundial, discutido anualmente na COP (Conferência das Partes), o órgão máximo da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre Mudança do Clima (UNFCCC). Na COP são discutidas as metas e metodologias para reduzir o ritmo das mudanças climáticas causadas pela emissão dos gases de efeito estufa, dentre outros assuntos. Além disso, estabelecem-se os termos e métodos a serem utilizados pelos Estados signatários do Acordo de Paris, que estipulou a meta de reduzir em 2 °C a temperatura média global até ao final do século (COP, 2019), acentuando ainda mais a necessidade da busca por energias sustentáveis.

O bioetanol ou etanol de segunda geração (2G) é um biocombustível produzido a partir da biomassa lignocelulósica, que se destaca como matéria prima de elevada disponibilidade, principalmente no Brasil, onde a produção de etanol de primeira geração é expressiva, gerando uma quantidade significativa de bagaço de cana-de-açúcar. Desta forma, o aproveitamento de parte deste bagaço para a produção de etanol 2G, de forma conciliada com a produção de energia, permitiria aumentar a produção desse biocombustível sem requerer maior área plantada (WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015). Além disso, o dióxido de carbono emitido durante a queima de biocombustíveis é reabsorvido na fotossíntese das plantas, contribuindo para a redução da emissão de CO₂ na atmosfera.

O processo de produção de etanol hemicelulósico consiste no tratamento da biomassa em condições que permitam o rompimento da estrutura lignocelulósica e a solubilização dos açúcares fermentescíveis, seguidos por fermentação e separação. O pré-tratamento é importante para desestruturar a biomassa lignocelulósica, deixando a

celulose e a hemicelulose mais acessíveis às enzimas hidrolíticas (quando necessárias), gerando açúcares fermentescíveis. O pré-tratamento pode gerar produtos com distintas características. Nesse sentido, vale destacar o pré-tratamento ácido, que é capaz de solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa vegetal, gerando um hidrolisado rico em xilose, bem como o pré-tratamento hidrotérmico, que além de não requerer o uso de solventes químicos, é capaz de solubilizar a hemicelulose, deixando celulignina como fração sólida para posterior hidrólise enzimática (MILESSI, 2017).

A viabilidade econômica da produção de etanol 2G, no entanto, depende do desenvolvimento de tecnologia capaz de superar desafios, como o alto consumo energético nas etapas de pré-tratamento e também a incapacidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* selvagem de fermentar de maneira eficiente a fração de pentoses presente na biomassa, proveniente da hidrólise da hemicelulose (KUMAR; SINGH; GHOSH, 2009; MUSSATTO et al., 2012).

Viabilizar a fermentação das pentoses, além da fração de hexoses, aumenta a produção de etanol sem requerer maior área plantada. No entanto, demanda a utilização de uma levedura capaz de metabolizar esse tipo de açúcar, bem como tolerar elevadas concentrações de etanol no meio. Nesse contexto, a engenharia genética tem sido amplamente utilizada no desenvolvimento de novas cepas de leveduras, tornando-as aptas a metabolizar de forma mais eficiente uma grande variedade de açúcares em etanol (MEIJNEN et al., 2016).

Além dos açúcares fermentescíveis, xilose e glicose, na etapa de pré-tratamento são gerados diferentes compostos inibitórios, tais como furfural, hidroximetilfurfural (HMF) e ácido acético, dentre outros. De acordo com a literatura, eles são capazes de inibir a fermentação e o crescimento microbiano, resultando em reduções significativas de rendimento e produtividade em etanol. Nesse sentido, a produção economicamente viável de etanol lignocelulósico demanda um microrganismo que apresente elevada tolerância aos componentes tóxicos presentes no hidrolisado (DEMEKE et al., 2013b).

Por essa razão, diversas linhagens de levedura capazes de fermentar os açúcares presentes nos hidrolisados e com tolerância melhorada aos inibidores presentes no meio têm sido desenvolvidas por meio da engenharia genética por diversos grupos de pesquisa. Destaque nessa área, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Johan M. Thevelein, da KU Leuven (Bélgica) tem trabalhado no desenvolvimento de leveduras robustas, capazes de assimilar xilose, tolerantes a inibidores do hidrolisado e com elevado rendimento e produtividade em etanol, para aplicação industrial. Demeke e

colaboradores (2013a,b) modificaram a levedura *Ethanol red* (industrialmente utilizada para produção de etanol 1G) para torná-la capaz de fermentar rapidamente xilose, desenvolvendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18 (T18). Esta última, no entanto, se revelou menos tolerante a inibidores, como ácido acético. Posteriormente, Meijnen e colaboradores (2016) desenvolveram a cepa HAA1 e em seguida foi desenvolvida a cepa MDS130 (BELO, 2020). MDS 130 foi desenvolvida a partir da T18 por um método de *genome shuffling* e evolução adaptativa. A cepa demonstrou melhoria em sua capacidade fermentativa em hidrolisados contendo elevadas concentrações de inibidores e também em hidrolisado de sabugo de milho (THEVELEIN et al., 2018). Ambas as leveduras foram produzidas a partir de modificações genéticas na levedura T18 e evolução adaptativa, buscando obter cepas mais robustas e resistentes a inibidores. Mais recentemente, o grupo passou a investir no desenvolvimento de leveduras para Bioprocessamento Consolidado (BPC), no qual as etapas de hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares são reunidas em única etapa, diminuindo assim o custo do processo (CLAES et al., 2020). A linhagem *Saccharomyces cerevisiae* AC14, capaz de secretar 7 enzimas lignocelulolíticas foi então construída e, além de reunir todas as funcionalidades da MDS130, constitui a primeira cepa industrial fermentadora de xilose que secreta 7 enzimas heterólogas.

Por meio de uma parceria com o grupo do Prof. Thevelein, os grupos de pesquisa LaFaC (Laboratório de Fábricas Celulares) e LabEnz (Laboratório de Engenharia Enzimática) do DEQ/UFSCar vêm estudando as leveduras superiores desenvolvidas na KU Leuven para a produção de etanol 2G visando processos implementáveis em escala industrial. Os grupos LaFaC e LabEnz têm longa tradição no desenvolvimento de processos para produção de etanol 1G e 2G utilizando tecnologias inovadoras, ambientalmente amigáveis e escalonáveis, baseadas em células imobilizadas e reatores de alto desempenho.

Nesse sentido, a presente tese de doutorado visa contribuir para o desenvolvimento de processos robustos e escalonáveis para a produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de hemicelulose, utilizando células de leveduras recombinantes superiores em alta carga, em sua forma livre ou imobilizadas em esferas de alginato, visando a aplicação em bioprocessos consolidados e biorrefinarias. A tese de doutorado 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).

Capítulo 2 OBJETIVOS E ESTRUTURA DA TESE

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras recombinantes de alta performance, livres ou imobilizadas em gel de alginato de cálcio, em alta carga.

Como objetivos específicos, destacam-se:

- i) Avaliação da viabilidade da utilização de hidrolisado hemicelulósico para a produção de etanol 2G em biorreator de leito fixo;
- ii) Caracterização das leveduras geneticamente modificadas (*S. cerevisiae* T18, HAA1, MDS 130) em termos de desempenho fermentativo e seleção da cepa com maior potencial para utilização na produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de hemicelulose;
- iii) Estudar a produção de etanol 2G por bioprocessamento consolidado utilizando uma levedura de alta performance, com secreção de enzimas lignocelulolíticas.

Conforme mencionado anteriormente, a presente tese de Doutorado se insere no projeto temático “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas” e é a continuação de uma longa trajetória de estudos visando o desenvolvimento de uma tecnologia de alto desempenho para a produção de etanol 2G em escala industrial, que culminou no doutorado de Thaís S. Milessi, defendido em 2017, no qual as leveduras recombinantes da KU-Leuven começaram a ser utilizadas. Assim, dando continuidade ao trabalho da Profa. Dra. Thais S. Milessi, os experimentos foram iniciados com fermentações conduzidas em meios formulados a partir do hidrolisado bruto concentrado rico em xilose, buscando investigar os efeitos da exposição das células de levedura recombinante a elevadas concentrações de etanol e de inibidores (objetivo específico i). A partir dos resultados observados ao comparar o desempenho das linhagens T18 e HAA1, verificou-se a necessidade da caracterização das leveduras recombinantes (objetivo específico ii) de forma a identificar a levedura mais promissora para ser utilizada em processos industriais de produção de etanol 2G em meios formulados a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Os experimentos com a levedura

AC14, capaz de secretar 7 enzimas hidrolíticas (objetivo específico iii), foram iniciados durante o período de doutorado sanduíche realizado na KU-Leuven, Bélgica e finalizados no Brasil.

A presente tese de Doutorado está dividida em capítulos. O terceiro capítulo apresenta a revisão bibliográfica sobre os temas abordados na presente tese de doutorado. O quarto capítulo engloba materiais e métodos gerais, que são comuns em todas as etapas do trabalho. Os capítulos 5, 6 e 7 apresentam os distintos estudos abordados ao longo do período de doutorado, relacionados com os objetivos específicos, sendo:

Capítulo 5: Produção contínua de etanol 2G utilizando hidrolisado hemicelulósico e levedura recombinante superior imobilizada em reator de leito fixo;

Capítulo 6: Seleção de meio fermentativo e linhagem de levedura superior para aplicação na produção de etanol 2G em reator de leito fixo;

Capítulo 7: Produção de etanol 2G em bioprocesso consolidado utilizando levedura de última geração com secreção de enzimas lignocelulolíticas.

No Capítulo 8 são descritas as considerações finais e no Capítulo 9 as sugestões para trabalhos futuros.

Capítulo 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

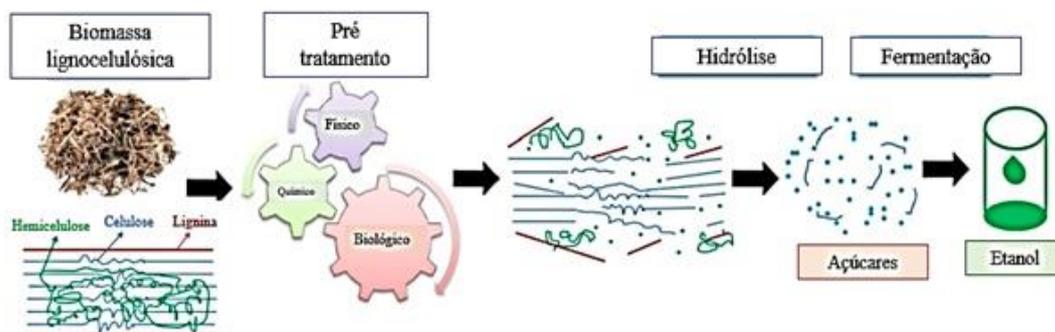
3.1 Produção de etanol de segunda geração

No início do século XX, as pesquisas deram grande destaque para o desenvolvimento de refinarias de petróleo, carvão e gás natural, a fim de explorar o estoque disponível de combustíveis fósseis, alternativas de baixo custo para a produção de combustível. No entanto, problemas ambientais causados pelo uso dessa classe de combustíveis, tornaram urgentes a busca por alternativas sustentáveis que pudessem viabilizar técnica e economicamente a produção de biocombustíveis a partir de fontes renováveis, preferencialmente resíduos agroindustriais de baixo valor agregado, que não competem com a produção de alimentos (SHARMA et al., 2018). Nesse sentido, a utilização de subprodutos agroindustriais em bioprocessos é uma alternativa racional para produção de substratos para fermentação e uma contribuição para solucionar o problema da poluição ambiental, causada pelo acúmulo dos mesmos no meio ambiente (PANDEY et al., 2000).

A produção de etanol de segunda geração a partir de materiais lignocelulósicos envolve geralmente três principais passos sequenciais, como mostra a Fig. 3.1: (i) pré-tratamento da biomassa lignocelulósica; (ii) hidrólise da celulose e da hemicelulose a açúcares fermentescíveis; (iii) fermentação microbiana para a produção de etanol (DUBEY; JAKEER; GAUR, 2016) seguida por recuperação do álcool por evaporação/destilação. A segunda etapa envolve não apenas a hidrólise das fibras de celulose e hemicelulose, mas também liberação dessas fibras que ficam envolvidas pela lignina no tecido vegetal, a fim de facilitar a ação das enzimas. Essa é a principal etapa que torna o processo de produção de etanol 2G mais oneroso que a de 1G, pois essa conversão dos polímeros em açúcares só é possível através de processos térmicos, químicos ou enzimáticos (LASER et al., 2002).

De maneira geral, resíduos agrícolas, como palha de milho e arroz, resíduos florestais, como madeiras, folhagens e galhos, grama de pradaria (*switchgrass*), resíduos sólidos municipais ou resíduos alimentícios podem constituir fontes de biomassa lignocelulósica. A produção de biocombustível a partir desses materiais deve ser ajustada de acordo com sua disponibilidade em cada país ou região, de acordo com o clima e o tipo de vegetação (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014).

Figura 3.1 Visão geral da produção de etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica



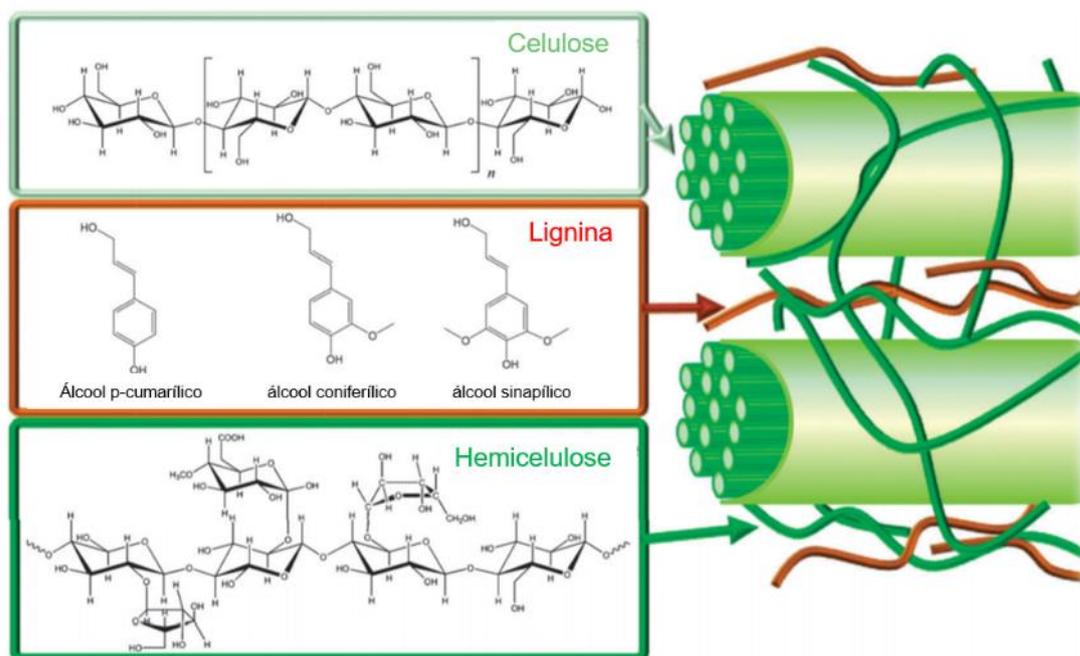
Fonte: Adaptado de Pandiyan e colaboradores (2019)

No Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar, resíduo da produção de açúcar ou etanol de primeira geração, é um material que tem grande potencial para ser utilizado no processo de produção de etanol 2G, visto que é produzido em elevada quantidade e já está disponível nas usinas. Na safra de 2020/2021, cerca de 585 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram produzidas no Brasil (UNICA, 2021), utilizadas na produção de etanol 1G e resultando na geração de uma grande quantidade de bagaço de cana-de-açúcar, equivalente a 140 kg por tonelada de cana processada. Dessa forma, o aproveitamento de parte do bagaço, de forma conciliada com a produção de energia, para a produção de etanol 2G, permitiria aumentar a produção desse biocombustível sem requerer maior área plantada (VALENTINE et al., 2012).

3.2 Materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica é considerada uma matéria prima sustentável, uma vez que é renovável e se apresenta de forma abundante e bem distribuída na natureza (LUO et al., 2019). De maneira geral, é composta por aproximadamente 40-60% de celulose, 20-40% de hemicelulose, envoltos em uma rígida estrutura de lignina, que compõe 10-25% do material (MISHRA; GHOSH, 2019), como mostrado na Fig. 3.2.

Figura 3.2 Estrutura da biomassa lignocelulósica formada por celulose, hemicelulose e lignina



Fonte: Adaptado de Alonso; Wettstein; Dumesic (2012)

Celulose ($C_6H_{10}O_5$)_x é o polissacarídeo mais abundante na natureza. Quantidades da ordem de 10^{11} toneladas de celulose são sintetizadas anualmente por plantas utilizando a energia solar (KLEMM et al., 2005). A celulose possui uma estrutura linear com regiões amorfas e cristalinas, sendo composta por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β-(1→4). Os filamentos de celulose permitem a formação de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares, enrijecendo a cadeia e formando fibrilas e fibras insolúveis e mecanicamente estáveis (MISCHNICK; MOMCILOVIC, 2010), bem como insolúveis em água e na maioria dos solventes orgânicos (SWATLOSKI et al., 2002).

A hemicelulose ($C_5H_8O_4$)_m, localizada nas paredes celulares secundárias, é um biopolímero ramificado heterogêneo contendo pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose, galactose) e/ou ácidos urônicos (GÍRIO et al., 2010). Ela é relativamente fácil de hidrolisar por causa de sua estrutura amorfa e ramificada (com cadeia lateral curta), bem como baixo peso molecular (LI et al., 2010). Para aumentar a digestibilidade da celulose, é recomendável remover a hemicelulose, pois cobrem as fibrilas de celulose, limitando sua disponibilidade para a hidrólise enzimática (AGBOR et al., 2011). As hemiceluloses são relativamente sensíveis às condições de operação, portanto, parâmetros como temperatura e tempo de retenção devem ser controlados

durante o pré-tratamento para evitar a formação de subprodutos como furfural e hidroximetilfurfural (HMF), que podem inibir o processo de fermentação (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). As hemiceluloses mais abundantes são as xilanas, principais componentes da hemicelulose das paredes celulares secundárias que, quando submetidas à hidrólise total, geram monômeros de xilose (GÍRIO et al., 2010). Por outro lado, quando submetida a uma hidrólise branda, a hemicelulose pode gerar cadeias de xilooligômeros, que podem ser ainda hidrolisados a xilooligossacarídeos (XOS), que são oligômeros pequenos de moléculas de xilose, ligados por ligações β -1,4 e compostos por 2-7 unidades de xilose (WANG; LU, 2013).

A lignina, por sua vez, é um polímero composto principalmente por três álcoois aromáticos, álcool cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico, que liga as fibras de celulose e hemicelulose, formando uma barreira física na parede celular vegetal. Lignina é recalcitrante à degradação e resistente à maioria dos ataques microbianos e estresses oxidativos (DASHTBAN, SCHRAFT, QIN, 2009)

Os três principais componentes da biomassa lignocelulósica, celulose, hemicelulose e lignina estão fortemente emaranhados e unidos entre si, formando a matriz lignocelulósica. Essa característica estrutural dificulta a separação e sacarificação dos componentes da biomassa, resultando em baixa digestibilidade de matérias-primas lignocelulósicas em sua forma bruta (GALBE; ZACCHI, 2012). Para melhorar a digestibilidade da matriz lignocelulósica e, conseqüentemente, aumentar a eficiência da bioconversão para produção de etanol, vários tipos de pré-tratamentos têm sido estudados com base nas propriedades de cada tipo de material lignocelulósico (ZHOU, 2017).

3.3 Pré-tratamento de materiais lignocelulósicos

Pré-tratamentos podem ser realizados por métodos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, ou ainda podem consistir na combinação deles (HAGHIGHI; HOSSEIN; TABATABAEI, 2013). O pré-tratamento efetivo da biomassa para liberar os componentes celulósicos e hemicelulósicos é pré-requisito para a obtenção de bioetanol em elevados rendimentos (AMOAHA et al., 2017). Essa etapa afeta significativamente a viabilidade econômica do processo de produção de etanol 2G, consistindo em cerca de 20% do custo total do mesmo (YANG; WYMAN, 2004). Idealmente, o pré-tratamento da biomassa deve ser rápido, consumir pouca energia, ser eficiente na recuperação do material celulósico e hemicelulósico, liberar a estrutura do

envolvimento pela lignina, maximizar a digestibilidade do material pré-tratado, minimizar a perda de açúcares e os custos de operação (AMOA et al., 2017; MARGEOT et al., 2009) e evitar a formação de produtos de degradação que sejam inibitórios para os passos subsequentes do processo (AGBOR et al., 2011).

Uma vez que diferentes materiais lignocelulósicos têm diferentes características físico-químicas, é necessário adotar tecnologias de pré-tratamento baseadas nas propriedades da biomassa lignocelulósica derivada de cada tipo de matéria-prima, bem como dos produtos desejados. Além disso, a escolha do pré-tratamento adequado tem um grande impacto em todas as etapas subsequentes do processo em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos tóxicos potencialmente inibitórios para a levedura na etapa de fermentação, demanda de energia no processo e etapa de *downstream*, bem como tratamento dos resíduos gerados no processo (GALBE; ZACCHI, 2012).

O efeito de distintos pré-tratamentos varia amplamente em termos de suas características físicas e químicas. Alguns são capazes de gerar um hidrolisado contendo açúcares solubilizados, enquanto outros preparam o material para ser hidrolisado por enzimas. O tratamento alcalino, por exemplo, é capaz de solubilizar a lignina, ao passo que o tratamento ácido é altamente seletivo para hidrólise da hemicelulose. A remoção da lignina é importante para eliminar a interação entre lignina e celulases, tornando a hidrólise mais eficiente. O tratamento alcalino solubiliza mais de um terço da hemicelulose a açúcares, principalmente pentoses, enquanto o tratamento ácido é capaz de solubilizar a maior parte da hemicelulose a açúcares (FU et al., 2011). Dessa forma, um pré-tratamento adequado deve ser determinado com base na composição química da biomassa e de acordo com a(s) fração(ões) da biomassa lignocelulósica que se deseja recuperar. A escolha do(s) pré-tratamento(s) é uma etapa crítica para a eficiente sacarificação e posterior fermentação da biomassa lignocelulósica (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014).

O objetivo dos pré-tratamentos físicos, como moagem, extrusão e radiação é aumentar a área superficial e reduzir o tamanho das partículas de material lignocelulósico (HARUN et al., 2011). Além disso, reduz o grau de polimerização e de cristalização da matéria-prima e geralmente é usado em conjunto com outro tipo de pré-tratamento.

Pré-tratamentos químicos incluem o processo organossolve, ozonólise, líquido iônico e os tratamentos ácido, hidrotérmico e alcalino. Os pré-tratamentos mais comuns

são os ácidos e alcalinos, e têm sido amplamente empregados para resíduos de culturas vegetais (KARIMI; TAHERZADEH, 2016). Os pré-tratamentos utilizados no presente trabalho são o pré-tratamento ácido e o hidrotérmico, descritos com detalhes a seguir.

3.3.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido envolve o uso de ácidos concentrados ou diluídos para romper a estrutura recalcitrante da biomassa lignocelulósica. Pré-tratamentos com ácidos diluídos apresentam algumas vantagens em relação a ácidos concentrados, como obtenção de hidrolisados de menor toxicidade e redução da corrosão dos equipamentos (ANWAR; GULFRAZ; IRSHAD, 2014).

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é o método mais comum e comercialmente utilizado para uma variedade de biomassas (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010), sendo o mais favorável para aplicações industriais. Esse pré-tratamento consiste na mistura de ácidos diluídos (0,2 a 2,5%) na biomassa a temperaturas entre 120 e 210 °C por poucos minutos ou até por horas (SAHA et al., 2018; SUN; CHENG, 2002). O método é amplamente utilizado para o pré-tratamento de materiais herbáceos e resíduos agrícolas (KUHAD et al., 2011), como o bagaço de cana-de-açúcar, apresentando a vantagem de solubilizar a hemicelulose, principalmente a xilana, gerando predominantemente monômeros de xilose. No entanto, dependendo do grau de severidade do processo, alguns produtos de degradação da biomassa são produzidos, como furfural e HMF, provenientes da degradação da xilose e glicose, respectivamente; ácido acético proveniente dos grupos acetil da hemicelulose; e ácidos alifáticos. O hidrolisado obtido contém ainda compostos fenólicos e aromáticos, provenientes da solubilização de parte da lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Estes compostos são inibidores que podem afetar o metabolismo do microrganismo na etapa de fermentação do hidrolisado (SAHA et al., 2018), bem como afetar a performance das fermentações (LARSSON et al., 1999). Apesar disso, o pré-tratamento com ácidos diluídos gera menos produtos de degradação em comparação com pré-tratamentos com ácidos concentrados.

O pré-tratamento ácido geralmente produz uma fração sólida, onde fica a celulignina, e uma fração líquida, onde fica a hemicelulose solubilizada. O hidrolisado obtido por meio do pré-tratamento ácido é particularmente indicado para fermentações conduzidas com linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas, capazes de

assimilar eficientemente xilose e glicose presentes no mesmo (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010).

Para contornar as dificuldades apresentadas pelo processo utilizando hidrolisados ácidos, uma etapa de destoxificação do hidrolisado pode se fazer necessária, de modo a reduzir as quantidades de inibidores do meio, para que seja adequado para a fermentação. Muitos métodos de destoxificação para remoção desses compostos ou redução da sua concentração nos hidrolisados têm sido avaliados, podendo ser os mesmos físicos (evaporação, filtração em membrana), químicos (neutralização, *overliming* com hidróxido de cálcio, tratamento com carvão ativado, resinas de troca iônica e extração com acetato de etila) ou ainda biológicos (utilização de enzimas, como lacase ou lignina peroxidase) (CHANDEL, A.K; SILVA, S.S.; SINGH, 2012). Além disso, o uso de células imobilizadas tem apresentado resultados promissores em fermentações de meios contendo inibidores (MILESSI et al., 2020a).

3.3.2 Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico requer a exposição da biomassa à água em alta pressão durante intervalos de tempo entre 1 e 15 minutos e temperaturas entre 170 e 230 °C (SILVA, 2013), gerando o produto do pré-tratamento hidrotérmico, que é composto pelo licor (fração líquida) e pela biomassa pré-tratada (fração sólida). Por utilizar apenas água pura, sem a adição de solventes orgânicos ou de soluções ácidas e básicas, o pré-tratamento hidrotérmico vem ganhando destaque, pois não necessita de etapas como neutralização e recuperação do ácido ou solvente ou de reatores resistentes à corrosão, o que reduz os custos do processo (CANILHA et al., 2012). Possui também a vantagem de solubilizar a hemicelulose e manter a celulose na fibra, facilitando a posterior utilização de xilose e hidrólise enzimática da celulose (MILESSI, 2017).

O hidrolisado obtido por meio do pré-tratamento hidrotérmico é particularmente indicado para estudos de BPC (GROPOSO; DE CASTRO; PEREIRA, 2013; LYND et al., 2005), ou seja, fermentações conduzidas com linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas e outros organismos, capazes de sintetizar enzimas que atuam na despolimerização da celulose e da hemicelulose, além de assimilar eficientemente xilose e glicose liberadas pela ação dessas enzimas, como será descrito no item 3.4.

Milessi (2017) empregou o pré-tratamento hidrotérmico a 195 °C por 10 min e proporção 1:10 (sólido:líquido) para extração de grande parte da xilana existente no

bagaço de cana na forma de xilooligômeros, predominantemente. Dos Santos Rocha e colaboradores (2017) avaliaram o efeito de diferentes condições de temperatura (180, 195 e 200 °C) e tempo (0 a 40 min) durante o pré-tratamento hidrotérmico na remoção de celulose, hemicelulose e lignina de palha de cana-de-açúcar. Sob as melhores condições (195 °C e 15 min), foi obtida remoção significativa de hemicelulose (85 %) com baixa perda de celulose (21 %).

3.4 Inibidores gerados durante a etapa de pré-tratamento da biomassa

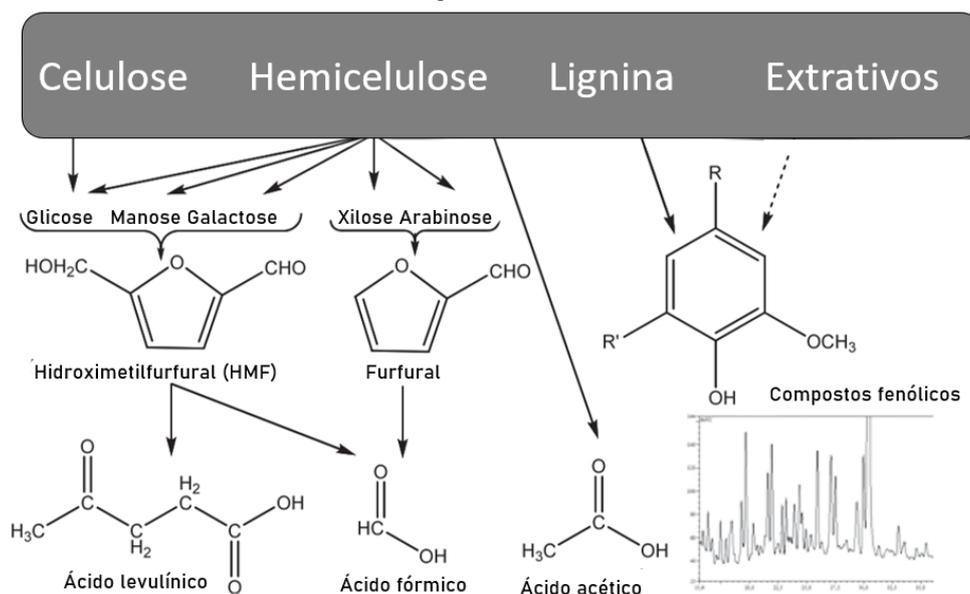
A geração de sub-produtos durante a etapa de pré-tratamento está relacionada com o tipo de material e também o tipo e severidade do pré-tratamento aplicado. As substâncias que podem inibir o metabolismo microbiano englobam compostos fenólicos e outros aromáticos, ácidos alifáticos, aldeídos de furano, íons inorgânicos, bioalcoóis, entre outros (JÖNSSON, ALRIKSSON and NILVEBRANT, 2013).

Um grande número de compostos fenólicos é formado a partir de lignina durante o pré-tratamento da lignocelulose ou da hidrólise catalisada por ácido. Parte da lignina se precipita em forma de um resíduo sólido, ao passo que uma parte da mesma ainda é degradada a compostos fenólicos, como vanilina, siringaldeído, ácido ferúlico, ácido vanílico, guaicol e outros compostos aromáticos, como mostra a Fig.3.3. Ácidos carboxílicos formados durante o pré-tratamento também contribuem para a formação de um ambiente reacional ácido (JÖNSSON, ALRIKSSON and NILVEBRANT, 2013). Os efeitos dos compostos fenólicos e outros compostos aromáticos, que podem inibir o crescimento microbiano e afetar o rendimento em produtos, são bastante variáveis e podem estar relacionados a grupos funcionais específicos (LARSSON et al., 2000).

Ácidos alifáticos, como ácido acético, ácido fórmico e levulínico também podem estar presentes em hidrolisados lignocelulósicos. O ácido acético é formado primariamente pela hidrólise de grupos acetila da hemicelulose, enquanto ácido fórmico e levulínico surgem como produtos de degradação termoquímica catalisada por ácido a partir de polissacarídeos. O ácido fórmico é produto da degradação de furfural e HMF, enquanto o ácido levulínico é formado pela degradação de HMF (Fig. 3) (ULBRICHT, 1984). Ácidos não dissociados se difundem pela membrana celular e posteriormente se dissociam devido ao pH citosólico neutro, levando a um aumento do pH intracelular, o que pode levar à morte celular (BELLISSIMI et al., 2009).

Aldeídos de furano, como furfural e HMF, comumente presentes em hidrolisados hemicelulósicos, são formados pela desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente. Ambos os compostos são responsáveis por inibir o crescimento e reduzir rendimento e produtividade em etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Figura 3.3 : Esquema indicando as rotas principais de formação de inibidores e o composto do qual derivam.



Fonte: Adaptado de Jönsson; Alriksson e Nilvebrant (2013)

3.5 Hidrólise enzimática

A hidrólise, na qual a celulose e a hemicelulose são convertidas a monômeros simples, é uma etapa crítica para a produção de etanol 2G. Em comparação com a hidrólise ácida, a hidrólise enzimática apresenta menor demanda por energia por ser realizada em condições amenas de temperatura e pressão (FERREIRA et al., 2009). As condições ótimas para aplicação de celulasas e hemicelulasas consistem em temperatura entre 40 e 50 °C e pH entre 4 e 5 (SUN; CHENG, 2002). Apesar das vantagens da hidrólise enzimática, como baixa toxicidade aos microrganismos a serem utilizados na etapa de fermentação, baixa corrosão de equipamentos em comparação à hidrólise ácida ou alcalina, a demanda por enzimas de alta especificidade, que apresentam alto valor agregado, eleva o custo do processo como um todo (PANDIYAN et al., 2019).

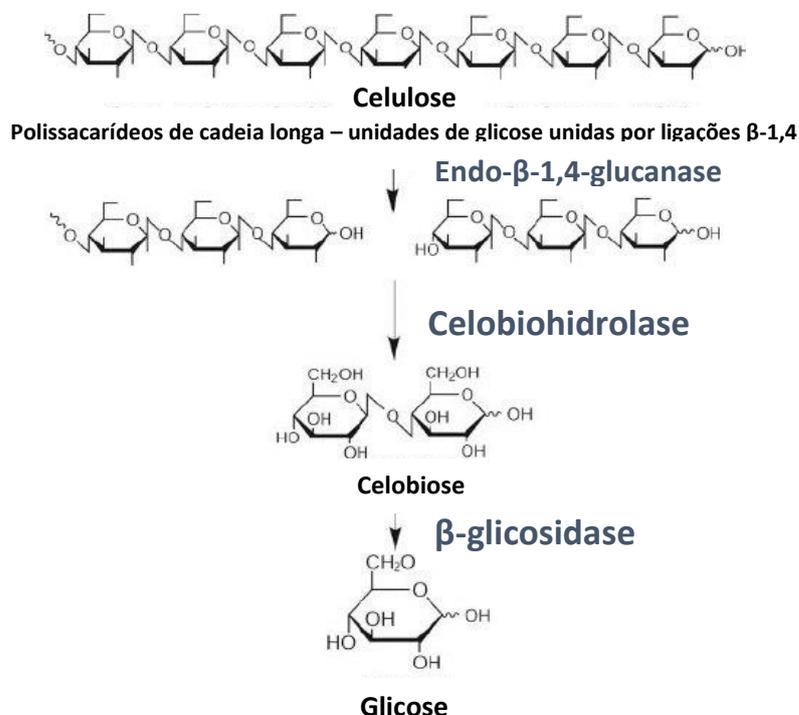
A hidrólise da celulose requer um complexo enzimático de celulasas composto por quatro enzimas, sendo elas, endoglucanase (EG), celobiohidrolase I e II (CHB) e β -glicosidade (BGL). A hidrólise da hemicelulose, por sua vez, demanda duas enzimas

principais, xilanase (XYL) e β -xilosidase (BXL), porém, para atingir a hidrólise completa, múltiplas enzimas auxiliares são necessárias para hidrolisar diversas cadeias laterais da xilana, como acetil xilana esterases (AXE) (CLAES et al., 2020).

As β -1,4-endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) são utilizadas no processo de despolimerização da celulose, sendo uma das enzimas primárias necessárias para a desconstrução desse polímero. Esta enzima rompe, randomicamente, ligações internas β -1,4 da celulose, produzindo assim oligossacarídeos ou unidades menores de polissacarídeos. Por outro lado, as exoglucanases liberam celobiose ou glicose a partir de extremidades não redutoras do polímero de celulose. Ambas, endoglucanase e exoglucanase são inibidas pelos seus produtos, de modo que outras enzimas são essenciais para a completa hidrólise do oligossacarídeo e da celobiose em glicose (LEE et al., 2016).

As celobiohidrolases (E.C. 3.2.1.91) hidrolisam as extremidades das cadeias de celulose e liberam celobiose, molécula formada por duas unidades de glicose. Existem pelo menos dois tipos de celobiohidrolases, I e II, que atacam as extremidades redutoras e não redutoras das cadeias de celulose, respectivamente (VÄLJAMÄE et al., 1998). A Fig. 3.4 mostra um esquema do mecanismo das celulases na cadeia de celulose.

Figura 3.4 Representação esquemática da ação das celulases sobre a celulose



Fonte: Xie e colaboradores (2007)

A hidrólise da xilana, por sua vez, também requer a ação de diversas enzimas para que seja completa. As endo- β -1,4-xilanases (E.C. 3.2.1.8) são responsáveis pela hidrólise de ligações β -1,4 na xilana, o principal componente da hemicelulose, de modo que são cruciais para a conversão da hemicelulose a moléculas de xilose. Elas clivam aleatoriamente ligações glicosídicas entre as unidades de xilose, formando xilooligômeros no início do processo de hidrólise, os quais são hidrolisados a xilooligossacarídeos, que são oligômeros de xilose de baixo grau de polimerização (2-7 unidades de xilose) ao longo do processo (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

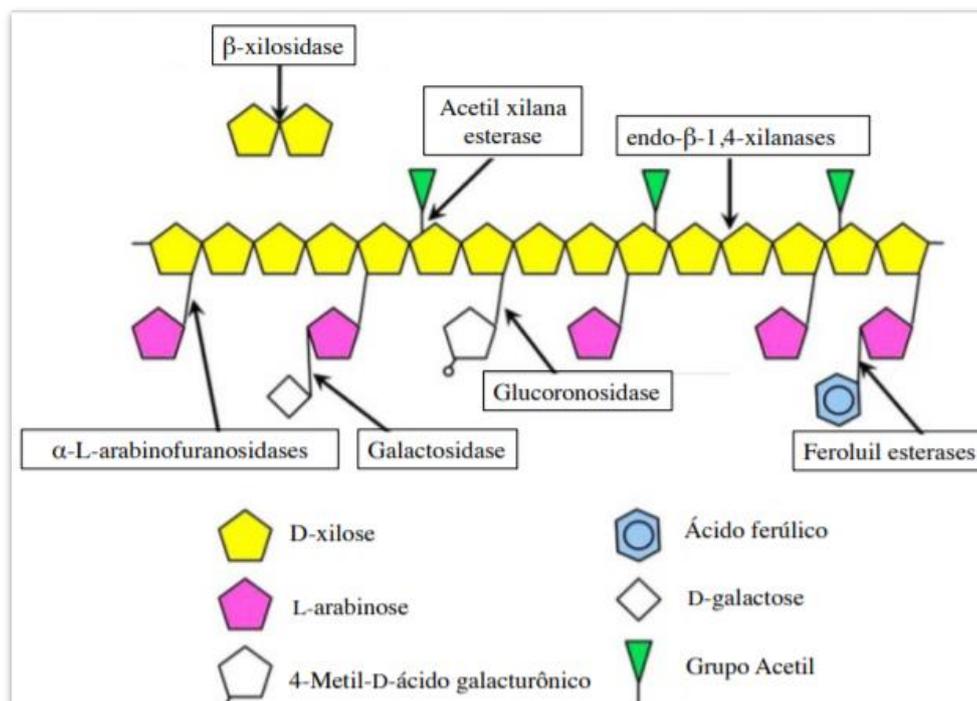
As β -xilosidades (E.C. 3.2.1.37) começam a atuar depois que a xilana já sofreu uma série de hidrólises pela ação das xilanases, sendo capazes de hidrolisar oligômeros curtos, cuja presença poderia inibir a endoxilanase, contribuindo para aumentar a eficiência da hidrólise da xilana (DODD; CANN, 2009). Além disso, essa enzima hidrolisa preferencialmente xilobiose (equivalente a duas unidades de xilose) (SUNNA; ANTRANIKIAN, 1997).

As acetil xilana esterases (E.C. 3.1.1.72) desempenham um importante papel na hidrólise da xilana, uma vez que os grupos acetila podem interferir na aproximação das enzimas, de modo que a eliminação desses grupos facilita a ação das endoxilanases (POLIZELI et al., 2005).

A Fig. 3.5 ilustra esquematicamente o funcionamento das enzimas xilanolíticas para desconstrução da xilana a monômeros de xilose.

Primeiramente as xilanases, acetil xilana esterases e enzimas auxiliares trabalham juntas para produzir XOS de cadeia curta, com liberação de ácido acético e ferúlico (subprodutos). Em seguida as arabinofuranosidases e glucuronidases, que são enzimas auxiliares, liberam arabinose e ácido glucurônico a partir dos XOS. Posteriormente as β -xilosidades convertem os XOS em seus açúcares constituintes, moléculas de xilose. Os microrganismos fermentadores de xilose transportam a mesma para a via das pentoses fosfato para subsequente fermentação e produção de biocombustíveis (DODD; CANN, 2009).

Figura 3.5 Mecanismo de ação das enzimas necessárias para hidrólise total da xilana



Fonte: Adaptado de Ratanakhanokchai e colaboradores (2013)

3.6 *S. cerevisiae* recombinantes fermentadoras de xilose

Desenvolver um processo fermentativo robusto é imprescindível para a produção competitiva de etanol partir de biomassa vegetal (ZHANG et al., 2019a). Apesar da glicose proveniente da celulose ser o componente principal da biomassa lignocelulósica, a mesma pode conter até 40% de hemicelulose (MISHRA; GHOSH, 2019), composta majoritariamente por xilana, formada por unidades de xilose. Assim, para que a produção de etanol seja economicamente competitiva, a fermentação de ambas as moléculas de açúcares derivadas da biomassa é mandatória.

Saccharomyces cerevisiae é a levedura mais utilizada em processos industriais de produção de etanol de primeira geração, apresentando rápido crescimento, elevada produtividade e alta tolerância a etanol (MATSUSHIKA; INOUE, 2009). Apesar das vantagens associadas à utilização de *S. cerevisiae*, a mesma não é capaz de fermentar a xilose, dificultando sua utilização em processos de produção de etanol 2G (GÍRIO et al., 2010; MATSUSHIKA; INOUE, 2009). Algumas cepas de leveduras selvagens possuem a capacidade de fermentar naturalmente xilose a etanol, como *Scheffersomyces* (*Pichia*) e *Candida* (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007; SLININGER et al., 1982), porém a produtividade e o rendimento em produto a partir de xilose são consideravelmente

baixos em comparação com a fermentação de glicose. Além disso, em alguns casos, é necessário manter condições de cultivo microaerófilas cuidadosamente controladas, gerando custos adicionais e aumentando a complexidade do processo (SKOOG; HAHN-HÄGERDAL, 1990).

Nesse contexto, várias pesquisas têm sido realizadas para gerar linhagens de *S. cerevisiae* capazes de assimilar xilose (DEMEKE et al., 2013a; DOS SANTOS et al., 2016; GONÇALVES et al., 2014; HECTOR et al., 2013; JO et al., 2016; VERHOEVEN et al., 2017). Dentre as modificações presentes nas linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes desenvolvidas a partir de diferentes estratégias (MISKOVIC et al., 2017), destaca-se a introdução da enzima xilose isomerase (XI) em *S. cerevisiae* (DEMEKE et al., 2013b, 2013a; DOS SANTOS et al., 2016; MISKOVIC et al., 2017; VERHOEVEN et al., 2017; WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015), que viabiliza a isomerização direta da xilose a xilulose em uma única etapa. Além das técnicas de Biologia Molecular, a Engenharia Evolutiva também foi empregada para a obtenção de linhagens que consomem xilose mais eficientemente em condições anaeróbias (DEMEKE et al., 2013b; DOS SANTOS et al., 2016; WASYLENKO; STEPHANOPOULOS, 2015).

Os avanços alcançados nos últimos anos foram significativos, de modo que foram reportados diversos trabalhos utilizando linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* capazes de fermentar misturas de glicose e xilose com elevada produção de etanol, conversão completa de açúcares e formação insignificante de subprodutos, como xilitol e glicerol. Demeke e colaboradores (2013b) utilizaram a levedura industrial *Ethanol red* para construir a linhagem de levedura *S. cerevisiae* GS1.11-26, capaz de fermentar xilose e glicose. A fermentação de 36 g/L de glicose e 37 g/L de xilose em meio YP ocorreu durante 13 horas e alcançou produtividade de 2,4 g/L/h em etanol e rendimento próximo do teórico. dos Santos e colaboradores (2016) utilizaram linhagens recombinantes derivadas da levedura industrial PE-2 e produziram 23 g/L de etanol a partir de 50 g/L de xilose, apresentando produtividade em etanol de 1,25 g/L/h. Zhu e colaboradores (2021) modificaram uma cepa industrial de *S. cerevisiae* para fermentar 50 g/L de xilose, produzindo mais de 16 g/L de etanol com formação de xilitol abaixo de 3 g/L. Liu e colaboradores (2021) realizaram uma série de mutações na cepa *S. cerevisiae* F106 e notaram que o número de cópias de cromossomos está positivamente correlacionado com o rendimento em etanol, de modo que os melhores resultados foram

obtidos com a cepa triplóide em hidrolisado de palha de milho, 7 vezes maior que o rendimento da cepa diplóide.

Como descrito acima, modificações genéticas têm sido amplamente aplicadas aos organismos no contexto de produção de etanol 2G, sendo consideradas ótimas alternativas para melhorar as características e o desempenho dos mesmos para determinadas finalidades, como consumo de um substrato específico para produção eficiente dos produtos de interesse. Apesar dos grandes avanços realizados nessa área, algumas dificuldades tecnológicas ainda necessitam ser contornadas, de modo a viabilizar a produção eficiente de etanol 2G, tais como a operação de reatores com elevada carga de levedura, elevada produtividade em etanol e a utilização eficiente de hidrolisados ou produtos de pré-tratamento obtidos a partir de resíduos lignocelulósicos.

Além das técnicas de engenharia evolutiva para obtenção de cepas recombinantes robustas, é possível utilizar técnicas de destoxificação do meio hidrolisado, bem como de imobilização de células, o que pode contribuir para melhorar o desempenho de processos fermentativos nos quais os microrganismos são expostos a componentes inibitórios (JUDIT KRISCH; AND BÉLA SZAJÁNI, 1997; KEWELOH; HEIPIEPER; REHM, 1989; MILESSI et al., 2020a, 2020c; NAJAFPOUR et al., 2004). A literatura ainda relata que modificações na composição do meio de cultivo ou nas condições de cultivo, podem contribuir para melhorar a resistência de células à presença de etanol.

3.7 Configurações de processos de hidrólise enzimática e fermentação

Existem algumas configurações de processo já estabelecidas para a hidrólise da biomassa lignocelulósica e sua posterior fermentação visando à produção econômica de etanol 2G, como mostra a Fig. 3.6. A hidrólise seguida de fermentação (SHF) envolve duas etapas separadas, uma de hidrólise enzimática através da adição de enzimas, seguida por outra etapa de fermentação. A sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) consiste em um processo no qual os açúcares liberados a partir da celulose por hidrólise enzimática são consumidos simultaneamente na fermentação (PAULOVA et al., 2015). A sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF) combinam SSF à fermentação cooperativa de pentoses e hexoses; a SHIF combina as etapas de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas, enquanto o bioprocessamento consolidado (BPC) de matérias primas lignocelulósicas (LEE et al., 2017) reúne a combinação das

etapas de produção de enzimas, hidrólise e fermentação de hexoses e pentoses, envolvendo apenas um microrganismo ou consórcio (LYND et al., 2005).

Figura 3.6 Configurações de bioprocessos disponíveis para conversão de biomassa lignocelulósica a produtos



Fonte: Adaptado de Parisutham; Kim; Lee (2014)

3.7.1 Bioprocessamento Consolidado (BPC)

O BPC é um processo que resulta em custo reduzido em comparação com as outras configurações de processo, uma vez que todas as etapas ocorrem em um único reator (PARISUTHAM; KIM; LEE, 2014). Além disso, em casos onde as enzimas são produzidas pelo microrganismo utilizado, o processo não incorpora os custos relacionados com a produção ou aquisição das mesmas (LYND et al., 2005). Um microrganismo ideal para aplicação em BPC deve ser capaz de hidrolisar a biomassa de maneira eficiente e completa, utilizar todos os açúcares liberados (hexoses e pentoses) e gerar produtos com rendimento, concentração e produtividade elevados. Deve ainda demandar suplementação mínima de nutrientes (HUANG; ANDERSON; CLUBB, 2014), apresentar robustez e tolerância a etanol e inibidores, de modo que seja capaz de fermentar de maneira eficiente meios formulados a partir de hidrolisados lignocelulósicos industriais, por exemplo (DEPARIS et al., 2017b).

A maior desvantagem do BPC é que a sacarificação e a fermentação são realizadas na temperatura ótima requerida pelo microrganismo. No entanto, a temperatura ótima das enzimas é geralmente mais elevada (LYND et al., 2005), de modo que dificilmente o processo ocorre nas condições ótimas em todas as suas etapas.

Além disso, a complexidade do processo requer a utilização de um microrganismo capaz de secretar diversas enzimas lignocelulolíticas, tornando-se uma tarefa bastante desafiadora para a engenharia genética.

Alguns estudos reportam a expressão de enzimas lignocelulolíticas em cepas de *S. cerevisiae* de laboratório. Van Rensburg e colaboradores (1998) modificaram a cepa *S. cerevisiae* Y294[pECCB] para expressar β -glicosidase, endo- β -1,4-glucanase, celobiohidrolase e celodextrinase, tornando-a capaz de hidrolisar diversos substratos celulósicos. Den Haan e colaboradores (2007) obtiveram atividade extracelular de endoglucanase e β -glicosidase para hidrolisar celulose amorfa na linhagem Y294[CEL5]. Fujita e colaboradores (2004) co-expressaram β -glicosidase e endoglucanase na superfície celular de *S. cerevisiae* MT8-1/pBG211/pEG23u31H6/pFCBH2w3, permitindo a hidrólise de β -glucana. Xilana *birchwood* foi hidrolisada a xilose através da expressão de β -xilosidase e endoxilanase em *S. cerevisiae* MT8-1/pBG211/pEG23u31H6 e Y294 (XYN2 XLO1) (FUJITA et al., 2004; LA GRANGE et al., 2001). Por outro lado, a capacidade de expressão de enzimas em cepas industriais de *S. cerevisiae* é raramente citada em literatura. Favaro e colaboradores (2015) viabilizaram a utilização de amido através da secreção de amilases na linhagem *S. cerevisiae* M2n[TLG1-SFA1], ao passo que Khrastov e colaboradores (2011) introduziram a capacidade de secretar celulasas em *S. cerevisiae* 590.E1 promovendo a produção de etanol a partir de celulose.

Apesar dos avanços nas áreas de engenharia genética, metabólica e biologia molecular, apenas recentemente foi reportado o desenvolvimento de uma cepa industrial fermentadora de xilose e capaz de produzir etanol 2G pela expressão simultânea de um conjunto de enzimas-chave para a hidrólise de substratos lignocelulósicos, com eficiente utilização de xilose e glicose. Claes e colaboradores (2020) criaram a cepa *S. cerevisiae* AC14, capaz de expressar simultaneamente sete enzimas lignocelulolíticas: endoglucanase, β -glicosidase, celobiohidrolase I e II, β -xilosidase e acetil xilano esterase. A cepa AC14 apresentou resultados promissores em múltiplos substratos sendo, até o momento, a primeira levedura capaz de secretar este *pool* de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. Desta forma, representa um grande avanço na área de produção de biocombustíveis e tem potencial como plataforma para desenvolvimento de processos econômicos de produção de etanol utilizando substratos lignocelulósicos.

3.8 Imobilização de células

O tipo de levedura utilizada e sua concentração celular são os principais fatores que determinam a capacidade de produção e tolerância a etanol na etapa de fermentação. A utilização de leveduras em sua forma imobilizada oferece diversas vantagens, como a utilização de células contínua ou repetidamente, possibilitando ainda o uso de elevadas densidades celulares nos cultivos e facilitando a recuperação e separação de produtos (AGNIHOTRY et al., 2017; ZHAO et al., 2016). Além disso, a imobilização de células é um recurso promissor para aumentar a produtividade em etanol, bem como a eficiência dos processos (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019; SINGH et al., 2013; COHEN, 2001).

Vários estudos relatam melhoria no desempenho de processos utilizando células imobilizadas em comparação com células livres, uma vez que apresentam maior tolerância a etanol e inibidores presentes em meios fermentativos compostos por hidrolisados lignocelulósicos (CHANDEL et al., 2009; MILESSI et al., 2020a; SINGH et al., 2013).

A imobilização das células pode ocorrer de maneira natural, por meio de interações eletrostáticas, como a formação de biofilmes ou adesão microbiana em suportes sintéticos ou naturais. Por outro lado, a imobilização celular também pode ser realizada de maneira artificial, por meio de ligações covalentes ou pela encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou agentes ligantes (COVIZZI et al., 2007). Os métodos para imobilização celular podem ser divididos em: ligação a superfícies, auto-agregação, contenção por barreiras e aprisionamento em matrizes porosas, conforme mostra a Fig. 3.7.

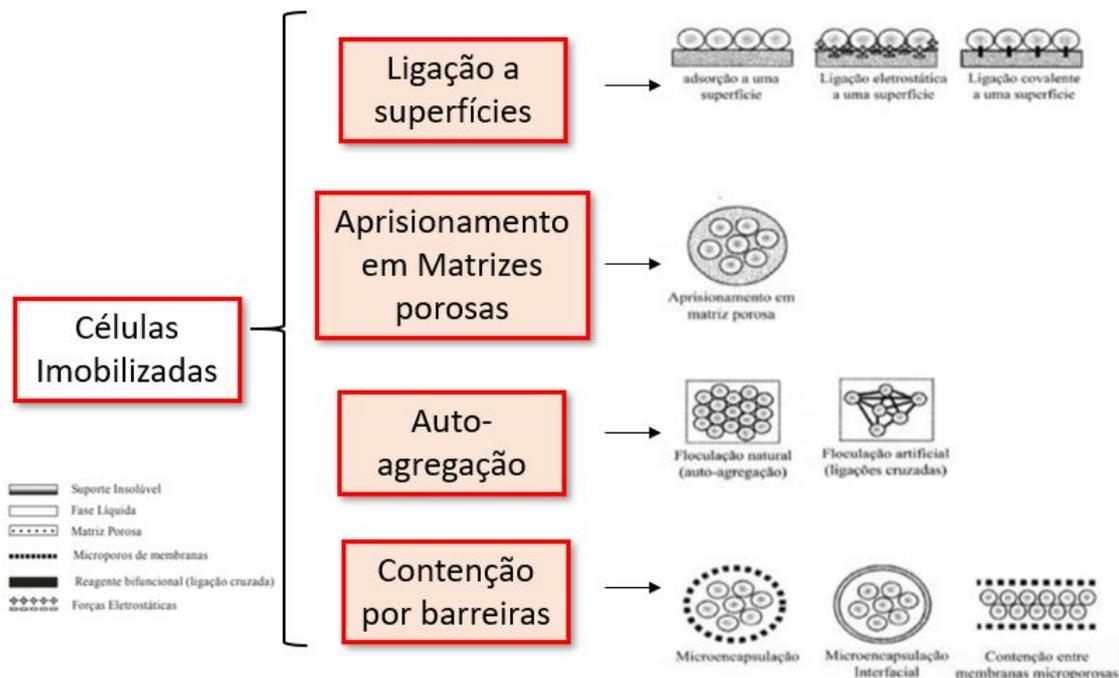
O método de imobilização na superfície do suporte apresenta o menor custo operacional, porém apresenta como desvantagem a perda de biomassa microbiana e consequente equilíbrio entre células livres e imobilizadas no sistema, pela falta de uma barreira física de contenção celular. Os materiais mais utilizados como suporte são celulósicos e inorgânicos (COVIZZI et al., 2007).

A tendência de formação de agregados celulares em suspensão é conhecida como floculação, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes flocculantes ou ligantes (KOURKOUTAS et al., 2004).

A técnica de contenção por barreiras (ou contenção em membranas) é baseada no aprisionamento de células *in situ* ou na interface entre dois líquidos imiscíveis.

Apresenta como desvantagem a limitação de transferência de massa devido a possibilidade das células se fixarem no suporte devido ao crescimento microbiano (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2006).

Figura 3.7 Diferentes métodos de imobilização celular



Fonte: Adaptado de Milessi (2012)

O método de aprisionamento em matrizes porosas é baseado na difusão artificial das células microbianas em um complexo molecular rígido ou semi-rígido, sendo a matriz pré-formada ou sintetizada *in situ*. A matriz celular formada permite que ocorra transferência de gases e de massa (mesmo que limitada) durante o processo fermentativo, impedindo a difusão de células para o meio de cultivo (NEDOVIĆ; WILLAERT, 2006). A escolha da matriz mais adequada para a imobilização deve ser realizada de acordo com o produto desejado, bem como o microrganismo e metabólitos estudados (PETRE et al., 1999). Além disso, a porosidade, grau de hidrofobicidade e o tamanho do poro interferem na intensidade de adesão celular (SILVA et al., 2006). De acordo com Kumar, Gosh e Pal (2019), a imobilização de células em matrizes de gel oferece várias vantagens, como melhor estabilidade celular; aumento do limite de tolerância para condições de estresse, como altas concentrações de substrato e produto. Além disso, a formação de subprodutos tem sido reduzida em fermentações com células

imobilizadas, levando a rendimento e pureza superiores aos observados para células suspensas.

3.9 Modos de operação de reatores de leito fixo para produção de etanol 2G

O projeto de biorreatores para produção de etanol 2G e sua aplicação utilizando células imobilizadas pode envolver diversas configurações, como reatores tipo tanque agitado, reatores de leito fixo (CANABARRO et al., 2017), de leito fluidizado, pneumáticos ou biorreatores de membrana, apresentando diversas vantagens sobre a operação de reatores utilizando células livres, como tempos de residência curtos e possibilidade de uso de altas cargas de células. A estabilidade prolongada, a seletividade da reação, o aumento do rendimento em produto e a simplificação do processo de *downstream* são outras características vantajosas dos biorreatores utilizando células imobilizadas (NEMATI; WEBB, 2011).

Devido à sua disponibilidade comercial, os reatores tipo tanque agitado têm sido largamente utilizados em escala laboratorial (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019). Ercan, Irfan e Mustafa (2013) produziram etanol a partir de extrato de alfarroba com o uso de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em um biorreator tanque agitado. Quando utilizaram 2% de alginato de cálcio para imobilizar as células, obtiveram valores de concentração, rendimento e produtividade em etanol equivalentes a 40,10 g/L, 46,23%, 3,19 g/L/h, respectivamente e 90,66% de conversão de açúcares. Em outro estudo, a cepa de levedura auto-floculante KF-7 foi usada para a fermentação contínua de açúcares derivados de melaço para produção de etanol em um reator tanque agitado. Os autores operaram o processo por mais de um mês e alcançaram até 87% do rendimento teórico em etanol e 6,6 g/L/h de produtividade (TANG et al., 2010). Apesar dos bons resultados já obtidos, é preciso cautela ao utilizar esse tipo de reator para cultivo com células imobilizadas, uma vez que, quando utilizadas altas taxas de agitação, as micropartículas podem ser fragmentadas pelo cisalhamento promovido pelos impelidores (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019).

Os reatores de leito empacotado consistem em uma coluna preenchida com o material imobilizado. O meio de cultivo pode ser adicionado ou alimentado à coluna e retirado continuamente ou ao final da fermentação, de forma que podem ser operados em batelada ou batelada repetida (com recirculação ou não do meio fermentado) ou no modo contínuo (com alimentação de meio fresco e retirada do meio fermentado,

continuamente). Quando o material imobilizado fica confinado em um determinado volume do reator e com movimentação restrita, configura-se o reator de leito fixo. Já quando o material imobilizado é deslocado pela corrente ascendente de meio, movimentando-se livremente no volume de confinamento, tem-se o reator de leito fluidizado. Esse tipo de biorreator é bastante utilizado em processos que envolvem reações de inibição por produto, como é o caso da produção de etanol. As vantagens do uso do biorreator de leito fluidizado consistem em facilidade de operação e altas taxas de reação. As células imobilizadas têm elevada área superficial específica para interação sólido-líquido e, ao contrário dos sistemas utilizando células livres, elevadas densidades celulares podem ser aplicadas (KARAGOZ, BILL e OZKAN, 2019).

Reatores de leito empacotado têm sido usados para produzir etanol em sistemas contínuos usando células imobilizadas em gel de alginato de cálcio. Nigam, Mandal e Singh (2015) utilizaram células de *Clavispora opuntiae* imobilizadas em alginato para produzir etanol a partir de xilose utilizando um reator de leito empacotado operado em modo contínuo. O rendimento máximo em etanol foi de 0,462 g_{etanol}/g_{xilose} obtido a uma taxa de diluição de 0,09 h⁻¹. A produtividade máxima em etanol obtida foi de 3,1 g/L/h a uma taxa de diluição de 0,31 h⁻¹. O reator foi operado por 45 dias sem nenhuma perda viabilidade celular.

Milessi (2021) utilizou um reator de leito fixo em modo contínuo e *beads* de alginato de cálcio contendo células da levedura *S. cerevisiae* HAA1 para produção de etanol a partir de 80 g/L de xilose. Após a suplementação do meio com nutrientes (peptona e extrato de levedura) e a realização de lavagens programadas no reator, foi possível operá-lo por até 15 dias com produtividade aproximada de 5 g/L/h de etanol (PEREZ et al., 2021).

Dessa forma, dados os resultados obtidos em reator de leito empacotado utilizando células imobilizadas e as vantagens relacionadas à operação do mesmo, este biorreator se destaca como promissor na utilização em bioprocessos para produção de etanol 2G.

Capítulo 4 MATERIAIS E MÉTODOS GERAIS

Os procedimentos descritos a seguir foram similares em todas as etapas do presente trabalho de doutorado, independente da linhagem de levedura utilizada. As composições dos meios fermentativos variam de acordo com estudo realizado, e estão descritas nos respectivos capítulos.

4.1 Pré inóculo e inóculo

Inicialmente, uma alçada da cultura estoque foi estriada em meio sólido YPDX 2%, composto por 10 g/L de xilose, 10 g/L de glicose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, suplementado com 15 g/L de ágar. As placas foram incubadas a 35 °C e os pré-inóculos foram produzidos através da adição de uma colônia em 30 mL de YPDX 2% e 1mg/mL de ampicilina e deixados em incubadora a 200 rpm e 30°C, com acompanhamento da densidade ótica (DO). Os inóculos foram preparados em frascos de 1L, nos quais 10 mL dos pré-inóculos contendo células na fase exponencial de crescimento foram transferidos para frascos Enlenmeyer de 1 L contendo 250 mL de YPDX 2% e 1mg/mL de ampicilina, sendo os frascos mantidos a 30°C e 200 rpm pelo tempo necessário até atingirem DO necessária para imobilização (ainda na fase exponencial de crescimento celular). As células foram recuperadas por centrifugação (4500 rpm por 20 min) e utilizadas em sua forma livre ou imobilizada.

4.2 Imobilização

A imobilização foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Milesi e colaboradores (2020a). A suspensão de biomassa concentrada obtida após a centrifugação foi adicionada na proporção de 10 % (m/m) a uma solução contendo alginato de sódio (concentração final de 1% m/m). A suspensão contendo células e alginato foi gotejada em solução de coagulação (CaCl_2 0,25M e MgCl_2 0,25M), conforme descrito por Silva (2013), de modo a se formarem os *beads*. Ao final da imobilização, as microcápsulas foram recolhidas por peneiramento e mantidas a 5 °C por pelo menos 12 h em meio contendo peptona e extrato de levedura (solução de cura).

4.3 Meios fermentativos

4.3.1 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado (HB)

O hidrolisado de hemicelulose bruto foi produzido pela equipe do Prof. Dr. Júlio César dos Santos e do Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva no Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena/USP a partir de bagaço de cana-de-açúcar, gentilmente doado pela Ipiranga Agroindustrial (Descalvado, SP). Foi empregado o pré-tratamento por hidrólise ácida em reator de 200 litros de capacidade. O bagaço foi misturado com H_2SO_4 (98% de pureza) na proporção de 100 mg de H_2SO_4 /g de bagaço seco por 20 minutos a 121 °C utilizando razão de 1:10 de sólido/líquido (ANTUNES et al., 2015).

4.3.2 Preparo do hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado (HC)

A produção do hidrolisado concentrado também foi realizada pela equipe do Prof. Dr. Júlio César dos Santos e do Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena/USP, que também integram a equipe de pesquisadores do projeto temático FAPESP ao qual este trabalho está inserido. Para isso, ao final da reação de hidrólise descrita no item 4.3.1, a fração líquida assim obtida foi separada da fração sólida e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a 70 °C (ANTUNES et al., 2019). Para a obtenção do hidrolisado bruto concentrado (HC) utilizado nos experimentos, o hidrolisado concentrado cedido pela EEL/USP foi submetido à correção de pH até 5,6 ou 5,2 através da adição de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e posterior filtração para remoção do precipitado e obtenção da fração líquida isenta de sólidos insolúveis, de acordo com procedimento descrito por Silva (2013). O condicionamento do HC foi realizado nos laboratórios do Centro de Processos Catalíticos e Biotecnológicos (CPCB) do Departamento de Engenharia Química/UFSCar.

4.3.3 Preparo do hidrolisado destoxificado (HD)

O hidrolisado destoxificado foi obtido após submeter o hidrolisado de hemicelulose concentrado (item 4.3.2) a uma etapa de destoxificação realizada através do aumento do pH do meio até 10 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e filtração do mesmo. Em seguida, o pH do meio foi reduzido a 5,5 através de adição de ácido fosfórico e filtrado novamente. À solução resultante foi adicionado carvão ativado 3% (m/v) e a mesma foi mantida em *shaker* sob agitação de 200 rpm a 30 °C, durante 1 hora. Após nova filtração da suspensão, a

mesma foi autoclavada a 111 °C, 0,5 atm, por 15 minutos (ALVES et al., 1998). O meio foi ainda esterilizado por filtração em membrana estéril (0,22 µm) antes da utilização como meio de cultivo.

4.3.4 Preparo do hidrolisado hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em reator de alta pressão Parr modelo 4848 com capacidade de 2L, munido de controle de agitação mecânica e aquecimento, no CPCB/UFSCar. O pré-tratamento foi realizado a 195 °C por 10 min utilizando relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) (DOS SANTOS ROCHA et al., 2017). Ao final do processo, o bagaço foi filtrado ainda quente para evitar a precipitação da lignina solubilizada. A fração líquida obtida foi caracterizada e será chamada licor hidrotérmico (LH), ao passo que a fração sólida será chamada de bagaço tratado hidrotérmicamente (BTH). As frações LH e BTH foram utilizadas nos estudos de BPC (Capítulo 7).

4.3.5 Preparo e caracterização dos meios de cultivo

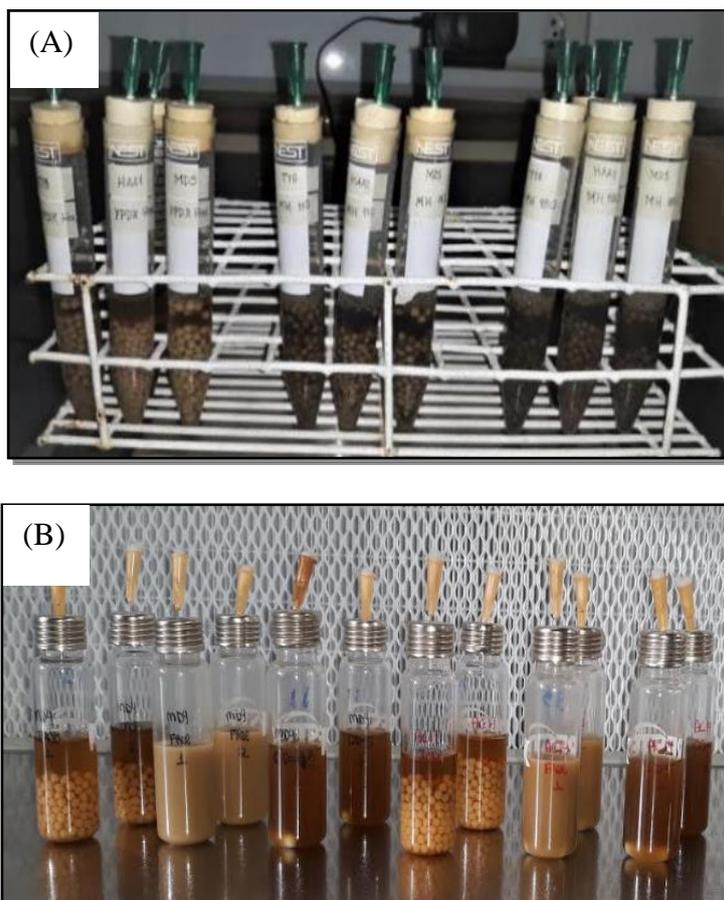
Os experimentos foram realizados em diferentes meios fermentativos elaborados com hidrolisado de hemicelulose bruto não concentrado (HB), hidrolisado de hemicelulose bruto concentrado (HC), hidrolisado destoxificado (HD) e melaço (M), sendo este último gentilmente cedido pela Ipiranga Agroindustrial (Descalvado, SP). Os hidrolisados foram preparados conforme descrito nos itens 4.3.1. a 4.3.3. Experimentos de referência foram realizados utilizando meio YPDX, com concentração de glicose e xilose semelhantes à dos hidrolisados, contendo ainda peptona (40 g/L) e extrato de levedura (20 g/L). O mesmo vale para o meio YPXDHB, composto por hidrolisado hemicelulósico bruto (não concentrado) e suplementado com YPX, que será melhor detalhado no Capítulo 6. Todos os meios hidrolisados utilizados no presente trabalho foram suplementados com ampicilina (1mg/mL) e CaCl₂ (4 g/L). A adição do antibiótico foi realizada para prevenir contaminações, já que as fermentações foram conduzidas em condições não assépticas, reproduzindo o ambiente industrial. Já a suplementação do meio com CaCl₂ é importante para manter a integridade dos *beads*.

As composições dos meios em termos de açúcares e subprodutos foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e variam de acordo com suas aplicações. As composições dos meios estão indicadas nos respectivos capítulos desta tese.

4.4 Ensaios fermentativos e reciclos de células em mini-reatores

Grande parte dos ensaios fermentativos apresentados nos capítulos 5, 6 e 7 da presente tese foram realizados em mini-reatores de 15 mL com 6 ou 8 mL de volume reacional, a depender do ensaio (Fig. 4.1A), contendo partes iguais de meio e de células imobilizadas (ou de suspensão concentrada de células livres). Parte dos ensaios apresentados no capítulo 7 foram os únicos realizados em frascos distintos, uma vez que foram experimentos conduzidos no laboratório de Biologia Molecular da KU-Leuven (Bélgica). Nesses casos, os mini-reatores eram de 15 mL, com 10 mL de volume reacional (Fig. 4.1B), contendo 5 mL de meio fermentativo e 5mL de células (livres ou imobilizadas). Nos capítulos 5 e 6, os experimentos em mini-reatores foram conduzidos em batelada repetida e em batelada simples no capítulo 7.

Figura 4.1 (A) Mini-reatores utilizados para as fermentações com levedura recombinante imobilizada nos experimentos realizados no LaFaC – UFSCar e (B) Mini-reatores utilizados para as fermentações com levedura recombinante nos experimentos realizados no Laboratório de Biologia Molecular – KU-Leuven



Fonte: Arquivo pessoal da autora

As fermentações foram acompanhadas a partir de produção de CO₂, determinados pela perda de massa dos mini-reatores (MESQUITA et al., 2021; MILESSI et al., 2020a). Durante o processo fermentativo, foram feitas medidas de massa dos mini-reatores periodicamente em balança analítica, visando acompanhar a diminuição da mesma devido à liberação do gás carbônico gerado no processo. Como a pressão externa é aproximadamente constante e a interna aumenta à medida que o CO₂ é produzido, somente gases de dentro do mini-reator são expelidos. Para a fermentação alcoólica por *S. cerevisiae*, o gás carbônico é o único gás produzido durante o processo e ocorre em proporção estequiométrica com a formação de etanol. A diferença entre a massa inicial e a medida em cada tempo forneceu a massa de gás carbônico liberada, Equação 4.1. Em todos os ensaios, foi incluído um mini-reator extra como controle, contendo o mesmo volume total (sem células imobilizadas), para monitoramento da perda de massa por evaporação e correção da perda de massa total. Esse modo de acompanhamento do processo não exige retirada de amostras e, portanto, apresenta a vantagem de não alterar a condição anaeróbia estabelecida ao longo das fermentações. A estabilização da massa dos frascos indicava o fim de cada ciclo fermentativo, sendo o meio fermentado retirado por separação simples (pipetagem) e novo meio adicionado aos mini-reatores, para a operação com reciclo de células. Ao final de cada batelada, uma amostra de *bead* foi retirada para análise de viabilidade e uma alíquota de meio fermentado foi coletada para análise de açúcares, glicerol, xilitol, etanol e ácido acético por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para início de uma nova batelada, meio fresco era adicionado aos mini-reatores, de modo que os ciclos foram repetidos até a observação de perda de viabilidade das células ou finalização do processo.

$$m_{\text{CO}_2}(\text{g}) = (m_{0\text{exp}} - m_{\text{texp}}) - (m_{0\text{controle}} - m_{\text{tcontrole}}) \quad (4.1)$$

Onde $m_{\text{CO}_2}(\text{g})$ é a massa cumulativa de CO₂ liberada até o tempo da medida, $m_{0\text{exp}}(\text{g})$ é a massa do micro-reator contendo os *beads* e o meio fermentativo no tempo zero, $m_{\text{texp}}(\text{g})$ é a massa do micro-reator contendo os *beads* e o meio fermentativo no tempo da medida, $m_{0\text{controle}}$ é a massa do controle no tempo zero e $m_{\text{tcontrole}}$ é a massa do controle no tempo da medida.

4.5 Métodos Analíticos

4.5.1 Medida da concentração de células

A concentração de células livres (C_x) a ser imobilizada foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g/L) através de curvas de calibração dadas nas equações 4.2-4.6. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada.

$$\text{MDS 130: } C_x \text{ (g/L)} = (0,624 \pm 0,01) \times \text{DO} \quad (4.2)$$

$$\text{HAA1: } C_x \text{ (g/L)} = (0,555 \pm 0,007) \times \text{DO} \quad (4.3)$$

$$\text{T18: } C_x \text{ (g/L)} = (0,49 \pm 0,014) \times \text{DO} \quad (4.4)$$

$$\text{AC14: } C_x \text{ (g/L)} = (0,821 \pm 0,043) \times \text{DO} \quad (4.5)$$

$$\text{MD4: } C_x \text{ (g/L)} = (0,801 \pm 0,052) \times \text{DO} \quad (4.6)$$

DO: Densidade ótica

4.5.2 Medida da concentração de carboidratos, ácidos orgânicos e inibidores

A composição dos meios frescos e das suspensões finais de cada batelada repetida foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os compostos detectados nas análises foram: glicose, xilose, etanol, sacarose, frutose, glicerol, xilitol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Foi utilizado o cromatógrafo Waters Breeze 2 equipado com detectores de índice de refração e UV-visível. A coluna utilizada foi a Sugar-Pak I com fase móvel de Ca-EDTA 50 mg/L em um fluxo de 0,5 mL/min e temperatura de 80°C. Todas as amostras foram congeladas, descongeladas e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi então novamente centrifugado a 10000 rpm por 5 minutos, sendo que amostras contendo hidrolisados hemicelulósicos ou melaço foram ainda filtradas em membranas de 0,22 μm (DEMEKE et al., 2013b) antes de serem diluídas (se necessário) e analisadas no cromatógrafo. Para a determinação dos inibidores furfural e HMF o cromatógrafo Waters Breeze 2, 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 (MILESSI et al., 2020a).

4.5.3 Viabilidade celular

A viabilidade da levedura foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer. Para a análise da viabilidade de células imobilizadas, antes da coloração com azul de metileno, os *beads* foram dissolvidos em citrato de sódio 8% (m/v), na proporção 100 mg de beads por mL de solução sob agitação em vortex e temperatura ambiente. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) presentes em um espaço definido da câmara de contagem (SILVA, 2013). As células contabilizadas como não viáveis apresentaram coloração azul após o tratamento com azul de metileno, ao passo que células viáveis não apresentaram mudança na coloração.

4.6 Definições e procedimentos de cálculo

Para avaliação dos ensaios fermentativos, foram acompanhados os índices de desempenho como produtividade, rendimento em etanol e conversão de substrato consumido. Para fermentações contínuas, além dos procedimentos de cálculos, as definições de tempo de residência, número de tempos de residência e taxa de diluição são detalhadas.

4.6.1. Ensaios em bateladas simples ou repetidas

Produtividade volumétrica em etanol – Q_P (g/L/h)

$$Q_P = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{\Delta t_f} \quad (4.7)$$

Onde:

- C_{Pf} : concentração de etanol ao final das bateladas (g/L),
- C_{Pi} : concentração de etanol no início do processo (g/L),
- Δt_f : tempo de duração de cada batelada repetida até que fosse atingido 96% de conversão de ART (h).

Rendimento em etanol – $Y_{P/S}$ (g_{E1OH}/g_{ART})

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{C_{Si} - C_{Sf}} \quad (4.8)$$

Onde:

- C_{Pf} : concentração de etanol ao final das bateladas (g/L),
- C_{Pi} : concentração de etanol no início do processo (g/L),

- C_{Sf} : concentração de substrato ao final da fermentação (g/L),

- C_{Si} : concentração de substrato no início do processo (g/L).

Conversão de substrato – X %

$$X_{\%} = \frac{C_{Si} - C_{Sf}}{C_{Si}} \times 100 \quad (4.9)$$

Onde:

- C_{Si} : concentração de açúcares totais no tempo inicial da batelada (g/L),

- C_{Sf} : concentração de açúcares totais no caldo fermentado ao final da batelada (g/L),

$X_{\%}$: conversão final de substrato calculada com base nas análises de CLAE (%).

Conversão de substrato em função do tempo - $X_{(t)}$ (%)

$$X_{(t)} = \frac{m_{CO_2(t)}}{m_{CO_2f}} \times X_{\%} \quad (4.10)$$

Onde:

- $m_{CO_2(t)}$: massa de CO_2 liberada no tempo t (g);

- m_{CO_2f} : massa total de CO_2 liberada ao final do processo (g);

4.6.2 Ensaios contínuos

Tempo de residência – τ (h)

$$\tau = \frac{V}{F} \quad (4.11)$$

Onde:

-V: volume do reator (mL),

-F: taxa volumétrica na corrente de entrada entrada (mL/h).

Taxa de diluição – D (1/h)

$$D = \frac{1}{\tau} \quad (4.12)$$

Número de tempos de residência - θ (adimensional)

$$\theta = \frac{t}{\tau} \quad (4.13)$$

Onde:

-t é o tempo de reação (h),

$-\tau$ é o tempo de residência (h).

Conversão de substrato - X (%)

$$X (\%) = \frac{C_{Se} - C_{Ss}}{C_{Se}} \times 100$$

(4.14)

Onde:

- C_{Se} : concentração de substrato na corrente de entrada do reator (g/L),
- C_{Ss} : concentração de substrato na corrente de saída do reator (g/L).

Rendimento em etanol – $Y_{P/S}$ (g_{EiOH}/g_{ART})

$$Y_{P/S} = \frac{C_{Ps}}{C_{Se} - C_{Ss}} \quad (4.15)$$

Onde:

- C_{Ps} : concentração de etanol na corrente de saída do reator (g/L),
- C_{Se} : concentração de substrato na corrente de entrada do reator (g/L),
- C_{Ss} : concentração de substrato na corrente de saída do reator (g/L).

Produtividade volumétrica em etanol – Q_P (g/L/h)

$$Q_P = \frac{C_{Ps}}{\tau}$$

(4.16)

Onde:

- C_{Ps} : concentração de etanol na corrente de saída do reator (g/L),
- τ : tempo de residência (h).

Capítulo 5 PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ETANOL 2G A PARTIR DE XILOSE UTILIZANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO E LEVEDURA RECOMBINANTE SUPERIOR IMOBILIZADA EM REATOR DE LEITO FIXO

No presente capítulo apresentam-se os resultados do artigo “*Unraveling continuous 2G ethanol production from xylose using hemicellulose hydrolysate and immobilized superior recombinant yeast in fixed-bed bioreactor*”, publicado no *Biochemical Engineering Journal*. Os ensaios em reator de leito fixo operado continuamente apresentados no artigo foram realizados durante o Doutorado de Thais Milessi (MILESSI, 2017) e também no período no qual permaneceu como pesquisadora de Pós Doutorado no DEQ/UFSCAR, acompanhados pela doutoranda Caroline Perez. A outra parte do artigo é composta por estudos complementares, abordando o efeito do etanol e dos inibidores presentes nos hidrolisados, realizados durante o desenvolvimento da presente tese de Doutorado.

5.1 Introdução

Preocupações com o aquecimento global e as mudanças climáticas têm impulsionado a busca e o desenvolvimento de fontes energéticas alternativas nas últimas décadas (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010). Nesse sentido, materiais lignocelulósicos são matérias-primas abundantes e de baixo custo para produção de etanol 2G, representando uma alternativa interessante à utilização de combustíveis fósseis para atender à crescente demanda de combustível, sem competir com a produção de alimentos, além de serem produzidos a partir de matérias vegetais, que fixam CO₂, reduzindo a pegada de carbono na atmosfera (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007).

Conforme descrito na Revisão Bibliográfica da presente tese, o bagaço de cana-de-açúcar é a biomassa lignocelulósica mais abundante no Brasil, sendo gerada como subproduto da produção de açúcar e etanol 1G. Sua eficiente utilização para produção de etanol 2G demanda a hidrólise dos polímeros lignocelulósicos, celulose e hemicelulose, em seus açúcares constituintes, glicose e xilose, respectivamente (OH; JIN, 2020; SAKAMOTO et al., 2012). A ruptura da estrutura da biomassa vegetal geralmente é alcançada através de uma etapa de pré-tratamento que, além de açúcares fermentescíveis, gera compostos inibitórios, produtos da degradação de açúcares ou

lignina, como ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A viabilidade econômica de um processo industrial para produção de etanol 2G envolve a obtenção de elevadas concentrações de etanol e alta produtividade. Dessa forma, ambas as frações de açúcares presentes nos hidrolisados, pentoses e hexoses, devem ser eficientemente convertidas a etanol (FU et al., 2009). Alguns fungos filamentosos, bactérias e leveduras são capazes de fermentar naturalmente xilose, no entanto, geralmente esses microrganismos não suportam altas concentrações de etanol no meio de cultivo ou apresentam baixa produtividade (CHANDEL et al., 2011).

A *Saccharomyces cerevisiae*, por outro lado, é uma levedura industrial que tem sido amplamente utilizada para produção de etanol 1G, uma vez que é tolerante a altas concentrações de etanol, apresenta elevado rendimento e produtividade no processo fermentativo, além de apresentar robustez frente a condições de estresse inerentes à produção de etanol em escala industrial. No entanto, espécies selvagens não são capazes de fermentar pentoses, especialmente xilose, o componente presente em maior quantidade em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar. Para suprir essa demanda, cepas recombinantes capazes de metabolizar eficientemente esse açúcar têm sido desenvolvidas através de esforços da engenharia genética (DEMEKE et al., 2013a; MEIJNEN et al., 2016; STOJILJKOVIC; FOULQUIÉ-MORENO; THEVELEIN, 2020).

Ademais, várias abordagens também têm sido exploradas nas áreas de engenharia metabólica e evolutiva, no sentido de desenvolver cepas recombinantes mais tolerantes à combinação tóxica de etanol e inibidores (DEMEKE et al., 2013b; MEIJNEN et al., 2016), uma vez que organismos artificialmente modificados tendem a ser mais sensíveis à presença desses compostos (BELLISSIMI et al., 2009b; NIJLAND; DRIESSEN, 2020).

Além dessas técnicas, a imobilização celular em alginato de cálcio demonstra potencial protetor frente a inibidores (MILESSI et al., 2020a). As vantagens da encapsulação celular vão além da proteção frente a condições ambientais adversas, permitindo processos mais eficientes e maiores produtividades volumétricas (COHEN, 2001). A técnica de imobilização também permite o uso de distintas configurações de biorreatores (por exemplo, leito fixo) e modos de operação (contínuo, bateladas repetidas), sendo que processos em modo contínuo podem ainda aumentar a viabilidade e lucratividade da produção de etanol (HILD; STUCKEY; LEAK, 2003; TASHIRO et

al., 2005). Ainda com relação a processos contínuos, os mesmos podem contribuir para reduzir o custo de produção de biocombustíveis devido à redução no tamanho dos fermentadores, custo dos equipamentos, tempo ocioso e força de trabalho (CRESPO et al., 2012; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Essas características de processo, associadas às vantagens da imobilização celular, podem melhorar a taxa de produção de etanol e, conseqüentemente, a viabilidade da produção de etanol 2G em escala industrial (RATTANAPAN; LIMTONG; PHISALAPHONG, 2011).

Alguns estudos sobre a produção contínua de etanol a partir de xilose em biorreator de leito fixo utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* (MILESSI et al., 2020b; MISHRA et al., 2016) ou bactérias, como *Caloramator boliviensis* e *Thermoanaerobacter* (CRESPO et al., 2012; GEORGIEVA; AHRING, 2007; GEORGIEVA; MIKKELSEN; AHRING, 2008), são reportados em literatura. Na maioria deles, no entanto, são produzidas baixas concentrações de etanol ou a operação do processo é caracterizada por baixa estabilidade, contaminação bacteriana e demanda melhorias significativas para aumento de escala e operação industrial.

Um processo competitivo e robusto para produção contínua de etanol 2G deve gerar elevadas concentrações desse componente (acima de 40 g/L) (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003) de modo a reduzir os custos de destilação, bem como maximizar a conversão dos açúcares presentes nos hidrolisados. Geralmente elevadas concentrações de etanol não são atingidas na maior parte dos estudos publicados em literatura utilizando cepas recombinantes e hidrolisados hemicelulósicos (HO et al., 1999; HO; CHEN; BRAINARD, 1998; ZHAO; XIA, 2010). Além disso, há uma lacuna não preenchida com relação à performance das leveduras em condições industriais e durante a exposição prolongada às condições de processo. Nesse sentido, no presente capítulo objetivou-se avaliar a viabilidade da produção contínua de etanol 2G a partir de hidrolisados hemicelulósicos ricos em xilose como meio fermentativo industrial utilizando *S. cerevisiae* recombinante imobilizada. Primeiramente a influência da concentração de substrato na produtividade em etanol e a operação do biorreator de leito fixo em estado estacionário foram avaliadas utilizando meio sintético composto por xilose. Diversas estratégias para estabilizar a operação do biorreator a elevadas concentrações de etanol e conversão de açúcares foram implementadas. Em seguida a fermentação de hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado foi investigada.

5.2 Materiais e métodos específicos

5.2.1 Estratégia experimental

Os experimentos nesta etapa do trabalho foram desenvolvidos utilizando a levedura modificada GSE16-T18 HAA1 (HAA1), uma cepa de *S. cerevisiae* modificada para melhorar sua tolerância a ácido acético (MEIJNEN et al., 2016), em sua forma imobilizada em alginato de cálcio. As etapas de preparação de pré-inóculo, inóculo e imobilização das células estão descritas no capítulo 4 (Materiais e Métodos).

Neste capítulo, descreve-se as fermentações contínuas de meio fermentativo rico em xilose utilizando um reator de leito fixo operado com alta carga de células. Primeiramente a performance de fermentações contínuas em reator de leito fixo foram caracterizadas com relação à capacidade de conversão de açúcares, produtividade e rendimento em etanol, bem como estabilidade no estado estacionário. O sistema foi alimentado utilizando distintas concentrações de xilose na corrente de alimentação, variando as taxas de diluição. As taxas de diluição foram ajustadas com base na velocidade de assimilação de xilose (10,26 g/L/h), que foi estimada em experimentos prévios em mini-reatores, de modo a alcançar conversão de substrato acima de 95%. Posteriormente, a performance de fermentações contínuas simulando condições industriais, isto é, utilizando hidrolisado hemicelulósico concentrado (HC) como meio fermentativo, foi avaliada. Na última etapa do presente estudo, os efeitos do etanol e dos compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico concentrado sobre o potencial fermentativo foram avaliados em mini-reatores operados em bateladas repetidas.

5.2.2 Quantificação de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram quantificados segundo a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1974).

5.2.3 Fermentações contínuas

Os ensaios contínuos foram realizados a 35 °C e pH 5,2 em um reator de leito fixo com 100 mL de volume total e 5 cm de diâmetro, conforme descrito por Milessi (2017) e Milessi e colaboradores (2020c). 50 g de *beads* de células imobilizadas foram adicionadas assepticamente ao reator, correspondentes a metade do volume reacional do mesmo, DO = 100 e 1:1 $V_{\text{células}}:V_{\text{meio}}$. O sistema foi operado a distintas vazões de operação, de acordo com o tempo de residência (τ , h) definido para cada condição. Meio

foi continuamente alimentado através da base do biorreator com o auxílio de uma bomba peristáltica, de modo que percolava o leito recheado com *beads* de levedura e saía do reator por uma saída do topo do mesmo, onde era coletado em um reservatório (MILESSI et al., 2020b). Amostras foram coletadas periodicamente para quantificação de substratos e produtos. Os experimentos utilizando células imobilizadas em reator contínuo foram realizados utilizando meio definido contendo distintas concentrações de xilose (40, 60, 80 ou 120 g/L) e tempos de residência correspondentes a 3,6; 5,4; 7,3 e 10,9, respectivamente. O meio mínimo foi suplementado com KH_2PO_4 5 g/L, MgSO_4 2 g/L, CaCl_2 2 g/L e uréia 1,5 g/L (MILESSI, 2017). Estudos adicionais foram conduzidos para investigar a performance das fermentações em meio complexo YPX, contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e 80 g/L de xilose ou meio industrial YPHC-I, contendo 10 g/L de extrato de levedura, 20 g/L de peptona e hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado de cana-de-açúcar (HC-I). Todos os meios fermentativos utilizados foram submetidos a esterilização por filtração em membrana (0,22 μm). O hidrolisado hemicelulósico foi produzido de acordo com a metodologia descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2 do capítulo 4. O HC utilizado nessa etapa do trabalho foi submetido a ajuste de pH para 5,2 utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e suplementação com 20 g/L de extrato de levedura e 40 g/L de peptona, de modo que sua composição nos ensaios contínuos está representada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 Caracterização do meio hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado (HC-I) utilizado para fermentação contínua. Compostos fenólicos totais são apresentados em função de gramas equivalentes de ácido gálico.

Meio Fermentativo	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Compostos fenólicos (gEAG/L)
YPHC-I	7,36	46,5	8,27	0,18	0,15	2,45

As concentrações dos meios foram determinadas por CLAE, conforme descrito em 4.6.2. A influência de lavagens programadas na estabilidade operacional do reator também foi avaliada. As lavagens consistiram no aumento da vazão de alimentação de meio no reator (2,73 L/h) por aproximadamente 2 minutos, resultando na passagem de 100 mL de meio fresco pelo leito fermentativo, seguida por retomada da vazão regular de operação (MILESSI, 2017).

5.2.4 Experimentos em bateladas repetidas

Ensaio fermentativos complementares foram realizados para avaliar o efeito da exposição prolongada das células ao etanol e inibidores presentes no hidrolisado, bem como o efeito sinérgico da exposição a ambos. Dessa forma, foram realizados experimentos em bateladas repetidas, conforme descrito no item 4.4 do Capítulo 4 (Materiais e Métodos) utilizando meio YPDX e YPHC-II suplementados ou não com 50 g/L de etanol (p.a. 99,8%, Sigma-Aldrich). As fermentações foram monitoradas através de pesagens periódicas, de modo a acompanhar a perda de massa causada pela liberação de CO₂ (MESQUITA et al, 2021; MILESSI et al., 2020a) até a estabilização da mesma, indicativo do final do ciclo fermentativo.

Para compensar o efeito de diluição do meio pelos *beads* de aproximadamente 1,8 vezes (MILESSI et al., 2020a), os meios frescos adicionados aos mini-reatores foram preparados com o dobro da concentração de açúcares, conforme mostrado na Tabela 5.2. Os meios, YPDX e YPHC-II foram ainda suplementados com peptona e extrato de levedura, equivalentes a 40 e 20 g/L, respectivamente.

Tabela 5.2 Caracterização dos meios YPDX, hidrolisado hemicelulósico bruto (HC-II) utilizados para fermentações complementares em mini-reatores

Meio Fermentativo	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Compostos fenólicos (gEAG/L)
YPDX	19	112	0	0	0	0
YPHC-II	18,96	112,96	14,96	0,48	0,41	5,9

As concentrações dos meios foram determinadas por CLAE, conforme descrito em 4.6.2.

5.3 Resultados e discussão

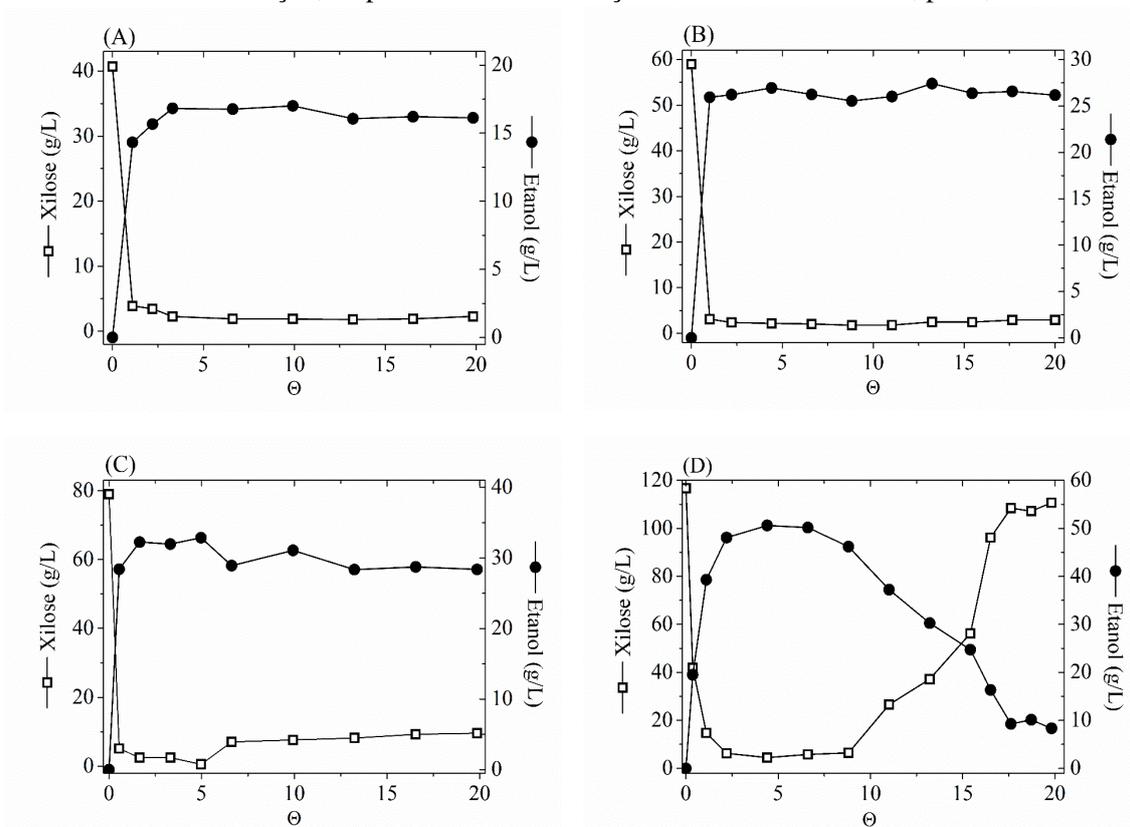
5.3.1 Resultados prévios obtidos pelo grupo de pesquisa:

Influência da concentração de xilose na performance das fermentações contínuas em reator de leito fixo

Processos contínuos são conhecidos por permitirem a obtenção de elevadas produtividades (ANDERSEN; JENSEN; MIKKELSEN, 2015; PALMQVIST; GALBE; HAHN-HÄGERDAL, 1998). Por outro lado, a exposição prolongada a elevadas concentrações de etanol produzidas a partir da alimentação do sistema com meios

contendo altas concentrações de açúcares pode prejudicar a viabilidade celular, causando perdas de eficiência e instabilidade. Dessa forma, Milessi (2017) estudou a performance da levedura HAA1 em fermentações contínuas utilizando distintas concentrações de xilose na alimentação de modo a serem identificadas as condições que permitissem altas taxas de conversão de substrato, bem como elevado rendimento e produtividade em etanol por longos períodos, ao mesmo tempo em que a estabilidade operacional fosse mantida. Os perfis de consumo de xilose e produção de etanol utilizando meio mínimo (MM) contendo distintas concentrações de xilose (4, 60, 80, 120 g/L) são mostrados na Fig. 5.1. É importante destacar que os resultados são mostrados em função do número de tempos de residência (Θ), ou seja, a razão entre o tempo de processo e o tempo de residência previamente fixado para cada fermentação contínua (MILESSI, 2017; PEREZ et al., 2021).

Figura 5.1 Perfis de concentrações de xilose residual e de etanol produzido em função do número de tempos de residência (Θ) para diferentes condições de fermentação contínua por *S. cerevisiae* HAA1 imobilizada em biorreator de leito fixo (DO = 100) e alimentação utilizando MM composto por distintas concentrações de xilose: (A) 40 g/L, (B) 60 g/L, (C) 80 g/L e (D) 120 g/L. Os tempos de residência foram 3,6; 5,4; 7,3 e 10,9 h para cada concentração de xilose na alimentação, respectivamente. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021) e Milessi (2017)

Como pode-se observar na Fig. 5.1, a levedura HAA1 apresentou alta performance nos ensaios utilizando 40 e 60 g/L de concentração de xilose no meio fermentativo. O estado estacionário foi rapidamente atingido e manteve-se estável por mais de 20 tempos de residência (20Θ) em ambas as condições, com conversão de xilose próxima a 100 % (Fig. 5.2). As concentrações de etanol no efluente foram de 17 e 26 g/L e os rendimentos em etanol de 0,42 e 0,46 g/g, respectivamente, para as concentrações iniciais de xilose de 40 e 60 g/L (Tabela 5.3), conforme discutido em Milessi (2017) e Perez et al. (2021). Dessa forma, a operação em estado estacionário foi satisfatória em ambas as condições sem que houvesse perdas de eficiência em conversão de xilose (Fig. 5.1A e 5.1B). Por outro lado, em ambos os casos a concentração de etanol no efluente manteve-se abaixo da mínima requerida para reduzir os custos na etapa de destilação (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003).

Tabela 5.3 - Índices de performance obtidos durante o estado estacionário de fermentações contínuas utilizando distintas concentrações xilose inicial em MM e levedura recombinante imobilizada HAA1 (DO = 100) em reator de leito fixo. Condições fermentativas: 35°C, pH 5,2

Índices de performance	Concentrações de xilose iniciais (g/L)			
	40	60	80*	120**
Conversão (%)	95,25 ± 0,94	95,88 ± 0,62	96,09 ± 2,78	95,27 ± 0,80
τ (h)	3,6	5,4	7,3	10,8
C_{EtOH} (g/L)	16,82 ± 0,63	26,23 ± 0,72	31,42 ± 1,58	49,62 ± 1,35
$Y_{P/S}$ (g _{EtOH} /g _{xilose})	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,01
Qp (g/L/h)	4,67 ± 0,17	4,85 ± 0,13	4,30 ± 0,15	4,60 ± 0,12
Viabilidade celular final***	99%	98%	85%	0%

* Estado estacionário de 1 a 10 tempos de residência.

** Estado estacionário de 2,2 a 6,6 tempos de residência.

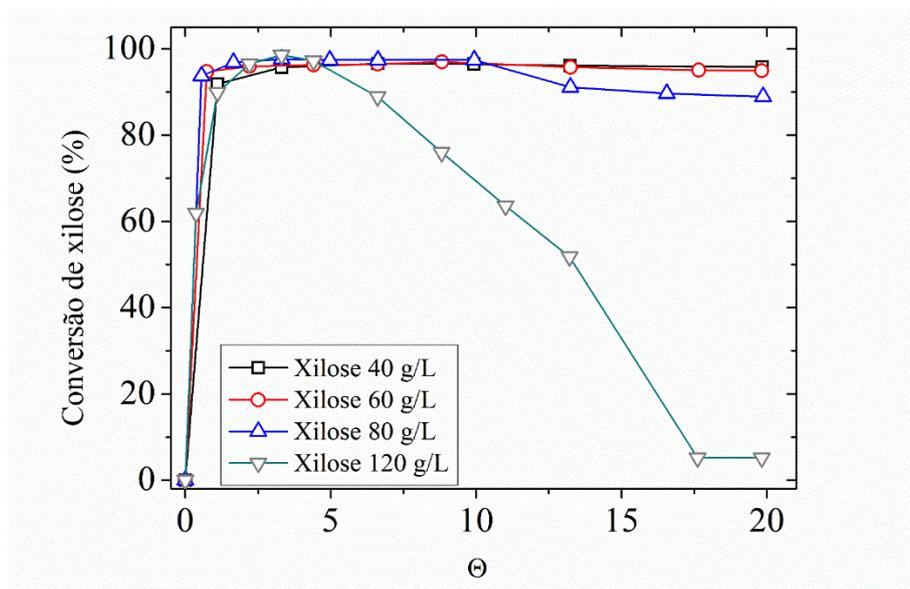
*** Medida ao final dos experimentos.

Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021) e Milessi (2017)

Para atingir concentrações mais elevadas de etanol no efluente, fermentações contínuas contendo maiores concentrações iniciais de xilose, equivalentes a 80 e 120 g/L, foram avaliadas (Fig. 5.1C e 5.1D). No ensaio fermentativo utilizando 80 g/L de xilose, a conversão do sistema se manteve próxima a 96% por até 10 tempos de

residência (Fig. 5.2), produzindo concentrações de etanol no efluente próximas a 31 g/L, bem como rendimento de 0,42 g/g em etanol. No entanto, depois disso a conversão do sistema caiu a aproximadamente 90% (Fig. 5.2) e o experimento foi finalizado após 20 tempos de residência (MILESSI, 2017; PEREZ et al., 2021).

Figura 5.2 Perfis de conversão de xilose por *S. cerevisiae* HAA1 imobilizada em função do número de tempos de residência (Θ) durante fermentações contínuas realizadas em reator de leito fixo (DO = 100) em MM composto por concentrações iniciais de xilose de 40, 60, 80 e 120 g/L. Tempos de residência são equivalentes a 3,6; 5,4; 7,3 e 10,9 h para as distintas concentrações de xilose na alimentação, respectivamente. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021) e Milessi (2017)

Quando utilizada a concentração de 120 g/L de xilose no meio de alimentação, foi obtida a maior concentração de etanol no efluente por um curto período de tempo, equivalente a 50 g/L, durante 2,2 e 6,6 números de tempos de residência, apresentando conversão de xilose em torno de 95 % (Tabela 5.3). Depois disso, a conversão de xilose caiu rapidamente (Fig. 5.2), ao passo que a concentração de etanol também diminuiu e a concentração de xilose residual aumentou rapidamente (Fig. 5.1D). Isso levou o sistema contínuo a um comportamento instável de modo que, após 20 tempos de residência, todas as células dentro do biorreator estavam mortas (Tabela 5.3), conforme relatado por Milessi (2017) e Perez et al. (2021).

As viabilidades celulares finais, medidas nos *beads* de células coletados após o final dos ensaios contínuos, são apresentadas na Tabela 5.3. Nota-se que os valores diminuem conforme aumenta a concentração de xilose inicial nos ensaios. Perdas significativas de viabilidade celular foram observadas quando 80 e 120 g/L de xilose

foram utilizadas na alimentação do reator, nos quais as células foram expostas a concentrações de etanol acima de 30 g/L por 73 e 54 horas, respectivamente (Fig. 5.1C-D), como constatado por Milessi (2017) e Perez et al. (2021).

O etanol é um conhecido inibidor do metabolismo microbiano que se acumula na fração hidrofóbica da membrana celular, dificultando a assimilação de nutrientes por interromper a funcionalidade dos transportadores da membrana (SWINNEN et al., 2015). Quando em elevadas concentrações, esse composto compromete a viabilidade das células e aumenta a velocidade da morte celular, bem como influencia na síntese de macromoléculas, reduz a atividade de enzimas e perturba o metabolismo celular (STANLEY et al., 2010).

A levedura *S. cerevisiae* selvagem é bastante utilizada em processos industriais de produção de etanol 1G por ser robusta e capaz de tolerar elevadas concentrações de etanol, superiores a 16 % v/v (126 g/L), ao passo que cepas de laboratório podem tolerar concentrações inferiores desse composto, em torno de 5-12 % v/v (39-94 g/L) (SWINNEN et al., 2012). Deparis e colaboradores (2017) destacaram que o desenvolvimento de vias metabólicas artificiais em células microbianas pode causar consequências imprevisíveis nas mesmas como, por exemplo, maior sensibilidade a condições de estresse. Dessa forma, os resultados aqui apresentados sugerem que o efeito tóxico do etanol sobre as células da levedura recombinante HAA1 foi causado pela combinação do tempo de exposição aliado à concentração do mesmo, comprometendo a eficiência do processo, bem como sua estabilidade operacional.

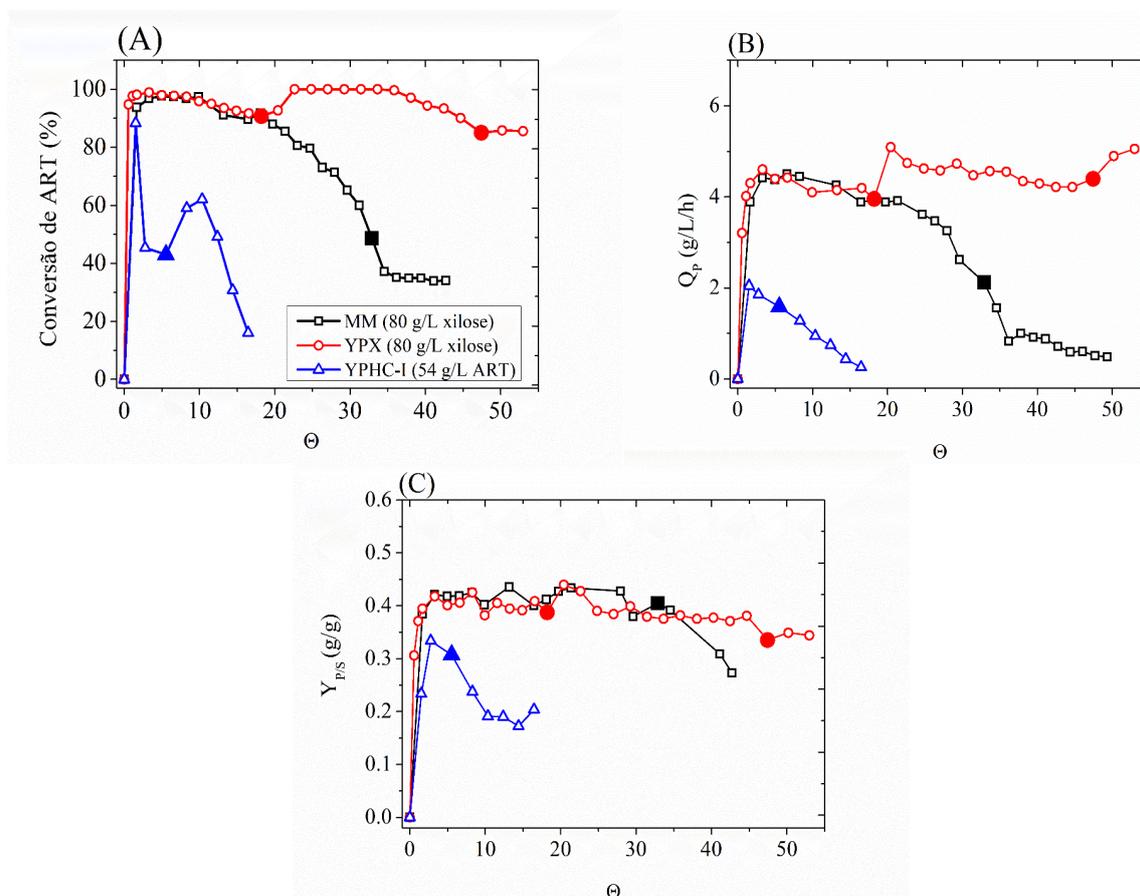
Apesar de terem apresentado alta estabilidade, as fermentações contínuas realizadas com meio fermentativo contendo 40 e 60 g/L de xilose não produziram concentrações de etanol elevadas o suficiente para tornar o processo viável economicamente, de modo que a concentração de 80 g/L de xilose foi selecionada para ser melhor investigada no presente trabalho, uma vez que foi a maior concentração de substrato utilizada que permitiu a operação do reator de leito fixo com estabilidade satisfatória. Nesse sentido, várias estratégias foram aplicadas para melhorar a performance desse processo, conforme será detalhado a seguir (PEREZ et al., 2021).

5.3.2. Estratégias para melhorar a estabilidade operacional do reator de leito fixo

Para manter o estado estacionário com elevada conversão de açúcares por longos períodos durante a fermentação contínua, novas estratégias foram exploradas.

Inicialmente Milessi (2017) realizou uma replicata do ensaio contínuo em MM contendo 80 g/L de xilose foi realizada, dessa vez por 43 tempos de residência (43Θ). O mesmo padrão obtido no ensaio preliminar e apresentado nas Fig. 5.1C e 5.2 para 80 g/L de xilose inicial foi reproduzido por 20 tempos de residência. O estado estacionário foi mantido por 10 tempos de residência (10Θ) com 97 % de conversão de xilose (Fig. 5.3A) e 32 g/L de etanol no efluente, correspondente a 4,44 g/L/h de produtividade em etanol (Fig. 5.3B) e 0,42 g/g de rendimento em etanol (Fig. 5.3C). Depois de 10 tempos de residência (10Θ), a conversão de xilose começou a diminuir gradualmente, ao passo que, depois de 20 tempos de residência (20Θ), a conversão do sistema caiu drasticamente.

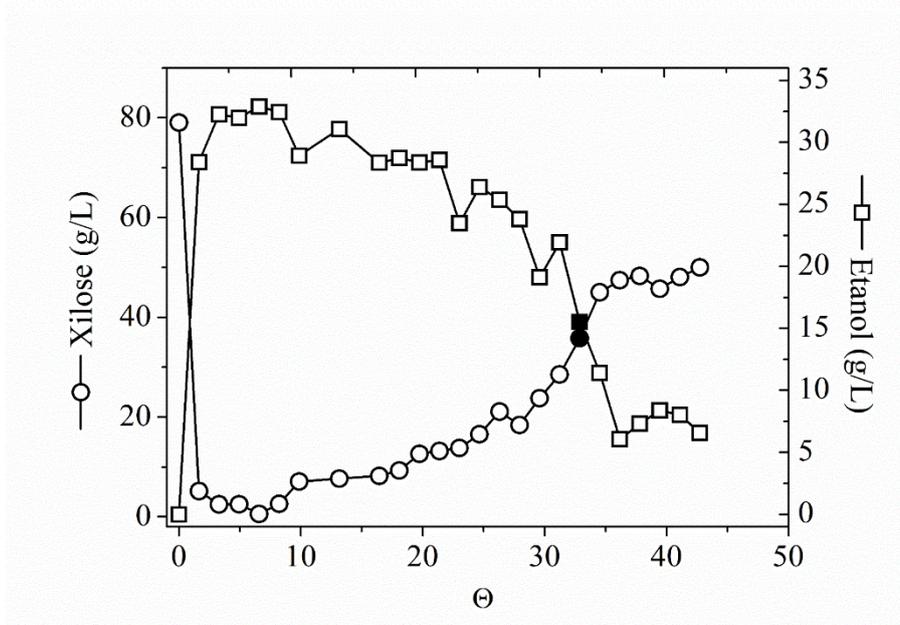
Figura 5.3 Produção contínua de etanol em biorreator de leito fixo a partir de xilose utilizando *S. cerevisiae* HAA1 (DO = 100) em MM (Milessi, 2017) e YPX 80 g/L xilose ($\tau = 7,3$ h), e meio YPHC-I contendo 54 g/L ART ($\tau = 4,34$). Perfis de conversão de ART (A), Produtividade em etanol (B) e rendimento em etanol (C). Etapas de lavagem estão indicadas por símbolos preenchidos. Quadrados pretos (MM), círculos vermelhos (YPX), triângulos azuis (YPHC-I). Condições fermentativas: 35 °C, pH 5.2



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021) e Milessi (2017)

Uma etapa de lavagem do reator foi incorporada após 33 tempos de residência (33 Θ), momento em que a conversão de xilose diminuiu e chegou a 54,5 %. A lavagem do sistema foi capaz de reduzir drasticamente a concentração de etanol dentro do reator, sendo efetiva para reestabilizar a queda de conversão do mesmo por mais 10 tempos de residência, porém com baixa conversão de xilose (~ 40%, Fig. 5.3A). Dessa forma, o ensaio fermentativo foi interrompido após 43 tempos de residência, quando as concentrações de etanol e xilose residual atingiram aproximadamente 6,5 e 50 g/L aproximadamente (Fig. 5.4), e a viabilidade celular final foi de 32 %.

Figura 5.4 Perfis de concentrações de xilose residual e de etanol produzido para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por *S. cerevisiae* HAA1 em reator de leito fixo contendo 80 g/L de xilose ($\tau = 7,3$) até 44 tempos de residência. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. A etapa de lavagem é indicada pelos símbolos preenchidos



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021) e Milessi (2017)

A tolerância da levedura *S. cerevisiae* a etanol é fortemente influenciada pela limitação de nutrientes presentes no meio fermentativo e ao estresse imposto pelas condições de cultivo (SWINNEN et al., 2015). Lucero e colaboradores (2000) relataram redução nas taxas fermentativas de leveduras quando a fonte de nitrogênio foi esgotada. Comportamento similar foi observado por Brandberg e colaboradores (2005) durante fermentações contínuas de hidrolisado ácido de abeto diluído em reator contínuo de

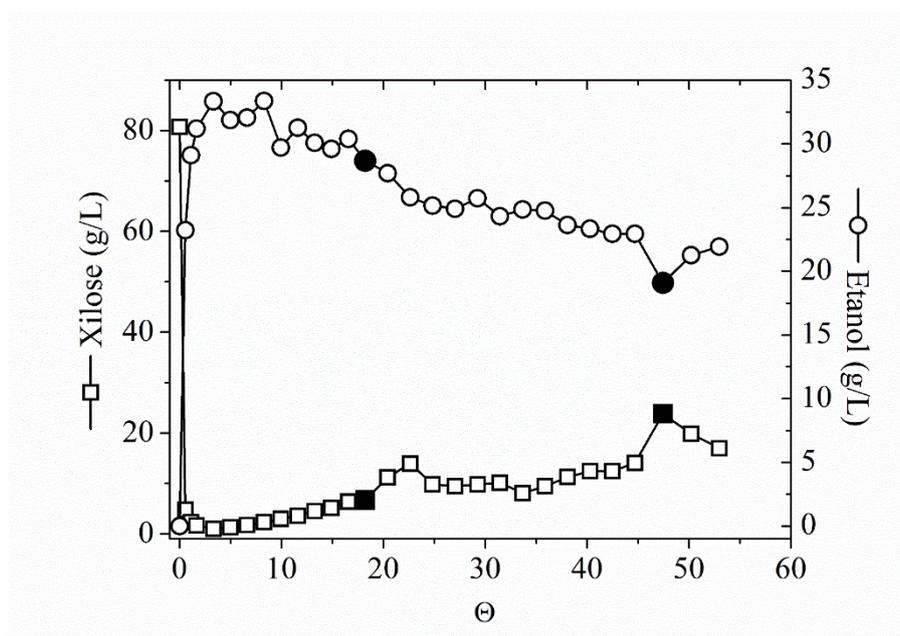
tanque agitado utilizando *S. cerevisiae* ATCC 96,581, onde melhoria significativa da produtividade ao longo prazo foi observada após a adição de nutrientes.

Sabendo disso e baseando-se na reestabilização do sistema observada por Milessi (2017) após a lavagem, uma nova estratégia para melhorar a estabilidade do estado estacionário durante a fermentação contínua foi testada no presente trabalho. A estratégia consistiu na suplementação do meio com nutrientes (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona), combinada com a lavagem do reator no momento que a conversão de xilose fosse reduzida a menos de 90 %, ou seja, antes que ocorresse queda brusca na viabilidade celular. A Fig. 5.3A mostra que essa estratégia foi eficaz na manutenção de elevadas taxas de conversão de xilose por mais de 50 tempos de residência (50 Θ) em meio YPX. Depois das etapas de lavagem do reator, que ocorreram em 18 e 47 tempos de residência, momento em que a conversão do sistema atingiu 90 e 80 %, respectivamente, a produtividade em etanol manteve-se igual ou superior a 5 g/L/h (Fig. 5.3B), com rendimento médio em etanol de $0,39 \pm 0,03$ g/g (Fig. 5.3C). Os perfis de redução na produção de etanol e aumento na concentração de xilose residual são mostrados na Fig. 5.5 e provavelmente estão relacionados à perda de viabilidade gradual das células de levedura. De maneira geral, os resultados apresentados na Fig. 5.3 e 5.5 confirmam que a combinação das estratégias de enriquecimento do meio fermentativo com nutrientes e lavagens programadas do sistema são técnicas eficazes para minimizar a perda de viabilidade celular devido à exposição prolongada ao etanol, resultando em uma operação robusta, com duração superior a 15 dias (equivalente a 54 Θ).

Fermentações contínuas para produção de etanol 2G utilizando células imobilizadas e xilose como substrato são raramente reportadas em literatura. Crespo e colaboradores (2012) utilizaram células imobilizadas de *Caloramator boliviensis* para fermentar xilose continuamente. O sistema operou por ~18 dias, mas com baixa produtividade (0,36 g/L/h) e concentração de etanol (2,9 g/L) devido à baixa atividade fermentativa da bactéria termofílica utilizada. Além disso, os resultados apresentados na Fig. 5.3 para o meio YPX se destacam quando comparados à fermentação contínua de 65 g/L de xilose por isomerização e fermentação simultâneas (SIF) por levedura *S. cerevisiae* nativa co-imobilizada com a enzima xilose isomerase em gel de alginato de cálcio (MILESSI et al., 2020b). O sistema operou por 11 dias com 85 % de conversão de xilose, concentração de etanol no efluente de 25 g/L e produtividade de 2 g/L/h, enquanto o rendimento em etanol manteve-se entre 0,37 e 0,41 g/g. O maior obstáculo

reportado pelos autores foi a contaminação bacteriana, mesmo na presença dos antibióticos Kamoran, clorafenicol e ampicilina, devido à baixa velocidade de fermentação de xilulose pela levedura (SILVA, 2013). No presente estudo, no entanto, não foi observada contaminação microbiana, provavelmente devido à alta taxa de assimilação de xilose pela levedura recombinante HAA1.

Figura 5.5 Perfis de concentração de xilose residual e de etanol produzido para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por *S. cerevisiae* HAA1 imobilizada em reator de leito fixo contendo meio YPX 80 g/L de xilose ($\tau = 7,3$) até 54 tempos de residência. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. As etapas de lavagem são indicadas pelos símbolos preenchidos.



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021)

Mishra e colaboradores (2016) fermentaram continuamente uma mistura de 60 g/L de glicose e 30 g/L de xilose durante 6 dias utilizando a levedura *S. cerevisiae* GSE16-T18 imobilizada e variando a taxa de diluição no sistema. Os autores obtiveram 83% de conversão de xilose, equivalente a ~ 22 g/L/h e ~ 40 g/L de produtividade e concentração de etanol no efluente, respectivamente. A utilização de glicose como substrato contribuiu para a elevada produtividade obtida no processo, uma vez que esse açúcar é assimilado mais rapidamente (em torno de 10 vezes) que as pentoses por *S. cerevisiae*. De maneira similar, a maior concentração de etanol obtida em comparação com o presente trabalho pode ser atribuída à diferença na tolerância a etanol entre as distintas cepas recombinantes utilizadas.

No trabalho de Milessi (2017) foi validada uma estratégia experimental que manteve o processo contínuo de fermentação de xilose operando por notáveis 365 horas (54 tempos de residência) em meio sintético. Nesse sentido, as lavagens programadas podem ser aplicadas a qualquer fermentação contínua, possibilitando a produção de elevadas concentrações de etanol sem perdas significativas de viabilidade celular.

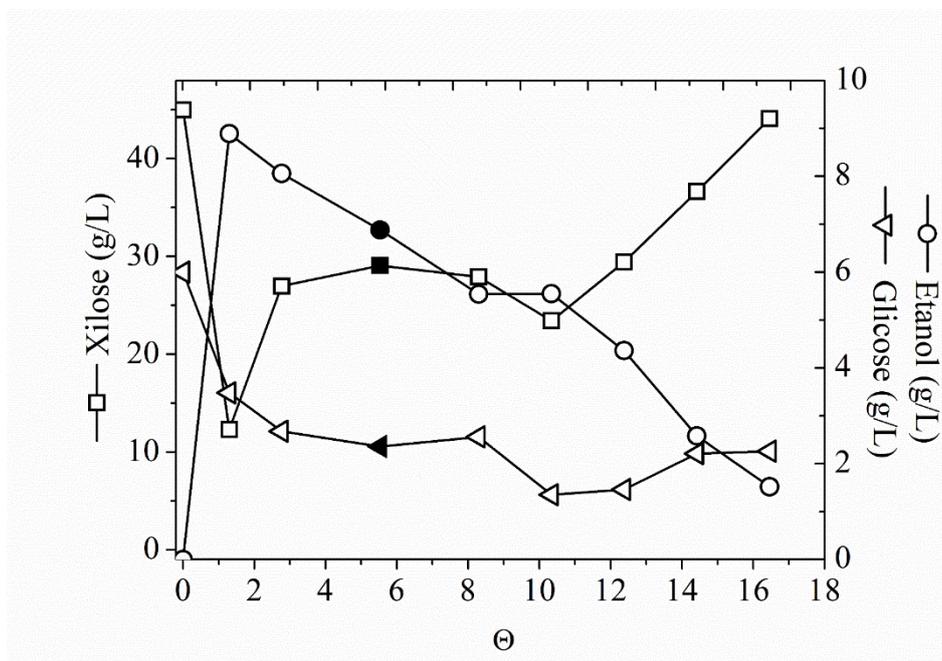
5.3.3. Efeitos tóxicos do etanol e do hidrolisado hemicelulósico contendo inibidores sobre a performance fermentativa da levedura recombinante HAA1

Devido aos resultados promissores obtidos nas fermentações contínuas de meio YPX contendo 80 g/L de xilose e submetido a lavagens programadas, a viabilidade da operação contínua do reator utilizando um meio fermentativo industrial, composto por hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado suplementado com peptona e extrato de levedura (YPHC-I), foi avaliada. Os resultados obtidos estão mostrados na Fig. 5.3, juntamente com os resultados em MM e YPX contendo 80 g/L de xilose. As conversões de açúcares utilizando meio YPHC-I rapidamente atingiram 90 % (Fig. 5.3), no entanto, caíram em seguida, antes do sistema atingir o estado estacionário. O mesmo comportamento foi observado para a produtividade e rendimento em etanol em meio YPHC-I, que apresentaram valores iniciais de 1,86 g/L/h (Fig. 5.3A) e 0,33 g/g (Fig. 5.3B), respectivamente, para 4,3 tempos de residência, seguidos por um declínio acentuado. Elevadas concentrações de xilose foram detectadas no efluente devido à baixa assimilação, enquanto a máxima concentração de etanol foi de 8,89 g/L. Os perfis de consumo de açúcares e produção de etanol são mostrados na Fig. 5.6. Depois de ~5 tempos de residência, o sistema foi lavado utilizando o meio YPHC-I, na tentativa de reverter a queda na conversão de açúcares. A lavagem levou a um aumento na conversão de açúcares de ~60 % (Fig. 5.3A) por um curto período de tempo, de modo que não foi efetiva para estabilizar o processo. Dessa forma, a fermentação contínua utilizando o hidrolisado hemicelulósico bruto foi finalizada depois de 16 tempos de residência com viabilidade celular final das células imobilizadas de 24 %.

Os resultados mostrados na Fig. 5.3 sugerem que a presença de elevadas concentrações de inibidores no meio HC-I foi responsável pela desestabilização do processo contínuo de fermentação. O furfural já fora reportado como responsável por reduzir a taxa específica de crescimento das células, bem como as produtividades específica e volumétrica de etanol (MOHD AZHAR et al., 2017; PALMQVIST;

ALMEIDA; HAHN-HÄGERDAL, 1999). O HMF afeta a permeabilidade das membranas e causa uma fase lag mais longa no crescimento de microrganismos (LARSSON et al., 1999), enquanto o ácido acético afeta significativamente a capacidade fermentativa, principalmente em organismos modificados para consumo de xilose (BELLISSIMI et al., 2009b; DEPARIS et al., 2017a; JUDIT KRISCH; AND BÉLA SZAJÁNI, 1997; MILESSI et al., 2020a).

Figura 5.6 Perfis de consumo de açúcares e produção de etanol para distintos tempos de residência durante fermentação contínua por *S. cerevisiae* HAA1 em reator de leito fixo utilizando meio YPHC-I ($\tau = 5,4$). Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2. A etapa de lavagem está indicada pelos símbolos preenchidos



Fonte: Adaptada de Perez e colaboradores (2021)

O etanol produzido durante as fermentações também pode ter contribuído para a desestabilização do sistema, como foi observado nos experimentos realizados em meio sintético, uma vez que as lavagens do sistema melhoraram, mesmo que apenas momentaneamente, a conversão de açúcares em ambos os ensaios contínuos utilizando meio YPX e YPHC-I. Além disso, o tempo ao qual as células são expostas aos compostos inibitórios pode influenciar seu grau de toxicidade. Dessa forma, para investigar separadamente os efeitos dos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico e do etanol produzido durante as fermentações, foi delineada e realizada uma série de experimentos complementares conduzidos em modo batelada repetida

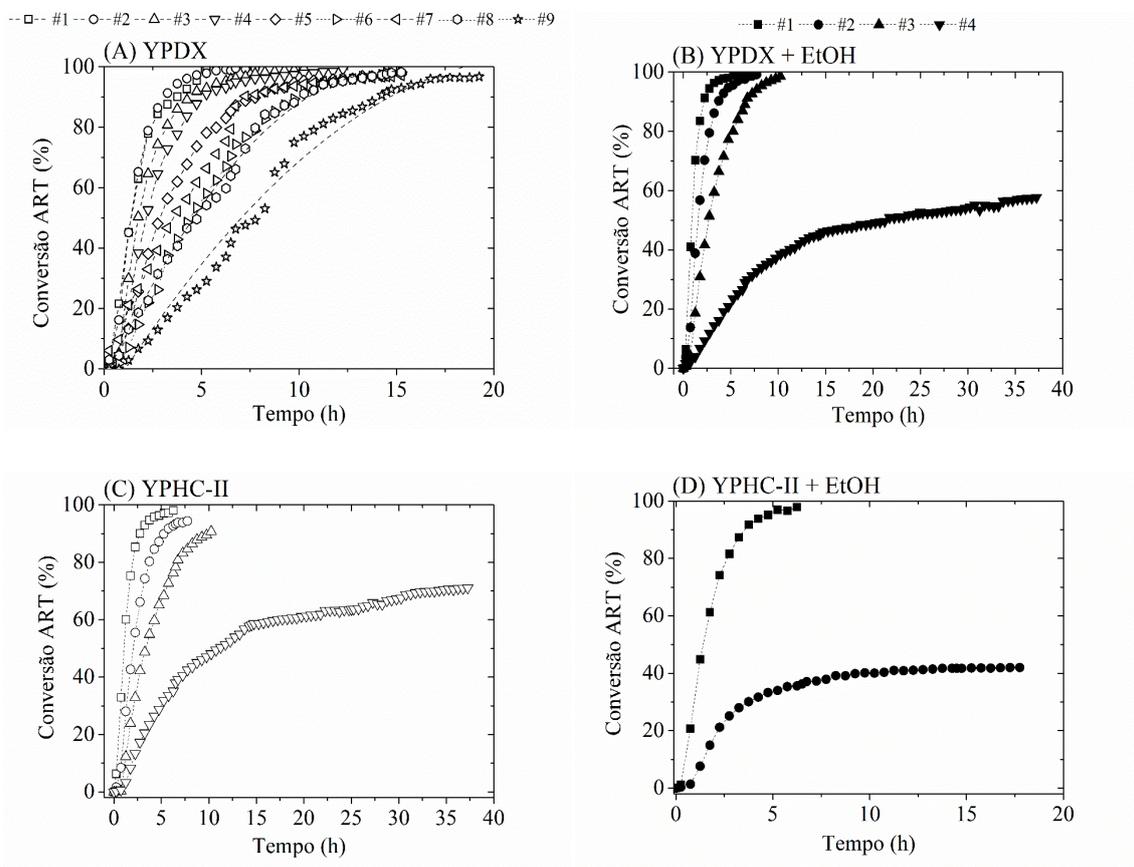
utilizando mini-reatores. Fermentações em mini-reatores utilizando células imobilizadas foram recentemente reportadas como capazes de reproduzir de maneira fiel as condições de cultura em reatores de tipo tanque agitado ou leito fixo (MESQUITA et al., 2021; MILESSI et al., 2020a).

Foram realizados 4 conjuntos de experimentos em bateladas repetidas utilizando meio sintético YPDX e hidrolisado bruto concentrado (YPHC-II) com e sem suplementação de 50 g/L de etanol, como descrito na seção 5.2.4. Os perfis de conversão de açúcares obtidos nas condições estudadas são mostrados na Fig. 5.7, ao passo que os principais índices de performance são mostrados na Tabela 5.4. Ambos os meios, YPDX e HC-II continham aproximadamente 112 g/L de xilose, 19 g/L de glicose, 20 g/L de extrato de levedura e 40 g/L de peptona. O meio YPHC-II ainda era composto por inibidores, produzidos na etapa de pré-tratamento: aproximadamente 15 g/L de ácido acético, 0,48 g/L de furfural, 5,9 g/L de compostos fenólicos e 0,41 g/L de HMF. É importante destacar que todos os componentes dos meios foram diluídos aproximadamente 1,8 vezes após a adição dos *beads*.

As leveduras encapsuladas foram capazes de fermentar 9 bateladas repetidas com mais de 90% de conversão de açúcares no meio YPDX (Fig. 5.7A), mantendo a viabilidade celular final de 85% (Tabela 5.4) após 123 horas de tempo total de fermentação. O aumento gradual no tempo de fermentação (Fig. 5.7A), bem como as quedas de rendimento e produtividade em etanol nas bateladas subsequentes podem ter ocorrido devido à queda na viabilidade celular causada pela exposição intensa a elevadas concentrações de etanol, acima de ~60 g/L (Tabela 5.4).

Na presença de meio YPHC-II, as células imobilizadas foram capazes de realizar 4 bateladas repetidas. Nas bateladas #1, #2 e #3, as performances fermentativas foram ligeiramente inferiores às obtidas em meio YPDX (Tabela 5.4). Depois de serem expostas aos inibidores por 24 horas nas primeiras 3 bateladas, as células começaram a 4ª batelada comprometidas. Como resultado, a 4ª batelada durou 37 horas e apresentou conversão incompleta dos açúcares, além de viabilidade celular final de 68 % (Fig. 5.7B). As produtividades e rendimentos em etanol foram gradualmente diminuindo após a segunda batelada, conforme mostrado na Tabela 5.4.

Figura 5.7 Fermentação em bateladas repetidas em mini-reatores pela levedura imobilizada HAA1 utilizando diferentes meios. (A) YPDX (B) YPDX suplementado com etanol, (C) YPHC-II e (D) YPHC-II suplementado com etanol. Bateladas distintas são representadas por símbolos diferentes e identificadas pelo número de referência (#) na legenda. Símbolos preenchidos representam meios suplementados com etanol. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,2



Fonte: Elaborada pela autora

As Figs. 5.7B e 5.7D mostram os resultados das fermentações em meios com suplementação de etanol. No meio YPDX suplementado com etanol, foram realizadas apenas 3 bateladas repetidas com completo consumo de açúcares (Fig. 5.7B). A produtividade em etanol caiu bruscamente após a primeira batelada, bem como a viabilidade celular e o rendimento em etanol (Tabela 5.4). Novamente, a exposição por ~24 horas a elevadas concentrações de etanol claramente enfraqueceu as células. A 4ª batelada repetida em meio YPDX + EtOH terminou após 37 h com apenas 60 % de açúcares convertidos (Fig. 5.7B) e 76 % de viabilidade celular (Tabela 5.4). O experimento em meio YPHC-II suplementado com etanol apresentou o pior cenário fermentativo: enquanto na primeira batelada uma conversão de açúcares de 97 % foi atingida (Fig. 5.7D), apenas 6h de exposição à combinação de etanol e inibidores presentes no hidrolisado foram suficientes para afetar toda a população de células. Na

segunda batelada, produtividade e rendimento em etanol caíram a 0,83 g/L/h e 0,26 g/g, respectivamente (Tabela 5.4). Quando o experimento foi finalizado, a conversão de açúcares final foi de apenas 40% (Fig. 5.7D) e a viabilidade celular final foi de 43 % (Tabela 5.4). Em todos os ensaios, as concentrações de xilitol e glicerol nas últimas bateladas ficaram abaixo de 3,5 g/L.

Tabela 5.4 Viabilidades celulares finais, concentrações iniciais e finais de etanol, rendimento e produtividade volumétrica em etanol durante fermentações em bateladas repetidas utilizando meio sintético e industrial, suplementados ou não com etanol e utilizando células imobilizadas de HAA1. Os valores representam a média de replicatas, com menos de 5 % de desvio

	Reciclo	Viabilidade celular (%)	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Q _P (g/L/h)
YPDX	1	98	0	44,9	0,49	10,56
	2	96	13,7	59,4	0,49	7,61
	3	92	15,3	60,2	0,44	4,49
	4	90	14,3	58,7	0,43	4,44
	5	90	12,4	58,8	0,43	3,64
	6	88	11,4	53,2	0,41	2,79
	7	88	7,8	53,5	0,43	2,85
	8	86	8,9	45,6	0,37	2,16
	9	85	18,7	54,9	0,37	1,81
YPDX + EtOH	1	97	35,7	74,0	0,43	9,25
	2	86	43,39	83,9	0,41	4,5
	3	79	42,12	85,9	0,41	4,37
	4	76	53,01	78,4	0,30	1,27
YPHC	1	95	0	35,4	0,43	8,33
	2	88	2,85	34,6	0,42	5,30
	3	74	4,15	37,1	0,43	3,29
	4	68	8,36	34,0	0,37	1,33
YPHC + EtOH	1	77	27,5	34,0	0,40	7,42
	2	43	26,7	35,6	0,26	0,83

Fonte: Elaborada pela autora

Os experimentos em batelada repetida se assemelharam aos ensaios de fermentação contínua utilizando meio YPX e YPHC-I (Fig. 5.3). Nas fermentações em bateladas repetidas, quando o meio fermentado era removido e meio fresco adicionado para dar início a uma nova batelada, um procedimento similar a etapa de lavagem era realizado. Por outro lado, quando meio YPDX foi suplementado com etanol, não ocorreu a “etapa de lavagem”, de modo que a operação foi reduzida a apenas 4 bateladas. Assim como aconteceu com a cultura contínua (Fig. 5.3), os experimentos em bateladas repetidas em meio YPDX apresentaram uma excelente performance até mesmo quando obtidas elevadas concentrações finais de etanol, confirmando a importância das etapas de lavagens durante fermentações longas (Fig.5.7A).

Os resultados obtidos em fermentações em bateladas repetidas realizadas em meios YPDX+EtOH e YPHC-II (Fig. 5.7B-C) indicaram que ambos, etanol e compostos inibitórios presentes no meio hidrolisado hemicelulósico concentrado, afetaram significativamente a performance fermentativa quando as células foram expostas a esses inibidores por ~24 horas. Além disso, as fermentações realizadas em meio YPHC-II+EtOH (Fig. 5.7D) confirmaram o forte efeito sinérgico desses inibidores, que foi extremamente tóxico quando ambos faziam parte da composição do meio de cultivo. O mesmo ambiente tóxico foi produzido durante a fermentação contínua de YPHC-I, responsável por causar um colapso na operação contínua após ~7 horas (Fig. 5.3).

Vale a pena destacar que os perfis de conversão de açúcares na primeira batelada foram muito similares para todos os meios fermentativos (Fig. 5.7), indicando que os efeitos dos compostos tóxicos não podem ser avaliados em uma única fermentação. As ótimas performances nas primeiras bateladas são provavelmente resultado da proteção temporária oferecida pela técnica de imobilização celular, que forma uma barreira de proteção às células no interior dos *beads* (MILESSI et al., 2020a; SUN et al., 2007). As altas produtividades ainda obtidas nas primeiras bateladas podem ser atribuídas à presença de glicose nos meios YPDX e YPHC-II (Tabela 5.4).

Apesar da sua importância, existem poucos trabalhos em literatura que avaliam a performance de cepas recombinantes em condições industriais utilizando hidrolisados obtidos a partir de matérias primas de baixo custo. Milessi e colaboradores (2020a) avaliaram a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar de composição similar ao hidrolisado YPHC-I utilizado nos estudos do presente capítulo por células imobilizadas de *S. cerevisiae* GSE16-T18. Os autores reportaram uma queda

na produtividade de etanol de 5 g/L/h na primeira batelada para 3.3 g/L/h na terceira batelada, similar à observada no presente estudo, de 8.3 para 3.2 g/L/h nas fermentações em meio YPHC-II (Tabela 5.4). Jin e colaboradores (2012) avaliaram a performance fermentativa de *S. cerevisiae* 424A (LNH-ST) em hidrolisado de palha de milho rico em xilose (30 g/L) e observaram redução de 89% na taxa de consumo de xilose no hidrolisado em comparação com o meio sintético contendo quantidade equivalente de xilose. Assim como observado no presente estudo, a baixa performance resultante da fermentação contínua de hidrolisado ácido obtido a partir de resíduos florestais utilizando *S. cerevisiae* CBS 8066 imobilizada em alginato de cálcio também foi atribuída à exposição contínua da levedura a elevadas concentrações de inibidores presentes no hidrolisado.

Fermentações contínuas utilizando hidrolisados hemicelulósicos são raramente reportadas em literatura, sendo que, na maioria dos casos, os hidrolisados são submetidos a etapas adicionais de destoxificação ou diluição, com o objetivo de torná-los menos tóxicos (CRESPO et al., 2012; GEORGIEVA; AHRING, 2007; TALEBNIA; TAHERZADEH, 2006). Mishra e colaboradores (2016) estudaram a produção contínua de etanol 2G utilizando hidrolisado enzimático de palha de arroz e *S. cerevisiae* GSE16-T18 imobilizada em alginato de cálcio variando as taxas de diluição durante o processo. Os autores obtiveram um perfil de estado estacionário por 72 horas, produzindo aproximadamente 42 g/L de etanol com produtividade de 26 g/L/h. Os resultados superiores obtidos por Mishra e colaboradores (2016) estão provavelmente relacionados à menor quantidade de lignina na palha de milho em comparação com o bagaço de cana-de-açúcar, que gera menores quantidades de inibidores (GUO et al., 2009). Além disso, o hidrolisado de palha de milho foi preparado por hidrólise enzimática, processo que gera uma quantidade de inibidores bastante inferior ao pré-tratamento ácido, no entanto incorpora elevados custos ao processo (HAGHIGHI; HOSSEIN; TABATABAEI, 2013). Devido ao alto custo do tratamento enzimático, os tratamentos ácido e hidrotérmico aparecem, até o momento, como as melhores alternativas para aplicação em escala industrial (SOLARTE-TORO et al., 2019; YANG, B., TAO, L., WYMAN, 2017). No entanto, como apresentado no presente capítulo, os altos níveis de inibidores gerados durante o pré-tratamento, especialmente quando utilizada alta carga de sólidos, ou ainda quando os hidrolisados são submetidos a uma etapa adicional de concentração, essenciais para gerar hidrolisados com altas concentrações de açúcares,

consistem no maior desafio a ser contornado para viabilizar a produção de etanol 2G em escala industrial a partir de hidrolisados hemicelulósicos.

Nesse sentido, técnicas de destoxificação têm sido amplamente utilizadas para produzir hidrolisados contendo elevadas concentrações de açúcares (BADER; GERMEC; TURHAN, 2020; LI et al., 2019), apesar do alto custo. Por outro lado, uma alternativa para obter meios fermentativos industriais contendo altas concentrações de açúcar e baixa carga de inibidores é a suplementação de hidrolisados lignocelulósicos com matérias-primas industriais ricas em açúcares de baixo custo, como caldo de cana ou melaço, isto é, integrar a produção de etanol 1G e 2G (MILESSI et al., 2019). Apesar disso, melhorias futuras na tolerância a etanol e inibidores de cepas recombinantes também vão abrir caminho para o estabelecimento de processos fermentativos robustos, viáveis economicamente e estáveis.

5.4 Conclusões

Os resultados apresentados no presente capítulo exploraram a produção contínua de etanol 2G em condições industriais por *S. cerevisiae* recombinante imobilizadas em biorreator de leito fixo utilizando elevadas concentrações de xilose na corrente de alimentação do reator e meio fermentativo composto por hidrolisado hemicelulósico rico em xilose. Para manter a fermentação contínua e estável de xilose utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* HAA1, a estratégia de introdução de etapas de lavagem do sistema e de suplementação do mesmo com nutrientes (peptona e extrato de levedura) foi validada. Por outro lado, os fortes efeitos sinérgicos da presença de etanol e inibidores em processos fermentativos utilizando *S. cerevisiae* HAA1 foram destacados. Esta é uma questão importante e complexa na busca e no desenvolvimento de um processo industrial robusto e viável para produção de etanol, que merece ser abordado no contexto da Biorrefinaria aliado à análise técnico-econômica.

Capítulo 6 SELEÇÃO DE MEIO FERMENTATIVO E DE LINHAGEM DE LEVEDURA SUPERIOR PARA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM REATOR DE LEITO FIXO

O presente capítulo desta tese tem como base artigo que está em fase de redação intitulado “*Towards a feasible industrial 2G ethanol production process based on recombinant S. cerevisiae: medium and strain selection for robust fixed-bed reactor operation*”. Esse artigo é resultado de um esforço conjunto de parte dos integrantes do grupo de pesquisa “Laboratório de Fábricas Celulares” – LaFaC (DEQ/UFSCar), sendo que parte dos resultados aqui apresentados foram realizados durante a presente tese de doutorado, enquanto a outra parte dos resultados foi obtida no Mestrado de Laís Pereira e foram incluídos neste capítulo para subsidiar a discussão, sendo devidamente referenciados. Finalmente, os ensaios em biorreator de leito fixo foram realizados em conjunto pela Doutoranda Caroline Perez, pela Mestranda Laís Pereira e pela Doutoranda Juliana Sandri, respectivamente.

6.1 Introdução

O conceito de biorrefinaria é baseado na utilização total da biomassa vegetal para produção de energia, combustíveis e/ou produtos químicos, de modo que a integração da produção de etanol 1G e 2G representa um importante avanço nesse aspecto, capaz de aumentar a eficiência da planta, bem como aumentar a sustentabilidade do processo e reduzir os impactos econômicos e ambientais da produção de combustíveis (AGUIAR et al., 2021; DIAS et al., 2013; LIU et al., 2013). Nesse sentido, produzir etanol a partir de resíduos lignocelulósicos de maneira eficiente e economicamente viável, apesar de promissor em teoria, tecnicamente ainda é um desafio.

Conforme citado no capítulo anterior, um processo robusto e competitivo de produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos deve conter elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis visando reduzir os custos relacionados à destilação (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003). No entanto, após a etapa de pré-tratamento, seja ele hidrotérmico ou por hidrólise ácida, os hidrolisados obtidos a partir de bagaço de cana geralmente apresentam baixas concentrações de xilose (ANTUNES et al., 2019; ZHANG et al., 2020). Como alternativa para obtenção de hidrolisados mais concentrados em açúcares, a razão “sólido:líquido” durante a etapa de pré-tratamento e as condições de operação podem ser ajustadas. Porém, essas mesmas condições

favorecem a formação de inibidores do processo fermentativo. Por outro lado, hidrolisados mais concentrados em açúcares podem ser obtidos a partir de hidrolisados diluídos pelo método de evaporação, comumente empregado na indústria. No entanto, assim como ocorre com a concentração de açúcares, a concentração dos inibidores gerados na etapa de pré-tratamento também aumentará na etapa de evaporação. A presença de inibidores e a concentração dos mesmos nos hidrolisados podem afetar a fisiologia celular e resultar em perda de viabilidade das células de levedura durante a fermentação, bem como ocasionar reduções de rendimento e produtividade em etanol (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000), como observado nos ensaios descritos no capítulo anterior utilizando hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado (HC).

Como relatado anteriormente, as pesquisas em engenharia genética e biologia molecular estão sempre buscando o desenvolvimento de cepas mais resistentes e robustas para que possam ser aplicadas em processos industriais de produção de etanol 2G resultando em elevados rendimentos em produto (DEMEKE et al., 2013a; HOANG NGUYEN TRAN et al., 2020; MEIJNEN et al., 2016; STOJILJKOVIC; FOULQUIÉ-MORENO; THEVELEIN, 2020). No entanto, o uso combinado de outras técnicas, como imobilização celular, destoxificação de hidrolisados ou mistura de hidrolisados com melaço ou caldo de cana, também pode trazer vantagens nos processos, tornando-os mais robustos e viáveis técnica e economicamente.

No capítulo anterior, fermentações em bateladas repetidas se destacaram pelo uso de meio fresco a cada reciclo, que alivia o estresse celular em função da exposição a etanol e melhora o desempenho do processo, bem como produtividade e rendimento em etanol e eficiência na conversão de açúcares. Por outro lado, mostrou-se que o desempenho das fermentações em condições industriais utilizando a linhagem *S. cerevisiae* HAA1 foi significativamente afetado pelos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico bruto e pelo etanol produzido durante as fermentações, destacando-se a necessidade de buscar cepas com potencial para aplicação industrial em meios contendo elevadas concentrações de açúcares e inibidores. A seleção de cepas robustas é indispensável para aplicação industrial por longos períodos, característico do processo Melle-Boinot, utilizado em 85% das usinas de produção de etanol brasileiras (AMORIM et al., 2011; BASSO; BASSO; ROCHA, 2011).

Como alternativa à utilização de hidrolisados hemicelulósicos concentrados e ricos em inibidores, a integração da produção de etanol 1G e 2G se destaca como uma abordagem para obtenção de hidrolisados com altas concentrações de açúcares, através

do enriquecimento de hidrolisados hemicelulósicos com melão ou caldo de cana-de-açúcar (MILESSI et al., 2019). A diluição de melão prévia à etapa de fermentação já é um processo consolidado em plantas de produção de etanol 1G, utilizada para ajustar o teor de açúcares no meio. Dessa forma, a mistura de hidrolisados hemicelulósicos e melão para aplicação como meio fermentativo apresenta diversas vantagens: aumentar a concentração de açúcares em hidrolisados sem que seja necessária uma etapa de concentração dos mesmos; aumentar a produtividade do processo devido à rápida assimilação de hexoses e economizar energia (GONÇALVES et al., 2014; MILESSI et al., 2020a).

A integração da produção de etanol 1G e 2G é amplamente discutida na literatura, porém a maioria dos estudos são focados em análises técnico-econômicas e estudos da viabilidade do processo. Além disso, alguns trabalhos avaliam a aplicação de leveduras selvagens para fermentação apenas da fração celulósica da biomassa, resultando na subutilização da fração hemicelulósica, ao passo que alguns trabalhos investigam a cocultura de organismos selvagens capazes de assimilar glicose e xilose individualmente (DE ANDRADE et al., 2013; ERDEI et al., 2010; FARIAS; MAUGERI FILHO, 2019; GUTIÉRREZ-RIVERA et al., 2015; HENRY; KUMAR, 2018), o que gera processos com baixas produtividades em etanol. Até o presente momento, não foram encontrados registros em literatura de trabalhos que avaliem a integração de processos de produção de etanol 1G e 2G utilizando microrganismos recombinantes.

Nesse contexto, no presente capítulo desta tese objetivou-se desenvolver um processo fermentativo de alta performance e industrialmente viável de produção de etanol 2G a partir de hidrolisados hemicelulósicos em biorreator de leito fixo utilizando uma levedura recombinante selecionada imobilizada em alginato de cálcio. Três leveduras *S. cerevisiae* distintas, modificadas para adquirir a capacidade de assimilar eficientemente xilose (T18, HAA1 e MDS130), foram avaliadas com relação à sua capacidade fermentativa em meios industriais contendo até 106 g/L de açúcares, os quais foram preparados a partir de sub-produtos de plantas processadores de cana-de-açúcar, visando integrar a produção de etanol 1G e 2G. A configuração meio-levedura que apresentou os resultados mais promissores em escala de mini-reator foi validada em biorreator de leito fixo operado em regime de bateladas repetidas.

6.2 Materiais e métodos específicos

Os experimentos nesta etapa do trabalho foram desenvolvidos utilizando as leveduras modificadas *S. cerevisiae* GSE16-T18 (T18), GSE16-T18 HAA1 (HAA1) e MDS 130 em suas formas imobilizadas em alginato de cálcio. As etapas de preparação de pré-inóculo, inóculo e imobilização das células estão descritas no Capítulo 4, Materiais e Métodos.

Antes dos experimentos com ciclos de células, a robustez das leveduras imobilizadas na presença de elevada concentração de etanol foi caracterizada em mini-reatores contendo solução hidroalcolica com 60 g/L de etanol (valor correspondente à concentração após a adição dos *beads* de levedura). Para isso, em mini-reatores foram adicionados 4mL de *beads* de levedura (T18, HAA1 ou MDS130) e 4 mL de solução contendo 120 g/L de etanol. Os mini-reatores foram incubados estaticamente a 35 °C e amostras dos *beads* das 3 leveduras avaliadas foram retiradas ao longo de 100 horas de incubação, seguidas por análises de viabilidade celular.

Após a caracterização de tolerância ao etanol, foram realizados ensaios fermentativos em bateladas repetidas utilizando mini-reatores contendo meios fermentativos industriais preparados a partir de hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado (HB), hidrolisado bruto concentrado (HC), hidrolisado destoxificado (HD) e hidrolisado bruto não concentrado suplementado com melaço (MHB). A obtenção e o preparo dos mesmos estão descritos nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3 do Capítulo 4. Os meios foram suplementados com peptona (40 g/L), extrato de levedura (20 g/L) e CaCl₂ (4 g/L). Experimentos utilizando meio sintético YPDX e meio YPXDHB foram preparados com composição em açúcares equivalente à dos hidrolisados, e foram utilizados como ensaios fermentativos de referência. É importante destacar que os desvios apresentados nesta parte da tese foram obtidos a partir da propagação de desvio relativo, estimado a partir de experimentos em duplicata realizados em meios contendo concentrações equivalentes de açúcares e calculados de acordo com o teste de Tukey (95 % de confiança). A Tabela 6.1 mostra quais meios foram preparados a partir de hidrolisados hemicelulósicos ou melaço (A), suas respectivas composições prévias à formulação dos meios (B) e as concentrações de cada meio fermentativo avaliado, bem como o total de açúcares fermentescíveis de cada um deles (C). É importante destacar que, após a adição dos meios aos *beads* de levedura, as composições dos meios fermentativos são diluídas aproximadamente 1,8 vezes (MILESSI et al., 2020a).

Tabela 6.1 Presença de hidrolisado ou melaço em cada meio industrial utilizado nas fermentações (A), composição dos meios utilizados para formulação do meio MHB (B) e composição detalhada dos distintos meios industriais e meios de referência utilizados na avaliação da performance fermentativa das cepas T18, HAA1 e MDS130 (C). Essas concentrações foram determinadas antes da adição de meio às células imobilizadas de levedura

(A) Presença de hidrolisados ou melaço nos meios fermentativos avaliados						
	YPDX	YPHD	YPHC	YPXDHB	MHB1	MHB2
HB (Bruto não concentrado)	-	-	-	Sim	Sim	Sim
HC (Bruto concentrado)	-	-	Sim	-	-	-
HD (Destoxificado)	-	Sim	-	-	-	-
Melaço	-	-	-	-	Sim	Sim
(B) Composição dos meios hidrolisado não concentrado e melaço previamente à formulação dos meios MHB						
	HB	Melaço				
Xilose	18,2	-				
Glicose	1,3	79,5				
Sacarose	-	719,2				
Frutose	-	79,2				
Ácido acético	4,6	-				
Furfural	0,3	-				
Hidroximetilfurfural (HMF)	0,006	-				
(C) Composição dos meios (g/L)						
	YPDX	YPHD	YPHC	YPXDHB	MHB1	MHB2
Extrato de levedura	20,0	20,0	20,0	20,0	-	-
Peptona	40,0	40,0	40,0	40,0	-	-
Xilose	95,1	98,8	86,8	88,8	17,2	16,2
Glicose	9,7	7,6	9,1	9,3	6,9	6,8
Sacarose	-	-	-	-	63,8	61,2
Frutose	-	-	-	-	6,1	5,9
Ácido acético	-	2,81	6,47	3,33	4,06	4,11
Furfural	-	0,011	0,37	0,219	0,267	0,251
HMF	-	0,002	0,016	0,004	0,005	0,005
Total de açúcares fermentescíveis	104,9	106,4	95,9	98,1	94,0	90,1

HB: hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado; HC: hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado; HD: hidrolisado hemicelulósico destoxificado; MHB1: composição do meio em fermentações em mini-reatores; MHB2: composição do meio na fermentação em biorreator de leito fixo (MHB: hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado suplementado com melaço; nd – não detectado.

Fonte: Parcialmente adaptado de Pereira (2021)

As concentrações dos meios foram determinadas por CLAE, conforme descrito em 4.6.2 e os procedimentos de cálculos foram realizados conforme descrito em 4.7.2.

6.2.1 Ensaio em biorreator de leito fixo

Após a seleção da linhagem e do meio industrial que apresentaram resultados mais promissores nos experimentos em mini-reatores, a combinação selecionada foi avaliada em um biorreator de leito fixo (BLF) com 100 ml de volume total, descrito com detalhes por Milessi e colaboradores (2020a) e mostrado na Fig. 6.1. O biorreator foi carregado com 40 g de *beads* em uma câmara de fluxo laminar e posteriormente instalado em um suporte universal e conectado ao banho termostático a 35 °C. Para dar-se início à operação, 40 mL de meio MHB2 foi inserido pela parte inferior do sistema com o auxílio de uma bomba peristáltica. Amostras foram retiradas por um amostrador inserido na parte superior do BLF a cada 30 minutos durante cada batelada para acompanhamento do consumo de açúcares e formação de produtos. Ao final de cada batelada, o meio fermentado era removido do sistema e novo meio adicionado para dar início a uma nova batelada, enquanto as células eram retidas no sistema (PEREIRA, 2021).

Figura 6.1 Reator de leito fixo em operação contendo 40 mL de células de *S. cerevisiae* MDS130 imobilizadas em alginato de Cálcio e 40 mL de meio MH2. Condições fermentativas: pH 5,6 e 35 °C.



Fonte: Arquivo pessoal da autora

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Caracterização geral das diferentes linhagens de levedura *S. cerevisiae* recombinantes

Nos últimos 6 anos, foram desenvolvidas diversas leveduras recombinantes de última geração pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Johan Thevelein (KU Leuven, Bélgica), a exemplo da T18, HAA1 e MDS 130, com o objetivo de aprimoramento contínuo das linhagens para adequá-las às características requeridas para a utilização das mesmas em processos industriais: elevada tolerância a compostos inibitórios presentes nos meios fermentativos; alto rendimento em etanol; assimilação eficiente dos açúcares fermentescíveis e formação mínima de subprodutos, como glicerol, xilitol e ácido acético.

De acordo com Demeke et al. (2013a), a levedura T18 é uma cepa de *S. cerevisiae* modificada para o consumo de xilose, apresentando altas taxas de consumo da mesma. Ela foi obtida através da inserção de genes de xilose isomerase (XI) de *Clostridium phytofermentans* na levedura *Ethanol Red*, utilizada industrialmente na produção de etanol 1G, por meio de técnicas de análise poligênica seguida por adaptação evolutiva.

A levedura GSE16-T18 HAA1 (HAA1), descrita no trabalho de Meijnen e colaboradores (2016), foi desenvolvida para melhorar a tolerância da levedura T18 ao ácido acético. Para isso, foi aplicada uma técnica de análise de plataforma poligênica para elucidar a base genética da elevada tolerância à ácido acético, de modo que foi identificado o gene HAA1, um regulador conhecido de tolerância ao ácido acético, bem como os genes GLO1, DOT5, CUP2 e VMA7 como novos genes determinantes para alta tolerância ao ácido acético. Duas cópias do alelo superior contendo uma mutação no gene HAA1, objetivando a melhoria da tolerância ao ácido acético, foram inseridos na levedura T18.

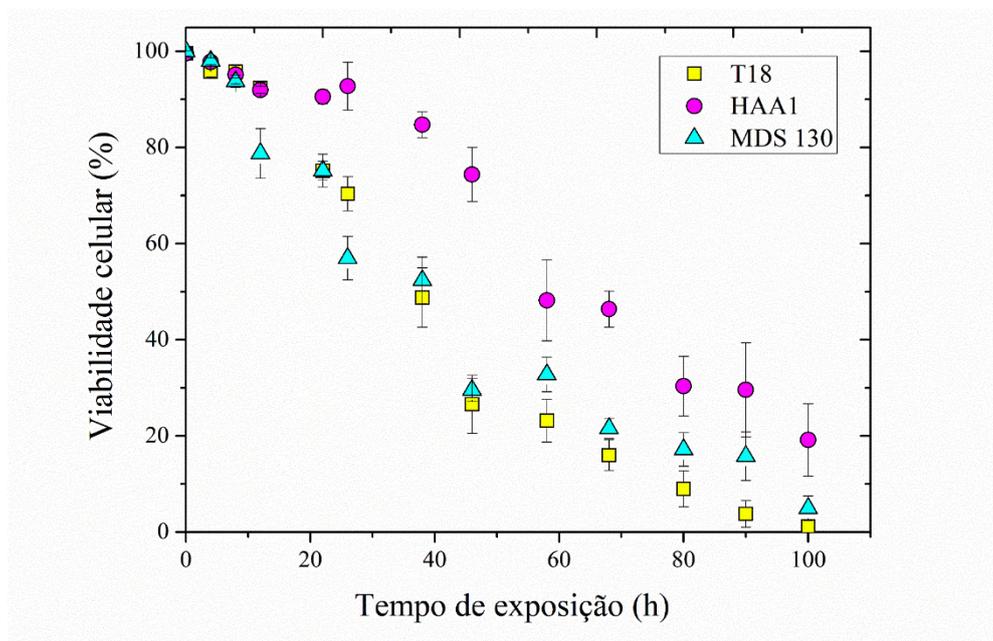
A linhagem MDS 130, por sua vez, também foi cedida pelo Prof. Johan Thevelein. Essa levedura também é derivada da GSE16-T18, após melhorias para consumo de xilose e tolerância a inibidores presentes em hidrolisados (LIAO et al., 2020). Dessa forma, foram realizados experimentos em bateladas repetidas empregando diferentes meios fermentativos para avaliar o desempenho das leveduras T18, HAA1 e MDS 130.

6.3.2 Tolerância a etanol

O etanol é o principal produto das fermentações por *S. cerevisiae*, no entanto, elevadas concentrações do mesmo podem ser prejudiciais às células de leveduras, principalmente quando se trata de cepas modificadas, como observado no Capítulo 5 desta tese. Dessa forma, o efeito letal do etanol sobre as células das leveduras T18, HAA1 e MDS 130, imobilizadas em alginato, foi avaliado em solução hidroalcolica contendo 120 g/L de etanol, de modo que, após a adição dos *beads*, a concentração final de etanol em solução foi de aproximadamente 60 g/L. Os experimentos foram conduzidos simultaneamente a 35 °C e os resultados estão apresentados na Fig. 6.2.

A partir da Fig. 6.2 é possível observar que, nas condições estudadas, a levedura HAA1 apresentou maior resistência à exposição à solução contendo 60 g/L de etanol, uma vez que as viabilidades celulares desta cepa foram superiores ao longo do tempo de exposição em comparação com as outras duas cepas avaliadas, T18 e MDS 130.

Figura 6.2 Viabilidade das células de levedura T18, HAA1 e MDS 130 imobilizadas em alginato de cálcio em função do tempo de exposição em solução hidroalcolica contendo 60 g/L de etanol. Condição: 35 °C



Fonte: Elaborado pela autora

O efeito da exposição das células imobilizadas ao etanol é uma função da concentração de etanol e também do tempo de exposição. Conforme prolonga-se o

tempo de exposição, as células de levedura perdem sua viabilidade, conforme mostra a Fig. 6.2. Em elevadas concentrações, o etanol aumenta a taxa de morte celular, sendo que, em condições fermentativas, ele pode afetar a biossíntese de macromoléculas, reduzindo assim as atividades de algumas enzimas e modificando o metabolismo celular (HALLSWORTH; NOMURA; IWAHARA, 1998; HU et al., 2007; STANLEY et al., 2010).

A levedura *S. cerevisiae* selvagem é conhecida pela sua elevada resistência a etanol, e apesar dos esforços da engenharia genética para desenvolver leveduras recombinantes com características adequadas para utilização em condições industriais, as alterações das vias metabólicas artificialmente introduzidas nos organismos recombinantes podem torná-los mais sensíveis a condições de estresse (DEPARIS et al., 2017b). Dessa forma, selecionar cepas robustas de leveduras recombinantes fermentadoras de xilose é essencial para viabilizar o processo de produção de etanol 2G. Na condição avaliada, a cepa HAA1 apresentou maior robustez à exposição ao etanol, apresentando viabilidade superior a 40% mesmo após 40 horas de exposição a 60 g/L de etanol, indicando que é a mais resistente com relação à presença desse inibidor. Por outro lado, é também importante avaliar a performance das leveduras em condições fermentativas e utilizando meios fermentativos industriais. Assim, foram realizadas fermentações em meios contendo hidrolisados, melaço e em meio sintético.

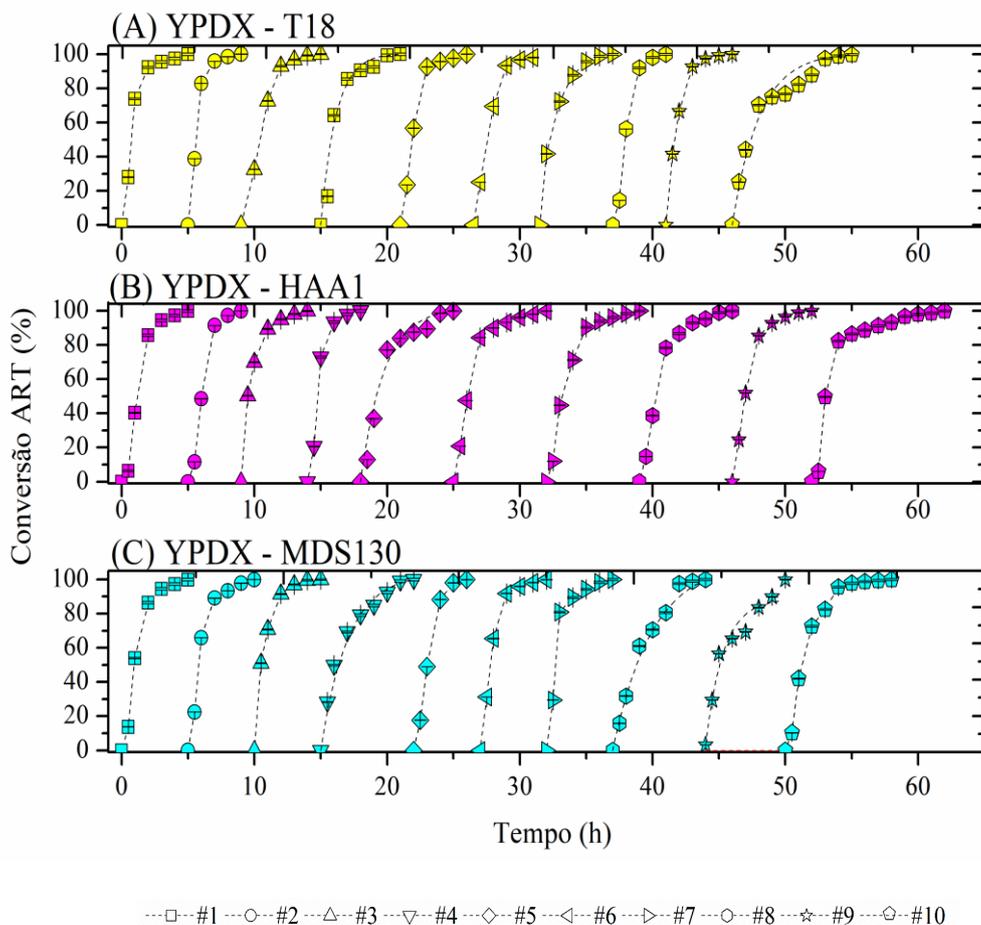
6.3.3 Performance das leveduras em meio YPDX

A performance das leveduras recombinantes em meio sintético YPDX contendo concentração de açúcares semelhante à concentração presente em meios industriais foi avaliada. A caracterização das leveduras em meio isento de inibidores é essencial para avaliar a performance das mesmas na presença de elevadas concentrações de açúcares, que podem levar a altas concentrações de etanol nos meios fermentativos. Além disso, os resultados das fermentações em meio sintético são referência para analisar o desempenho dessas leveduras em meios industriais e direcionar as pesquisas para melhorias de processo. Os perfis de conversão obtidos durante os experimentos utilizando reciclo de células em meio YPDX estão apresentados na Fig. 6.3.

As três leveduras recombinantes apresentaram perfis semelhantes de conversão de açúcares durante 10 bateladas repetidas, convertendo praticamente a totalidade de

açúcares presentes no meio fermentativo em todos os ciclos. Os resultados em rendimento, produtividade e concentração de etanol inicial e final em cada ciclo fermentativo para cada uma das leveduras são mostrados na Fig. 6.4. Valores exatos e desvios são mostrados na Tabela 1 no Apêndice A.

Figura 6.3 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPDX pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 104,9 g/L açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6, estático. Cada curva distinta representa um ciclo

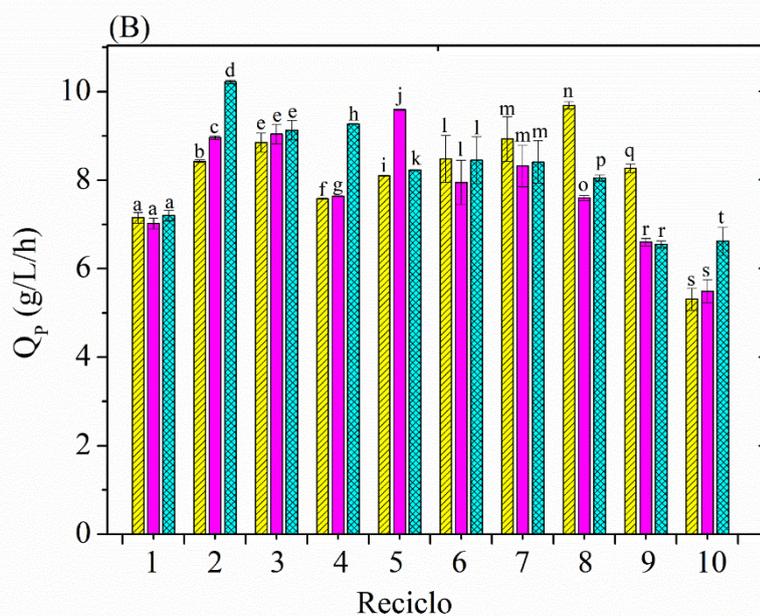
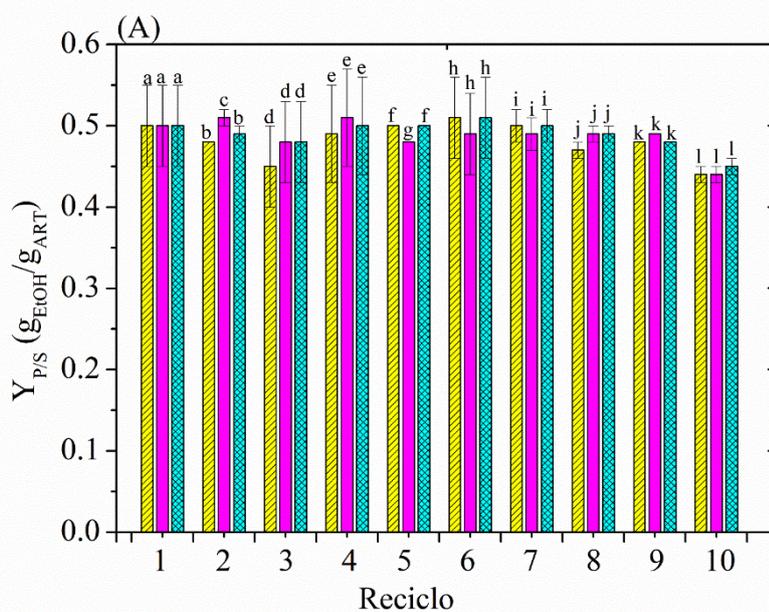


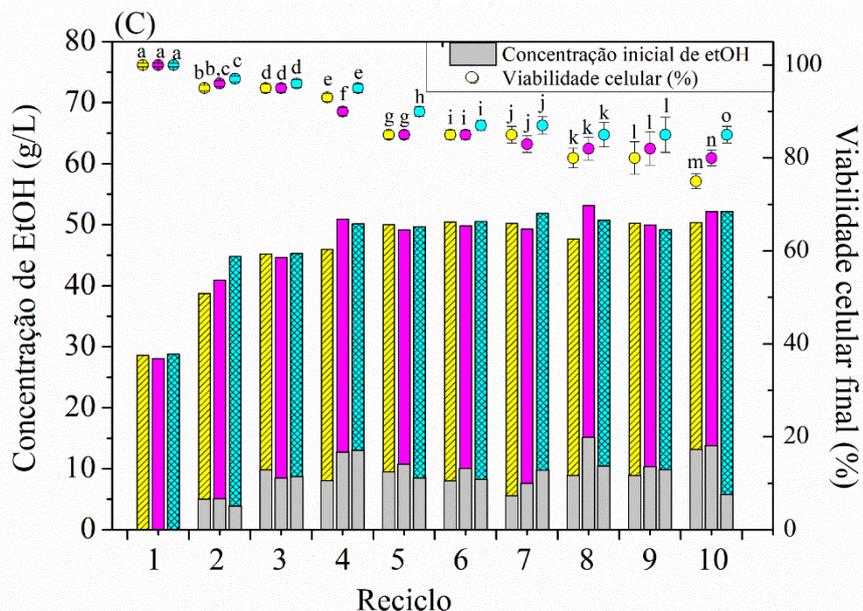
Fonte: Elaborado pela autora

Como mostrado na Fig. 6.4, as 3 leveduras estudadas apresentaram comportamento estatisticamente semelhante em termos de rendimento, produtividade e viabilidade de acordo com o teste de Tukey com 95 % de confiança. Rendimentos se mantiveram em valores acima de 0,44 g_{EIOH}/g_{ART} e as produtividades apresentaram uma leve redução apenas no último ciclo, provavelmente devido à queda na viabilidade

(devido à exposição a etanol por mais de 50 horas), que apresenta um perfil lento de diminuição à medida que o número de bateladas aumenta (Fig. 6.4C).

Figura 6.4 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPDx para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais para parâmetros em um mesmo reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança





Fonte: Elaborado pela autora

Milessi e colaboradores (2020a) estudaram a fermentação de meio YPX contendo 40 g/L de xilose utilizando células da levedura T18 imobilizada em alginato de cálcio e também alcançaram 10 bateladas repetidas com performances similares, conversão de xilose muito próxima a 100%, produção de aproximadamente 17 g/L de etanol e rendimento de 0,44 $\text{g}_{\text{EtOH}}/\text{g}_{\text{xilose}}$, sem formação de subprodutos. No experimento de Milessi e colaboradores (2020a), as produtividades em etanol variaram entre 4,1 e 4,7 g/L/h, sendo que a duração das 10 bateladas repetidas totalizou 47 horas. Por outro lado, as bateladas repetidas do presente estudo apresentaram duração média de 60 horas, devido à maior concentração de açúcares iniciais, equivalente a 104,9 g/L. Além disso, maiores concentrações de açúcares iniciais levam à produção de quantidades elevadas de etanol, que podem afetar a velocidade das fermentações e a viabilidade das células. Após 10 ciclos realizados pelos autores supracitados, as viabilidades celulares ainda se mantinham em torno de 98%, enquanto no presente estudo as mesmas variaram entre 75-85%, indicando que os maiores tempos de fermentação, principalmente na última batelada, provavelmente estão relacionados à perda de viabilidade celular. De acordo com Ansanay-Galeote (2001) o efeito inibitório do etanol é uma das principais razões para a lentidão nas fermentações, sendo que sua presença em elevadas concentrações é altamente tóxica para o crescimento e metabolismo celular.

Wahlbom e colaboradores (2003) estudaram o desempenho de *S. cerevisiae* TMB 3400 durante a fermentação de 20 g/L de xilose em modo batelada, obtendo

rendimento em etanol de 0,25 g_{EtOH}/g_{xilose} e produtividade de 0,10 g_{EtOH}/g_{ms}/h. Sonderegger et al. (2004) avaliaram a fermentação de meios contendo xilose e glicose (50 g/L de cada) em batelada por duas cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, F12 e BH42, e obtiveram rendimentos de 0,26 e 0,28 g_{EtOH}/g_{ART}. Ho e colaboradores estudaram a fermentação de meio YEPX contendo 50 g/L de xilose por *S. cerevisiae* 1400 e obtiveram rendimento de 0,3 g_{EtOH}/g_{Xilose}. Esses resultados obtidos em processos de batelada relatados na literatura reforçam a superioridade das cepas estudadas no presente trabalho em meio sintético.

O desempenho das leveduras recombinantes também pode ser comparado com o das leveduras naturalmente fermentadoras de xilose. Dhabhai; Chaurasia e Dalai (2012) estudaram a fermentação de uma mistura de 50,75 g/L de açúcares contendo glicose e xilose na proporção (1:5 de glicose para xilose) utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* co-cultivadas com células de *Pichia stipitis*. O rendimento obtido foi de 0,47 g_{EtOH}/g_{ART} e a produtividade foi de 0,43 g/L/h, valor bastante inferior às produtividades obtidas no presente estudo.

6.3.4 Performance das linhagens de *S. cerevisiae* recombinante em meios industriais

6.3.4.1 Fermentação de meio hidrolisado bruto concentrado (HC)

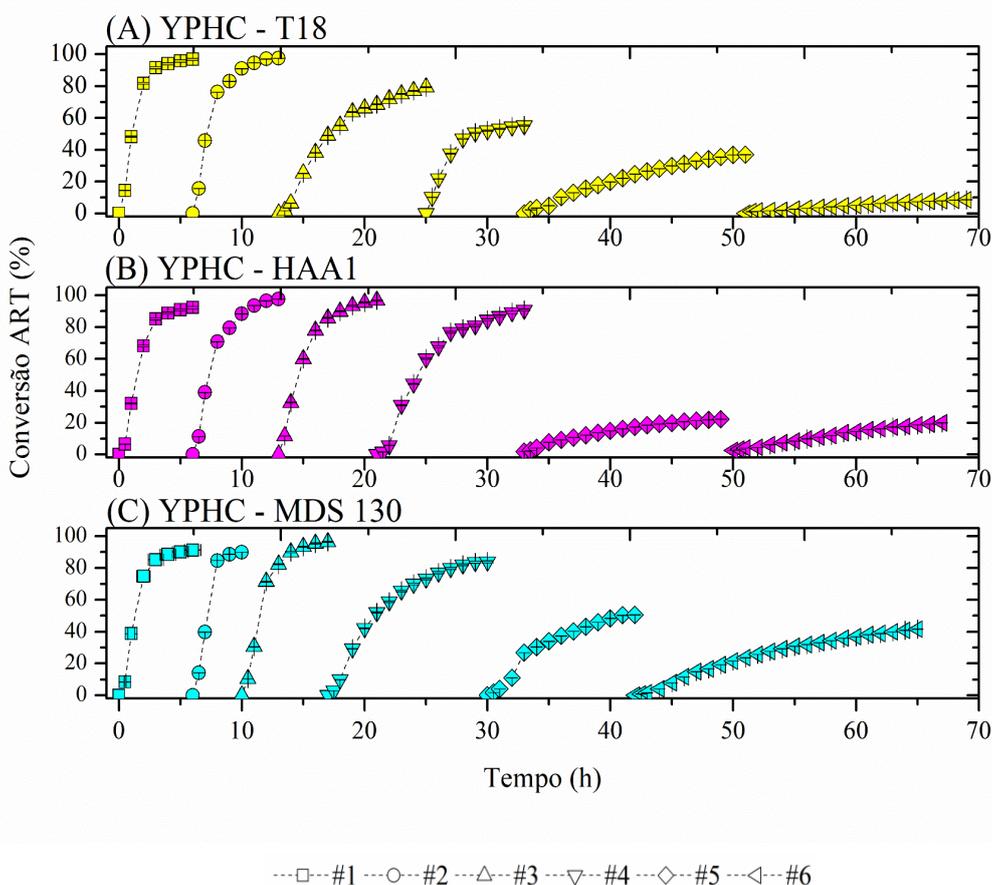
O tratamento do bagaço de cana utilizando ácido diluído é reconhecido como um método eficiente para liberar quantidades significativas de xilose rapidamente a partir da solubilização da fração hemicelulósica e da hidrólise dos oligossacarídeos, resultando em um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose e arabinose (ALVIRA; BALLESTEROS; NEGRO, 2010). Apesar de ser um dos métodos mais versáteis de despolimerização da hemicelulose, inibidores como furfural, HMF, compostos fenólicos (ANTUNES et al., 2016a) e ácido acético (BELLISSIMI et al., 2009a; MEIJNEN et al., 2016) são gerados durante o tratamento.

Para que o processo de produção de etanol 2G seja viável industrialmente, as fermentações devem apresentar resultados promissores em meios industriais, formulados a partir de hidrolisados hemicelulósicos e/ou melaço, contendo elevada concentração de açúcares redutores, de modo a produzir altas concentrações de etanol, acima de 40 g/L, visando reduzir os custos de destilação (WINGREN; GALBE; ZACCHI, 2003). Para garantir a concentração de açúcares iniciais desejada, o

hidrolisado hemicelulósico utilizado no presente estudo foi concentrado. No entanto, além de maior concentração de açúcares, os inibidores presentes no meio também foram concentrados, como mostrado na Tabela 5.1.

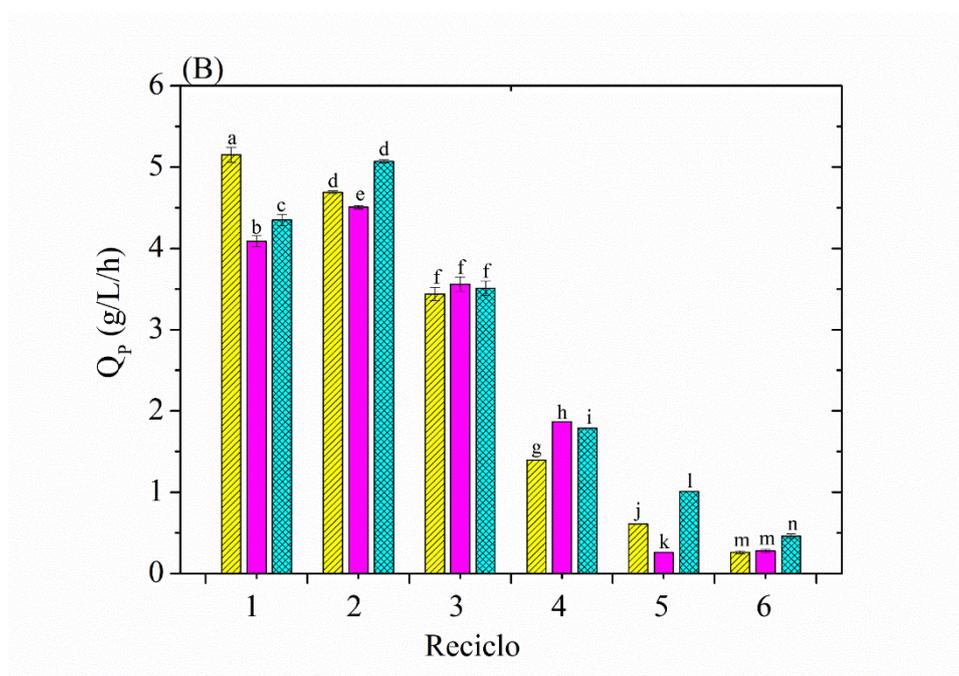
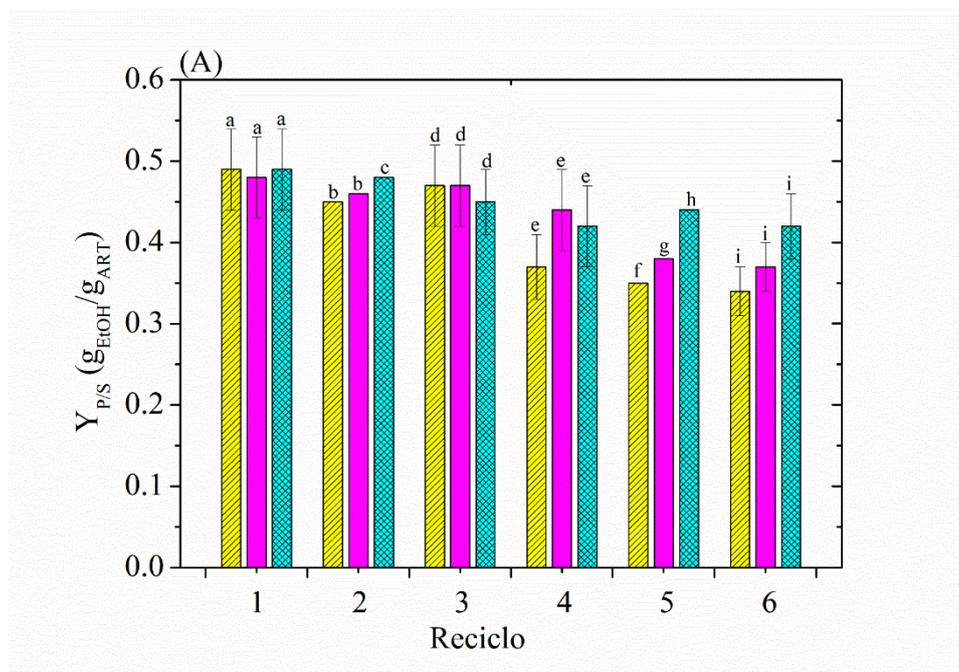
Para avaliar o desempenho das diferentes leveduras recombinantes em meio formulado com hidrolisado bruto concentrado (YPHC), foram realizadas fermentações em bateladas repetidas utilizando as leveduras T18, HAA1 e MDS 130 imobilizadas em alginato de cálcio. Os perfis de variação da conversão de açúcares fermentescíveis ao longo do tempo para as diferentes leveduras em meio YPHC estão apresentados na Fig. 6.5. A Fig. 6.6 mostra resultados em concentração de etanol (inicial e final em cada reciclo), rendimento e produtividade em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo.

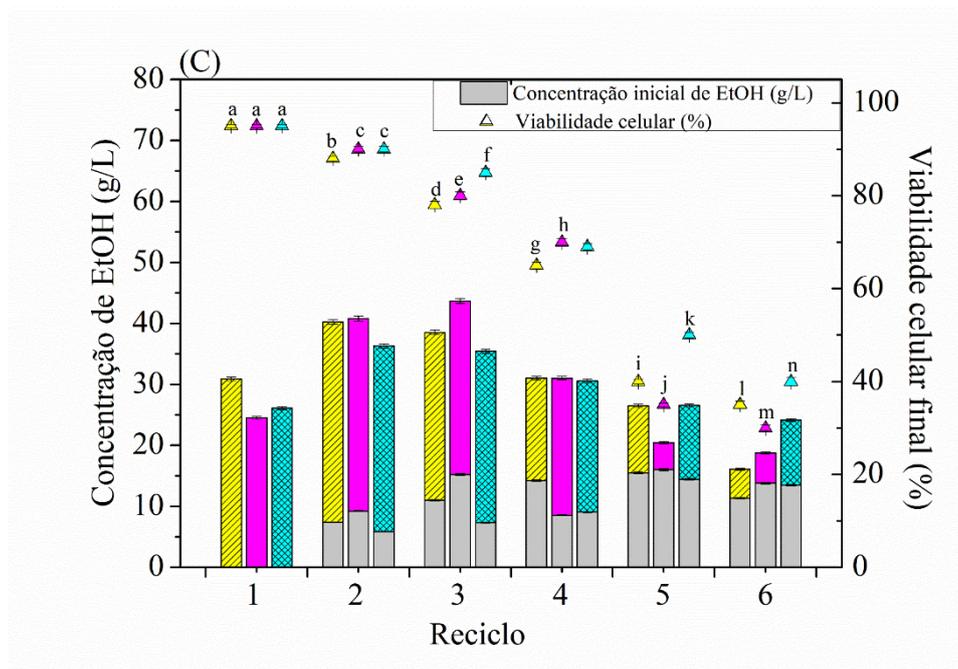
Figura 6.5 Acompanhamento da conversão de açúcares fermentescíveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPHC pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 95,9 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6, estático. Cada curva representa um reciclo



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 6.6 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPHC para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança





Fonte: Elaborado pela autora

Foram realizadas 6 bateladas repetidas utilizando as 3 distintas leveduras recombinantes. Na presença do hidrolisado bruto concentrado, nenhuma levedura conseguiu reproduzir o ciclo de 10 fermentações sucessivas com alta conversão de açúcares observada no meio YPD_X (Fig. 6.3). Além do menor número de ciclos, não houve conversão total de ART em todas as bateladas. A levedura T18 apresentou bom desempenho nas 2 primeiras bateladas, com conversão de ART muito próxima de 100%. No entanto, a partir da terceira batelada, o desempenho da mesma passou a cair gradativamente, de modo que a conversão de ART passou a diminuir, enquanto que os tempos de fermentação aumentaram. A última batelada, por sua vez, não superou 10% de conversão, de modo que o processo foi interrompido e a viabilidade das células ao final do processo foi de 35%, como mostra a Fig. 6.6C. A levedura HAA1 apresentou desempenho satisfatório nas 4 bateladas iniciais, com elevada conversão de ART e aumento do tempo de fermentação de 6 horas, na primeira batelada, para 11 horas, na quarta. As bateladas 5 e 6, no entanto, apresentaram desempenho notavelmente inferior às bateladas anteriores, com conversão de ART abaixo de 20%, longa duração e viabilidade celular de 30% ao final do processo. A levedura MDS 130 também foi capaz de fermentar satisfatoriamente 4 bateladas repetidas com conversão elevada de ART. As bateladas 5 e 6 apresentaram desempenho inferior às bateladas anteriores com relação à conversão de ART, que foi próxima a 50 e 40%, respectivamente. Além disso, o tempo

de duração das 2 últimas bateladas foi significativamente superior à duração das bateladas anteriores e a viabilidade final das células foi equivalente a 40% (Fig. 6.6C).

Como mostra a Fig. 6.6, as produtividades se mantiveram elevadas por 3 ciclos para as 3 leveduras utilizadas, sendo bastante inferiores nos últimos 3 ciclos, provavelmente devido ao tempo de exposição aos inibidores presentes no meio fermentativo, bem como ao etanol gerado durante o processo. De um modo geral, a performance das leveduras HAA1 e MDS 130 em meio YPHC foi superior com relação à conversão de açúcares, uma vez que foram capazes de converter mais de 90% dos açúcares totais por 4 ciclos. Rendimentos em etanol foram estatisticamente semelhantes para as 3 leveduras nos ciclos 1-4, sendo significativamente superiores para a levedura MDS130 nos 2 últimos ciclos (Fig. 6.6B). O desempenho da linhagem HAA1 foi ainda consistente com o observado no experimento em batelada repetida, também em meio contendo hidrolisado bruto com concentração de ART inicial ~40 % maior (Fig. 5.7 – Capítulo 5), no qual 3 ciclos de alta conversão foram alcançados. Valores exatos de produtividade, rendimento e concentrações de etanol, bem como viabilidades celulares finais são mostrados na Tabela 2 do Apêndice A.

Analisando as Fig. 6.6A-C de acordo com o teste de Tukey (95% de confiança), percebe-se que a levedura MDS130 se destaca tanto no quesito produtividade e rendimento em etanol, quanto em viabilidades celulares finais considerando todos os ciclos realizados. Na sequência, o segundo melhor desempenho foi da levedura HAA1 e os piores resultados foram obtidos com a cepa T18. O desempenho superior da levedura recombinante MDS130 já era esperado, uma vez que foi desenvolvida para que fosse mais tolerante a ácido acético e inibidores, presentes em elevada concentração no HC.

Meijnen e colaboradores (2016) obtiveram resultados bastante satisfatórios quando compararam o desempenho das leveduras T18 e HAA1 durante fermentações em meio YP contendo 20% de glicose, suplementados ou não com ácido acético em diferentes concentrações (1%, 1,2%, 1,4%, 1,6% e 2%). A performance da cepa HAA1 foi superior à cepa T18 em todos os experimentos utilizando as diferentes concentrações de ácido acético, e especialmente a fase lag, foi substancialmente menor nas fermentações utilizando a cepa HAA1, de modo que as taxas fermentativas foram superiores em relação às taxas obtidas pela cepa T18, como já era esperado.

O efeito inibitório de compostos gerados durante a etapa de pré-tratamento e hidrólise é bastante conhecido e estudado em processos de fermentação utilizando a

levedura *S. cerevisiae*. O ácido acético, mesmo em baixas concentrações, pode prejudicar severamente o desempenho fermentativo de leveduras (ALMEIDA et al., 2007; CASEY et al., 2010). Dessa forma, a tolerância a esse componente é uma característica importante industrialmente, principalmente quando se trata de uma levedura artificialmente fermentadora de pentoses (BELLISSIMI et al., 2009a; CASEY et al., 2010; MATSUSHIKA; SAWAYAMA, 2012). Apesar da cepa MDS130 ter apresentado resultados superiores, a mesma ainda não foi capaz de reproduzir o cenário obtido em meio YPD, indicando que não tem potencial pra ser utilizada em fermentações em meio HC, que nesse caso continha 6,47 g/L de ácido acético em sua composição.

Milessi e colaboradores (2020a) estudaram a fermentação de meio YP contendo 40 g/L de xilose em bateladas repetidas utilizando células de levedura T18 imobilizadas em alginato de cálcio em concentração similar à do presente estudo (DO = 100). Na presença de 8 g/L de ácido acético, quantidade levemente superior à concentração de ácido acético no HC, os autores realizaram 10 bateladas repetidas com elevada conversão de xilose e duração total de 120 horas. A produção de etanol média foi de aproximadamente 17 g/L, o rendimento de 0,43 g_{EtOH}/g_{xilose} e a produtividade de 1,6 g/L/h. Esses resultados sugerem que as quedas em produtividade, rendimento, conversão de açúcares e menor número de bateladas repetidas obtidas no presente estudo para as 3 leveduras recombinantes avaliadas, estão relacionadas com a sinergia da presença de ácido acético e outros inibidores, e também podem estar relacionadas às maiores quantidades de etanol produzidas nas fermentações do presente estudo, devido à maior concentração de ART. Os mesmos autores mencionados acima realizaram fermentações em bateladas repetidas utilizando a levedura T18 imobilizada em Ca-alginato e meio hidrolisado bruto concentrado semelhante ao utilizado no presente estudo, composto por xilose (100 g/L), glicose (9,7 g/L), furfural (0,368 g/L), HMF (0,016 g/L), ácido acético (6,5 g/L) e suplementado com peptona (40 g/L) e extrato de levedura (20 g/L), obtendo 3 bateladas repetidas com elevada conversão de açúcares, resultados condizentes com os obtidos neste estudo. As produtividades em etanol também diminuíram com os ciclos, e passaram de 5 para 3,3 g/L/h na primeira e terceira bateladas, respectivamente, em comparação com 5,15 e 3,44 g/L/h no presente estudo. Os autores ainda atribuíram o número limitado de bateladas repetidas obtido à presença de outros inibidores no hidrolisado, como furfural e HMF, que afetaram

diretamente a performance das fermentações, como também aconteceu no presente estudo.

Furfural e HMF presentes em hidrolisados também são relatados como inibidores do metabolismo microbiano. Furfural em concentração de 0,2% foi reportado como responsável por inibir completamente fermentação por *S. cerevisiae*, bem como reduzir as concentrações de DNA e lipídeos das células e prejudicar enzimas presentes nas mesmas (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988; TAHERZADEH et al., 2000). Apesar dos efeitos do HMF terem sido reportados como mais brandos em relação ao furfural (TAHERDAZEH et al., 2000), diversos autores relataram efeitos adversos da presença de HMF em fermentações realizadas por *S. cerevisiae*, influenciando a taxa de crescimento e a taxa fermentativa das células de *S. cerevisiae* quando HMF estava presente em concentrações entre 1-5 mg/mL (PFEIFER, BONN, 1984; RAJAK; BANERJEE, 2020; TAHERZADEH et al., 2000). Por outro lado, a presença de ambos os inibidores, furfural e HMF foi relatada como extremamente tóxica às células. Taherzadeh e colaboradores (1997) encontraram uma relação direta entre a taxa fermentativa e as quantidades de furfural e HMF, independente da origem do hidrolisado. Dessa forma, a presença de não apenas ácido acético, furfural, HMF no hidrolisado concentrado, mas também de outros inibidores que não foram quantificados, mas podem estar presentes em hidrolisado ácido de bagaço de cana, como compostos fenólicos e vanilina, aliados ao etanol produzido durante o processo, afetaram o desempenho fermentativo das bateladas repetidas utilizando as 3 diferentes cepas de *S. cerevisiae* recombinante do presente estudo, mesmo imobilizadas, assim como relatado no Capítulo anterior.

Zhang e colaboradores (2019b) avaliaram fermentações de meios preparados a partir de hidrolisado de sorgo doce pré-tratado com H_2SO_4 e diluídos, utilizando uma levedura recombinante *S. cerevisiae* comercial em sua forma livre e concluíram que a presença de etanol e inibidores prejudicou a performance das fermentações proporcionalmente às quantidades presentes nos meios fermentativos. Da mesma forma, no presente estudo, fermentações em meio isento de inibidores apresentaram rendimentos mais elevados em etanol (Fig. 6.4A), ao passo que fermentações em meio YPHC, contendo inibidores do metabolismo microbiano, apresentaram menores valores de rendimento em etanol, como pode ser observado na Fig. 6.6A. Resultados bastante semelhantes foram obtidos por Sandri (2019), que avaliou o desempenho da levedura MDS 130 em sua forma livre em meio hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar

concentrado, contendo glicose (9,27 g/L), xilose (60,63 g/L), ácido acético (11,16 g/L), HMF (0,21 g/L) e furfural (0,24 g/L). A autora obteve conversão de xilose e glicose de apenas 27 e 42%, respectivamente nas fermentações em meio hidrolisado, ao passo que em meio YPDX contendo açúcares nas mesmas concentrações, os mesmos foram totalmente consumidos. Adicionalmente, ao final das fermentações, a viabilidade das células cultivadas em hidrolisado foi de 65%, enquanto em meio YPDX foi de 80%, indicando mais uma vez o efeito da sinergia de inibidores sobre a performance de fermentações

Considerando o grau de toxicidade dos compostos presentes no hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado, os resultados obtidos em relação a desempenho fermentativo, rendimento em etanol, produtividade e viabilidades celulares, apesar de superiores para a linhagem MDS 130, ainda foram muito semelhantes para as três leveduras avaliadas, de modo que nenhuma delas se destacou como promissora para ser utilizada em processos industriais utilizando meio YPHC. As quedas de desempenho a partir da quarta batelada foram associadas às quantidades de inibidores presentes no meio preparado a partir de hidrolisado bruto. Dessa forma, optou-se por avaliar a utilização de hidrolisados destoxificados como alternativa para reduzir a toxicidade do hidrolisado na tentativa de aumentar o número de bateladas repetidas realizadas. O processo de destoxificação envolve a realização de uma sequência de etapas posteriores ao pré-tratamento com o objetivo de remover parte dos inibidores presentes no meio hidrolisado bruto concentrado.

6.3.4.2 Fermentação de meio hidrolisado destoxificado (HD)

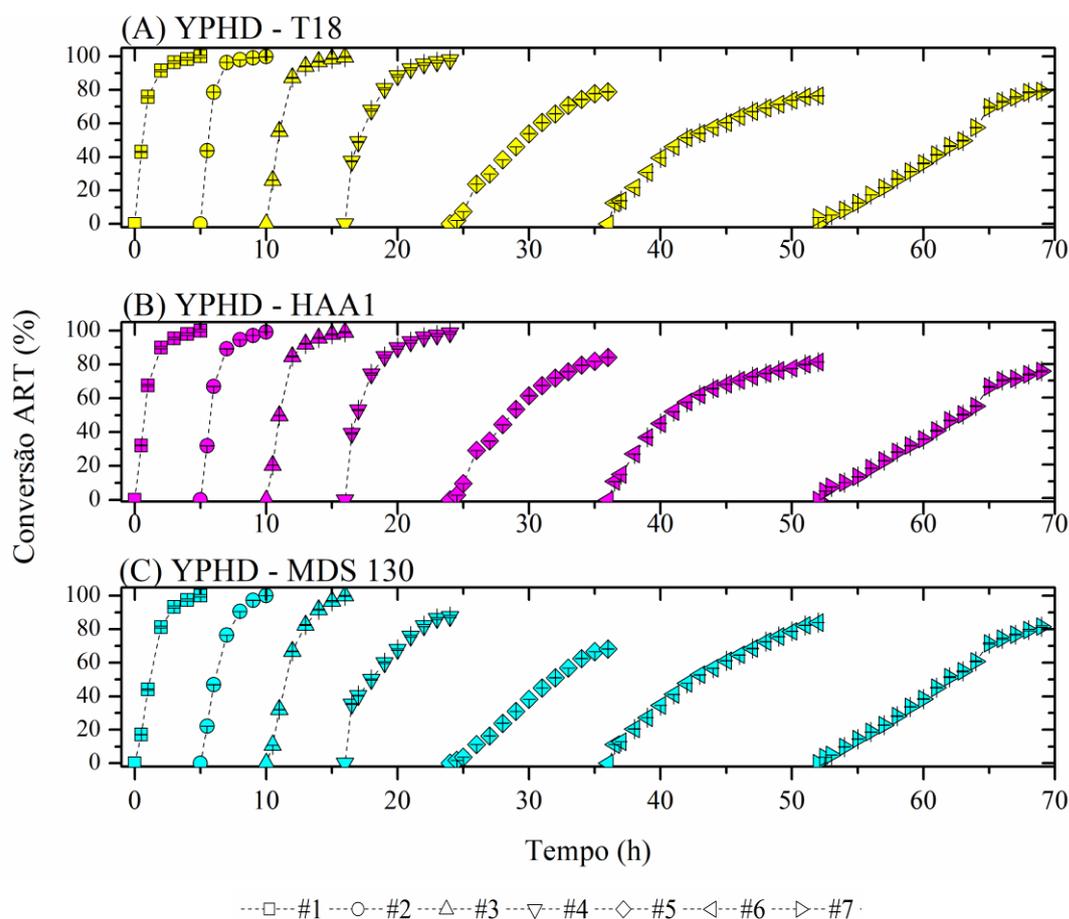
Conforme visto anteriormente em meio hidrolisado bruto concentrado (HC), a despolimerização da hemicelulose por processos químicos permite elevados rendimentos em xilose, porém gera potenciais inibidores (CHANDEL et al., 2009; GÍRIO et al., 2010) que afetam a taxa de assimilação de açúcares com diminuição da formação de produtos.

O método de destoxificação utilizado no presente trabalho é um método químico e foi capaz de remover grande parte do HMF, furfural e ácido acético presentes no hidrolisado bruto concentrado (Tabela 6.1). Utilizando o mesmo método, Alves e colaboradores (1998) reduziram as concentrações de HMF e furfural de hidrolisado ácido de bagaço de cana-de-açúcar, apesar de não terem removido significativamente ácido acético. Sandri (2019) também utilizou um método de destoxificação similar em

hidrolisado semelhante ao do presente trabalho, e obteve redução das concentrações de HMF, furfural e ácido acético, de modo que o método é considerado eficaz para redução da toxicidade em hidrolisados e não apresenta custos elevados.

Os resultados em conversão de açúcares fermentescíveis utilizando as leveduras T18, HAA1 e MDS 130 em meio YPHD são mostrados na Fig. 6.7. É possível observar que foram realizados 7 ciclos para as 3 leveduras utilizadas, e os resultados em função da conversão de açúcares também foram bastante semelhantes. Resultados em função de produtividades, rendimento, concentrações de etanol e viabilidades celulares são mostrados na Fig. 6.8.

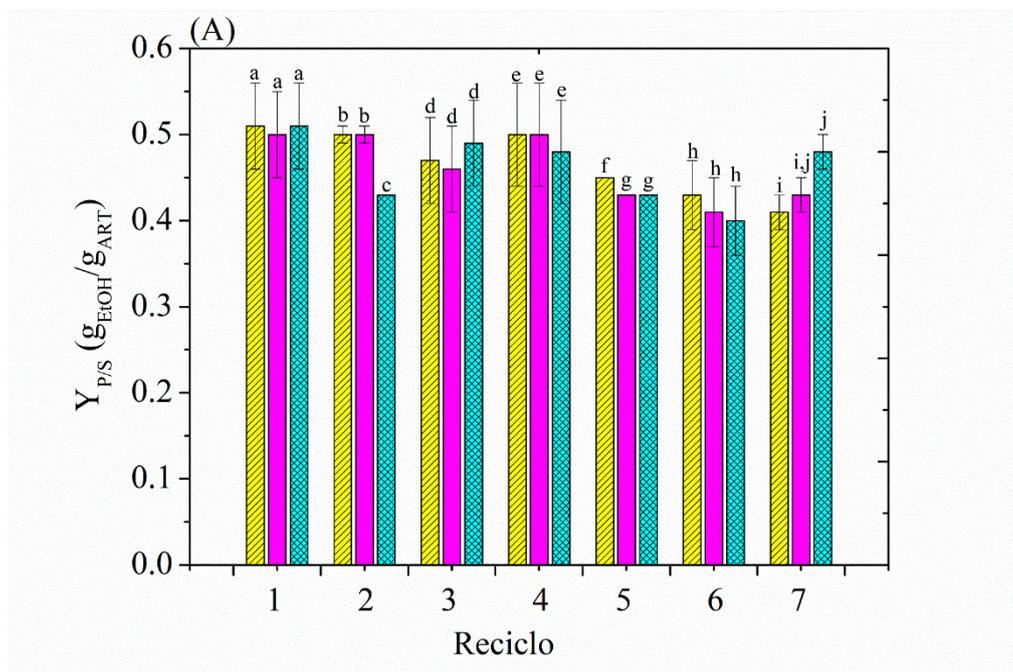
Figura 6.7 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPHD pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 106,4 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo

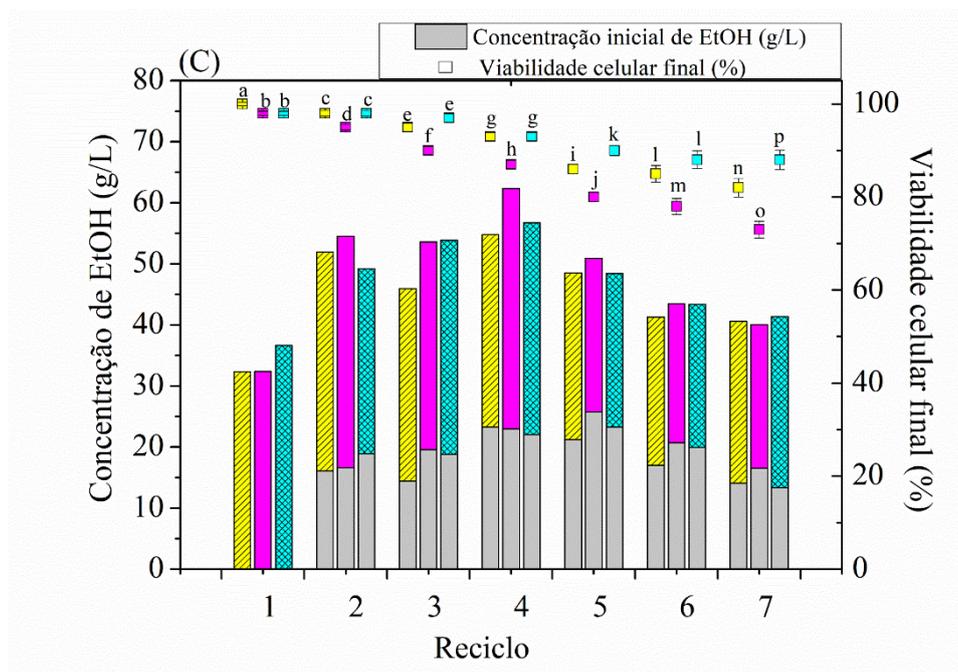
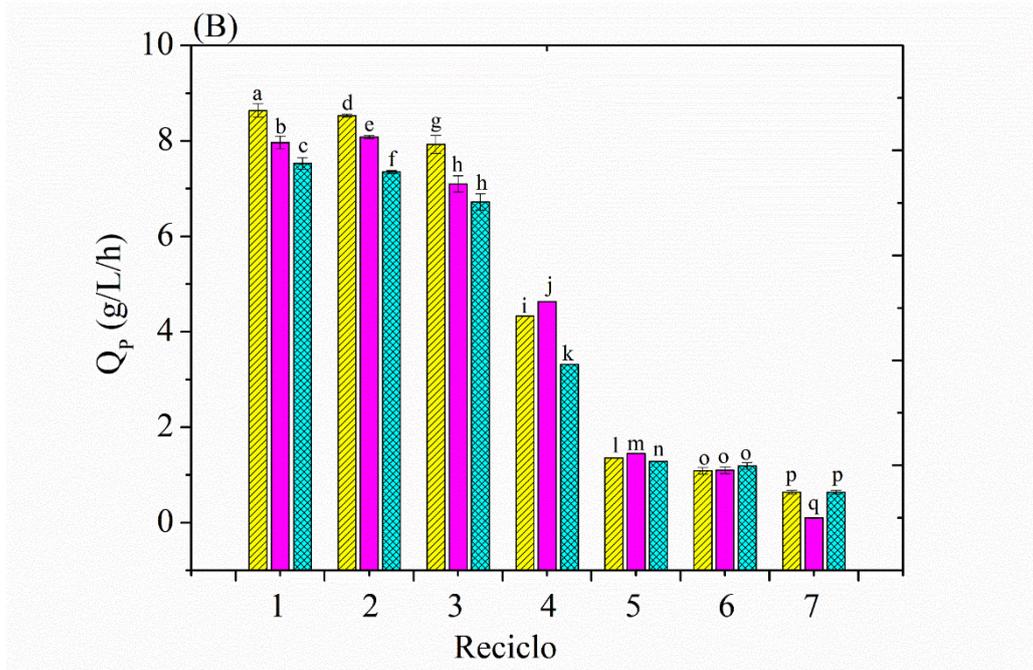


Fonte: Elaborado pela autora

Novamente, nenhuma linhagem conseguiu reproduzir no meio contendo o hidrolisado destoxificado o desempenho observado no meio YPD_X, com 10 fermentações sucessivas em alta conversão (Fig. 6.3). As quatro primeiras bateladas utilizando as 3 leveduras apresentaram conversão de açúcares acima de 90%, sendo que a conversão da quarta batelada utilizando a levedura MDS 130 foi um pouco inferior em comparação com as outras leveduras. A partir da quarta batelada o desempenho das fermentações começou a diminuir, de modo que as bateladas passaram a durar mais tempo e a conversão de açúcares foi diminuindo, refletindo em menores produtividades em etanol, como pode ser observado na Fig. 6.8 B, que passaram de valores entre 6-8 g/L/h nas primeiras bateladas para 3-5 g/L/h na quarta batelada, e valores abaixo de 1 g/L/h, na sétima batelada. Valores exatos das concentrações de etanol e índices de performance são mostrados na Tabela 3 do Apêndice A.

Figura 6.8 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPHD para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança





Fonte: Elaborado pela autora

Analisando as Fig. 6.8 A-C de maneira geral, observa-se que a linhagem T18 se destacou em termos de produtividade e rendimento em etanol, ao passo que HAA1 foi a pior delas em termos de viabilidade celular final.

Zhao e Xia (2010) estudaram a fermentação de hidrolisado ácido de palha de milho concentrado e destoxificado, contendo xilose (71,8 g/L) e ácido acético (1,16 g/L) por *S. cerevisiae* ZU-10 imobilizada em alginato de cálcio. Os autores foram capazes de

realizar 5 bateladas repetidas com conversão de xilose acima de 92%, produção de etanol acima de 30 g/L e rendimento em etanol acima de 0,39 g_{EiOH}/g_{xilose}. Cada batelada durou um total de 72 horas, tempo bastante superior ao tempo das bateladas realizadas nesse ensaio. Os resultados obtidos no presente estudo com relação ao rendimento em etanol foram superiores aos obtidos por Zhao e Xia (2010), uma vez que permaneceram acima de 0,40 g_{etanol}/g_{ART} por 7 bateladas. Por outro lado, desempenhos inferiores em função da conversão de açúcares provavelmente foram decorrentes da concentração de etanol, que foi superior no presente estudo.

Martín e colaboradores (2002) avaliaram a fermentabilidade de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado por explosão a vapor e posteriormente hidrolisado por enzimas em sua forma bruta e destoxificada através de *overliming* utilizando Ca(OH)₂. O hidrolisado antes do tratamento com Ca(OH)₂ continha, além de glicose e xilose, ácido acético (4 g/L), furfural (1,4 g/L), HMF (0,3 g/L) e fenóis (4,2 g/L), e após a destoxificação, apresentou redução na concentração dos inibidores ácido acético (3 g/L), furfural (1 g/L), HMF (0,15 g/L) e fenóis (3,2 g/L). Os hidrolisados foram fermentados por *S. cerevisiae* TMB 3001 recombinante em sua forma livre. Os resultados obtidos em termos de rendimento em etanol foram de 0,35 g_{EiOH}/g_{ART} para o hidrolisado que passou por tratamento utilizando Ca(OH)₂ e 0,26 g_{EiOH}/g_{ART} para o hidrolisado bruto, além de produtividades específicas de etanol de 0,26 e 0,14 g/g/h para os hidrolisados tratado e bruto, respectivamente. O método de destoxificação utilizado pelos autores não foi considerado promissor, uma vez que as concentrações de inibidores no meio tratado ainda foram elevadas, de modo que prejudicaram a performance do processo fermentativo, apesar de apresentar resultados superiores com relação ao hidrolisado não tratado. Em comparação com resultados obtidos no presente trabalho, rendimentos em etanol foram superiores tanto para o hidrolisado bruto, quanto para hidrolisado destoxificado (Fig.6.6B e 6.8B). Sandri (2019) avaliou o desempenho de fermentações utilizando células livres de MDS 130 em meio hidrolisado destoxificado, obtendo total consumo de glicose e apenas 34% de consumo de xilose, respectivamente. Os rendimentos globais em etanol dos processos foram equivalentes a 30% no caso no hidrolisado destoxificado e 17 % no caso do hidrolisado bruto, indicando a alta influência dos inibidores presentes no meio mesmo após a destoxificação do mesmo.

Certamente o método de destoxificação aplicado contribuiu para reduzir as concentrações de furfural, HMF e ácido acético no meio fermentativo, que resultou na manutenção da viabilidade celular a níveis semelhantes da observada em meio YPDX

isento de inibidores (Figs. 6.4C e 6.8C). As produtividades em etanol obtidas nos 3 primeiros ciclos fermentativos também se mantiveram próximas aos valores obtidos em meio YPD_X, como mostrado nas Fig. 6.4B e 6.8B. A partir do quarto ciclo, no entanto, as produtividades em etanol obtidas no meio YPHD diminuíram, chegando a valores próximos das obtidas em meio YPHB (Fig. 6.6B). A produtividade é um parâmetro influenciado por diferentes fatores, do número de células produzindo etanol, que está diretamente relacionado com a viabilidade celular, à cinética de fermentação. Analogamente, o etanol produzido durante as fermentações, bem como os compostos tóxicos presentes nos meios YPHC e YPHD que se acumulam a cada ciclo fermentativo prejudicam não somente as viabilidades celulares, mas também reduzem as taxas fermentativas, como já mostrado por mecanismos cinéticos de inibição (MESQUITA et al., 2021; SHULER; KARGI, 2002). Dessa forma, taxas fermentativas reduzidas devido ao aumento da concentração de inibidores no meio, juntamente com o etanol produzido ao longo dos ciclos, levaram à diminuição da produtividade no processo, como ilustrado com clareza na Fig. 6.8B.

As concentrações de etanol finais obtidas após cada ciclo fermentativo em meio YPD_X (Fig. 6.4C) foram semelhantes às obtidas em meio YPHD (Fig. 6.6C), acima de 45 g/L após a primeira batelada fermentativa. Esses resultados indicam que o efeito sinérgico entre inibidores presentes no meio fermentativo que se acumulam ao longo do processo, juntamente com o etanol produzido, prejudicaram a performance das fermentações. Resultados obtidos nas próximas etapas desta tese em meios preparados a partir hidrolisado bruto não concentrado (YPD_{XH} e MH) irão demonstrar que as concentrações de furfural, HMF e ácido acético presentes no meio YPHD não são suficientes para causar tamanha queda de desempenho no processo, de modo que, além do etanol produzido e das concentrações de furfural, HMF e ácido acético, ainda existem outros inibidores no hidrolisado destoxificado que foram concentrados e não removidos na etapa destoxificação, se acumulando ao longo dos ciclos fermentativos e prejudicando esta etapa. O efeito tóxico devido à combinação da presença de etanol e inibidores produzidos durante a etapa de pré-tratamento de bagaço de cana-de-açúcar já foi reportado por ser extremamente tóxico para células de levedura mesmo em sua forma imobilizada, intensificada pelo tempo de exposição (PEREZ et al., 2021).

Apesar dos resultados não terem sido promissores, as leveduras recombinantes aqui avaliadas ainda apresentaram performance superior à de microrganismos naturalmente fermentadores de pentose. Antunes e colaboradores (2019) utilizando

Scheffersomyces shehatae UFMG-MH 52.2 imobilizada em alginato de cálcio avaliaram a produção de etanol 2G em bateladas repetidas em biorreator de leito fluidizado a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por processo similar ao do presente trabalho. Os autores observaram queda significativa da conversão de açúcar após a quinta batelada, mesmo trabalhando com baixas concentrações de inibidores, açúcares e etanol (em torno de 30 g/L de xilose e 10 g/L de etanol). Adicionalmente, devido ao longo tempo de processo (72h), a produtividade observada nas bateladas ficou em torno de 0,3 g/L/h, valor expressivamente inferior ao observado no presente trabalho. Utilizando a levedura *Scheffersomyces stipitis* (aka *Pichia*), um dos microrganismos naturalmente fermentadores de xilose mais estudados para a produção de etanol 2G, Milessi (2012) conduziu a fermentação em bateladas repetidas em biorreator STR tipo cesta utilizando as células imobilizadas em alginato e hidrolisado hemicelulósico ácido destoxificado contendo 35 g/L de xilose e obtido de forma semelhante ao do presente trabalho. Foram realizadas 3 bateladas com performance semelhantes, com rendimentos e produtividades da ordem de 0,2 g/g e 0,67 g/L/h, após as quais a produtividade caiu significativamente.

Desta forma, as leveduras recombinantes de última geração avaliadas no presente trabalho se destacam por apresentarem elevado rendimento e produtividade (da ordem de 10 vezes maior) quando comparadas aos microrganismos naturalmente fermentadores de xilose. Porém, a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico obtido por pré-tratamento ácido convencional seguida por concentração dificulta sua aplicação em larga escala, exigindo uma abordagem no contexto de Biorrefinaria para viabilizar sua utilização. Além disso, é importante destacar que a produção do hidrolisado bruto concentrado requer uma etapa adicional de evaporação, implicando no aumento do consumo de energia e conseqüentemente, no custo total do processo. Quando se trata da produção do hidrolisado destoxificado, além da etapa de concentração ainda se fazem necessárias as etapas de destoxificação, adicionando ainda mais custos ao processo (KUHAD et al., 2011) inerentes à adição de duas operações unitárias ao mesmo. Portanto, novas estratégias para aumentar a concentração de açúcares nos meios fermentativos sem que seja necessário aumentar a carga de inibidores do mesmo devem ser exploradas. Nesse sentido, a mistura de hidrolisados hemicelulósicos com outros produtos e subprodutos do processamento da cana-de-açúcar, como caldo de cana e melaço, se apresenta como uma solução mais promissora e ainda pouco explorada para

alcançar a concentração de açúcares desejada, dispensando as etapas de concentração de hidrolisado.

6.3.5 Fermentação de meios formulados com hidrolisado hemicelulósico bruto não concentrado (HB)

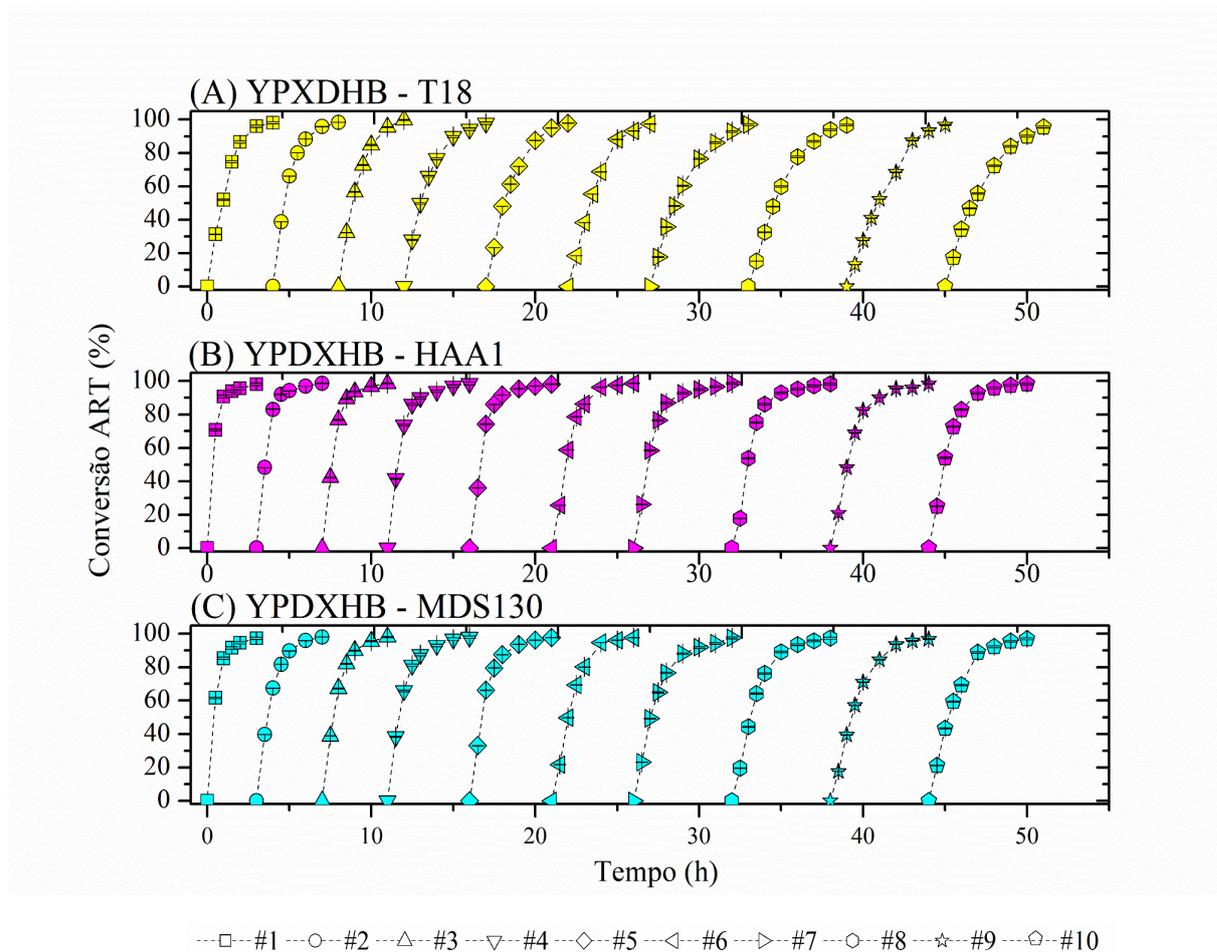
Como mostrado na seção anterior, o uso de evaporação para obtenção do hidrolisado bruto concentrado (HC) ou evaporação seguida de destoxificação para obtenção do hidrolisado destoxificado (HD) não foram estratégias promissoras para obtenção um meio fermentativo industrial, além de agregar um aumento no custo global do processo, tornando-o economicamente inviável. Dessa forma, Pereira (2021) avaliou o uso de hidrolisado hemicelulósico não concentrado suplementado com melaço para correção da concentração de açúcares do meio, promovendo assim a integração da produção de etanol 1G e 2G.

Um experimento preliminar de caracterização do hidrolisado bruto (não concentrado - HB) foi realizado. Para que a performance das leveduras fosse comparável aos ensaios em meio YPDX, YPHC e YPHD, o hidrolisado HB foi suplementado com peptona, extrato de levedura, xilose e glicose, obtendo-se o meio YPXDHB com concentrações similares de açúcares por Pereira (2021), conforme mostrado na Tabela 6.1C. Os resultados obtidos por PEREIRA (2021) em função da conversão de açúcares redutores totais e os índices de performance para cada uma das 3 leveduras avaliadas em cada um dos ciclos são reproduzidos nas Fig.6.9 e 6.10.

A Fig. 6.9 indica que as 3 leveduras avaliadas, T18, HAA1 e MDS130, foram capazes de realizar 10 ciclos fermentativos com conversão de ART acima de 95% e performances similares. As produtividades em etanol, com exceção do terceiro ciclo, foram significativamente inferiores para a linhagem T18, variando entre 5,1 e 7,4 g/L/h, ao passo que apresentou valores entre 7,8 e 9,5 g/L/h para HAA1 e entre 6,9 e 9,9 g/L/h para MDS130, como mostra a Fig. 6.10B (PEREIRA, 2021). Valores exatos de produtividade, rendimento e concentrações de etanol iniciais e finais, bem como de viabilidades celulares são mostradas na Tabela 1 do Anexo A. Os valores de produtividade em etanol inferiores para a levedura T18 podem ter ocorrido provavelmente devido a menor resistência dessa linhagem à exposição a etanol, uma vez que HAA1 e MDS130 são cepas derivadas da T18 e melhoradas para tolerância a etanol e ácido acético (DEMEKE et al., 2013a; LIAO et al., 2020). Os rendimentos em

etanol para as 3 leveduras avaliadas também foram semelhantes, apesar da linhagem HAA1 ter se destacado em alguns dos ciclos realizados.

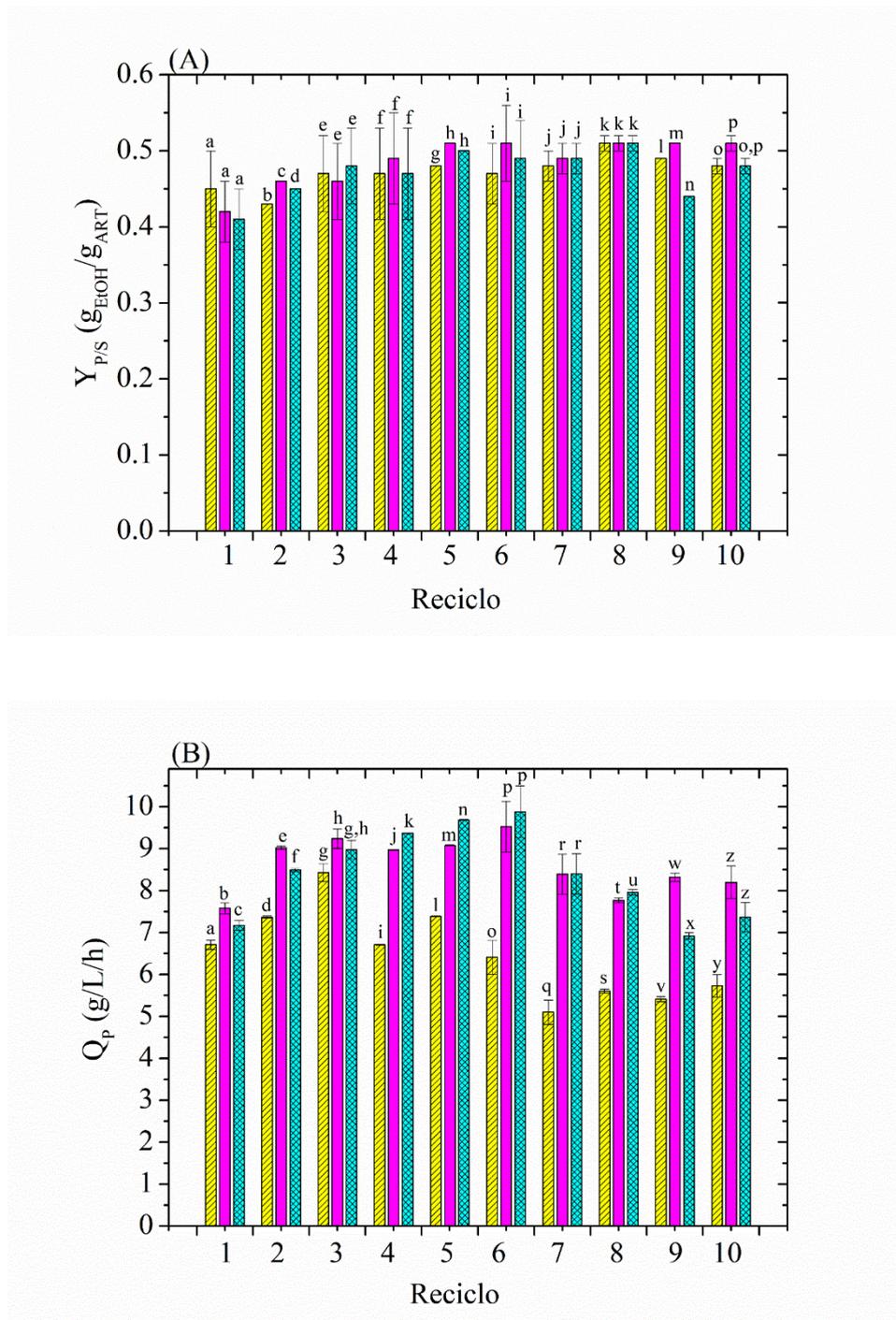
Figura 6.9 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPXDHB pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 98,1 g/L de açúcares iniciais, Do = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo

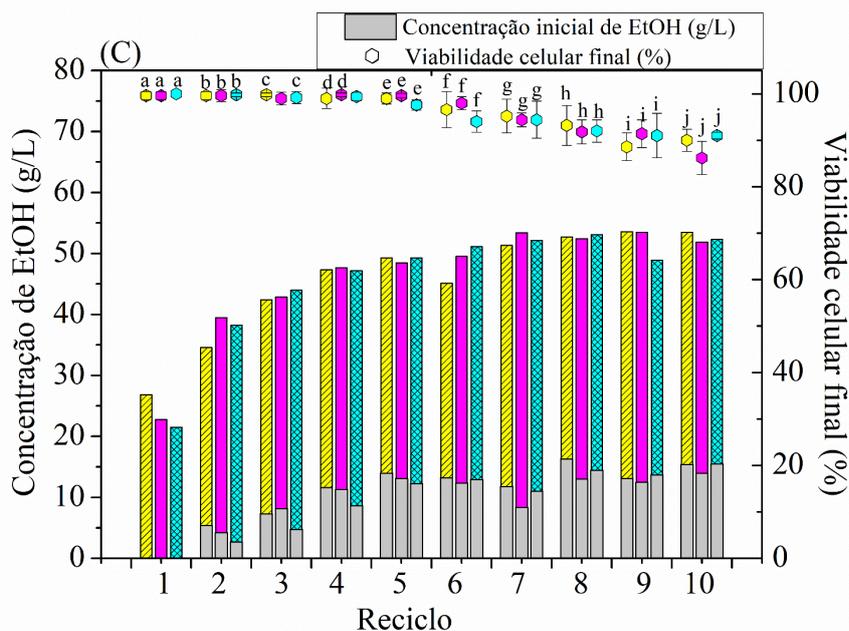


Fonte: Adaptada de Pereira (2021)

As viabilidades celulares das 3 leveduras mantiveram-se acima de 86% (Fig. 6.10C) mesmo após 50 horas de exposição a elevadas concentrações de etanol, que chegaram a até 50 g/L nos 4 últimos ciclos (PEREIRA, 2021). Esses resultados foram semelhantes aos obtidos em meio YPDX (Fig. 6.4C). As concentrações de glicerol e xilitol se mantiveram entre valores abaixo de 7,0 e 2,0 g/L, respectivamente.

Figura 6.10 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio YPXDHB para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança





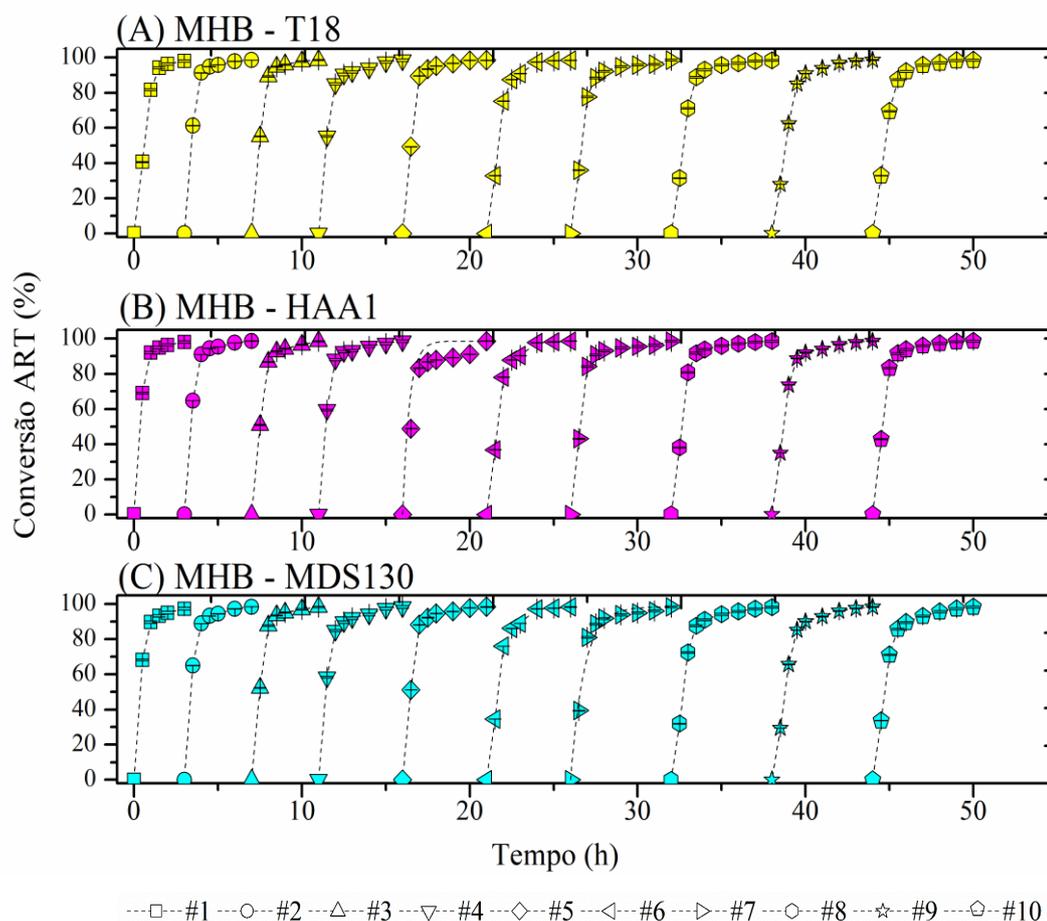
Fonte: Adaptada de Pereira (2021)

Os resultados obtidos em meio YPXDHB indicam que o hidrolisado bruto não concentrado é adequado para uso em bateladas repetidas utilizando células imobilizadas sem que os inibidores ali presentes afetem a performance fermentativa das leveduras. Esse resultado é de certa forma surpreendente, uma vez que os resultados obtidos em meio YPXDHB são superiores aos obtidos em meio YPHD, que apresenta menores concentrações de furfural, HMF e ácido acético. Isso ocorreu provavelmente devido à presença de inibidores não quantificados no hidrolisado destoxificado, que foram concentrados na etapa de preparação do hidrolisado bruto concentrado e não removidos durante a etapa de destoxificação. Compostos fenólicos derivados principalmente da degradação ou solubilização da lignina, como ácido 4-hidroxibenzoico, 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, álcool dihidrociniferílico, aldeído coniferílico, siringaldeído e ácido sirínico (KUMAR et al., 2020) são potenciais inibidores possivelmente presentes no meio hidrolisado destoxificado e suas toxicidades são inversamente proporcionais aos pesos moleculares, ao passo que um estudo recente identificou os compostos fenólicos como componentes mais tóxicos em comparação com ácidos carboxílicos e furanos, uma vez que apresentam moléculas com baixos pesos moleculares, de modo que penetram com maior facilidade nas membranas celulares (KUMAR et al., 2018). Dessa forma, o hidrolisado não concentrado foi selecionado para os estudos futuros.

Para obter um meio fermentativo industrial, Pereira (2021) suplementou o hidrolisado não concentrado (HB) com melaço, subproduto da produção de açúcar no Brasil e composto por elevadas concentrações de sacarose (Tabela 6.1B), que é rapidamente convertida a glicose e frutose pela invertase presente na membrana periplasmática de *S. cerevisiae* (BASSO et al., 2011). O melaço ainda contém nutrientes, como potássio, fosfato, nitrogênio, vitaminas e minerais (FARIAS; MAUGERI FILHO, 2019; PALMONARI et al., 2020), de modo que no meio preparado com melaço e hidrolisado (MHB1) não foi necessária suplementação com peptona e extrato de levedura (PEREIRA, 2021). A composição do meio MHB1 é apresentada na Tabela 6.1C.

Os perfis de conversão de ART no meio MHB1 relatados por PEREIRA (2021) foram semelhantes aos obtidos em meio YPDX e YPXDHB, com conversão de açúcares acima de 98% em todos os 10 ciclos utilizando as 3 linhagens de levedura (Fig. 6.11A-C). Por outro lado, as produtividades em etanol obtidas em meio MHB1 foram superiores às obtidas em meio YPXDHB, como mostrado na Fig. 6.12B. Para as 3 cepas avaliadas, as produtividades em etanol se mantiveram acima de 11 g/L/h nos 3 primeiros ciclos, caíram a valores intermediários entre os ciclos 4-7, e se mantiveram acima de 6 g/L/h até o final do processo. A redução nos valores de produtividade em etanol a partir do 4º ciclo está relacionada à viabilidade celular, que também apresentou uma pequena diminuição ao longo do processo, resultando em 88, 80 e 74% para as células de T18, HAA1 e MDS130, respectivamente ao final de 50 horas de fermentações (Fig. 6.12C). A diminuição das viabilidades celulares, por sua vez, está relacionada à exposição prolongada a etanol, que apresentou concentrações acima de 40 g/L (com exceção do primeiro ciclo), como mostra a Fig. 6.12C, e inibidores que se acumulam ao longo dos ciclos. Os rendimentos em etanol (Fig. 6.12A) se mantiveram acima de 0,44 g/g em todos os casos estudados. Valores exatos podem ser encontrados na Tabela 2 do Anexo A. As concentrações de xilitol e glicerol ficaram abaixo de 1,5 e 2 g/L, respectivamente (PEREIRA, 2021).

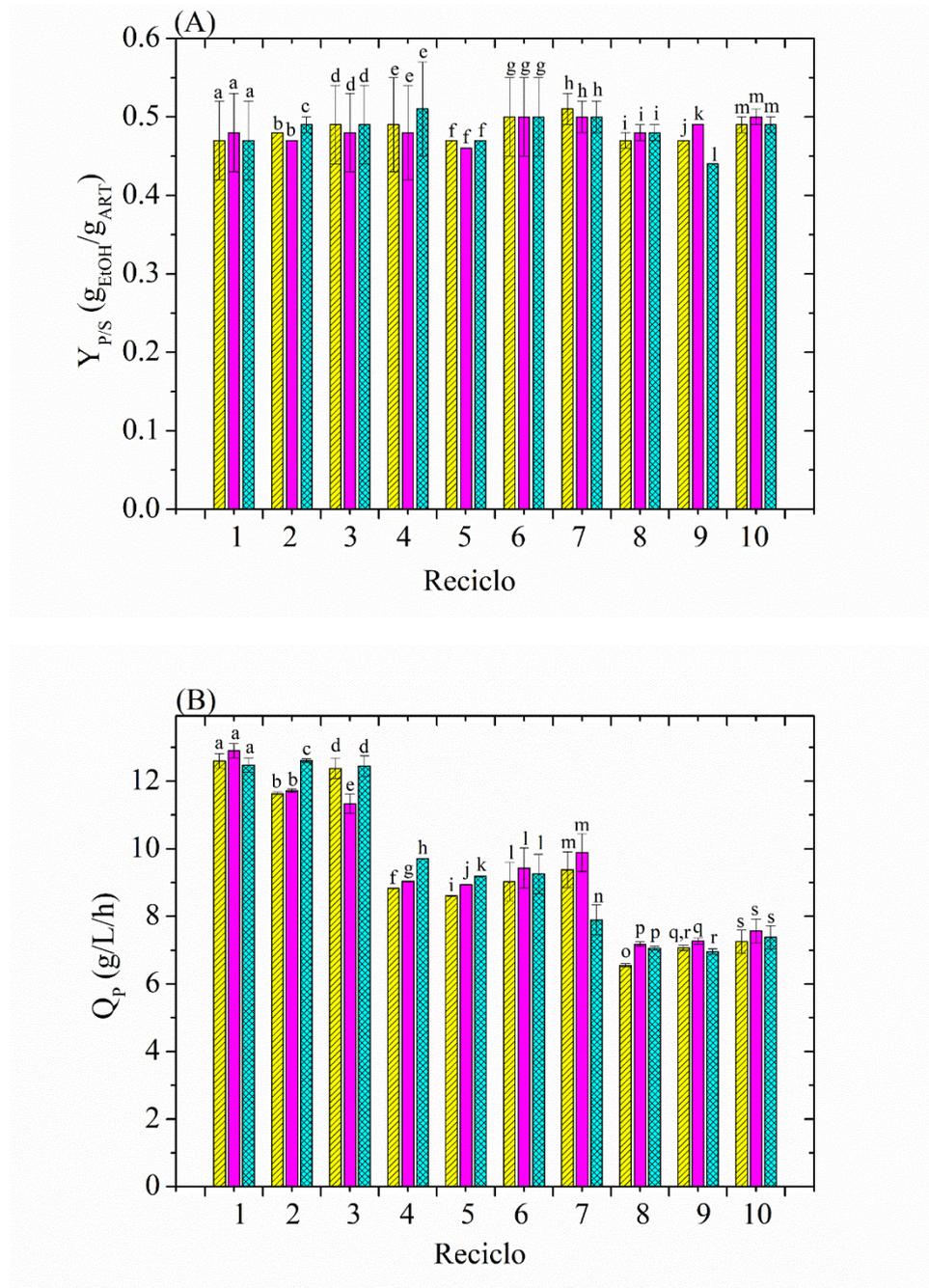
Figura 6.11 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB1 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS 130. Condições fermentativas: T = 35 °C, 94 g/L de açúcares iniciais, DO = 100, pH = 5,6. Cada curva representa um reciclo

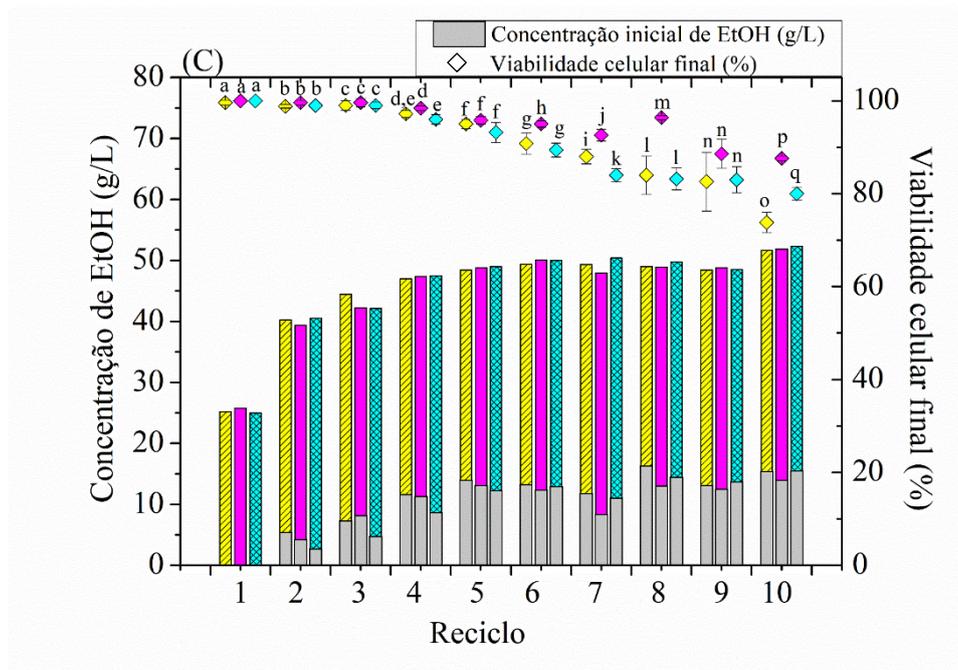


Fonte: Adaptada de Pereira (2021)

As produtividades mais elevadas obtidas em meio MHB1 em comparação com os meios de referência são explicadas pela presença de maior concentração de hexoses nesse meio, que são assimiladas muito mais rapidamente que pentoses por *S. cerevisiae* (DEMEKE et al., 2013; KATAHIRA et al., 2008). De fato, o meio MHB1 contém a maior parcela de açúcares redutores em forma de hexoses, aproximadamente 17 g/L de xilose e 77 g/L de hexoses que, aliada à alta carga de células, resulta em um aumento significativo de produtividade em etanol.

Figura 6.12 Resultados obtidos em cada reciclo fermentativo utilizando meio MHB1 para as 3 leveduras avaliadas: T18 (amarelo), HAA1 (rosa) e MDS130 (azul claro) com relação aos rendimentos em etanol (A), produtividades em etanol (B) e concentrações iniciais (barras cinzas) e finais (barras coloridas) de etanol, bem como viabilidades celulares ao final de cada reciclo (C). Letras iguais em cada reciclo de cada Figura indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança





Fonte: Adaptada de Pereira (2021)

De acordo com Hoang (2018), o maior desafio no conceito de biorrefinaria é a falta de cepas de alta performance capazes de assimilar xilose. Dessa forma, esse gargalo foi superado nos presentes ensaios, uma vez que todas as leveduras avaliadas apresentaram ~96% de conversão de açúcares em todos os ciclos com até 3 horas de processo, produzindo concentrações de etanol em torno de 40-50 g/L (Fig. 6.12C). Além disso, esse processo não demanda a suplementação do meio com peptona e extrato de levedura, reduzindo os custos globais do mesmo. Nesse sentido, os excelentes resultados apresentados utilizando leveduras recombinantes e meio MHB1 encorajam a integração da produção de etanol 1G e 2G utilizando meio hidrolisado ácido suplementado com melão como meio fermentativo industrial. O meio MHB foi então selecionado para *scale-up* em biorreator de leito fixo.

Apesar da determinação do meio fermentativo ter sido assertiva, a escolha da cepa a ser utilizada nos ensaios em biorreator não foi trivial. Foi desenvolvida uma metodologia de scores para que os parâmetros: produtividade em etanol, rendimento em etanol e viabilidades finais das leveduras em todos os meios industriais estudados (YPHC, YPHD e MHB1) fossem comparados através do teste de Tukey com nível de confiança de 95% (software OriginPro 8.5). Para resultados com diferença significativa foram atribuídas as pontuações de 1 para o maior valor; 0,5 para o valor intermediário e 0 para o menor valor. No caso de existir apenas uma média significativamente distinta, apenas valores de 0 e 1 foram atribuídos. Para resultados que não apresentassem

resultados significativamente distintos não foi atribuída nenhuma pontuação (PEREIRA, 2021). A pontuação obtida por cada linhagem em cada um dos parâmetros avaliados está discriminada na Tabela 6.2.

Tabela 6.2 Pontuações obtidas para cada linhagem de levedura avaliada nos meios industriais estudados. As comparações foram realizadas entre as 3 leveduras em cada um dos ciclos baseadas no teste de Tukey (95% de confiança)

		YPHB	YPHD	MHB1	Score total
T18	Q _P (g/L/h)	2,5	5	2,5	20,5
	Y _{P/S} (g _{EiOH} /g _{ART})	0	2	0,5	
	Viabilidade celular final (%)	1	6	1	
HAA1	Q _P (g/L/h)	1	3	4	18,5
	Y _{P/S} (g _{EiOH} /g _{ART})	0,5	1,5	1	
	Viabilidade celular final (%)	2,5	0	5	
MDS130	Q _P (g/L/h)	4	1	5	25,5
	Y _{P/S} (g _{EiOH} /g _{ART})	2	1	1	
	Viabilidade celular final (%)	5	6	0,5	

Fonte: Adaptada de Pereira (2021)

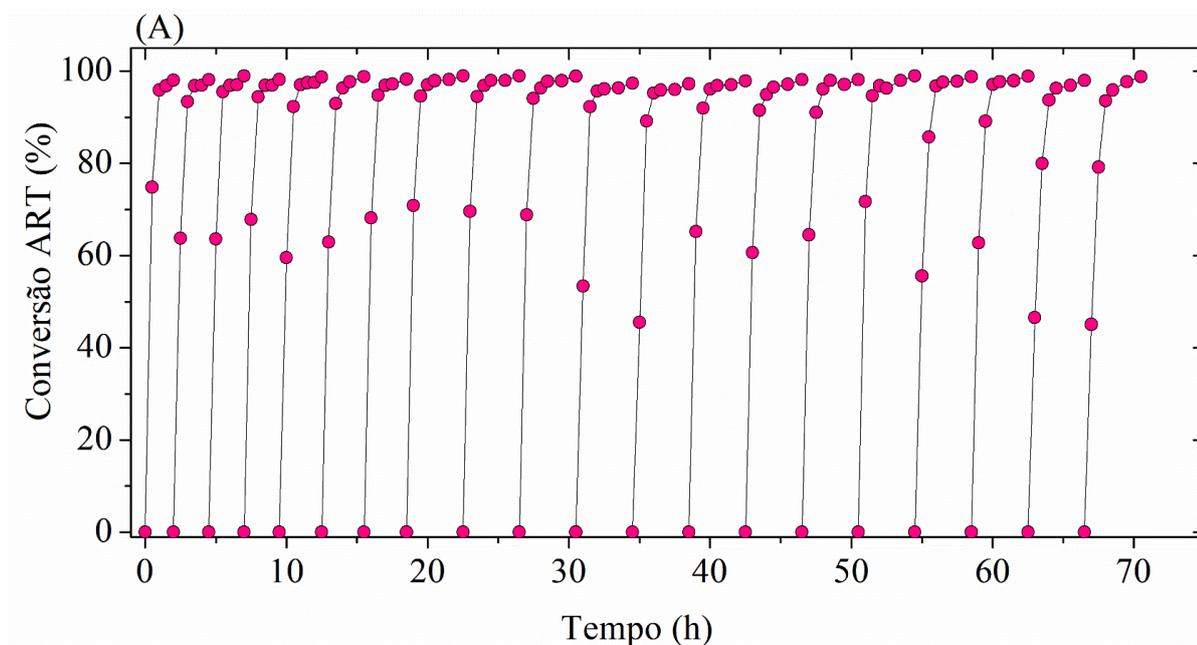
A linhagem com maior pontuação foi a *S. cerevisiae* MDS130, com 25,5 pontos. Essa era de fato a cepa desenvolvida mais recentemente dentre as cepas estudadas, que passou por mais modificações e melhorias genéticas para posterior fermentação de hidrolisados hemicelulósicos (LIAO 2020). Dessa forma, a combinação MDS130 e meio MHB foi selecionada para os ensaios em biorreator de leito fixo.

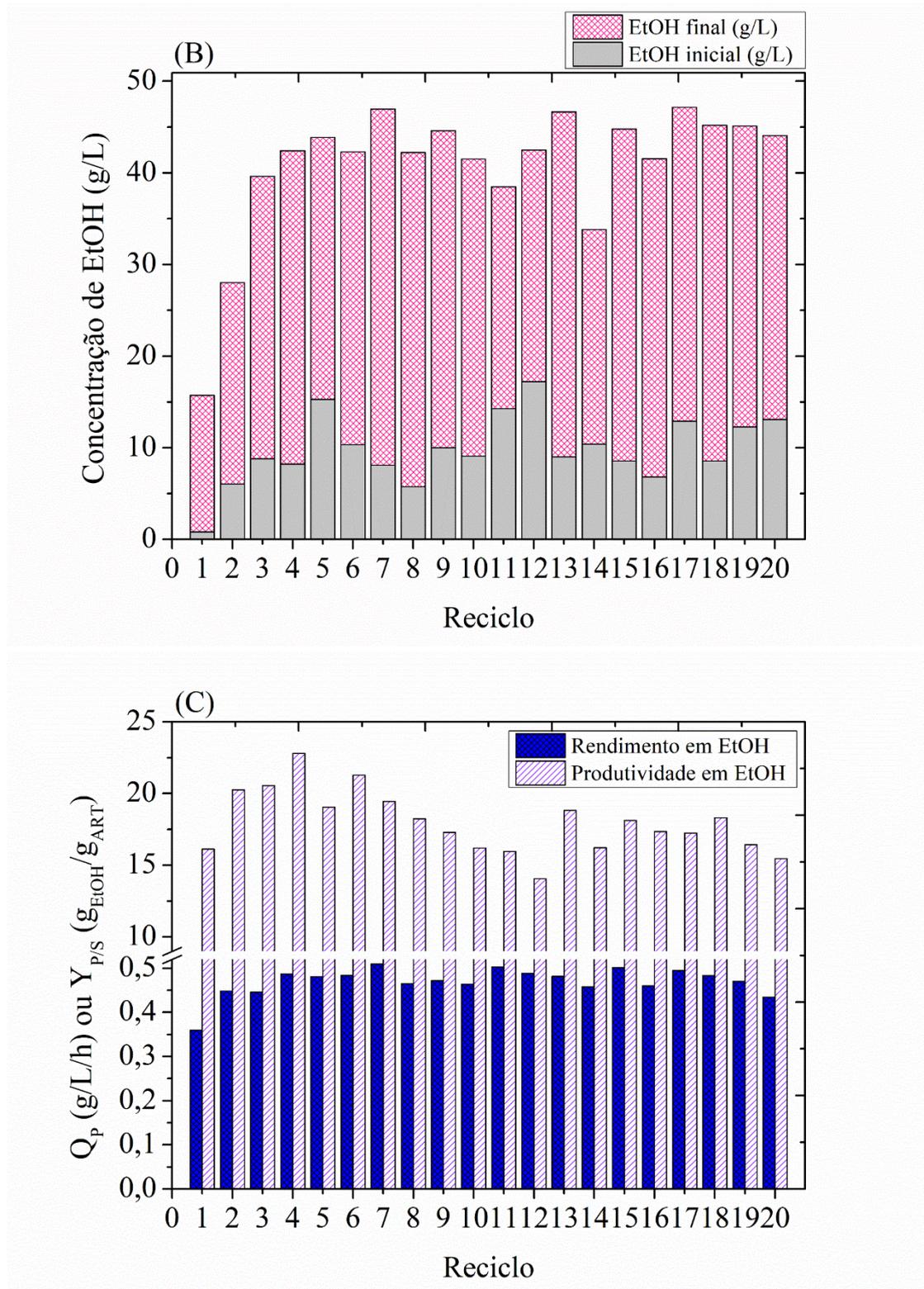
6.4 Integração da produção de etanol 1G e 2G: Bateladas repetidas em biorreator de leito fixo

Os ensaios em biorreator de bancada foram realizados em um biorreator de vidro encamisado com 100 mL de volume total descrito com detalhes por (MILESSI et al., 2020a) e mostrado na Fig. 6.1 (PEREIRA, 2021).

Os estudos em biorreator de leito fixo foram realizados com o intuito de avaliar a viabilidade, escalabilidade e estabilidade da fermentação em bateladas repetidas de meio MHB2 (composição descrita na Tabela 6.1) utilizando levedura MDS130 imobilizada. Foram realizadas 20 bateladas repetidas com consumo total de açúcares, elevada produtividade e rendimento em etanol, além de perfis similares de conversão de açúcares e produção de etanol (Fig. 6.13A e 6.13B), indicando que não houve perda significativa de eficiência no processo mesmo após um longo período de exposição das células a etanol e inibidores presentes no meio MHB2. As produtividades em etanol se mantiveram entre 14,07 e 22,81 g/L/h em todos os ciclos, enquanto rendimentos em etanol permaneceram entre 0,35 e 0,51 g_{EIOH}/g_{ART} (Fig. 6.13B), a concentração de etanol acumulada ao final dos ciclos permaneceu entre 15,71 e 46,98 g/L e a viabilidade final das células foi de 75%. As máximas concentrações de xilitol e glicerol produzidas ao longo do processo foram de 0,72 e 1,83 g/L, respectivamente (PEREIRA, 2021).

Figura 6.13 (A) Perfis de conversão de ART ao longo das 20 bateladas repetidas por células imobilizadas de MDS130 utilizando meio MHB2 como meio fermentativo industrial. Cada nova curva representa um novo ciclo. (B) Concentrações iniciais e finais de etanol em cada batelada e (C) Rendimentos e produtividades em etanol em cada ciclo fermentativo. Condições fermentativas: 35 °C, pH 5,6, DO = 100 e 1:1 V_{células}/V_{meio}





Fonte: Adaptado de Pereira (2021)

Os resultados obtidos são promissores e mostram um processo robusto, que mesmo após 70 horas de operação a elevadas concentrações de açúcares, se manteve operando em altas conversões de ART. Esses resultados ainda são superiores aos

obtidos em mini-reatores em meio YPDX e YPXDHB durante 10 ciclos, e provavelmente estão relacionados à presença de vitaminas, minerais e nutrientes no melão, bem como à maior concentração de hexoses, já mencionado anteriormente. A presença de nutrientes em cultivos influencia a tolerância a etanol da levedura *S. cerevisiae*, bem como sua performance fermentativa (LUCERO et al., 2000; SWINNEN et al., 2015), como observado no Capítulo 4 desta tese.

Diversas estratégias têm sido exploradas na literatura no intuito de desenvolver um processo robusto e industrialmente viável de produção de etanol 2G a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Poucos são os trabalhos que exploram o uso de hidrolisados suplementados com melão, sendo que alguns deles incorporam apenas o uso de hexoses por microrganismos selvagens (DE ANDRADE et al., 2013), enquanto outros realizam co-culturas de microrganismos consumidores de glicose e xilose. No entanto, esses estudos apresentam resultados de apenas uma batelada fermentativa e baixos rendimentos e produtividades em etanol. Gutiérrez-Rivera e colaboradores (2015) estudaram a produção de etanol a partir de hidrolisado ácido de cana-de-açúcar suplementado com melão. Os autores realizaram uma co-cultura de *S. cerevisiae* ITV-01 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 em meio composto por 50% de hidrolisado e 8% de melão, produzindo 53,8 g/L de etanol em 60 horas de fermentação sequencial, com rendimento e produtividade em etanol de 0,44 g/g e 1,07 g/L/h, respectivamente, resultados inferiores aos apresentados neste trabalho. Farias e Mageuri Filho (2019) também estudaram a fermentação em co-cultura de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com melão e contendo aproximadamente 100 g/L de ART. Os autores avaliaram distintas combinações de cepas fermentadoras de xilose e glicose e obtiveram a maior produtividade em etanol utilizando leveduras selvagens, *S. cerevisiae* e *Spathaspora passalidarum*, equivalente a 4,44 g/L/h com completo consumo de açúcares e produção de 30,2 g/L de etanol. Por outro lado, a maior produção de etanol foi obtida utilizando uma cepa mutante de *S. cerevisiae* combinada com *Scheffersomyces stipitis*, resultando em 49,2 g/L de etanol com produtividade de 0,6 g/L/h devido à baixa performance fermentativa da cepa mutante.

Como sugerido por estudos prévios (JOELSSON et al., 2016; MACRELLI et al., 2012), uma estratégia robusta de produção de etanol a partir de subprodutos agroindustriais para produção de elevadas concentrações em etanol por longos períodos é um passo importante para a viabilidade técnica e econômica da produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos. Dessa forma, a estratégia apresentada de utilização

de uma levedura recombinante imobilizada em alginato de cálcio e integração da produção de etanol 1G e 2G (PEREIRA, 2021) representa um importante avanço, adequado para uso em Biorrefinarias, ao passo que é similar ao processo Melle-Boinot, tecnologia mais comum encontrada em plantas industriais brasileiras para produção de etanol 1G (MUSSATTO et al., 2010), podendo ser facilmente adaptada para a aplicação sugerida neste estudo.

6.5 Conclusões

A utilização de hidrolisados hemicelulósicos concentrados durante fermentações em bateladas repetidas apresentou baixas performances mesmo após uma etapa de destoxificação para as 3 linhagens de levedura avaliadas. Por outro lado, a suplementação de hidrolisado hemicelulósico não concentrado com melação apresentou resultados notáveis em mini-reatores, sendo escolhido juntamente com a levedura MDS130 para ampliação de escala em biorreator de bancada. Os resultados obtidos em biorreator de leito fixo, com produtividades em etanol entre 14 e 22,8 g/L/h ao longo dos 20 ciclos fermentativos foram promissores, de modo que a integração da produção de etanol 1G e 2G utilizando levedura recombinante imobilizada em alginato de cálcio tem potencial de ampliação de escala em um processo industrial de produção de etanol em Biorrefinaria.

Capítulo 7 PRODUÇÃO DE ETANOL 2G EM BIOPROCESSO CONSOLIDADO UTILIZANDO LEVEDURA RECOMBINANTE SUPERIOR COM SECREÇÃO DE ENZIMAS LIGNOCELULOLÍTICAS

7.1. Introdução

Em comparação com as tecnologias de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSCF), a inserção da tecnologia de bioprocessamento consolidado (BPC) no Brasil ainda é muito limitada, principalmente devido à disponibilidade restrita de linhagens de *S. cerevisiae* recombinante com as características desejadas. De fato, não foi encontrado nenhum trabalho publicado em literatura até o momento utilizando *S. cerevisiae* para aplicação em BPC no Brasil.

Uma vez que o bagaço de cana-de-açúcar é um material gerado em grandes quantidades no país (DIAS et al., 2013) e o pré-tratamento hidrotérmico é capaz de gerar um licor rico em xilooligômeros (MILESSI, 2017) sem utilização de solventes agressivos ao meio ambiente, a possibilidade de estudar o processo de produção de etanol 2G utilizando uma nova geração de leveduras, com secreção de enzimas lignocelulolíticas, para aplicação em licores pré-tratados é uma oportunidade de agregar importantes avanços para a produção de etanol 2G.

Para isso, foi avaliado o desempenho da levedura *S. cerevisiae* AC14, uma levedura industrial fermentadora de xilose e capaz de secretar sete enzimas lignocelulolíticas, em sua forma imobilizada e livre, utilizando diferentes substratos e condições de pH em meio sintético. Em seguida, a ocorrência de limitação por transferência de massa intra-partícula quando utilizadas células imobilizadas também foi investigada. Experimentos com células livres foram conduzidos para acompanhamento da cinética de hidrólise e fermentação dos substratos. Posteriormente o uso das frações líquida e sólida resultantes do pré-tratamento hidrotérmico como meio fermentativo foi avaliada ao final dos estudos de BCP conduzidos na presente tese.

Os estudos relacionados ao BCP foram iniciados durante o período de doutorado sanduíche realizado na KU - Leuven, na Bélgica entre 10/2019 e 03/2020, no Laboratório de Biologia Molecular, liderado pelo prof. Dr. Johan M. Thevelein e finalizados no Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LaDaBio 2) do DEQ/UFSCar após retorno ao Brasil.

7.2. Metodologia específica

Os experimentos nesta etapa deste trabalho foram desenvolvidos utilizando as leveduras modificadas *S. cerevisiae* MD4 e AC14. A MD4 é uma levedura industrial fermentadora de xilose e tolerante a inibidores presentes no meio fermentativo e foi produzida a partir da levedura GSE16-T18 (DEMEKE et al., 2013a). AC14 foi desenvolvida por Claes e colaboradores (2020) e gentilmente cedida para a realização desta etapa do trabalho. A cepa AC14 foi obtida a partir da levedura MD4 através de integrações genômicas consecutivas de sete genes codificadores de enzimas lignocelulolíticas. Ela é a primeira levedura de *S. cerevisiae* industrial capaz de expressar e secretar simultaneamente sete enzimas lignocelulolíticas, sendo elas: endoglucanase (EG), β -glicosidade (BGL), celobiohidrolase I e II (CBH), xilanase (XYL), β -xilosidase (BXL) e acetil-xilano esterase (AXE). Mais detalhes sobre as enzimas secretadas pela cepa AC14 são mostrados na Tabela 7.1.

As etapas de preparação de pré-inóculo, inóculo e imobilização das células estão descritas no capítulo 4, Materiais e Métodos.

Para avaliar a performance fermentativa das leveduras imobilizadas, foi realizado inicialmente um ensaio de referência para fermentação em bateladas repetidas utilizando 120 g/L de xilose em meio suplementado com peptona e extrato de levedura (40 e 20 g/L, respectivamente), composição equivalente ao meio antes da diluição. Posteriormente, foi avaliado o desempenho da cepa AC14 utilizando-se D-celobiose (BioSynth ou Sigma) e xilana de sabugo de milho (*Corncob xylan* – Carl Roth), composta majoritariamente por xilooligossacarídeos ([XOS] > 95 %) e utilizando a cepa MD4 como controle.

Todos os meios sintéticos utilizados nos experimentos foram preparados com 20 g/L de glicose, 20 g/L de xilose, 20 g/L de celobiose e 20 g/L de xilana de sabugo de milho, e suplementados com 40 g/L de peptona e 20 g/L de extrato de levedura. Quando utilizadas células imobilizadas o meio foi também suplementado com CaCl₂ (4 g/L).

Tabela 7.1 As sete enzimas secretadas pela cepa AC14, os organismos dos quais foram clonados os genes para integração genômica, atividades enzimáticas específicas e temperatura e pH's ótimos das mesmas

Enzima	Microrganismo de origem	Atividade		
		específica na AC14 (U/gms)	Temperatura ótima	pH ótimo
β -glicosidade	<i>Trichoderma reesei</i>	12,44	65 °C	4,6
β -xilosidase	<i>Aspergillus niger</i>	10,76	60 °C	3,2
Xilanase	<i>Aspergillus niger</i>	28,01	50 °C	5,0
Endoglucanase	<i>Aspergillus oryzae</i>	17,48	45 °C	4,0 (Estável entre pH 3,0 e 7,0)
Celobiohidrolase I	<i>Chrysosporium lucknowense</i>	ND	NR, mas atividade detectada entre 30-35 °C	NR, mas atividade detectada em pH 5,0
Celobiohidrolase II	<i>Talaromyces emersonii</i>	ND	55 °C	5,0
Acetil-xilano esterase	<i>Clostridium cellulovorans</i>	ND	60 °C	5,0 (Estável entre 2,0 e 7,0)

NR: Não reportada;

ND: Não detectada;

Fonte: Adaptada de Claes e colaboradores (2020)

Todos os componentes foram autoclavados individualmente em soluções mãe concentradas e posteriormente diluídos e combinados para obtenção da solução nas concentrações adequadas, seguidas por ajuste de pH e posterior ultrafiltração em membrana estéril de 0,22 μ m. Para os ensaios variando o pH do meio, foi realizado o ajuste de pH individual em cada mini-reator após a adição de células sendo que, nesses casos, não foi realizada a ultrafiltração do meio. Os ensaios foram realizados em mini-reatores contendo $1V_{\text{meio}}:1V_{\text{células}}$ de modo que os meios inicialmente preparados foram

diluídos aproximadamente 1,8 vezes após a adição das células livres ou imobilizadas. Para os experimentos com células livres foram estudadas duas concentrações, equivalentes a $DO_{600} = 5$ e $DO_{600} = 100$, sendo esta última equivalente à concentração de células empregadas nos ensaios com células imobilizadas. Para atingir DO_{600} de 5 ou 100 nos ensaios, com base na DO obtida no inóculo, um determinado volume do mesmo foi centrifugado e posteriormente diluído em um volume previamente estabelecido de água destilada estéril, considerando ainda a diluição das células no meio, de modo que a DO final fosse 100 ou 5.

Além do meio sintético descrito acima, foram realizados experimentos com meio preparado a partir das frações líquida (LH) e sólida (BTH) obtida após pré-tratamento hidrotérmico, conforme descrito na seção 4.3.4 do capítulo 4 (Materiais e Métodos). A fração LH está caracterizada na seção 7.3.6 e o meio formulado com essa fração teve pH ajustado para 5,6 antes da fermentação. O meio não foi esterilizado e todos os ensaios foram realizados a 35 °C.

7.2.1 Métodos analíticos

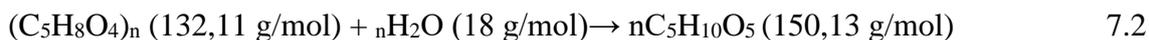
7.2.1.1 Hidrólise ácida total

Para estimar as concentrações de xilooligômeros presentes nos meios preparados a partir xilana de sabugo de milho e licor hidrotérmico no início e ao longo do processo, foi realizada hidrólise ácida total dos mesmos, para conversão dos oligômeros a monômeros. Em tubos de ensaio com tampa foram adicionados 2,5 mL de meio e 87 µL de H_2SO_4 72% v/v, sendo em seguida colocados em banho seco (Nova Ética) a 121 °C por 1 hora (Adaptado de WOLF, 2011). Após o resfriamento das amostras, as soluções obtidas foram neutralizadas com $CaCO_3$ (CORRADINI, 2019), centrifugadas 2 vezes a 10000 rpm por 5 minutos e filtradas em filtros de 0,22 µm para posterior análise de xilose por CLAE. A concentração de xilooligômeros totais foi estimada a partir da Equação 7.1.

$$C_{Xilooligômeros\ teórico} = (C_{Xilose}^{Após\ hidrólise\ ácida} - C_{Xilose}^{Inicial}) \times 0,88 \quad 7.1$$

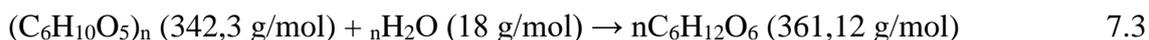
7.2.1.2 Cálculo da xilose potencial

A concentração de xilose potencial a ser obtida pela hidrólise total dos xilooligômeros oferecidos nos cultivos foi calculada pelo fator de conversão estequiométrico teórico de 0,88 baseado na Equação 7.2 (CORRADINI, 2019).



7.2.1.3 Cálculo da glicose potencial

A concentração de glicose potencial (em g/L) a ser obtida pela hidrólise total da celobiose (em g/L) oferecida nos cultivos foi calculada pelo fator de conversão de 0,95 obtido com base na reação estequiométrica:



$$C_{Glicose\ potencial} = (C_{Celobiose}) \times 1,055 \quad 7.4$$

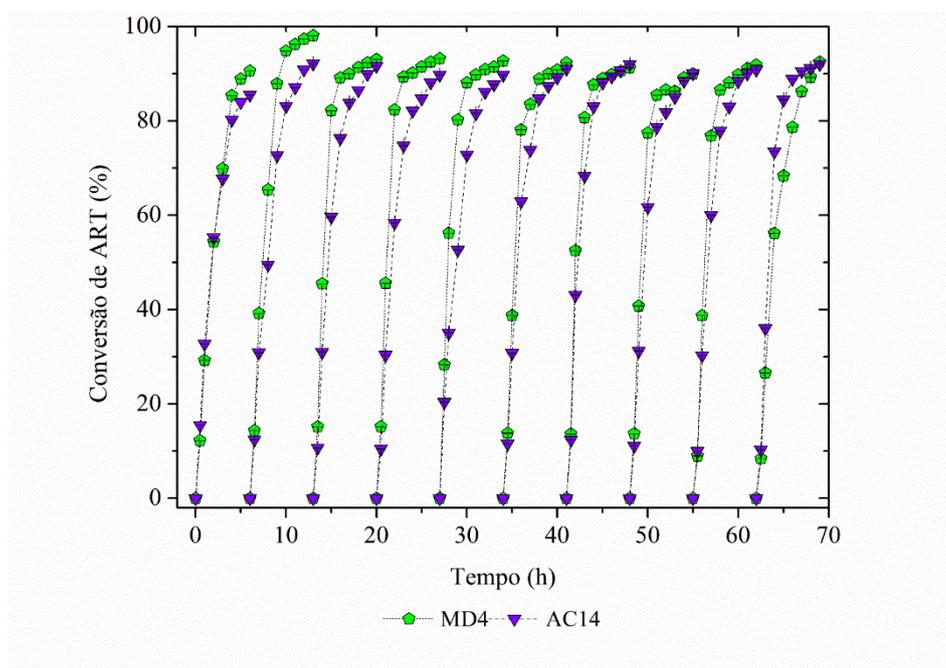
7.3 Resultados e discussões

7.3.1 Ensaios de referência

Antes de avaliar a performance da levedura AC14 em substratos compostos por polímeros de glicose ou xilose para verificar a ação das enzimas secretadas, foram realizados ensaios de referência utilizando meio composto por xilose (120 g/L) e suplementado com peptona e extrato de levedura (40 e 20 g/L, respectivamente). O objetivo desses ensaios foi verificar a capacidade fermentativa das leveduras, bem como caracterizar a tolerância a etanol por longos períodos, uma vez que alguns autores ressaltam que a introdução de vias metabólicas para a secreção de elevados níveis de diferentes enzimas pode resultar em estresse metabólico, comprometendo a capacidade fermentativa da cepa hospedeira (GÖRGENS et al., 2001; KAFRI et al., 2016; VAN RENSBURG et al., 2012). Por outro lado, Claes e colaboradores (2020) sugerem que cepas industriais robustas para produção de etanol 2G podem tolerar maior número e maiores quantidades de enzimas secretadas em comparação com cepas de laboratório ou cepas industriais para produção de etanol 1G. Sendo assim, os resultados obtidos em conversão de xilose ao longo de 10 ciclos são mostrados na Fig. 7.1. Índices de

desempenho em termos de concentrações finais de etanol, produtividade e rendimento em etanol, bem como viabilidades celulares correspondentes a cada reciclo são apresentados na Tabela 7.2.

Figura 7.1 Acompanhamento da conversão de açúcares redutores totais (% ART) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPX pelas leveduras MD4 e AC14. Condições fermentativas: T = 35 °C, pH = 5,6, 200 rpm, DO = 100. Cada curva representa um reciclo fermentativo



Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser observado na Fig. 7.1, ambas as leveduras apresentaram desempenho bastante satisfatório na fermentação de 60 g/L de xilose ao longo dos 10 ciclos, convertendo mais de 90% de xilose em todos eles, demonstrando elevada estabilidade das células a longos períodos de exposição a etanol. Cada ciclo de fermentação durou em média 7h e as produtividades e rendimentos permaneceram elevados durante todo o cultivo, mesmo com a diminuição de viabilidade celular ao longo do processo (Tabela 7.2). A diminuição da viabilidade celular ao longo do cultivo, por sua vez, é decorrente da exposição das células ao etanol, e é mais acentuada na cepa AC14, como já esperado, uma vez que esta cepa sofreu mais alterações genéticas e tende a ser mais sensível a condições de estresse (DEPARIS et al., 2017).

Os resultados obtidos para as cepas MD4 e AC14 em função da conversão de açúcares estão consistentes com os resultados de observados nos Capítulos 5 e 6 utilizando outras linhagens de levedura modificada em meio YPDX com composição de

açúcares semelhante. Por outro lado, as maiores produtividades obtidas em meio YPDX podem estar relacionadas com a presença de glicose no meio, cuja assimilação é mais rápida, como previamente mencionado.

Tabela 7.2 Índices de desempenho durante os ciclos em meio YPX utilizando células imobilizadas das leveduras MD4 e AC14. Condições fermentativas: pH = 5,6, 35 °C, 200 rpm, DO = 100)

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Viabilidade final (%)
1	AC14	1,37 ± 0,16	22,96 ± 0,54	4,32 ± 0,15	0,46 ± 0,02	98 ± 5,65
	MD4	1,66 ± 0,21	23,1 ± 0,38	4,29 ± 0,14	0,37 ± 0,03	100 ± 5,84
2	AC14	2,26 ± 0,20	34,51 ± 0,70	4,61 ± 0,06	0,41 ± 0,01	88 ± 6,87
	MD4	1,99 ± 0,19	35,66 ± 0,40	4,81 ± 0,02	0,39 ± 0,00	95 ± 6,14
3	AC14	3,9 ± 0,13	39,32 ± 1,36	5,06 ± 0,17	0,46 ± 0,00	85 ± 5,27
	MD4	3,88 ± 0,27	41,01 ± 0,52	5,30 ± 0,13	0,47 ± 0,01	93 ± 4,82
4	AC14	4,63 ± 0,31	41,85 ± 0,12	5,32 ± 0,08	0,50 ± 0,03	80 ± 6,99
	MD4	4,25 ± 10	43,88 ± 0,11	5,66 ± 0,01	0,46 ± 0,04	88 ± 6,35
5	AC14	5,09 ± 0,17	43,69 ± 0,25	5,52 ± 0,07	0,50 ± 0,00	75 ± 7,69
	MD4	3,39 ± 0,46	45,47 ± 0,69	6,01 ± 0,01	0,51 ± 0,00	85 ± 6,78
6	AC14	3,79 ± 0,36	45,56 ± 0,70	5,97 ± 0,17	0,51 ± 0,00	70 ± 5,00
	MD4	4,08 ± 0,79	45,37 ± 1,47	5,90 ± 0,37	0,48 ± 0,03	85 ± 4,12
7	AC14	3,32 ± 0,31	46,56 ± 0,71	6,18 ± 0,25	0,49 ± 0,01	70 ± 10,63
	MD4	5,00 ± 0,27	47,06 ± 2,08	6,01 ± 0,34	0,48 ± 0,02	83 ± 8,96
8	AC14	5,09 ± 0,52	46,24 ± 0,72	5,88 ± 0,09	0,51 ± 0,00	67 ± 5,86
	MD4	5,5 ± 0,88	46,36 ± 1,58	5,84 ± 0,05	0,50 ± 0,01	80 ± 4,91
9	AC14	5,00 ± 0,51	46,95 ± 0,70	5,99 ± 0,02	0,51 ± 0,00	63 ± 5,06
	MD4	5,1 ± 0,90	47,05 ± 1,77	5,99 ± 0,07	0,51 ± 0,00	80 ± 3,99
10	AC14	2,83 ± 0,26	46,03 ± 0,70	6,17 ± 0,23	0,51 ± 0,01	60 ± 6,27
	MD4	2,91 ± 0,54	46,72 ± 1,03	6,26 ± 0,29	0,50 ± 0,01	78 ± 4,82

Fonte: Elaborada pela autora

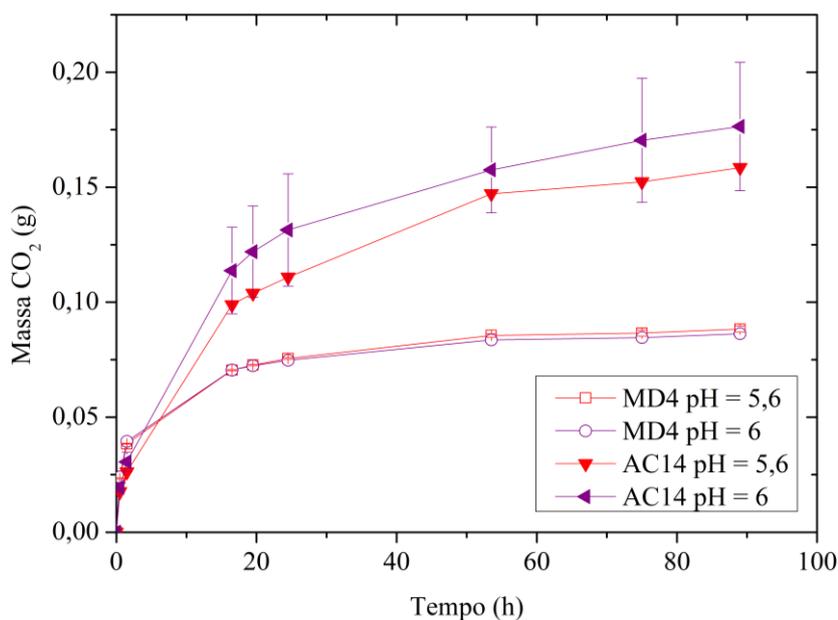
7.3.2 Ensaios fermentativos utilizando leveduras imobilizadas

As leveduras imobilizadas MD4 e AC14 foram avaliadas em meios contendo diversos substratos para verificar a capacidade de hidrólise da levedura AC14, tais como carboximetilcelulose (CMC), PASC (*phosphoric acid swollen cellulose*), avicel e xilana de eucalipto. No entanto, não houve hidrólise significativa a monômeros de xilose ou

glicose em nenhum desses casos. Claes e colaboradores (2020) também não observaram hidrólise significativa em PASC e CMC, e destacaram as baixas atividades de CBH I e II como possíveis causas. Por outro lado, celobiose e xilana de sabugo de milho (rica em XOS) apresentaram hidrólise e posterior fermentação, e por isso foram selecionadas para utilização no presente estudo.

Para avaliar qualitativamente a capacidade hidrolítica da levedura AC14, os ensaios foram realizados em paralelo com a levedura MD4, parental da AC14, porém sem capacidade hidrolítica. A diferença nos resultados obtidos entre ambas é resultante da hidrólise e posterior fermentação dos polímeros a etanol. A princípio foram utilizadas apenas leveduras imobilizadas e as fermentações foram conduzidas em pH = 5,6 e 6, próximos aos pH's ótimos de algumas das enzimas secretadas pela cepa AC14 e adequados para condições fermentativas de *S. cerevisiae*. A temperatura do processo foi de 35 °C e o mesmo foi realizado em condição estática. O meio utilizado nesses ensaios continha 20 g/L de glicose, xilose, celobiose e xilana de sabugo de milho, suplementado com YP. Os resultados são mostrados na Fig. 7.2 e estão registrados em função da perda de massa por liberação de CO₂.

Figura 7.2 Performance fermentativa das leveduras MD4 e AC14 imobilizadas em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de sabugo de milho em diferentes pH's (T = 35 °C, estático, DO = 100). Massa total de CO₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g (AC14); 0,098 (MD4)

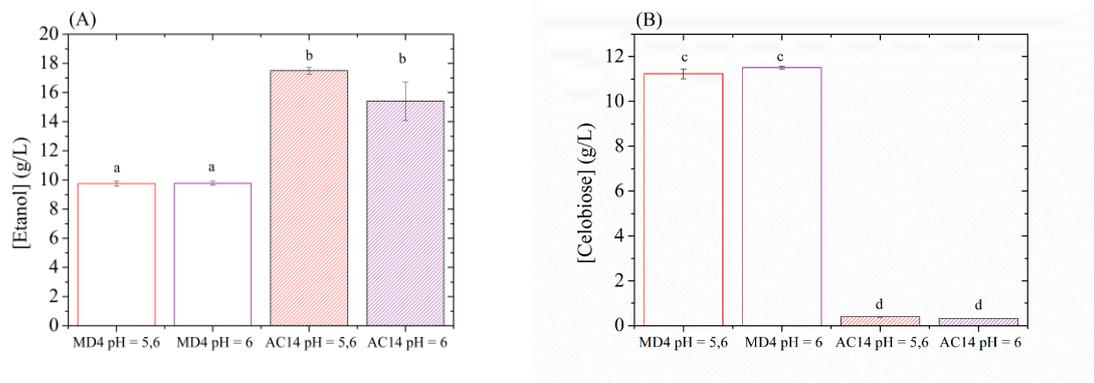


Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser observado na Fig. 7.2, além da fermentação dos açúcares presentes no meio, houve também hidrólise seguida de fermentação, o que explica o patamar mais alto de produção de CO₂ atingido pelas curvas da levedura AC14 em ambos os pH's avaliados. O tempo de fermentação após o consumo dos açúcares livres inicialmente presentes (glicose e xilose) chama a atenção. As curvas da linhagem AC14 sugerem que foram necessárias 70 h para fermentar a celobiose e xilana de sabugo de milho (~ 20 g/L) presentes no meio, mesmo com elevada concentração celular. Esse perfil é muito diferente do apresentado na Fig. 7.1 para 60 g/L de xilose. A lenta fermentação observada na Fig. 7.2 pode ser atribuída às etapas de hidrólise pelas celulases e xilanases produzidas pela levedura, que provavelmente se encontravam em baixa atividade volumétrica no meio. A baixa atividade volumétrica pode estar relacionada ao nível de expressão das enzimas e/ou às condições de temperatura e pH da fermentação. Outra possibilidade é a retenção de parte das enzimas dentro dos beads de alginato, caso existam resistências significativas que dificultem a difusão das enzimas do interior dos beads para meio.

Como é possível observar na Fig. 7.3A, o pH não influenciou no consumo de celobiose e produção de etanol pelas leveduras MD4 e AC14. Por outro lado, a produção de etanol e celobiose apresentou diferença significativa entre as leveduras de acordo com o teste de Tukey (95% de confiança). Como já era esperado, a cepa MD4 foi capaz apenas de fermentar os monômeros de açúcar presentes no meio, glicose e xilose, produzindo em média 10 g/L de etanol (Fig. 7.3A). A concentração de etanol produzida pela cepa AC14 acima de 10 g/L é resultado da hidrólise integral provavelmente de ambas celobiose e xilana, o que liberaria aproximadamente 0,205 g de CO₂ (pela estequiometria). A diferença entre a massa teórica de CO₂ e a massa final liberada mostrada na Figura 7.2 pode ser atribuída ao CO₂ não liberado, retido no *headspace* do reator ou solubilizado no meio. Como é possível observar na Fig. 7.3B, a celobiose não foi consumida pela cepa MD4, ao passo que foi quase totalmente consumida pela cepa AC14. A xilana não foi quantificada, uma vez que, nos laboratórios da KU Leuven onde foram realizados estes experimentos, não dispunham de infraestrutura adequada para a aplicação do método de hidrólise total. Infelizmente, não foi possível enviar essas amostras para serem analisadas no Brasil. No entanto, novos ensaios foram realizados para avaliar a capacidade de hidrólise e fermentação de XOS pela AC14, conforme será detalhado nas próximas seções.

Figura 7.3 Concentrações finais de etanol (A) e celobiose (B) após fermentação utilizando as leveduras AC14 e MD4 em diferentes pH's. Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14); 10,22 g/L (MD4). Letras iguais no mesmo gráfico indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança

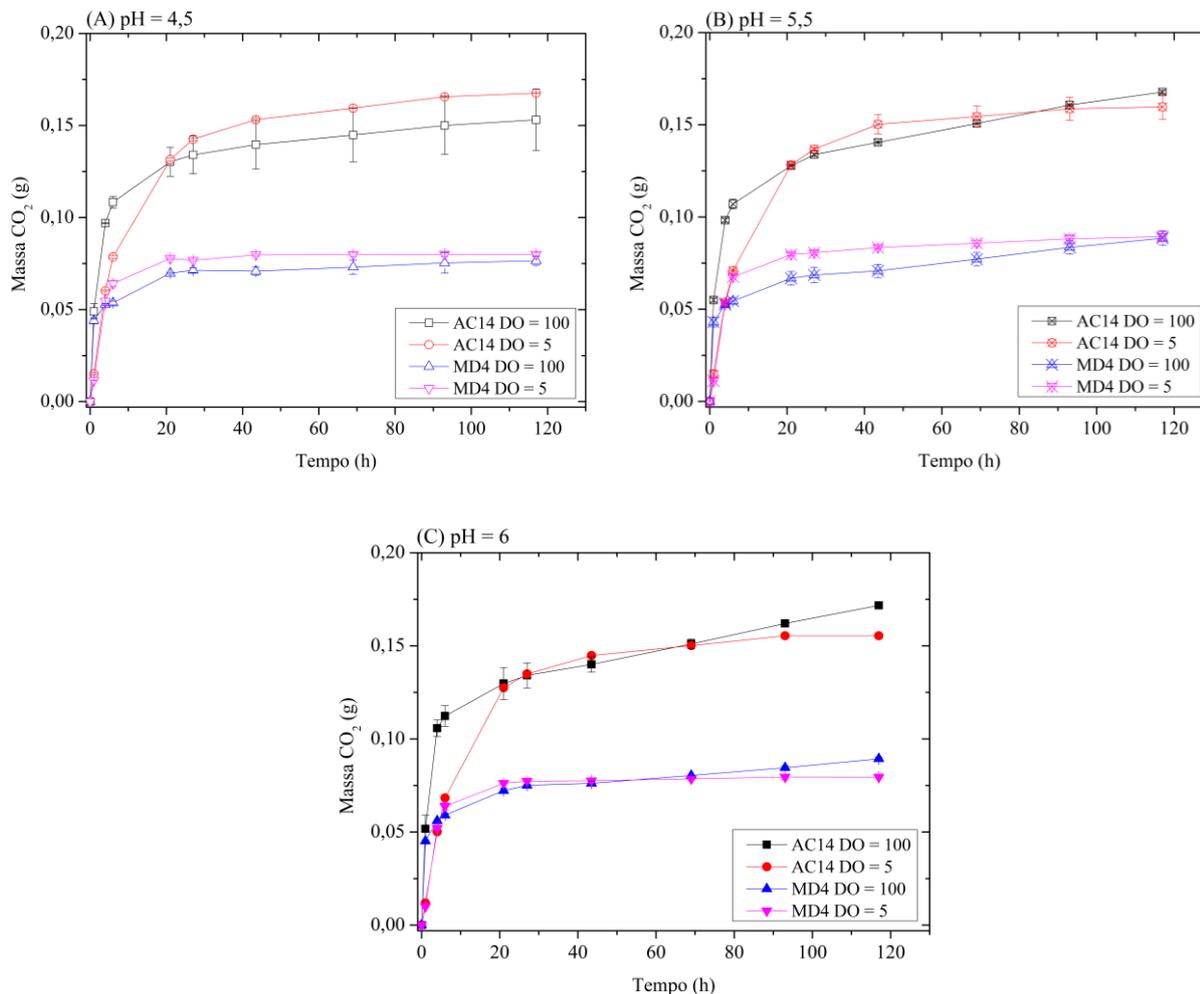


Fonte: Elaborado pela autora

7.3.3 Ensaios fermentativos utilizando leveduras livres

Como comentado na seção anterior, o longo tempo de fermentação mostrado na Fig. 7.2 pode estar associado à baixa atividade enzimática no meio, que por sua vez pode ser causada por limitações de transferência de massa, que dificultam a difusão das enzimas do interior do *bead* para o meio. Embora o gel de alginato seja permeável e poroso, quando contém uma alta carga de células imobilizadas, o interior do *bead* se apresenta como uma estrutura mais densa e compacta, de menor porosidade (MILESSI et al., 2020c). Assim, de fato, pouco se sabe sobre a difusão das enzimas secretadas pela levedura recombinante AC14 dentro dos *beads* de alginato. Dessa forma, novos experimentos foram conduzidos com as leveduras em sua forma livre em distintas concentrações ($DO_{600} = 5$ e $DO_{600} = 100$) para avaliar a ocorrência de efeitos difusivos dentro dos *beads*. Devido à diversidade dos pH's ótimos das enzimas secretadas, uma faixa mais ampla de valores de pH inicial foi também incluída nos novos experimentos. Além disso, em sua forma livre, as células são mais sensíveis a variações do pH, enquanto que, em sua forma imobilizada, o alginato utilizado para imobilização cria um microambiente em seu interior (RAZMOVSKI; VUČUROVIĆ, 2012). Os resultados obtidos são mostrados na Fig. 7.4.

Figura 7.4 Performance fermentativa das leveduras MD4 e AC14 em sua forma livre e em diferentes concentrações celulares em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de espiga de milho em diferentes pH's. (T = 35 °C, 200 rpm) (A) pH 4,5; (B) pH 5,5 e (C) pH 6,0. Massa total de CO₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g (AC14); 0,098 (MD4)



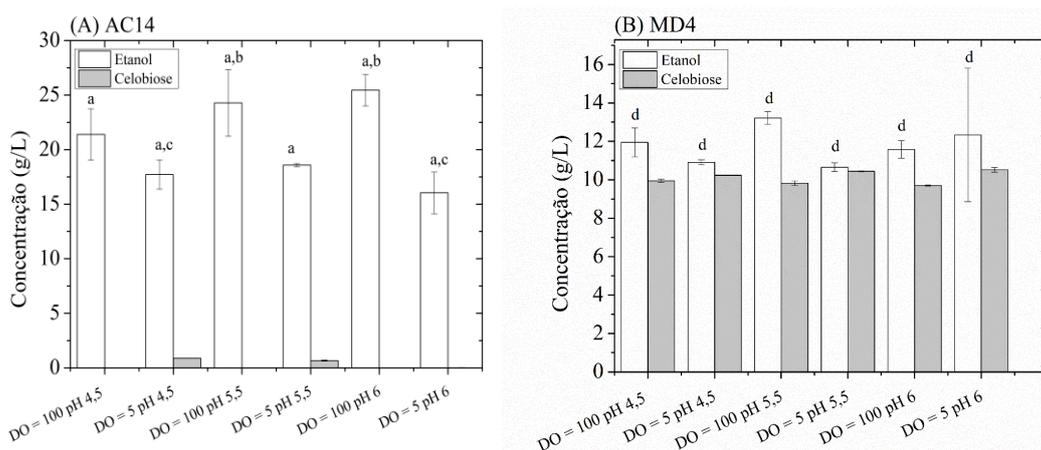
Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser observado na Fig. 7.4, a performance da levedura AC14 em diferentes pH's foi bastante semelhante, apesar das maiores concentrações celulares terem permitido uma taxa mais rápida de fermentação no início do processo, como pode ser observado em todos os casos estudados: em elevada concentração celular (DO₆₀₀ = 100), o sistema aparenta ter uma fermentação mais rápida em comparação com a menor concentração celular (DO₆₀₀ = 5), como pode ser visualizado pela inclinação das curvas vermelhas e pretas nos diferentes gráficos da Fig. 7.4. Nas primeiras 10 h de fermentação, quando se percebe a influência da maior concentração de células, a fermentação é sustentada principalmente pela assimilação dos açúcares livres inicialmente presentes no meio, que são rapidamente assimilados pelas células. Além

disso, a maior quantidade de células presentes no meio leva à maior produção de enzimas, e conseqüentemente a hidrólise também acontece mais rapidamente. Porém, após 10 h, nota-se uma drástica mudança na inclinação das curvas para ambas as densidades celulares empregadas para a AC14, indicando uma desaceleração da velocidade de produção de CO₂.

Estudos complementares da composição do meio, particularmente da concentração de XOS, ao longo do BCP são necessários para relacionar o perfil de produção de CO₂ com a hidrólise e o consumo dos diferentes substratos presentes no meio, conforme será discutido a seguir.

Figura 7.5 Concentrações finais de etanol e celobiose após fermentação utilizando as leveduras AC14 (A) e MD4 (B) em diferentes pH's. Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14); 10,22 g/L (MD4). Letras iguais no mesmo gráfico indicam que não há diferença estatisticamente significativa entre as médias das concentrações de etanol de acordo com o teste de Tukey com 95% de confiança



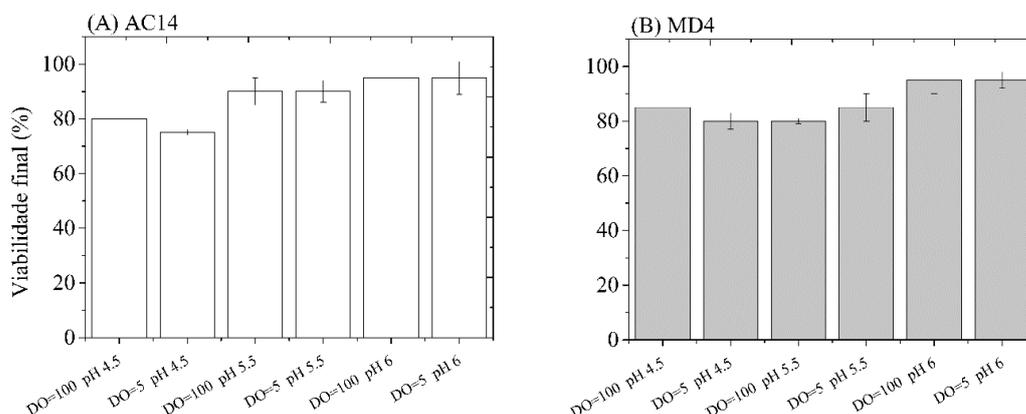
Fonte: Elaborado pela autora

Já em relação à celobiose, a Fig. 7.5A mostra que ela foi praticamente totalmente hidrolisada em todos os pH's estudados, sugerindo que não houve influência do pH inicial na atividade das celobiohidrolases. As viabilidades finais celulares após o processo estão mostradas na Fig. 7.6. É possível observar que todas elas permaneceram em valores acima de 78%, indicando uma boa estabilidade ao processo, mesmo utilizando células em sua forma livre e em baixas concentrações.

Em comparação ao experimento conduzido com células imobilizadas, também realizado em DO₆₀₀ 100 (Fig. 7.3A) utilizando meio fermentativo com a mesma composição, nota-se que as concentrações de etanol alcançadas com as células de AC14

livres (Fig. 7.5A) na mesma DO foram superiores. Assim, os resultados a princípio sugerem que, com a levedura AC14 em sua forma livre, a hidrólise de uma maior fração da xilana de sabugo de milho foi favorecida. A celobiose, por sua vez, foi totalmente consumida tanto pelas células imobilizadas quanto pelas livres (Fig.7.3B e 7.5A), por isso infere-se que a maior concentração de etanol produzido pelas células livres se deve à hidrólise mais eficiente da xilana, o que poderia ser explicado pela maior atividade de enzimas xilanolíticas no meio cultivado com células livres. Esses resultados, portanto, indicam que, no caso das células imobilizadas, podem ter ocorrido efeitos difusionais, levando a uma menor atividade das enzimas responsáveis pela hidrólise da xilana no meio de fermentação.

Figura 7.6 Viabilidades celulares finais das células de AC14 e MD4 nas diferentes condições avaliadas



Fonte: Elaborado pela autora

Para a linhagem MD4, os resultados estão consistentes. A linhagem é capaz de assimilar xilose e glicose, mas não os polímeros, pois não secreta enzimas. Assim, tanto a produção de CO₂ (Fig. 7.4) quanto a de etanol (Fig. 7.5B) não foram influenciadas pelo pH e ambas são significativamente inferiores às obtidas com a levedura AC14 em todas as condições estudadas. A velocidade de fermentação da MD4 foi ligeiramente superior para o experimento com DO₆₀₀ 100 (Fig.7.4), porém a observação do efeito da DO é dificultada pela baixa concentração de substrato (10 g/L de xilose e 10 g/L de glicose) presente no meio. A celobiose não foi consumida em nenhuma condição (Fig. 7.5B), como já era esperado.

Os resultados aqui apresentados foram obtidos em experimentos realizados em mini-reatores, que permitem o acompanhamento da evolução da fermentação

simplesmente pela medida da perda de massa de CO₂. Essa metodologia é bastante útil, prática e adequada para avaliar qualitativamente se houve hidrólise de polímeros quando as cepas MD4 e AC14 são comparadas. Por outro lado, a comparação de condições de cultivo, como é o caso dos diferentes experimentos realizados com a levedura AC14 (Fig. 7.2 e 7.4), pode ser comprometida pelas limitações inerentes ao método (erros de pesagem, retenção de CO₂ no mini-reator etc). Em todos os experimentos, a produção de CO₂ experimental foi inferior à estimada por cálculos estequiométricos, provavelmente devido à retenção de parte do CO₂ produzido pela fermentação dentro dos reatores, como já comentado anteriormente. Por outro lado, os dados experimentais de concentração de etanol estão consistentes com a estequiometria para todos os experimentos com a MD4 e para as fermentações da AC14 com células livres, em todos os pHs (Fig. 7.3 e 7.5).

Por essa razão, os comentários apresentados na discussão sobre a atividade das enzimas nas diferentes condições estudadas e limitações difusionais nas fermentações com células imobilizadas, são hipóteses que infelizmente não puderam ser comprovadas experimentalmente através das análises de XOS nas amostras. Apesar disso, resultados apresentados na próxima seção indicam que, de fato, existem efeitos difusionais internos aos *beads* de alginato.

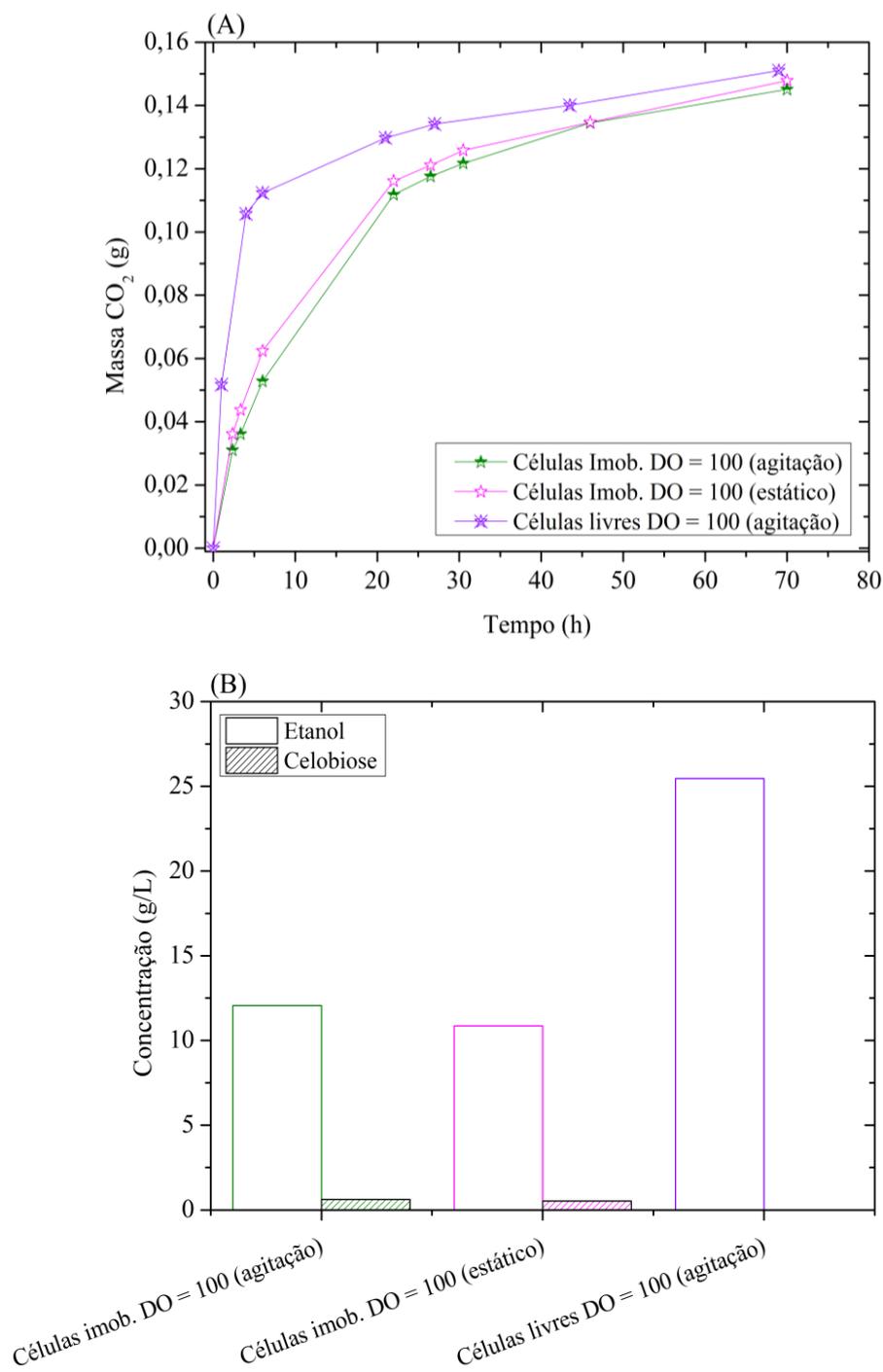
7.3.4 Avaliação da influência da agitação na difusão de enzimas

Uma vez que os resultados dos experimentos anteriores com células livres e imobilizadas em DO₆₀₀ 100 indicaram possível ocorrência de limitação difusional, o efeito da agitação no desempenho das fermentações também foi avaliado. Para isso, foi realizado um experimento utilizando células da levedura AC14 em sua forma imobilizada com agitação, sem agitação e em sua forma livre com agitação. Todos os ensaios foram realizados em pH = 6 e 300 rpm de agitação (quando agitados), e os resultados em função da perda de massa dos reatores e de etanol produzido ao final do processo, bem como concentrações de celobiose residual, são mostrados na Fig. 7.7.

A fermentação é mais rápida nas primeiras 20 h com células livres (Fig. 7.7 A), uma vez que a inclinação da curva é maior nesse caso, em comparação com as curvas dos experimentos utilizando células imobilizadas. Isso provavelmente se deve à maior homogeneização do meio e ausência de efeitos difusivos, facilitando o acesso das enzimas à celobiose e à xilana de sabugo de milho e intensificando a liberação dos açúcares pelas reações de hidrólise, que são prontamente assimilados pela levedura.

Após 20 h, o comportamento já observado nos experimentos anteriores, de desaceleração da fermentação, é reproduzido na Fig. 7.7A.

Figura 7.7 (A) Performance fermentativa da levedura AC14 em sua forma livre e imobilizada (com e sem agitação) em meio composto por glicose, xilose, celobiose e xilana de espiga de milho. (T = 35 °C, pH = 6, 300 rpm) e (B) concentrações finais de etanol e celobiose. Massa total de CO₂ estimada pela estequiometria (conversão total): 0,205 g Concentração final de etanol estimada pela estequiometria (conversão total): 21,41 g/L (AC14)



Fonte: Elaborado pela autora

Como já comentado anteriormente, as limitações no acompanhamento das fermentações pela liberação de CO₂ foram novamente constatadas. Apesar da massa total de CO₂ final ser bastante similar quando utilizadas células em alta concentração (DO₆₀₀=100) em sua forma livre e imobilizada, com e sem agitação (Fig. 7.7A), a Fig. 7.7B indica claramente a maior produção de etanol para as células livres, sob agitação. Além disso, a concentração final de etanol alcançada no experimento com agitação é igual à observada no experimento com células livres, sem agitação e em pH 6 (Fig. 7.5A), indicando que a hidrólise dos polímeros não é limitada pela difusão das enzimas no meio reacional. Além disso, o fato de a agitação não ter influenciado os experimentos com leveduras imobilizadas reforça a hipótese de transferência de massa limitada pela difusão intra-partícula. Por isso, a atividade enzimática no meio reacional seria menor com células imobilizadas, levando à menor velocidade de hidrólise dos polímeros e de fermentação.

Portanto, os resultados obtidos nos experimentos com células livres em DO₆₀₀=100 e pH's 5,5 e 6,0 sugerem que essas estratégias de fermentação são eficientes para promover a hidrólise de maior parte dos polímeros. Dessa forma, apesar das vantagens da utilização de células imobilizadas já citadas em outras etapas do presente trabalho, nas condições atuais nas quais vêm sendo realizada esta etapa do estudo, a imobilização compromete o desempenho das etapas de hidrólise dos polímeros e, conseqüentemente, rendimento e produtividade em etanol no processo fermentativo, optando-se por dar continuidade aos estudos utilizando-se células livres.

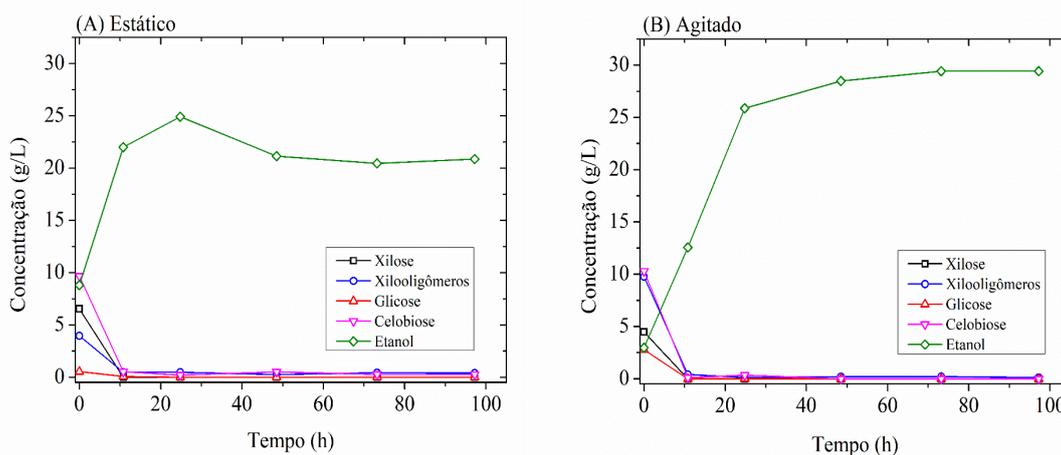
7.3.5 Avaliação do perfil de consumo de celobiose e xilana de sabugo de milho e produção de etanol por células livres de AC14 (DO=100)

Nessa etapa do trabalho foi realizado um estudo do perfil de consumo de celobiose e xilana de sabugo de milho para avaliar a cinética do processo de hidrólise e fermentação simultâneas. A avaliação da cinética é importante para melhorar o entendimento sobre a ação das enzimas secretadas pela levedura recombinante sobre a celobiose e sobre os XOS presentes na xilana de sabugo de milho. Os ensaios foram realizados utilizando células livres de AC14 em alta carga (DO₆₀₀=100) e meio composto por 20 g/L de glicose, 20 g/L de xilose, 20 g/L de celobiose e 20 g/L de

xilana de sabugo de milho suplementado com peptona (40 g/L) e extrato de levedura (20 g/L). O processo foi avaliado em modo estático e agitado (250 rpm) a 35 °C e pH 5,6.

Nas condições avaliadas foram preparados 6 mini-reatores contendo 4ml de meio fermentativo e 4 mL de suspensão de células, sendo que todos eles eram pesados e determinado frasco era retirado pontualmente ao longo do processo, de modo a acompanhar tanto perda de massa por liberação de CO₂, quanto o consumo de substratos e a formação de produtos e subprodutos (por análise da composição do sobrenadante do frasco retirado). Os resultados em termos do consumo de substratos e formação de produtos obtidos na condição estática e agitada são apresentados na Fig. 7.8A e 7.8B, respectivamente.

Figura 7.8 Ensaios fermentativos utilizando meio composto por xilose, glicose, xilana de sabugo de milho e celobiose (20 g/L cada) e células livres de AC14 em alta carga (DO₆₀₀=100) em modo estático ou agitado (250 rpm). Condições fermentativas: T=35 °C, pH 5,6.

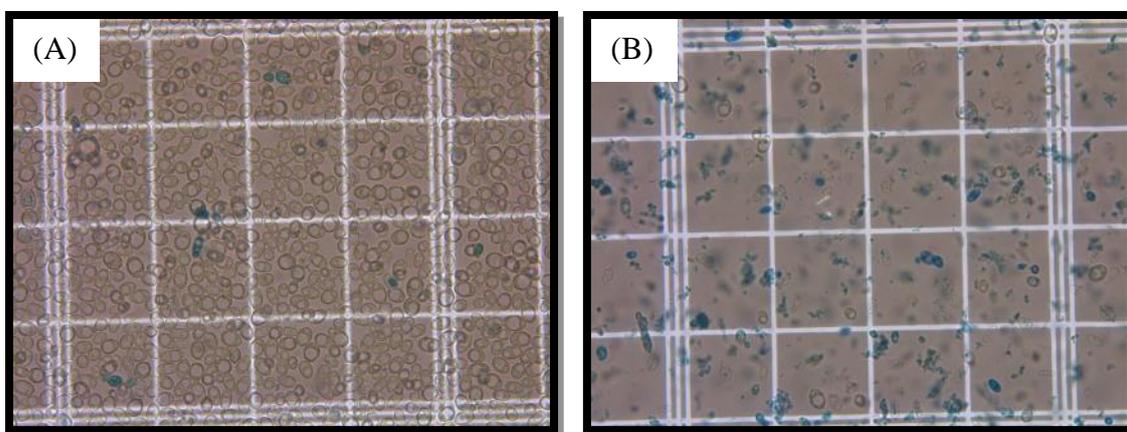


Fonte: Elaborado pela autora

É possível observar que, ao contrário do que se esperava com base nos resultados obtidos anteriormente, o processo aconteceu muito rápido, já na primeira amostra retirada havia uma quantidade significativa de etanol produzido e grande parte da glicose já havia sido consumida durante o pequeno intervalo de tempo de preparo de todas as amostras (~20 minutos). Notou-se ainda que, em ambos os casos, em até 24 horas de processo a levedura já havia consumido toda a glicose e xilose, bem como hidrolisado e consumido toda a celobiose e a xilana de sabugo de milho e produzido máximas concentrações de etanol. As concentrações de glicerol e xilitol ficaram abaixo de 1,4 e 0,8 g/L respectivamente em ambos os ensaios.

Com relação ao uso de agitação, apesar dos resultados terem sido semelhantes nos ensaios com e sem agitação, notou-se que a mesma estava sendo prejudicial às células de levedura, causando lise celular devido ao atrito. É importante destacar que a agitação foi promovida por um magneto dentro do mini-reator, colocado sobre uma plataforma magnética de agitação, de modo que o contato entre o magneto e as células causou danos às mesmas. A Fig. 7.9 mostra uma foto das células de AC14 depois de 28 horas de processo agitado e estático.

Figura 7.9 Imagens das células de AC14 após 28 horas de processo estático (A) e agitado (250 rpm) (B). Condições fermentativas: T = 35 °C, pH 5,6.



Fonte: Elaborado pela autora

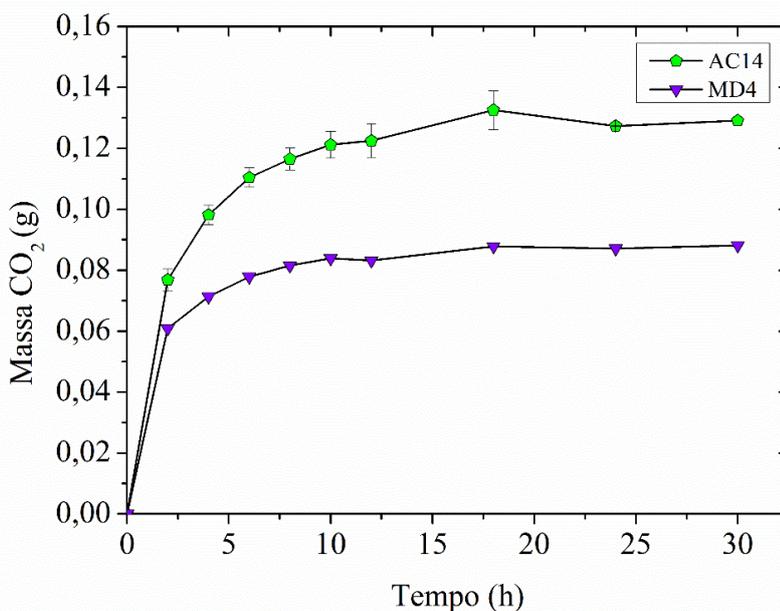
Nas imagens é possível ver com clareza que a agitação causou perda de integridade e viabilidade celular, como mostrado na Fig. 7.9 B, que contém fragmentos celulares e um maior número de células mortas (azuis). Dessa forma, definiu-se a condição estática para realização dos próximos experimentos. Destaca-se que, mesmo após 28 horas de exposição a ~25g/L de etanol, as células de AC14 em condição estática ainda apresentavam elevada viabilidade, em torno de 98%, indicando a robustez das mesmas em sua forma livre.

Como o processo foi acompanhado por um período maior que o necessário, em intervalos de muitas horas, foi realizada uma replicata do ensaio em condição estática, porém com amostragem em períodos mais curtos e duração de até 30 horas para uma descrição melhor da cinética das etapas simultâneas de hidrólise e fermentação. Antes do início do ensaio os mini-reatores foram deixados em banho de gelo, para que não ocorresse fermentação antes da retirada da amostra inicial. Para fins de comparação, um

reator contendo células da levedura MD4 e sob as mesmas condições foi acompanhado em paralelo. Os resultados obtidos em termos da liberação de CO_2 são mostrados na Fig. 7.10.

A Fig.7.10 indica que com apenas 18 horas de processo houve estabilização da perda de massa nos reatores por liberação de CO_2 . Comparando a produção de CO_2 para as leveduras MD4 e AC14, os resultados sugerem que houve hidrólise e fermentação no ensaio utilizando a levedura AC14, como já era esperado de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriores. Uma visão mais clara da cinética do processo BPC é mostrada na Fig. 7.11, a partir dos resultados obtidos em termos das concentrações de substratos e produtos.

Figura 7.10 Performance fermentativa das leveduras AC14 e MD4 em suas formas livres em alta carga ($\text{DO}_{600} = 100$) em meio sintético composto por xilose, glicose, celobiose e xilana de sabugo de milho. Condições fermentativas: $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,6$, estático

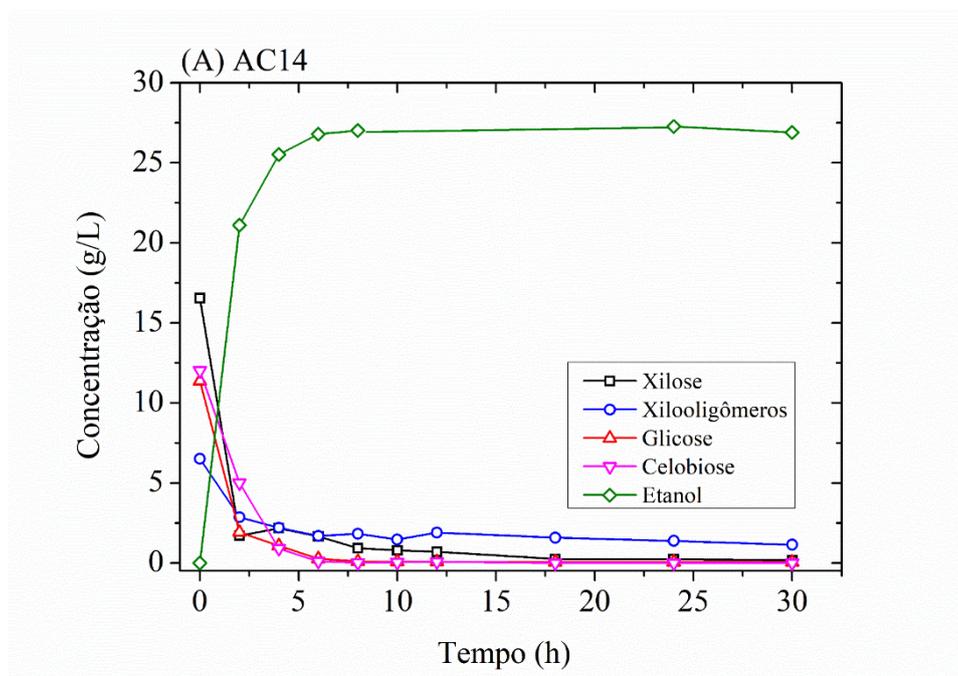


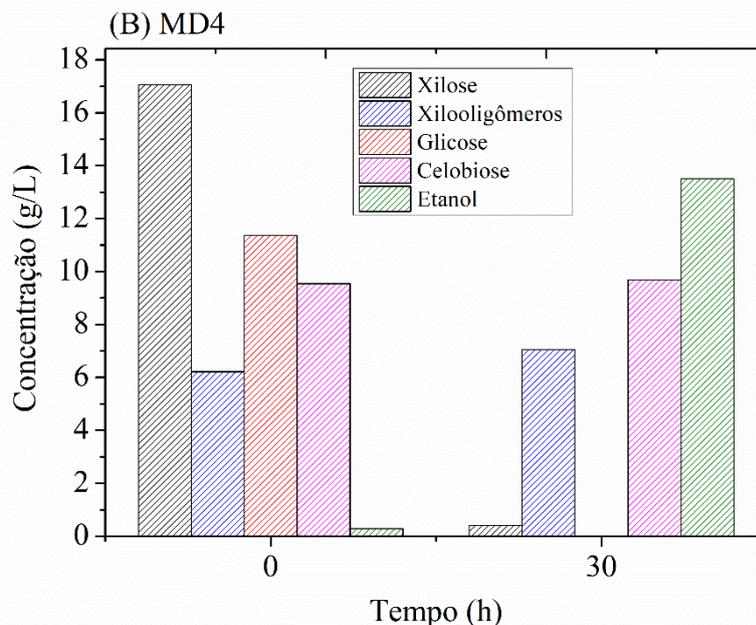
Fonte: Elaborado pela autora

Os resultados mostram que a levedura AC14 foi capaz de consumir xilose e glicose rapidamente, bem como hidrolisar simultaneamente a celobiose, consumindo a glicose liberada, de forma que a celobiose foi esgotada em apenas 6 horas de processo. A hidrólise dos xilooligômeros foi um pouco mais lenta, mas também ocorreu desde o início do cultivo. Neste caso, a hidrólise não foi completa, correspondendo a uma

conversão de 94% ao final das 30 horas de ensaio. A produtividade em etanol obtida após 6 horas de processo foi de 4,46 g/L/h e as viabilidades finais foram de 95%, semelhantes às viabilidades das células de MD4, que foram equivalentes a 92%. Corradini (2019) avaliou ensaios de hidrólise de 40 g/L de xilana de sabugo de milho utilizando dois tipos de biocatalisadores contendo β -xilosidase imobilizada: agarose-glioxil e quitosana-glutaraldeído a 35 °C e pH 5,6. O autor obteve conversão máxima de XOS de 70% em ambos os biocatalisadores avaliados, que mantiveram a conversão acima de 65% ao longo de 10 reciclos. Os resultados aqui apresentados em conversão são superiores aos obtidos por Corradini (2019) provavelmente devido à presença de outras enzimas em solução também produzidas pela AC14 e responsáveis pela hidrólise da xilana, como xilanase e acetil-xilano esterase, o que ressalta a superioridade dessa levedura e potencial para substituição de preparados enzimáticos, representando uma redução de custo significativa no processo.

Figura 7.11 Ensaios fermentativos utilizando meio composto por xilose, glicose, xilana de sabugo de milho e celobiose e células livres em alta carga ($DO_{600}=100$). Condições fermentativas: T=35 °C, pH 5,6, estático. (A) Acompanhamento das concentrações ao longo do processo utilizando células de AC14 e (B) Concentrações iniciais (t = 0 h) e finais (t = 30h) utilizando células de MD4





Fonte: Elaborado pela autora

Claes e colaboradores (2020) estudaram a hidrólise da xilana de sabugo de milho utilizando a levedura modificada AC14 e obtiveram conversão de 85% do substrato em 50 horas de processo. Os autores utilizaram 1 g_{ms}/L de células, ao passo que, no presente trabalho, devido à alta carga de células (DO₆₀₀=100), foi utilizado o equivalente a 82 g_{ms}/L de células, indicando que a maior concentração das mesmas provavelmente conduziu a uma maior produção de enzimas xilanolíticas e levou a uma maior taxa de hidrólise do substrato, resultando em tempo menor de processo. Resultados similares foram obtidos por Cunha e colaboradores (2020) quando compararam o tamanho do inóculo em um ensaio de BPC utilizando uma cepa recombinante de *S. cerevisiae* com capacidade hidrolítica. O aumento do inóculo de 7,5 para 15 g_{ms}/L melhorou a performance do processo, aumentando em 36% a concentração de etanol produzida.

Os resultados obtidos utilizando a levedura MD4 (Fig. 7.11B) indicam que, de fato, não houve consumo de celobiose ou de xilana de sabugo de milho, sendo que a mesma foi capaz de produzir aproximadamente metade da concentração de etanol produzida pelas células de AC14, como já era esperado. Dessa forma, verifica-se que a levedura AC14 tem potencial para realizar hidrólise e fermentação de hidrolisados contendo polímeros de glicose e xilose, podendo melhorar o rendimento desses processos e ainda diminuir o custo relacionado às enzimas necessárias na etapa de

hidrólise. Para verificar a viabilidade da operação utilizando fração celulósica e hemicelulósica de bagaço de cana pré-tratado, os próximos experimentos foram realizados em meio formulado com hidrolisado produzido por tratamento hidrotérmico de bagaço e também com a fração sólida obtida após o tratamento.

7.3.6 Avaliação de bioprocessamento consolidado em meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após pré-tratamento hidrotérmico de bagaço de cana-de-açúcar

Com o objetivo de avaliar a performance da levedura em um meio fermentativo industrial, foi realizado um ensaio utilizando as leveduras MD4 e AC14 em alta carga ($DO_{600}=100$) utilizando as frações sólida e líquida obtidas após pré-tratamento hidrotérmico (LH + BTH). À fração líquida foram adicionados 10 g_{ms}/L da fração sólida de bagaço de cana pré tratado (BTH), seguida por ajuste de pH até 5,6 utilizando NaOH. A composição do bagaço pré-tratado foi previamente determinada por Corradini (2019), e está descrita com detalhes na Tabela 7.3A. A composição do hidrolisado utilizado nessa etapa do trabalho está descrita na Tabela 7.3B.

A Fig. 7.12 mostra a evolução da perda de massa dos mini-reatores durante o processo, indicando que, de fato, houve hidrólise no ensaio utilizando a levedura AC14 devido à maior liberação de CO₂ em comparação com o ensaio utilizando a cepa MD4. Na Fig. 7.13 são mostradas as concentrações de xilose, glicose, celobiose e xilooligômeros totais ao longo do ensaio com as duas leveduras. Pode-se verificar que, apesar do processo ter sido acompanhado por mais de 40 horas e apresentado perfil de perda de massa (Fig. 7.12), as etapas de hidrólise e fermentação no caso do ensaio utilizando a levedura AC14 duraram apenas 7 horas, com produção de até 13 g/L de etanol. Como já era esperado, não houve consumo de xilooligômeros ou celobiose pela MD4. Os resultados de produção de etanol por esta cepa, no entanto, apresentam rendimento acima do teórico quando considerados apenas os açúcares livres presentes no licor hidrotérmico. Esse fato provavelmente está relacionado à presença de açúcares residuais na fração sólida hidrotérmica, uma vez que a mesma foi filtrada e seca após o pré-tratamento, sendo ela a responsável por aumentar a concentração de monômeros de açúcares em solução, que foram rapidamente consumidos. Essa hipótese é condizente com a massa de CO₂ liberada, que também está de acordo com a concentração de etanol produzida durante o processo. Corradini (2019) obteve 32% de rendimento em xilose na

água de lavagem de bagaço de cana explodido, indicando que açúcares residuais podem estar presentes na biomassa pré-tratada e seca.

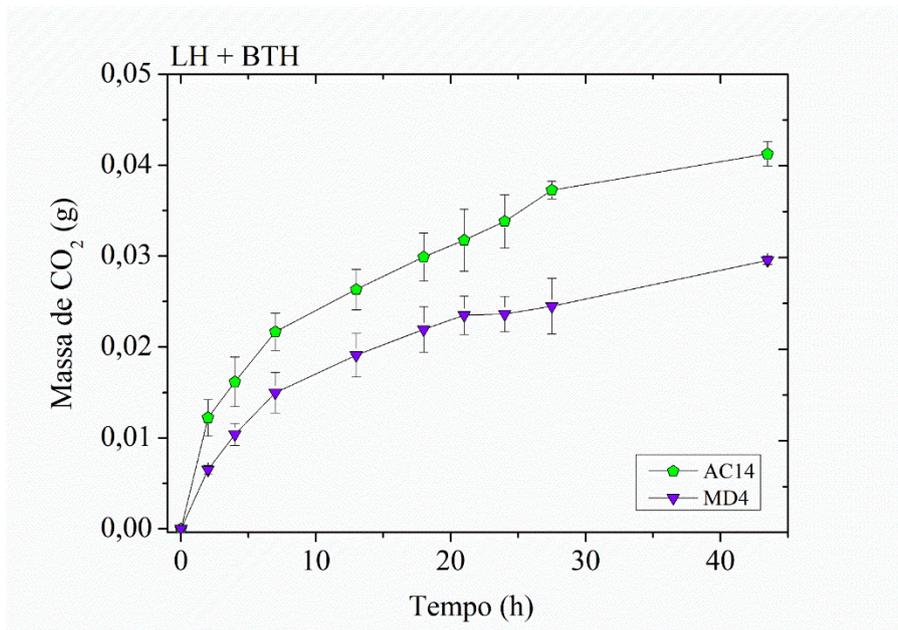
Tabela 7.3 Composição das frações sólida (BTH) e líquida (LH) obtidas após pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar (195 °C e 10 min, 1:10 sólido/líquido).

(A) Composição fração sólida (BTH)	
Componente (%)	
Celulose	35,1 ± 0,6
como glicose	34,3 ± 0,6
como celobiose	0,6 ± 0,0
como HMF	0,2 ± 0,0
Hemicelulose	8,8 ± 0,3
como xilose	7,3 ± 0,3
como arabinose	0,9 ± 0,0
como ácido acético	0,5 ± 0,0
como furfural	0,2 ± 0,0
Lignina total	22,9 ± 0,9
solúvel	6,5 ± 0,2
insolúvel	16,4 ± 0,9
Cinzas	2,7 ± 0,1
Total	69,6 ± 1,1
(B) Composição fração líquida (LH)	
Componente da fração líquida hidrotérmica	Concentração (g/L)
Xilose	6,68
Glicose	0,13
Celobiose	0,04
Xilooligômeros totais	9,20
Ácido acético	4,95
Furfural	0,85
HMF	0,12

Fonte (A): Corradini (2019)

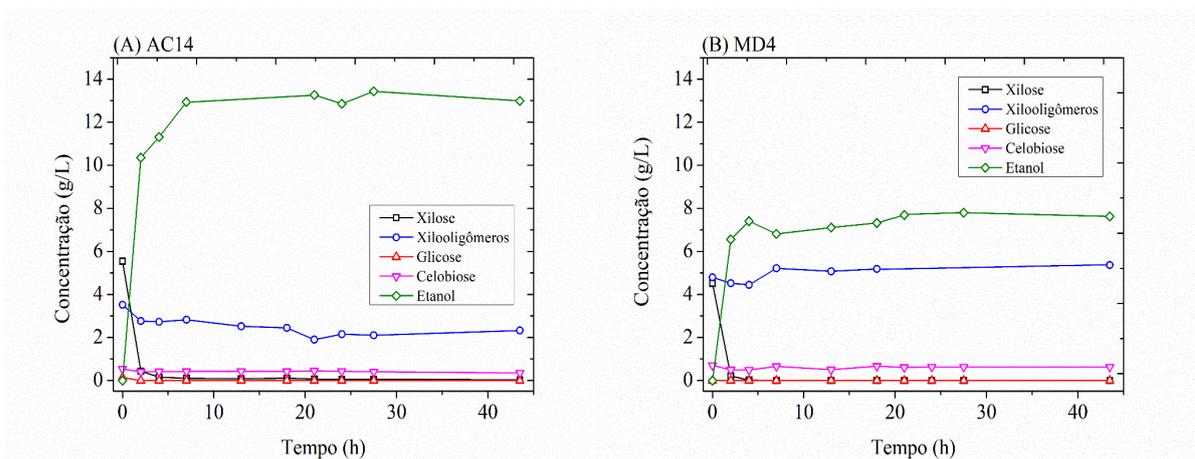
Fonte (B): Elaborado pela autora

Figura 7.12 Performance fermentativa das leveduras AC14 e MD4 em suas formas livres em alta carga ($DO_{600} = 100$) em meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após tratamento hidrotérmico (LH e BTH). Condições fermentativas: $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5,6$, estático



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 7.13 Ensaio fermentativos utilizando meio composto pelas frações sólida e líquida obtidas após tratamento hidrotérmico e células livres em alta carga ($DO_{600} = 100$). Condições fermentativas: $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} 5,6$, estático. (A) AC14 e (B) MD4



Fonte: Elaborado pela autora

De acordo com a Fig. 7.13A os xilooligômeros foram apenas parcialmente consumidos pela cepa AC14. Esse fato pode estar relacionado com a estrutura da xilana presente no bagaço de cana-de-açúcar. Existe uma grande diversidade de estruturas de xilana existentes, e a hidrólise completa e eficiente da mesma demanda a presença de

enzimas auxiliares, que atuam nas cadeias laterais, como α -L arabinofuranosidase, galactosidase, glucuronosidases e feroluil esterases, que atuam na remoção de L-arabinose, D-galactose, 4-metil-D-ácido galacturônico e ácido ferúlico (RATANAKHANOKCHAI et al., 2013). Essas enzimas não são produzidas pela AC14 e podem ter limitado a hidrólise dos xilooligômeros produzidos pelo pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar. Além disso, sabe-se que a remoção ou não de ramificações pode ainda afetar o desempenho de algumas xilanases, que dependem de ramificações para orientar o acoplamento à cadeia principal, influenciando diretamente no perfil de produtos obtidos no processo (BIELY; SINGH; PUCHART, 2016; DODD; CANN, 2009; MILESSI, 2017). Por outro lado, de acordo com Corradini (2019), a xilana de sabugo de milho, substrato que até então havia sido utilizado nos ensaios de BPC apresentando alto teor de conversão, é composta majoritariamente por xilobiose – X₂ (~2,55%), seguida por xilotriose – X₃ (~1,46%), xilotetraose – X₄ (~0,65%), xilopentaose – X₅ (~0,38%), sendo a X₂ hidrolisada à xilose pela β -xilosidase, enzima produzida pela AC14. A diferença nos desempenhos de hidrólise em meio sintético e hidrolisado hidrotérmico pode ainda estar relacionada à presença de inibidores no LH, como furfural, HMF e ácido acético (Tabela 7.3 B). Esses componentes podem interferir na performance fermentativa das leveduras, podendo ainda afetar a produção e secreção de enzimas para o meio fermentativo.

Corradini (2019) realizou ensaios de SHF do licor hidrotérmico utilizando um biocatalisador contendo derivados xilanólíticos de Multifect CX XL (coquetel enzimático comercial) e β -xilosidase de *Bacillus subtilis* encapsulados com *S. cerevisiae* GSE16-T18 (T18) em alginato de cálcio. O licor utilizado continha 3,11 g/L de glicose, 23,09 g/L de xilose, 15,7 g/L de X₂, 8,14 g/L de X₃, 5,16 g/L de X₄, 1,3 g/L de HMF, 0,93 g/L de furfural e 6,7 g/L de ácido acético. Ao final do processo, que durou 24 horas, houve produção de 15,03 g/L de etanol e 6,47 g/L de xilose residual, resultando em rendimento de 0,32 g_{EtOH}/g_{Açúcares potenciais} e produtividade de 0,63 g/L/h de etanol em comparação com 1,85 g/L/h de produtividade em etanol obtida no presente ensaio após 7 horas. A concentração de etanol produzida pela cepa AC14, com base na composição do LH e na concentração de etanol produzido pela cepa MD4, que incorpora a fração de açúcares residuais presentes na fração sólida hidrotérmica, pode ser explicada pelo consumo açúcares liberados pela hidrólise ao menos parcial dos xilooligômeros e da fração sólida do BTH.

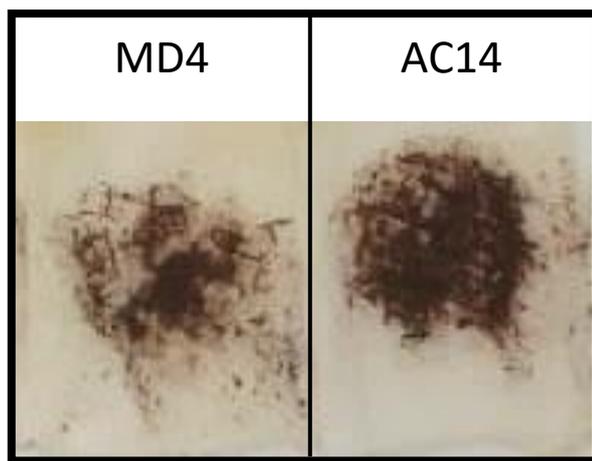
As viabilidades finais das células de AC14 e MD4 após as 43,5 horas de processo foram equivalentes a 90 e 92%, bastante elevadas após serem expostas a etanol e inibidores como furfural, HMF e ácido acético, indicando a robustez das mesmas. Ao final do ensaio utilizando a cepa AC14, a concentração de ácido acético no meio era de 3,96 g/L e dos subprodutos glicerol e xilitol eram de 0,26 e 0,27 g/L, respectivamente. Para a cepa MD4 os resultados foram semelhantes, equivalentes a 3,77 g/L de ácido acético, 0,1 g/L de glicerol e 0,21 g/L de xilitol.

Cunha e colaboradores (2020) desenvolveram a cepa recombinante *S. cerevisiae* ER-X-2P a partir da *ethanol red*, uma cepa industrial usada para produção de etanol 1G. À cepa modificada foi atribuída capacidade de consumir xilose e expressar β -xilosidase, β -glicosidase e xilanase na superfície das células. Os melhores resultados em função da produção de etanol foram obtidos a partir de licor produzido por tratamento hidrotérmico de xilana de sabugo de milho contendo 0,35 g/L de glicose, 5,01 g/L de xilose, 1,59 g/L de ácido acético, 0,123 g/L de HMF, 0,65 g/L de furfural, 1,86 g/L de glucooligossacarídeos e 26,7 g/L de XOS. Foi obtida uma concentração de 11,1 g/L de etanol e rendimento de 0,328 g_{EtOH}/g_{Açúcares potenciais} após 72 horas de processo, período significativamente superior às 7 horas necessárias para hidrólise e fermentação de LH no presente estudo. Em outro trabalho semelhante, *S. cerevisiae* foi modificada para assimilação de xilose e expressão de xilanase, β -xilosidase e β -glicosidase. Os melhores resultados foram obtidos pela cepa Sun49-7 a partir de licor de palha de arroz tratada hidrotermicamente, composto por 0,29 g/L de glicose, 0,08 g/L de celobiose, 3,41 g/L de celotriose, 1,26 g/L de xilose, 0,75 g/L de X₂, 0,52 g/L de X₃, 0,39 g/L de X₄, 0,30 g/L de X₅ e inibidores, como acetato (28,6 mM), furfural (12,6 mM), HMF (0,9 mM) e vanilina (0,3 mM). Após 72 horas de processo, foram obtidas 4,04 g/L de etanol, sendo que nas primeiras 3 horas houve aumento na concentração de xilose, indicando que ocorreu hidrólise devido à expressão de enzimas xilanolíticas nas células modificadas (HASUNUMA et al., 2014). Por outro lado, o tempo de processo nesse caso foi também superior ao tempo para hidrólise e fermentação no presente estudo.

Considerando os resultados aqui apresentados, destaca-se o potencial de aplicação da cepa recombinante AC14 em processos de BPC, que apresenta resultados promissores tanto em rendimento, quanto em produtividade em etanol. A produção de enzimas ainda não é suficiente para permitir a hidrólise completa dos xilooligômeros (Fig. 7.15A) ou da celulignina obtidos após o pré-tratamento hidrotérmico, como mostrado na Fig. 7.16, que retrata a fração sólida após 43,5 horas de processo para as

cepas MD4 e AC14. Análises complementares da fração sólida obtida ao final da fermentação com a AC14 estão em andamento para uma melhor avaliação da ação das enzimas na hidrólise desse substrato.

Figura 7.14 Imagens das frações sólidas obtidas após 43,5 horas de processo utilizando as cepas recombinantes de MD4 e AC14 após remoção do sobrenadante e filtração para remoção das células em suspensão



Fonte: Elaborado pela autora

7.4 Conclusão

O desempenho inferior do ensaio utilizando células da AC14 imobilizadas, mesmo sob agitação, indica a ocorrência de efeitos difusionais intra-partícula. Os melhores resultados foram obtidos em ensaios utilizando alta carga de células, indicando que a maior concentração das mesmas intensifica produção de enzimas, acelerando o processo de hidrólise e posterior fermentação, com significativos ganhos em produtividade. O acompanhamento do processo de hidrólise e fermentação através da retirada periódica de amostras revelaram que o mesmo acontece rapidamente, em menos de 7 horas para meio sintético composto por celobiose e xilana de sabugo de milho, isento de inibidores, e em menos de 9 horas para o hidrolisado hidrotérmico (LH+BTH). Ainda é preciso aprofundar a pesquisa com relação às enzimas limitantes do processo de hidrólise de xilooligômeros maiores, como os presentes no LH e também da celulignina presente na fração sólida, BTH. No entanto, os resultados aqui apresentados representam um importante avanço no que se refere à aplicação de Bioprocessamento Consolidado em condições industriais. Além disso, devido à sua simplicidade e ao baixo custo, quando comparados a tecnologias que demandam a

utilização de preparados enzimáticos comerciais ou o desenvolvimento de biocatalisadores, o processo aqui proposto, caracterizado pelo uso de alta carga de leveduras com capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas, ainda pode ser aprimorado, tornando-o ainda mais atrativo para aplicações práticas.

Capítulo 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leveduras recombinantes geneticamente modificadas para assimilar xilose estudadas no presente trabalho, *S. cerevisiae* T18, HAA1 e MDS130, se destacaram em termos de assimilação de xilose, apresentando resultados promissores em produtividade em etanol em meios contendo elevadas concentrações de açúcares. Estudos em biorreatores de leito fixo, operados em batelada repetida ou no modo contínuo com alta carga de células, foram realizados para avaliar a escalabilidade da produção de etanol 2G utilizando essas leveduras recombinantes. A suplementação de meios fermentativos com nutrientes e a lavagem do reator se mostraram efetivas para melhorar o desempenho do processo contínuo. O mesmo conceito de lavagem, que acontece a cada troca de meio nas fermentações em batelada repetida, explica o elevado número de ciclos alcançados.

Embora a literatura afirme que o ácido acético, o furfural e o HMF, gerados durante a etapa de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, sejam os principais responsáveis pela queda de desempenho das leveduras em fermentações conduzidas nos hidrolisados, constatou-se no presente trabalho que há outros fatores mais relevantes. De fato, os resultados mostraram que a etapa de concentração dos hidrolisados para aumentar seu teor de açúcares, a prolongada exposição a elevadas concentrações de etanol e a sinergia entre os diferentes inibidores constituem as principais causas de perda de viabilidade da levedura e, conseqüentemente, de dificuldade em manter o estado estacionário nas fermentações contínuas ou o número de ciclos com alta conversão nas bateladas repetidas. Constatou-se ainda que o procedimento de destoxificação empregado não foi eficiente em atenuar os efeitos tóxicos dos componentes presentes no hidrolisado hemicelulósico bruto concentrado. Assim, a integração da produção de etanol 1G e 2G proposta, mediada pela suplementação do hidrolisado *in natura* com melaço para alcançar o teor de açúcar desejado na fermentação, constitui um importante avanço para a implementação de processos de alto desempenho no contexto da Biorrefinaria, agregando aumento de produtividade, rendimento em etanol, viabilidade celular e estabilidade ao processo. A implementação dessa estratégia em reator de leito fixo com as células recombinantes imobilizadas em alta carga resultou em valores de produtividade de até 20 g/L/h e na realização de 20 ciclos fermentativos com performance similar e conversões de açúcares acima de 95%. Porém, a manutenção da viabilidade das células expostas a altas concentrações de

etanol, em processos de longa duração, ainda representa um desafio a ser enfrentado por pesquisadores das áreas de Engenharia Genética e de Engenharia de Bioprocessos.

Leveduras com capacidade de produzir enzimas hidrolíticas, adequadas para a aplicação em Bioprocessamento Consolidado, representam o futuro das pesquisas envolvendo a produção de etanol 2G (e de outros produtos) para processos integrados em Biorrefinarias. *S. cerevisiae* AC14 é uma fábrica celular excepcional, que produz celulasas, xilanases e enzimas auxiliares, apresentando características superiores a qualquer outra levedura desenvolvida para BPC relatada na literatura. Os estudos apresentados no presente trabalho são preliminares, mas já apontam que a operação em alta carga, que permite conduzir as fermentações em menos de 12 h, é compatível com os requisitos para implementação em escala industrial. Por outro lado, a complexidade e a diversidade dos materiais lignocelulósicos dificultam a seleção do mix de enzimas a serem clonadas para que a etapa de hidrólise de diferentes materiais seja efetiva. Neste sentido, o investimento em etapas de pré-tratamento complementares ao pré-tratamento hidrotérmico, podem ser consideradas, para viabilizar o desenvolvimento de um processo robusto e escalonável, com elevada taxa de hidrólise tanto de xilooligômeros, como de celooligômeros, e posterior fermentação.

Capítulo 9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O processo de produção de etanol 2G utilizando meio fermentativo formulado a partir de hidrolisado hemicelulósico bruto suplementado com melaço e utilizando células imobilizadas de levedura recombinante (MDS130) provou ser uma estratégia robusta e promissora para aplicação industrial em biorrefinarias. Nesse sentido, um direcionamento que pode ser dado para essa etapa do trabalho é a realização de um ensaio em planta piloto industrial aliado à análise técnico-econômica do processo. Outro aspecto que pode ser explorado é o desenvolvimento de estratégias de cultivo que favoreçam a manutenção da viabilidade celular para operação prolongada em concentrações de etanol acima de 70 g/L.

A levedura AC14 é uma cepa inédita, capaz de produzir e secretar 7 diferentes enzimas lignocelulolíticas, além de fermentar xilose e glicose com geração mínima de subprodutos. As possibilidades de aplicação desta cepa são inúmeras, e diversos são os direcionamentos que podem ser dados para estudos futuros. Até o momento, os resultados obtidos utilizando a levedura AC14 indicam que a mesma apresenta potencial para ser utilizada em bioprocessamento consolidado em sua forma livre e em alta carga utilizando substratos compostos por XOS e celobiose para produção de etanol 2G, apesar da mesma não ser eficiente para hidrolisar xilooligômeros maiores ou celulignina produzida por tratamento hidrotérmico a partir do bagaço de cana-de-açúcar. Nesse sentido, são listadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Determinar as enzimas que são limitantes à etapa de hidrólise de oligômeros de xilose e glicose presentes no fração líquida e sólida obtida após o pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar;
- Avaliar o perfil de atividades enzimáticas de endoglucanase, β -glicosidade, celobiohidrolases, xilanase, β -xilosidase e acetil-xilano esterase no meio de fermentação da cepa AC14;
- Identificar as estratégias que permitam maior produção das enzimas limitantes das etapas de hidrólise;
- Retomar os estudos com as células da levedura AC14 imobilizadas em alginato, utilizando *beads* de menor diâmetro, concentrações menores de alginato ou de células

no *bead* na tentativa de contornar os efeitos difusionais internos identificados no Capítulo 7;

- Avaliar a aplicação da levedura AC14 em hidrolisados com elevada concentração de açúcares potenciais, suplementado com melado, por exemplo, de modo a viabilizar economicamente a produção de etanol 2G;
- Avaliar o efeito da presença de inibidores sobre a produção de atividades enzimáticas e posterior hidrólise e fermentação de meio fermentativo;
- Avaliar a utilização das células de AC14 em regime de bateladas repetidas, de modo a verificar a capacidade de produção de enzimas e hidrólise ao longo dos ciclos, bem como a fermentação de ambas as frações resultantes do pré-tratamento hidrotérmico, em meio industrial contendo inibidores.

Referências

- ADITIYA, H. B.; MAHLIA, T. M. I.; CHONG, W. T.; NUR, Hadi; SEBAYANG, A. H. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016. DOI: 10.1016/j.rser.2016.07.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.07.015>.
- AGBOR, V.B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, , v. 29, n. 6, p. 675–685, 2011. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.05.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- AGNIHOTRY, H.; SHARMA, S.; KAUR, R.; SINGH, H. Ethanol Fermentation from Molasses Using Free and Immobilized Cells of *Saccharomyces cerevisiae* [MTCC3090] - A Comparative Study. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 9, n. 1, p. 183–188, 2017.
- AGUIAR, A.; MILESSI, T. S.; MULINARI, D. R.; LOPES, M. S.; DA COSTA, S. M.; CANDIDO, R. G. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, , v. 144, n. June 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.biombioe.2020.105896.
- ALMEIDA, J.R.M.; MODIG, T.; PETERSSON, A.; HÄHN-HÄGERDAL, B.; LIDÉN, G.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, , v. 82, n. 4, p. 340–349, 2007. DOI: 10.1002/jctb.1676. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1676>. Acesso em: 7 jun. 2019.
- ALONSO, D. M.; WETTSTEIN, S. G.; DUMESIC, J. A. Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. **Chemical Society Reviews**, , v. 41, n. 24, p. 8075–8098, 2012. DOI: 10.1039/c2cs35188a.
- ALVES, L.A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.. E.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. 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. DOI: 10.1007/BF02920126.
- ALVIRA, P.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Bioresource Technology Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis : A review. **Bioresource Technology**, , v. 101, n. 13, p. 4851–4861, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.093>.
- AMOAH, J.; ISHIZUE, N.; ISHIZAKI, M.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, K.; NINOMIYA, K.; YAMADA, R.; KONDO, A.; OGINO, C.. Development and evaluation of consolidated bioprocessing yeast for ethanol production from ionic liquid-pretreated bagasse. **Bioresource Technology**, , v. 245, p. 1413–1420, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.171. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.171>.

AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; DE CASTRO OLIVEIRA, J. V.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H.. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, , v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3437-6.

ANDERSEN, R. L.; JENSEN, K. M.; MIKKELSEN, M.J.. Continuous ethanol fermentation of pretreated lignocellulosic biomasses, waste biomasses, molasses and syrup using the anaerobic, thermophilic bacterium *Thermoanaerobacter italicus* pentocrobe 411. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0136060.

ANSANAY-GALEOTE, V.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; SABLAYROLLES, J.M.. Stress effect of ethanol on fermentation kinetics by stationary-phase cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 9, p. 677–681, 2001. DOI: 10.1023/A:1010396232420.

ANTUNES, F. A. F.; SANTOS, J. C.; CHANDEL, A. K.; CARRIER, D. J.; PERES, G. F. D.; MILESSI, T. S. S.; DA SILVA, S. S. Repeated batches as a feasible industrial process for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by using immobilized yeast cells. **Cellulose**, v. 26, n. 6, p. 3787–3800, 2019. DOI: 10.1007/s10570-019-02341-z.

ANTUNES, F. A. F.; SANTOS, J. C.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; PERES, G. F. D.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic Ethanol Production by Immobilized Wild Brazilian Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Effects of Cell Concentration and Stirring Rate. **Current Microbiology**, v. 72, n. 2, p. 133–138, 2016. a. DOI: 10.1007/s00284-015-0923-6.

ANWAR, Z.; GULFRAZ, M.; IRSHAD, M.. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, , v. 7, n. 2, p. 163–173, 2014. DOI: 10.1016/J.JRRAS.2014.02.003.

BADER, N. B.; GERMEC, M.; TURHAN, I.. *Scheffersomyces stipitis* biofilm reactor for ethanol production from acid-pretreated/detoxified and glucose- or xylose-enriched rice husk hydrolysate under a continuous process. **Biomass Conversion and Biorefinery**, 2020. DOI: 10.1007/s13399-020-00611-6.

BASSO, L.C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, v. 1530, 2011. DOI: 10.5772/17047.

BASSO, T. O. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694–703, 2011. DOI: 10.1016/j.ymben.2011.09.005.

BELLISSIMI, E.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; VAN MARIS, A. J. A. 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. a. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2009.00487.x.

BELO, E.V.C. Construction of new industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for lignocellulosic bioethanol production. p. 152, 2020. PhD. Thesis. Biochemistry and Biotechnology Department, Katholieke Kniversiteit Leuven.

BIELY, P.; SINGH, S.; PUCHART, V.. Towards enzymatic breakdown of complex plant xylan structures: State of the art. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 7, p. 1260–1274, 2016. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2016.09.001.

BRANDBERG, T.; SANANDAJI, N.; GUSTAFSSON, L.; FRANZÉN, C. J. Continuous fermentation of undetoxified dilute acid lignocellulose hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 96581 using cell recirculation. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 4, p. 1093–1101, 2005. DOI: 10.1021/bp050006y.

CANABARRO, N.I.; ALESSIO, C.; FOLETTO, E. L.; KUHN, R. C.; PRIAMO, W. L.; MAZUTTI, M. A. Ethanol production by solid-state saccharification and fermentation in a packed-bed bioreactor. **Renewable Energy**, v. 102, p. 9–14, 2017. DOI: 10.1016/j.renene.2016.10.026.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W.; FELIPE, M.; DA SILVA, S. S.. 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, 2012. DOI: 10.1155/2012/989572.

CARVALHO, CANILHA, S.. Uma Alternativa Para a Condução De Bioprocessos. **Revista Analytica**, n. June 2006, 2006.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N.W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a genetically engineered strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 4, p. 385–393, 2010. DOI: 10.1111/j.1567-1364.2010.00623.x.

CHANDEL, A.K; SILVA, S.S.; SINGH, O. V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, n. September, 2012. DOI: 10.5772/16454.

CHANDEL, A.K.; NARASU, M. L.; CHANDRASEKHAR, G.; MANIKYAM, A.; RAO, L. Venkateswar. Bioresource Technology Use of *Saccharum spontaneum* (wild sugarcane) as biomaterial for cell immobilization and modulated ethanol production by thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* VS 3. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 8, p. 2404–2410, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.11.014.

CHANDEL, A.K.; CHANDRASEKHAR, G.; RADHIKA, K.; RAVINDER, R.; RAVINDRA, P.. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 1, p. 8–20, 2011.

- CLAES, A.; DEPARIS, Q.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. **Metabolic Engineering**, v. 59, p. 131–141, 2020. DOI: 10.1016/j.ymben.2020.02.004.
- COHEN, Y.. Biofiltration - The treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. **Bioresource Technology**, v. 77, n. 3, p. 257–274, 2001. DOI: 10.1016/S0960-8524(00)00074-2.
- CORRADINI, F. A. S. **Estudo da produção de etanol a partir de xilose e xilooligômeros usando xilanases, xilose isomerase e levedura co- imobilizadas**. p. 197, 2019. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.
- COVIZZI, L.G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R.. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. p. 143–160, 2007.
- CRESPO, C.F.; BADSHAH, M.; ALVAREZ, M. T.; MATTIASSON, B.. Ethanol production by continuous fermentation of d-(+)-cellobiose, d-(+)-xylose and sugarcane bagasse hydrolysate using the thermoanaerobe *Caloramator boliviensis*. **Bioresource Technology**, v. 103, n. 1, p. 186–191, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.10.020.
- CUNHA, J. T.; ROMANÍ, A.; INOKUMA, K.; JOHANSSON, B.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; DOMINGUES, L. Consolidated bioprocessing of corn cob-derived hemicellulose: Engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* as efficient whole cell biocatalysts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1186/s13068-020-01780-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01780-2>.
- DASHTBAN; SCHRAFT, Q. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, n. 6, p. 578, 2009.
- DE ANDRADE, R. R.; MAUGERI FILHO, F.; MACIEL FILHO, R.; da COSTA, A.C.. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 351–359, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.12.045.
- DEMEKE, M. M.; DIETZ, H.; LI, Y.; FOULQUIE-MORENO, M.R.; MUTTURI, S.; DEPREZ, S.; ABT, T.D.; BONINI, B.M.; LIDEN, G.; DUMORTIER, F.; VERPLAETSE, A.; BOLES, E.; THEVELEIN, J.M. 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** p. 1–24, 2013. a.
- DEMEKE, M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J.M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol

production., **Biotechnology for Biofuel** p. 1–17, 2013. b.

DEN HAAN, R.; ROSE, S. H.; LYND, L.R.; VAN ZYL, W. H. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 9, n. 1, p. 87–94, 2007. DOI: 10.1016/j.ymben.2006.08.005.

DEPARIS, Q.; CLAES, A.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J.M. Engineering tolerance to industrially relevant stress factors in yeast cell factories. **FEMS yeast research**, v. 17, n. 4, p. 1–35, 2017. b. DOI: 10.1093/femsyr/fox036.

DHABHAI, R.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K. Efficient bioethanol production from glucose-xylose mixtures using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on canadian pine wood chips and free pichia stipitis. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 6, n. 5, p. 594–600, 2012. DOI: 10.1166/jbmb.2012.1253.

DIAS, M. O. S.; JUNQUEIRA, T. L.; CAVALETT, O.; PAVANELLO, L. G.; CUNHA, M.P.; JESUS, C. D. F.; MACIEL FILHO, R.; BONOMI, A.. Biorefineries for the production of first and second generation ethanol and electricity from sugarcane. **Applied Energy**, v. 109, p. 72–78, 2013. DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.03.081.

DODD, DYLAN; CANN, ISAAC K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, 2009. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2009.01004.x.

DOS SANTOS, L.V.; CARAZZOLLE, M.F.; NAGAMATSU, S.T.; SAMPAIO, N.M.; ALMEIDA, L.D.; PIROLLA, R.A.S.; BORELLI, G.; CORREA, T.L.R.; ARGUESO, J.L.; PEREIRA, G.A.G. Unraveling the genetic basis of xylose consumption in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains. **Scientific Reports**, v. 6, n. December, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1038/srep38676.

DOS SANTOS ROCHA, M.S.R.; PRATTO, B.; DE SOUSA, R.; ALMEIDA, R. M. R.G.; CRUZ, A.J. G.. A kinetic model for hydrothermal pretreatment of sugarcane straw. **Bioresource Technology**, v. 228, p. 176–185, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.12.087.

DUBEY, R; JAKEER, S.; GAUR, N. A. Screening of natural yeast isolates under the effects of stresses associated with second-generation biofuel production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 5, p. 509–516, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.09.006.

EL-DALATONY, M.M.; KURADE, M.B.; ABOU-SHANAB, R. A. I.; KIM, H.; SALAMA, E. Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* **Bioresource Technology**, v. 219, n. 2018, p. 98–105, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.07.113.

ERCAN, Y.; IRFAN, T.; MUSTAFA, K.. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 365–371, 2013. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.006.

ERDEI, B.; BARTA, Z.; SIPOS, B.; RÉCZEY, K.; GALBE, M.; ZACCHI, G.. Ethanol production from mixtures of wheat straw and wheat meal. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 16, 2010. DOI: 10.1186/1754-6834-3-16.

FARIAS, D.; MAUGERI FILHO, F. Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 147, n. January, p. 29–38, 2019. DOI: 10.1016/j.bej.2019.03.020.

FAVARO, L.; VIKTOR, M. J.; ROSE, S. H.; VILJOEN-BLOOM, M.; VAN ZYL, W.H.; BASAGLIA, M.; CAGNIN, L.; CASELLA, S.. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 9, p. 1751–1760, 2015. DOI: 10.1002/bit.25591.

FERREIRA, S.; DUARTE, A.P.; RIBEIRO, M.H. L.; QUEIROZ, J. A.; DOMINGUES, F.C. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of *Cistus ladanifer* and *Cytisus striatus* for bioethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 45, n. 3, p. 192–200, 2009. DOI: 10.1016/j.bej.2009.03.012.

FU, C.; MIELENZ, J. R.; XIAO, X.; GE, Y.; HAMILTON, C. Y.; RODRIGUEZ, M.. Genetic manipulation of lignin reduces recalcitrance and improves ethanol production from switchgrass. v. 108, n. 9, p. 3803–3808, 2011. DOI: 10.1073/pnas.1100310108.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J.. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 3, p. 210–217, 2009. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.04.006.

FUJITA, Y.; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A.. Synergistic Saccharification, and Direct Fermentation to Ethanol, of Amorphous Cellulose by Use of an Engineered Yeast Strain Codisplaying Three Types of Cellulolytic Enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1207–1212, 2004. DOI: 10.1128/AEM.70.2.1207-1212.2004.

GALBE, Mats; ZACCHI, Guido. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**, v. 46, p. 70–78, 2012. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.03.026.

GEORGIEVA, T. I.; AHRING, B.K. Evaluation of continuous ethanol fermentation of dilute-acid corn stover hydrolysate using thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 1, p. 61–68, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1149-8.

GEORGIEVA, T.I.; MIKKELSEN, M. J.; AHRING, B.K. Ethanol production from wet-exploded wheat straw hydrolysate by thermophilic anaerobic bacterium *Thermoanaerobacter* BG1L1 in a continuous immobilized reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 145, n. 1–3, p. 99–110, 2008. DOI: 10.1007/s12010-007-8014-1.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.01.088.

GONÇALVES, D.L.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B. B.; GOSHIMA, T.; BON, E. P. S.; STAMBUK, B. U. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p. 13–20, 2014. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2014.05.003.

GÖRGENS, J.F.; VAN ZYL, W.H.; KNOETZE, J. H.; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel. The metabolic burden of the PGK1 and ADH2 promoter systems for heterologous xylanase production by *Saccharomyces cerevisiae* in defined medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 73, n. 3, p. 238–245, 2001. DOI: 10.1002/bit.1056.

GROPOSO, C.; DE CASTRO, A. M.; PEREIRA, N.. Effects of agitation and exogenous H₂ on bioconversion of sugarcane bagasse into ethanol by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 16, n. 6, 2013. DOI: 10.2225/vol16-issue6-fulltext-7.

GUO, G. L.; HSU, D.C.; CHEN, W. H.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S.. Characterization of enzymatic saccharification for acid-pretreated lignocellulosic materials with different lignin composition. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 2, p. 80–87, 2009. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2009.05.012.

GUTIÉRREZ-RIVERA, B.; ORTIZ-MUÑIZ, B.; GÓMEZ-RODRÍGUEZ, J.; CÁRDENAS-CÁGAL, A.; DOMÍNGUEZ GONZÁLEZ, J.M.; AGUILAR-USCANGA, M. G.. Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses “B” in a mixed yeast culture. **Renewable Energy**, v. 74, p. 399–405, 2015. DOI: 10.1016/j.renene.2014.08.030.

HAGHIGHI, S.; HOSSEIN, A.; TABATABAEI, M.. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. v. 27, p. 77–93, 2013.

HAHN-HÄGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; JEPSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, n. May, p. 147–177, 2007. DOI: 10.1007/10_2007_062.

HALLSWORTH, J.E.; NOMURA, Y.; IWAHARA, M. Ethanol-induced water stress and fungal growth. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 5, p. 451–456, 1998. DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80150-5.

HARUN, M. Y.; DAYANG RADIAH, A. B.; ZAINAL ABIDIN, Z.; YUNUS, R. Effect of physical pretreatment on dilute acid hydrolysis of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*). **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5193–5199, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.02.001.

HASUNUMA, T.; HORI, Y.; SAKAMOTO, T.; OCHIAI, M.; HATANAKA, H.; KONDO, A.. Development of a GIN11/FRT-based multiple-gene integration technique affording inhibitor-tolerant, hemicellulolytic, xylose-utilizing abilities to industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for ethanol production from undetoxified lignocellulosic hemicel. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2014. DOI: 10.1186/s12934-014-0145-9.

HECTOR, R. E.; DIEN, B.S.; COTTA, M. A.; MERTENS, J. A. Growth and fermentation of D-xylose by *Saccharomyces cerevisiae* expressing a novel D-xylose isomerase originating from the bacterium *Prevotella ruminicola* TC2-24. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 84, 2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-84.

HENRY, A.J.; KUMAR, G. N.. Production of Bio-Ethanol from Various Lignocellulosics Using High Yielding Isolate of *Saccharomyces cerevisiae* APN07 : Mathematical Approach. **Journal of Global Pharma Technology**, v. 10, n. 5, p. 21–28, 2018.

HILD, H. M.; STUCKEY, D. C.; LEAK, D. J. Effect of nutrient limitation on product formation during continuous fermentation of xylose with *Thermoanaerobacter ethanolicus* JW200 Fe(7). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 6, p. 679–686, 2003. DOI: 10.1007/s00253-002-1175-5.

HO, N. W.; CHEN, Z.; BRAINARD, A. P.; SEDLAK, M. Successful design and development of genetically engineered *Saccharomyces yeasts* for effective cofermentation of glucose and xylose from cellulosic biomass to fuel ethanol. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 65, p. 163–192, 1999. DOI: 10.1007/3-540-49194-5_7.

HO, N.W. Y.; CHEN, Z.; BRAINARD, A.P. Genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of effective cofermentation of glucose and xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 5, p. 1852–1859, 1998. DOI: 10.1128/aem.64.5.1852-1859.1998.

HOANG NGUYEN TRAN, P.; KO, J.K.; GONG, G.; UM, Y.; LEE, S.M. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1186/s13068-019-1641-2.

HU, X. H.; WANG, M. H.; TAN, T.; LI, J. R.; YANG, H.; LEACH, L.; ZHANG, R. M.; LUO, Z. W. Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 175, n. 3, p. 1479–1487, 2007. DOI: 10.1534/genetics.106.065292.

HUANG, G. L.; ANDERSON, T. D.; CLUBB, R.T. Engineering microbial surfaces to degrade lignocellulosic biomass. **Bioengineered**, v. 5, n. 2, p. 96–106, 2014. DOI: 10.4161/bioe.27461.

JIN, M.; BALAN, V.; GUNAWAN, C.; DALE, B.E. Quantitatively understanding reduced xylose fermentation performance in AFEX™ treated corn stover hydrolysate using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST) and *Escherichia coli* KO11.

Bioresource Technology, v. 111, p. 294–300, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.01.154.

JO, S.E.; SEONG, Y. J.; LEE, H. S.; LEE, S. M.; KIM, S.J.; PARK, K.; PARK, Y. Cheol. Microaerobic conversion of xylose to ethanol in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SX6MUT expressing cofactor-balanced xylose metabolic enzymes and deficient in ALD6. **Journal of Biotechnology**, v. 227, p. 72–78, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.04.005.

JOELSSON, E.; ERDEI, B.; GALBE, M.; WALLBERG, O.. Techno-economic evaluation of integrated first- and second-generation ethanol production from grain and straw. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–16, 2016. DOI: 10.1186/s13068-015-0423-8.

JÖNSSON, L.J.; ALRKSSON, B.; NILVEBRANT, N.O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, p.2-10, 2013

JUDIT KRISCH; AND BÉLA SZAJÁNI. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter aceti*. **Biotechnology Letters**, , v. 19, n. 6, p. 525–528, 1997.

KAFRI, Moshe; METZL-RAZ, Eyal; JONA, Ghil; BARKAI, Naama. The Cost of Protein Production. **Cell Reports**, , v. 14, n. 1, p. 22–31, 2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.12.015>.

KARAGOZ, Pınar; BILL, Roslyn M.; OZKAN, Melek. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, , v. 143, p. 741–752, 2019. DOI: 10.1016/j.renene.2019.05.045.

KARIMI, KEIKHOSRO; TAHERZADEH, MOHAMMAAd J. **A critical review on analysis in pretreatment of lignocelluloses: Degree of polymerization, adsorption/desorption, and accessibility**. : Elsevier Ltd, 2016. v. 203 DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.035. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.035>.

KEWELOH, HERIBERT; HEIPIEPER, HERMANN JOSEF; REHM, HANS JÜRGEN. Protection of bacteria against toxicity of phenol by immobilization in calcium alginate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, , v. 31, n. 4, p. 383–389, 1989. DOI: 10.1007/BF00257609.

KHRAMTSOV, NIKOLAI. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, , v. 102, n. 17, p. 8310–8313, 2011. DOI: 10.1016/j.biortech.2011.05.075. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.075>.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, , v. 21, n. 4, p. 377–397,

2004. DOI: 10.1016/j.fm.2003.10.005.

KUHAD, Ramesh Chander; GUPTA, Rishi; KHASA, Yogender Pal; SINGH, Ajay;

ZHANG, Y. H. Perciva. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, , v. 15, n. 9, p. 4950–4962, 2011. DOI: 10.1016/j.rser.2011.07.058. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.07.058>.

KUMAR, Ashish; SINGH, L. K.; GHOSH, Sanjoy. 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. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.02.023. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.023>.

KUMAR, VINOD; BINOD, PARAMESWARAN; SINDHU, RAVEENDRAN; GNANSOUNOU, EDGARD; AHLUWALIA, VIVEK. Bioconversion of pentose sugars to value added chemicals and fuels: Recent trends, challenges and possibilities. **Bioresource Technology**, , v. 269, p. 443–451, 2018. DOI:

10.1016/j.biortech.2018.08.042. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.08.042>.

KUMAR, VINOD; YADAV, SUDESH K.; KUMAR, JITENDRA; AHLUWALIA, VIVEK. A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. **Bioresource Technology**, , v. 299, p. 122633, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122633.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122633>.

KYONG, JA; HYEONG, JE; ALTPETER, FREDY; KANNAN, BASKARAN; EUN, HA; HEON, KYOUNG; ALPER, HAL S.; UM, YOUNGSOON; LEE, SUN-MI.

Bioresource Technology. Largely enhanced bioethanol production through the combined use of lignin-modified sugarcane and xylose fermenting yeast strain. , v. 256, n. December 2017, p. 312–320, 2018.

LA GRANGE, D. C.; PRETORIUS, I. S.; CLAEYSSSENS, M.; VAN ZYL, W. H.

Degradation of Xylan to D-Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Coexpressing the *Aspergillus niger* β -Xylosidase (xlnD) and the *Trichoderma reesei* Xylanase II (xyn2) Genes. **Applied and Environmental Microbiology**, , v. 67, n. 12, p. 5512–5519, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5512-5519.2001.

LARSSON, Simona; PALMQVIST, Eva; HAHN-HÄGERDAL, Bärbel; TENGBORG, Charlotte; STENBERG, Kerstin; ZACCHI, Guido; NILVEBRANT, Nils-Olof. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood.

Enzyme and Microbial Technology, , v. 24, n. 3–4, p. 151–159, 1999. DOI: 10.1016/S0141-0229(98)00101-X. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014102299800101X>.

LARSSON, Simona; QUINTANA-SÁINZ, Alexis; REIMANN, Anders; NILVEBRANT, Nils Olof; JÖNSSON, Leif J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A**

Enzyme Engineering and Biotechnology, , v. 84–86, p. 617–632, 2000. DOI: 10.1385/ABAB:84-86:1-9:617.

LASER, MARK; SCHULMAN, DEBORAH; ALLEN, STEPHEN G.; LICHWA, JOSEPH; ANTAL, MICHAEL J.; LYND, LEE R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol.

Bioresource Technology, , v. 81, n. 1, p. 33–44, 2002. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00103-1.

LEE, CHO-RYONG; SUNG, BONG HYUN; LIM, KWANG-MOOK; KIM, MI-JIN; SOHN, MIN JEONG; BAE, JUNG-HOON; SOHN, JUNG-HOON. Co-fermentation using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. **Scientific Reports**, , v. 7, n. 1, p. 4428, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-04815-1. Disponível em:

<http://www.nature.com/articles/s41598-017-04815-1>. Acesso em: 7 jun. 2019.

LEE, Chong Kyu; JANG, Min Yeong; PARK, Hwa Rang; CHOO, Gab Chul; CHO, Hyun Seo; PARK, Sam Bong; OH, Ki Cheol; AN, Jong Bin; KIM, Bong Gyu. Cloning and characterization of xylanase in cellulolytic *Bacillus sp.* strain JMY1 isolated from forest soil. **Applied Biological Chemistry**, , v. 59, n. 3, p. 415–423, 2016. DOI: 10.1007/s13765-016-0179-2.

LEIF J JÖNSSON¹, BJÖRN ALRIKSSON, NILS-OLOF NILVEBRANT.

Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, , v. 21, n. 12, p. 40, 2013. DOI: 10.1186/1754-6834-6-16.

LI, M.Fei; FAN, Yong Ming; XU, Feng; SUN, Run Cang; ZHANG, Xun Li. Cold sodium hydroxide/urea based pretreatment of bamboo for bioethanol production: Characterization of the cellulose rich fraction. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 551–559, 2010. DOI: 10.1016/j.indcrop.2010.07.004.

LI, Q.; QIN, Y.; LIU, Y.; LIU, J.; LIU, Q.; LI, P.; LIU, L.. Detoxification and concentration of corn stover hydrolysate and its fermentation for ethanol production. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 13, n. 1, p. 140–151, 2019. DOI: 10.1007/s11705-018-1714-y.

LIAO, Y.A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production. **Science**, v. 367, n. 6484, p. 1385–1390, 2020. DOI: 10.1126/science.aau1567.

LIU, L. Engineered Polyploid Yeast Strains Enable Efficient Xylose Utilization and Ethanol Production in Corn Hydrolysates. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. March, p. 1–11, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.655272.

LIU, Q.; ZHOU, T.; LI, B.; YAO, S.; LI, A.; WU, J. Ethanol Production by Repeated Batch and Continuous Fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized in a Fibrous Bed Bioreactor. v. 23, p. 511–517, 2013.

LUCERO, P.; PENALVER, E.; MORENO, E.; LAGUNAS, R. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied**

and **Environmental Microbiology**, , v. 66, n. 10, p. 4456–4461, 2000. DOI: 10.1128/AEM.66.10.4456-4461.2000.

LUO, Y.; LI, Z.; LI, X.; LIU, X.; FAN, J.; CLARK, J. H. The production of furfural directly from hemicellulose in lignocellulosic biomass : A review. **Catalysis Today**, v. 319, n.2017, p. 14–24, 2019. DOI: 10.1016/j.cattod.2018.06.042..

LYND, L. R.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J.E.; LASER, M.Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: An update. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 577–583, 2005. DOI: 10.1016/j.copbio.2005.08.009.

MACRELLI, S.; ZACCHI, G.; MOGENSEN, J. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. **Biotechnology for biofuels**, v. 5, n. 1, p. art. 152, 2012.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F.. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current opinion in biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 372–80, 2009. DOI: 10.1016/j.copbio.2009.05.009.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains : current state and perspectives., p. 37–53, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-2101-x.

MATSUSHIKA, A.; SAWAYAMA, S. Characterization of a Recombinant Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain That Co-Ferments Glucose and Xylose: II. Influence of pH and Acetic Acid on Ethanol Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 8, p. 2094–2104, 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9920-4.

MEIJNEN, J.P. 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. 1–18, 2016. DOI: 10.1186/s13068-015-0421-x.

MESQUITA, T. J. B.; SANDRI, J.P.; HORTA, A.; GIORDANO, R.; ZANGIROLAMI, T. A high-throughput approach for modelling and simulations of homofermentative microorganisms applied to ethanol fermentation by *S. cerevisiae*. **Industrial Biotechnology**, v. In press, 2020.

MILESSI, T. S.; PEREZ, C. L.; ZANGIROLAMI, T.C.; CORRADINI, F. A. S.; SANDRI, J. P.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; GIORDANO, R. C.; THEVELEIN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2020. a. DOI: 10.1186/s13068-020-01722-y.

MILESSI, T.S.; SILVA, C. R.; MORAES, G. S.; AQUINO, P. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C.; ZANGIROLAMI, T.C. Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Cellulose**, , v. 27, n. 8, p. 4429–4442, 2020. b. DOI: 10.1007/s10570-020-03108-7.

MILESSI, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; PEREZ, C.L.; SANDRI, J.P.; CORRADINI, F. A. S.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J.M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Bioethanol Production from Xylose-Rich Hydrolysate by Immobilized Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in Fixed-Bed Reactor. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 75–80, 2020. c. DOI: 10.1089/ind.2020.29198.tsm.

MILESSI, T. S. D. S. **Imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. 2017. 148 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Biotecnologia, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2012.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de canade-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. 2017. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.

MISCHNICK, P.; MOMCILOVIC, D.. **Chemical Structure Analysis of Starch and Cellulose Derivatives**.: Elsevier Inc., 2010. v. 64 DOI: 10.1016/S0065-2318(10)64004-8.

MISHRA, A. SHARMA, A.K.; SHARMA, S.; BAGAI, R.; MATHUR, A.S.; GUPTA, R. P.; TULI, D.K. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, v. 98, p. 57–63, 2016. DOI: 10.1016/j.renene.2016.02.010.

MISHRA, A.; GHOSH, Sa.. Bioethanol production from various lignocellulosic feedstocks by a novel “ fractional hydrolysis ” technique with different inorganic acids and co- culture fermentation., v. 236, n. 2018, p. 544–553, 2019.

MISKOVIC, L.; ALFF-TUOMALA, S.; SOH, K.C.; BARTH, D.; SALUSJÄRVI, L.; PITKÄNEN, J.P.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M.; HATZIMANIKATIS, V.. A design-build-test cycle using modeling and experiments reveals interdependencies between upper glycolysis and xylose uptake in recombinant *S. cerevisiae* and improves predictive capabilities of large-scale kinetic models. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2017. DOI: 10.1186/s13068-017-0838-5.

MOHD AZHAR, S.H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J.A.; MOHD FAIK, A. A.; RODRIGUES, K. F.. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, n. November 2016, p. 52–61, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrep.2017.03.003.

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; GUIMARÃES, P. M. R.; SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I. C.; VICENTE, A.; DOMINGUES, L.; TEIXEIRA, J.A. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 6, p. 817–830, 2010. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2010.07.001.

MUSSATTO, S. I.; MACHADO, E. M. S.; CARNEIRO, L. M.; TEIXEIRA, J. A. Sugars metabolism and ethanol production by different yeast strains from coffee

- industry wastes hydrolysates. **Applied Energy**, v. 92, p. 763–768, 2012. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.08.020.
- NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; SYAHIDAH, K.; ISMAIL, K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, n. 92, p. 251–260, 2004. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.09.009.
- NEDOVIĆ, V.; WILLAERT, R. Applications of cell immobilisation biotechnology. **Vasa**, 2006.
- NEMATI, M.; WEBB, C. **Immobilized Cell Bioreactors.**: Elsevier B.V., 2011. v. 2 DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00100-8.
- NIGAM, J. N.; MANDAL, S. K.; SINGH, R. Continuous Ethanol Production from D-xylose II Using Immobilized Cells of *Clavispora opuntiae*. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 37, n. 15, p. 1629–1636, 2015. DOI: 10.1080/15567036.2011.631966.
- NIJLAND, J. G.; DRIESSEN, A. J. M. Engineering of Pentose Transport in *Saccharomyces cerevisiae* for Biotechnological Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2020. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00464.
- OH, E. J.; JIN, Y.S. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 1, p. 1–11, 2020. DOI: 10.1093/femsyr/foz089.
- PFEIFER, P.A G.; BONN, O. B. INFLUENCE OF BIOMASS DEGRADATION PRODUCTS ON THE FERMENTATION Fermentation medium and reagents. **Biotechnology Letters**, v. 6, n. 8, p. 541–546, 1984.
- PALMONARI, A. et al. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6244–6249, 2020. DOI: 10.3168/jds.2019-17644.
- PALMQVIST, E.; ALMEIDA, J. S.; HAHN-HÄGERDAL, B. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and bioengineering**, v. 62, n. 4, p. 447–54, 1999.
- PALMQVIST, E.; GALBE, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, n. 5, p. 545–551, 1998. DOI: 10.1007/s002530051332.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, , v. 74, n. 1, p. 25–33, 2000. DOI: 10.1016/S0960-8524(99)00161-3.
- PANDEY, A. SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1,

p. 69–80, 2000.

PANDIYAN, K.; SINGH, A.; SINGH, S.; KUMAR, A.; NAIN, L.. Technological interventions for utilization of crop residues and weedy biomass for second generation bio-ethanol production. v. 132, 2019.

PARISUTHAM, V.; KIM, T. H.; LEE, S. K.. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 431–440, 2014. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.03.114.

PAULOVA, L.; PATAKOVA, P.; BRANSKA, B.; RYCHTERA, M.; MELZUCH, K.. **Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency.** : Elsevier B.V., 2015. v. 33 DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.12.002.

PEREIRA, L.P.R.C. **Produção integrada de etanol 1G/2G utilizando meios industriais e leveduras recombinantes**, 2021. 101 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos.

PEREZ, C.L.; MILESSI, T.S.; SANDRI, J.P.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; GIORDANO, R.C.; THEVELEIN, J.M.; GIORDANO, R.L.C.; ZANGIROLAMI, T. C. Unraveling continuous 2G ethanol production from xylose using hemicellulose hydrolysate and immobilized superior recombinant yeast in fixed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, p. 1–2, 2021.

PETRE, M.; ZARNEA, G.; ADRIAN, P.; GHEORGHIU, E. Biodegradation and bioconversion of cellulose wastes using bacterial and fungal cells immobilized in radiopolymerized hydrogels. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 27, n. 4, p. 309–332, 1999. DOI: 10.1016/S0921-3449(99)00028-2.

POLIZELI, M. L. T. M.; RIZZATTI, A. C. S.; MONTI, R.; TERENCEZI, H. F.; JORGE, J. A.; AMORIM, D. S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 5, p. 577–591, 2005. DOI: 10.1007/s00253-005-1904-7.

RAJAK, R.C.; BANERJEE, R.. An innovative approach of mixed enzymatic venture for 2G ethanol production from lignocellulosic feedstock. **Energy Conversion and Management**, v. 207, n. November 2019, p. 112504, 2020. DOI: 10.1016/j.enconman.2020.112504.

RATANAKHANOKCHAI, K.; WAEONUKUL, R.; PASON, P.; TACHAAPAUKOON, C.; LAY, K.; SAKKA, K.; KOSUGI, A.; MORI, Y.. *Paenibacillus curdlanolyticus* Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. **Biomass Now - Cultivation and Utilization**, 2013. DOI: 10.5772/51820.

RATTANAPAN, A.; LIMTONG, S.; PHISALAPHONG, M.. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. v. 88, p. 4400–4404, 2011. DOI: 10.1016/j.apenergy.2011.05.020.

RAZMOVSKI, R.; VUČUROVIĆ, V.. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. **Fuel**, v. 92, n. 1, p. 1–8, 2012. DOI: 10.1016/j.fuel.2011.07.046.

SAHA, K.; MAHARANA, A.; SIKDER, J.; CHAKRABORTY, S.; CURCIO, S.; DRIOLI, E.. Continuous production of bioethanol from sugarcane bagasse and downstream purification using membrane integrated bioreactor. **Catalysis Today**, n. June, p. 0–1, 2018. DOI: 10.1016/j.cattod.2017.11.031.

SAKAMOTO, T.; HASUNUMA, T.; HORI, Y.; YAMADA, R.; KONDO, A.. Direct ethanol production from hemicellulosic materials of rice straw by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of hemicellulolytic enzymes on the surface of xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 4, p. 203–210, 2012. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2011.06.025.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1988. DOI: 10.1016/0141-0229(88)90135-4.

SANDRI, J.P. Obtenção e caracterização de levedura recombinante com elevada tolerância a etanol por engenharia evolutiva. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (2019).

SANTOS, J.C.; MARTON, J.M.; FELIPE, M.G. A. Continuous System of Combined Columns of Ion Exchange Resins and Activated Charcoal as a New Approach for the Removal of Toxics from Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 42, p. 16494–16501, 2014. DOI: 10.1021/ie502712j.

SHARMA, N. K.; BEHERA, S.; ARORA, R.; KUMAR, S.; SANI, R. K. Xylose transport in yeast for lignocellulosic ethanol production: Current status. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 125, n. 3, p. 346–352, 2018. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.10.006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. Bioprocess engineering: Basic concepts. **2nd ed. New Jersey: Prentice Hall Inc.**, v. 22, n. 3, p. 293, 2002. DOI: 10.1016/0168-3659(92)90106-2.

SILVA, A. J.; HIRASAWA, J. S.; VARESCHE, M. B.; FORESTI, E.; ZAIAT, M. Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. **Anaerobe**, v. 12, n. 2, p. 93–98, 2006. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2005.12.003.

SILVA, C. R. Da. Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (2019), p. 138, 2013.

SINGH, A.; SHARMA, P.; KUMAR, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488–493, 2013. DOI: 10.1016/j.renene.2012.07.003.

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. **Plyphenols and flavonoids**, v. 25, n. 119, p. 152–178, 1974.

SKOOG, K.; HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 11, p. 3389–94, 1990.

SLININGER, P. J.; BOTHAST, R. J.; VAN CAUWENBERGE, J. E.; KURTZMAN, C. P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 2, p. 371–384, 1982. DOI: 10.1002/bit.260240210.

SOLARTE-TORO, J.C.; ROMERO-GARCÍA, J.M.; MARTÍNEZ-PATIÑO, J.C.; RUIZ-RAMOS, E.; CASTRO-GALIANO, E.; CARDONA-ALZATE, C. A.. Acid pretreatment of lignocellulosic biomass for energy vectors production: A review focused on operational conditions and techno-economic assessment for bioethanol production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 107, n. February, p. 587–601, 2019. DOI: 10.1016/j.rser.2019.02.024.

STANLEY, D.; BANDARA, A.; FRASER, S.; CHAMBERS, P. J.; STANLEY, G. A. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 13–24, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2009.04657.x.

STOJILJKOVIC, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Polygenic analysis of very high acetic acid tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a complex genetic background and several new causative alleles. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–27, 2020. DOI: 10.1186/s13068-020-01761-5.

SUN, Z. J.; LV, G.J.; LI, S.Y.; XIE, Y.B.; YU, W. T.; WANG, W.; MA, X. J.. Probing the role of microenvironment for microencapsulated *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. **Journal of Biotechnology**, v. 128, n. 1, p. 150–161, 2007. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.09.001.

SUNNA, A.; ANTRANIKIAN, G. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 39–67, 1997. DOI: 10.3109/07388559709146606.

SWATLOSKI, R. P.; SPEAR, S. K.; HOLBREY, J. D.; ROGERS, R. D. Dissolution of cellulose with ionic liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 18, p. 4974–4975, 2002. DOI: 10.1021/ja025790m.

SWINNEN, S.. Identification of novel causative genes determining the complex trait of high ethanol tolerance in yeast using pooled-segregant whole-genome sequence

analysis., p. 975–984, 2012. DOI: 10.1101/gr.131698.111.22.

SWINNEN, S.; GOOVAERTS, A.; SCHAERLAEKENS, K.; DUMORTIER, F.; VERDYCK, P.; SOUVEREYNS, K.; ZEEBROECK, G.V.; FOULQUIÉ-MORENO, M.R.; THEVELEIN, J. M. Auxotrophic mutations reduce tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to very high levels of ethanol stress. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 9, p. 884–897, 2015. DOI: 10.1128/EC.00053-15.

TAHERZADEH, M. J.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, G. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 6, p. 701–708, 2000. DOI: 10.1007/s002530000328.

TAHERZADEH, M. J.; EKLUND, R.; GUSTAFSSON, L.; NIKLASSON, C.; LIDÉN, Gunnar. Characterization and Fermentation of Dilute-Acid Hydrolyzates from Wood. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 11, p. 4659–4665, 1997. DOI: 10.1021/ie9700831.

TALEBNIA, F.; TAHERZADEH, M. J. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. **Journal of Biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 377–384, 2006. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.013.

TANG, Y. Q.; AN, M. Z.; ZHONG, Y. L.; SHIGERU, M.; WU, X. L.; KIDA, K.. Continuous ethanol fermentation from non-sulfuric acid-washed molasses using traditional stirred tank reactors and the flocculating yeast strain KF-7. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 1, p. 41–46, 2010. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.07.002.

TASHIRO, Y.; TAKEDA, K.; KOBAYASHI, G.; SONOMOTO, K.. High production of acetone-butanol-ethanol with high cell density culture by cell-recycling and bleeding. **Journal of Biotechnology**, v. 120, n. 2, p. 197–206, 2005. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.05.031.

Thevelein, T.; Demeke, M.; Foulquié Moreno, M.R.; De Graeve, S.; Belo, E.V.C., 2018, Patente: Xylose isomerases that confer efficient xylose fermentation capability to yeast, WO2018115251A1.

ULBRICHT, R. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 4, n. 5, p. 843–853, 1984. DOI: 10.1016/0272-0590(84)90106-4.

VALENTINE, J.; CLIFTON-BROWN, J.; HASTINGS, A.; ROBSON, P.; ALLISON, G.; SMITH, P.. Food vs. fuel: The use of land for lignocellulosic “next generation” energy crops that minimize competition with primary food production. **GCB Bioenergy**, v. 4, n. 1, p. 1–19, 2012. DOI: 10.1111/j.1757-1707.2011.01111.x.

VÄLJAMÄE, P.; SILD, V.; PETTERSSON, G.; JOHANSSON, G.. The initial kinetics of hydrolysis by cellobiohydrolases I and II is consistent with a cellulose surface - Erosion model. **European Journal of Biochemistry**, v. 253, n. 2, p. 469–475, 1998. DOI: 10.1046/j.1432-1327.1998.2530469.x.

VAN RENSBURG, E.; DEN HAAN, R.; SMITH, J.; VAN ZYL, W. H.; GÖRGENS, J.F. The metabolic burden of cellulase expression by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Y294 in aerobic batch culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, n. 1, p. 197–209, 2012. DOI: 10.1007/s00253-012-4037-9.

VAN RENSBURG, P.; VAN ZYL, W.H.; PRETORIUS, Isak S. Engineering yeast for efficient cellulose degradation. **Yeast**, v. 14, n. 1, p. 67–76, 1998. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0061(19980115)14:1<67::AID-YEA200>3.0.CO;2-T.

VERHOEVEN, M. D.; LEE, M.; KAMOEN, L.; VAN DEN BROEK, M.; JANSSEN, D.B.; DARAN, J. M. G.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T. Mutations in PMR1 stimulate xylose isomerase activity and anaerobic growth on xylose of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by influencing manganese homeostasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. October 2016, p. 1–11, 2017. DOI: 10.1038/srep46155.

WAHLBOM, C. .; VAN ZYL, W.H.; JÖNSSON, L.J.; HAHN-HÄGERDAL, B.; CORDERO OTERO, R. R. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. **FEMS Yeast Research**, v. 3, n. 3, p. 319–326, 2003. DOI: 10.1016/S1567-1356(02)00206-4.

WANG, T. H.; LU, S.. Production of xylooligosaccharide from wheat bran by microwave assisted enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, , v. 138, n. 2–3, p. 1531–1535, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.09.124.

WASYLENKO, T. M.; STEPHANOPOULOS, G. Metabolomic and ¹³C-metabolic flux analysis of a xylose-consuming *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing xylose isomerase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 3, p. 470–483, 2015. DOI: 10.1002/bit.25447.

WINGREN, A.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Techno-Economic Evaluation of Producing Ethanol from Softwood : Comparison of SSF and SHF and Identification of Bottlenecks. v. 46, n. 0, 2003.

WOLF, L. Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos (2019) v. 5, p. 13–15, 2011.

XIE, G. BRUCE, D.C.; CHALLACOMBE, J.F.; CHERTKOV, O.; DETTER, J.C.; GILNA, P.; HAN, C.S.; LUCAS, S.; MISRA, M.; MYERS, G.L.; RICHARDSON, P.; TAPIA, R.; THAYER, R.; THOMPSON, L.S.; BRETTIN, T.S.; HENRISSAT, B.; WILSON, D.B.; McBRIDE, M.J. Genome sequence of the cellulolytic gliding bacterium *Cytophaga hutchinsonii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 11, p. 3536–3546, 2007. DOI: 10.1128/AEM.00225-07.

YANG, B., TAO, L., WYMAN, C. E. Strengths, challenges, and opportunities for hydrothermal pretreatment in lignocellulosic biorefineries. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2017. DOI: 10.1002/bbb.

- YANG, B.; WYMAN, C. E. Effect of Xylan and Lignin Removal by Batch and Flowthrough Pretreatment on the Enzymatic Digestibility of Corn Stover Cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 88–95, 2004. DOI: 10.1002/bit.20043.
- ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, , v. 68, n. 5, p. 524–530, 2000. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0290(20000605)68:5<524::AID-BIT6>
- ZHANG, K.; WELLS, P.; LIANG, Y.; LOVE, J.; PARKER, D. A.; BOTELLA, C.. Effect of diluted hydrolysate as yeast propagation medium on ethanol production. **Bioresource Technology**, , v. 271, n. August 2018, p. 1–8, 2019. b. DOI: 10.1016/j.biortech.2018.09.080. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.080>.
- ZHANG, X.; ZHANG, W.; LEI, F.; YANG, S.; JIANG, J.. Coproduction of xylooligosaccharides and fermentable sugars from sugarcane bagasse by seawater hydrothermal pretreatment. **Bioresource Technology**, v. 309, n. April, p. 123385, 2020. DOI: 10.1016/j.biortech.2020.123385. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123385>.
- ZHAO, J.; XIA, L.. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using immobilized recombinant yeast cells. **Biochemical Engineering Journal**, , v. 49, n. 1, p. 28–32, 2010. DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.007>.
- ZHAO, Z.; XIE, X.; WANG, Z.; TAO, Y.; NIU, X.; HUANG, X.; LIU, L.; LI, Z.. Immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* in mesoporous silica-based material: An efficiency continuous cell-recycle fermentation system for lactic acid production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 645–651, 2016. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.11.010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2015.11.010>.
- ZHOU, Z.. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals : A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. DOI: 10.1002/bit.26788.
- ZHU, Y.; ZHANG, J.; ZHU, L.; JIA, Z.; LI, Q.; XIAO, W.; CAO, L.. Minimize the Xylitol Production in *Saccharomyces cerevisiae* by Balancing the Xylose Redox Metabolic Pathway. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, n. February, p. 1–9, 2021. DOI: 10.3389/fbioe.2021.639595.

Apêndice A – Meios e índices de performance

Tabela 1: Composição inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo em meio YPDX utilizando células imobilizadas das leveduras T18, HAA1 e MDS 130. Letras iguais para os mesmos índices de desempenho em cada reciclo indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0	28,61 ± 0,28	7,15 ± 0,12 ^a	0,50 ± 0,05 ^u	100,0 ± 0,4 ^G
	HAA1	0,00 ± 0	28,07 ± 0,27	7,02 ± 0,12 ^a	0,50 ± 0,05 ^u	100,0 ± 0,4 ^G
	MDS 130	0,00 ± 0	28,79 ± 0,28	7,20 ± 0,12 ^a	0,50 ± 0,05 ^u	100,0 ± 0,4 ^G
2	T18	5,01 ± 0,05	38,73 ± 0,38	8,43 ± 0,03 ^b	0,48 ± 0,00 ^v	95,0 ± 0,6 ^H
	HAA1	5,09 ± 0,05	40,93 ± 0,40	8,96 ± 0,04 ^c	0,51 ± 0,01 ^w	96,0 ± 0,6 ^{HI}
	MDS 130	3,90 ± 0,04	44,79 ± 0,44	10,22 ± 0,04 ^d	0,49 ± 0,01 ^v	97,0 ± 0,6 ^I
3	T18	9,84 ± 0,10	45,23 ± 0,44	8,85 ± 0,22 ^e	0,45 ± 0,04 ^x	95,0 ± 0,9 ^J
	HAA1	8,48 ± 0,08	44,63 ± 0,43	9,04 ± 0,22 ^e	0,48 ± 0,05 ^x	95,0 ± 0,9 ^J
	MDS 130	8,73 ± 0,08	45,26 ± 0,44	9,13 ± 0,22 ^e	0,48 ± 0,05 ^x	96,0 ± 0,9 ^J
4	T18	8,06 ± 0,08	45,95 ± 0,45	7,58 ± 0,01 ^f	0,49 ± 0,06 ^y	93,0 ± 0,9 ^K
	HAA1	12,73 ± 0,12	50,92 ± 0,49	7,64 ± 0,01 ^g	0,51 ± 0,06 ^y	90,0 ± 0,9 ^L
	MDS 130	13,04 ± 0,13	50,12 ± 0,49	9,27 ± 0,01 ^h	0,50 ± 0,06 ^y	95,0 ± 1,0 ^K
5	T18	9,52 ± 0,09	50,01 ± 0,49	8,10 ± 0,01 ⁱ	0,50 ± 0,00 ^z	85,0 ± 1,0 ^M
	HAA1	10,80 ± 0,10	49,14 ± 0,48	9,59 ± 0,01 ^j	0,48 ± 0,00 ^A	85,0 ± 1,0 ^M
	MDS 130	8,52 ± 0,08	49,69 ± 0,48	8,23 ± 0,01 ^k	0,50 ± 0,00 ^z	90,0 ± 1,1 ^N
6	T18	8,03 ± 0,08	50,44 ± 0,49	8,48 ± 0,53 ^l	0,51 ± 0,05 ^B	85,0 ± 1,8 ^O
	HAA1	10,06 ± 0,10	49,82 ± 0,48	7,95 ± 0,50 ^l	0,49 ± 0,05 ^B	85,0 ± 1,8 ^O
	MDS 130	8,29 ± 0,08	50,55 ± 0,49	8,45 ± 0,53 ^l	0,51 ± 0,05 ^B	87,0 ± 1,9 ^O
7	T18	5,58 ± 0,05	50,23 ± 0,49	8,93 ± 0,51 ^m	0,50 ± 0,02 ^C	85,0 ± 2,1 ^P
	HAA1	7,65 ± 0,07	49,26 ± 0,48	8,32 ± 0,47 ^m	0,49 ± 0,02 ^C	83,0 ± 2,0 ^P
	MDS 130	9,79 ± 0,10	51,84 ± 0,50	8,41 ± 0,48 ^m	0,50 ± 0,02 ^C	87,0 ± 2,1 ^P
8	T18	8,92 ± 0,09	47,69 ± 0,46	9,69 ± 0,08 ⁿ	0,47 ± 0,01 ^D	80,0 ± 2,4 ^Q
	HAA1	15,16 ± 0,15	53,14 ± 0,52	7,60 ± 0,06 ^o	0,49 ± 0,01 ^D	82,0 ± 2,5 ^Q
	MDS 130	10,48 ± 0,10	50,74 ± 0,49	8,05 ± 0,07 ^p	0,49 ± 0,01 ^D	85,0 ± 2,6 ^Q
9	T18	8,89 ± 0,09	50,26 ± 0,49	8,27 ± 0,10 ^q	0,48 ± 0,00 ^E	80,0 ± 3,5 ^R
	HAA1	10,36 ± 0,10	49,97 ± 0,49	6,60 ± 0,08 ^r	0,49 ± 0,00 ^E	82,0 ± 3,6 ^R
	MDS 130	9,88 ± 0,10	49,19 ± 0,48	6,55 ± 0,08 ^r	0,48 ± 0,00 ^E	85,0 ± 3,8 ^R
10	T18	13,17 ± 0,13	50,32 ± 0,49	5,31 ± 0,25 ^s	0,44 ± 0,01 ^F	75,0 ± 1,6 ^S
	HAA1	13,78 ± 0,13	52,18 ± 0,51	5,49 ± 0,26 ^s	0,44 ± 0,01 ^F	80,0 ± 1,7 ^T
	MDS 130	5,80 ± 0,06	52,14 ± 0,51	6,62 ± 0,31 ^t	0,45 ± 0,01 ^F	85,0 ± 1,8 ^U

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 2: Composição inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo em meio YPHC utilizando células imobilizadas das leveduras T18, HAA1 e MDS 130. Letras iguais para os mesmos índices de desempenho em cada reciclo indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	30,89 ± 0,30	5,15 ± 0,09 ^a	0,49 ± 0,05 ^o	95,0 ± 0,4 ^x
	HAA1	0,00 ± 0,00	24,53 ± 0,24	4,09 ± 0,07 ^b	0,48 ± 0,05 ^o	95,0 ± 0,4 ^x
	MDS 130	0,00 ± 0,00	26,11 ± 0,25	4,35 ± 0,07 ^c	0,49 ± 0,05 ^o	95,0 ± 0,4 ^x
2	T18	7,41 ± 0,07	40,27 ± 0,39	4,69 ± 0,02 ^d	0,45 ± 0,00 ^p	88,0 ± 0,5 ^y
	HAA1	9,22 ± 0,09	40,80 ± 0,40	4,51 ± 0,02 ^e	0,46 ± 0,00 ^p	90,0 ± 0,6 ^z
	MDS 130	5,87 ± 0,06	36,30 ± 0,35	5,07 ± 0,02 ^d	0,48 ± 0,00 ^q	90,0 ± 0,6 ^z
3	T18	11,00 ± 0,11	38,53 ± 0,37	3,44 ± 0,08 ^f	0,47 ± 0,05 ^r	78,0 ± 0,8 ^A
	HAA1	15,24 ± 0,15	43,69 ± 0,42	3,56 ± 0,09 ^f	0,47 ± 0,05 ^r	80,0 ± 0,8 ^B
	MDS 130	7,35 ± 0,07	35,43 ± 0,34	3,51 ± 0,09 ^f	0,45 ± 0,04 ^r	85,0 ± 0,8 ^C
4	T18	14,22 ± 0,14	31,03 ± 0,30	1,40 ± 0,00 ^g	0,37 ± 0,04 ^s	65,0 ± 0,7 ^D
	HAA1	8,54 ± 0,08	31,01 ± 0,30	1,87 ± 0,00 ^h	0,44 ± 0,05 ^s	70,0 ± 0,7 ^E
	MDS 130	9,06 ± 0,09	30,57 ± 0,30	1,79 ± 0,00 ⁱ	0,42 ± 0,05 ^s	69,0 ± 0,7 ^E
5	T18	15,50 ± 0,15	26,50 ± 0,26	0,61 ± 0,00 ^j	0,35 ± 0,00 ^t	40,0 ± 0,5 ^F
	HAA1	16,03 ± 0,16	20,45 ± 0,20	0,26 ± 0,00 ^k	0,38 ± 0,00 ^u	35,0 ± 0,4 ^G
	MDS 130	14,45 ± 0,14	26,56 ± 0,26	1,01 ± 0,00 ^l	0,44 ± 0,00 ^v	50,0 ± 0,6 ^H
6	T18	11,34 ± 0,11	16,10 ± 0,16	0,26 ± 0,02 ^m	0,34 ± 0,03 ^w	35,0 ± 0,8 ^I
	HAA1	13,81 ± 0,13	18,77 ± 0,18	0,28 ± 0,02 ^m	0,37 ± 0,03 ^w	30,0 ± 0,6 ^J
	MDS 130	13,49 ± 0,13	24,16 ± 0,23	0,46 ± 0,03 ⁿ	0,42 ± 0,04 ^w	40,0 ± 0,9 ^K

Fonte: Elaborada pela autora

Tabela 3: Composição inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo em meio YPHD utilizando células imobilizadas das leveduras T18, HAA1 e MDS 130. Letras iguais para os mesmos índices de desempenho em cada reciclo indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	32,33 ± 0,31	8,64 ± 0,14 ^a	0,51 ± 0,05 ^r	100,0 ± 0,4 ^B
	HAA1	0,00 ± 0,00	32,38 ± 0,31	7,97 ± 0,13 ^b	0,50 ± 0,05 ^r	98,0 ± 0,4 ^C
	MDS 130	0,00 ± 0,00	36,65 ± 0,36	7,53 ± 0,12 ^c	0,51 ± 0,05 ^r	98,0 ± 0,4 ^C
2	T18	16,10 ± 0,16	51,92 ± 0,50	8,53 ± 0,03 ^d	0,50 ± 0,01 ^s	98,0 ± 0,6 ^D
	HAA1	16,64 ± 0,16	54,50 ± 0,53	8,08 ± 0,03 ^e	0,50 ± 0,01 ^s	95,0 ± 0,6 ^E
	MDS 130	18,93 ± 0,18	49,20 ± 0,48	7,35 ± 0,03 ^f	0,43 ± 0,00 ^t	98,0 ± 0,6 ^D
3	T18	14,44 ± 0,14	45,93 ± 0,45	7,93 ± 0,19 ^g	0,47 ± 0,05 ^u	95,0 ± 0,9 ^F
	HAA1	19,55 ± 0,19	53,59 ± 0,52	7,10 ± 0,17 ^h	0,46 ± 0,05 ^u	90,0 ± 0,9 ^G
	MDS 130	18,85 ± 0,18	53,86 ± 0,52	6,72 ± 0,17 ^h	0,49 ± 0,05 ^u	97,0 ± 0,9 ^F
4	T18	23,26 ± 0,23	54,78 ± 0,53	4,33 ± 0,00 ⁱ	0,50 ± 0,06 ^v	93,0 ± 0,9 ^H
	HAA1	22,94 ± 0,22	62,35 ± 0,61	4,63 ± 0,00 ^j	0,50 ± 0,06 ^v	87,0 ± 0,9 ^I
	MDS 130	22,02 ± 0,21	56,73 ± 0,55	3,32 ± 0,00 ^k	0,48 ± 0,06 ^v	93,0 ± 0,9 ^H
5	T18	21,25 ± 0,21	48,52 ± 0,47	1,36 ± 0,00 ^l	0,45 ± 0,00 ^w	86,0 ± 1,0 ^J
	HAA1	25,76 ± 0,25	50,89 ± 0,49	1,45 ± 0,00 ^m	0,43 ± 0,00 ^x	80,0 ± 1,0 ^K
	MDS 130	23,32 ± 0,23	48,44 ± 0,47	1,28 ± 0,00 ⁿ	0,43 ± 0,00 ^x	90,0 ± 1,1 ^L
6	T18	17,04 ± 0,17	41,29 ± 0,40	1,09 ± 0,07 ^o	0,43 ± 0,04 ^y	85,0 ± 1,8 ^M
	HAA1	20,68 ± 0,20	43,42 ± 0,42	1,10 ± 0,07 ^o	0,41 ± 0,04 ^y	78,0 ± 1,7 ^N
	MDS 130	19,97 ± 0,19	43,35 ± 0,42	1,19 ± 0,07 ^o	0,40 ± 0,04 ^y	88,0 ± 1,9 ^M
7	T18	14,09 ± 0,14	40,60 ± 0,39	0,64 ± 0,04 ^p	0,41 ± 0,02 ^z	82,0 ± 2,0 ^O
	HAA1	16,54 ± 0,16	40,02 ± 0,39	0,10 ± 0,01 ^q	0,43 ± 0,02 ^{zA}	73,0 ± 1,8 ^P
	MDS 130	13,37 ± 0,13	41,37 ± 0,40	0,64 ± 0,04 ^p	0,48 ± 0,02 ^A	88,0 ± 2,1 ^Q

Fonte: Elaborada pela autora

Anexo A – Meios e índices de performance

Tabela 1: Composição inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo em meio YPXDHB utilizando células imobilizadas das leveduras T18, HAA1 e MDS 130. Letras iguais para os mesmos índices de desempenho em cada reciclo indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{ART})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	26,85 ± 0,26	6,71 ± 0,11 ^a	0,45 ± 0,05 ^A	99,6 ± 0,9 ^Q
	HAA1	0,00 ± 0,00	22,74 ± 0,22	7,58 ± 0,13 ^b	0,43 ± 0,04 ^A	99,6 ± 0,9 ^Q
	MDS 130	0,00 ± 0,00	21,51 ± 0,21	7,17 ± 0,12 ^c	0,41 ± 0,04 ^A	100,0 ± 0,0 ^Q
2	T18	5,09 ± 0,05	34,58 ± 0,34	7,37 ± 0,03 ^d	0,43 ± 0,00 ^B	99,6 ± 0,9 ^R
	HAA1	3,40 ± 0,03	39,49 ± 0,38	9,02 ± 0,04 ^e	0,46 ± 0,00 ^C	99,6 ± 1,3 ^R
	MDS 130	4,25 ± 0,04	38,21 ± 0,37	8,49 ± 0,03 ^f	0,45 ± 0,00 ^D	99,8 ± 0,4 ^R
3	T18	8,65 ± 0,08	42,36 ± 0,41	8,43 ± 0,21 ^g	0,47 ± 0,05 ^E	99,8 ± 0,4 ^S
	HAA1	5,89 ± 0,06	42,85 ± 0,42	9,24 ± 0,23 ^h	0,46 ± 0,05 ^E	99,0 ± 1,4 ^S
	MDS 130	8,10 ± 0,08	44,00 ± 0,43	8,98 ± 0,22 ^{g,h}	0,48 ± 0,05 ^E	99,2 ± 1,3 ^S
4	T18	13,79 ± 0,13	47,34 ± 0,46	6,71 ± 0,01 ⁱ	0,47 ± 0,06 ^F	99,0 ± 2,2 ^T
	HAA1	11,83 ± 0,11	47,70 ± 0,46	8,97 ± 0,01 ^j	0,49 ± 0,06 ^F	99,8 ± 0,4 ^T
	MDS 130	9,71 ± 0,09	47,17 ± 0,46	9,37 ± 0,01 ^k	0,47 ± 0,06 ^F	99,4 ± 0,9 ^T
5	T18	12,33 ± 0,12	49,27 ± 0,48	7,39 ± 0,01 ^l	0,48 ± 0,00 ^G	99,0 ± 1,2 ^U
	HAA1	12,16 ± 0,12	48,47 ± 0,47	9,08 ± 0,01 ^m	0,51 ± 0,00 ^H	99,6 ± 0,5 ^U
	MDS 130	10,50 ± 0,10	49,25 ± 0,48	9,69 ± 0,01 ⁿ	0,50 ± 0,00 ^H	97,6 ± 1,1 ^U
6	T18	13,06 ± 0,13	45,12 ± 0,44	6,41 ± 0,40 ^o	0,47 ± 0,04 ^I	96,6 ± 3,9 ^V
	HAA1	11,40 ± 0,11	49,53 ± 0,48	9,53 ± 0,60 ^p	0,51 ± 0,05 ^I	98,0 ± 1,4 ^V
	MDS 130	12,61 ± 0,12	52,13 ± 0,51	9,88 ± 0,62 ^p	0,49 ± 0,05 ^I	94,0 ± 2,3 ^V
7	T18	20,71 ± 0,20	51,32 ± 0,50	5,10 ± 0,29 ^q	0,48 ± 0,02 ^J	95,2 ± 3,6 ^W
	HAA1	11,44 ± 0,11	53,41 ± 0,52	8,39 ± 0,48 ^r	0,49 ± 0,02 ^J	94,4 ± 1,5 ^W
	MDS 130	10,14 ± 0,10	52,14 ± 0,51	8,40 ± 0,48 ^r	0,49 ± 0,02 ^J	94,4 ± 4,0 ^W
8	T18	19,13 ± 0,19	52,73 ± 0,51	5,60 ± 0,05 ^s	0,51 ± 0,01 ^K	93,2 ± 4,3 ^X
	HAA1	13,60 ± 0,13	52,43 ± 0,51	7,77 ± 0,06 ^t	0,51 ± 0,01 ^K	91,8 ± 2,6 ^X
	MDS 130	13,31 ± 0,13	53,09 ± 0,52	7,96 ± 0,07 ^u	0,51 ± 0,01 ^K	92,0 ± 2,4 ^X
9	T18	21,09 ± 0,20	53,55 ± 0,52	5,41 ± 0,06 ^v	0,49 ± 0,00 ^L	88,6 ± 3,0 ^Y
	HAA1	11,87 ± 0,12	53,47 ± 0,52	8,32 ± 0,10 ^w	0,51 ± 0,00 ^M	91,4 ± 3,0 ^Y
	MDS 130	14,33 ± 0,14	48,91 ± 0,48	6,92 ± 0,08 ^x	0,44 ± 0,00 ^N	91,0 ± 4,8 ^Y
10	T18	19,10 ± 0,19	53,48 ± 0,52	5,73 ± 0,27 ^y	0,48 ± 0,01 ^O	90,0 ± 2,4 ^Z
	HAA1	10,85 ± 0,11	51,86 ± 0,50	8,20 ± 0,39 ^z	0,51 ± 0,01 ^P	86,2 ± 3,6 ^Z
	MDS 130	15,46 ± 0,15	52,31 ± 0,51	7,37 ± 0,35 ^z	0,48 ± 0,01 ^{O,P}	91,0 ± 0,7 ^Z

Fonte: Pereira (2021)

Tabela 2: Composição inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidades celulares após cada reciclo em meio MHB-I utilizando células imobilizadas das leveduras T18, HAA1 e MDS 130. Letras iguais para os mesmos índices de desempenho em cada reciclo indicam que as médias não diferem significativamente de acordo com teste de Tukey com 95% de confiança.

Reciclo	Levedura	[EtOH] ₀ (g/L)	[EtOH] _F (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{EtOH} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	25,20 ± 0,25	12,60 ± 0,21 ^a	0,47 ± 0,05 ^t	99,6 ± 0,5 ^G
	HAA1	0,00 ± 0,00	25,80 ± 0,25	12,90 ± 0,21 ^a	0,48 ± 0,05 ^t	100 ± 0,0 ^G
	MDS 130	0,00 ± 0,00	24,96 ± 0,25	12,48 ± 0,21 ^a	0,47 ± 0,05 ^t	100 ± 0,0 ^G
2	T18	5,36 ± 0,05	40,29 ± 0,40	11,64 ± 0,05 ^b	0,48 ± 0,00 ^u	98,8 ± 0,4 ^H
	HAA1	4,22 ± 0,04	39,37 ± 0,38	11,72 ± 0,05 ^b	0,47 ± 0,00 ^u	99,6 ± 0,5 ^H
	MDS 130	2,70 ± 0,03	40,53 ± 0,40	12,61 ± 0,05 ^c	0,49 ± 0,01 ^v	99,0 ± 0,0 ^H
3	T18	7,33 ± 0,07	44,48 ± 0,44	12,38 ± 0,30 ^d	0,49 ± 0,05 ^w	99,0 ± 1,0 ^I
	HAA1	8,18 ± 0,08	42,21 ± 0,41	11,34 ± 0,28 ^e	0,48 ± 0,05 ^w	99,6 ± 0,9 ^I
	MDS 130	4,76 ± 0,05	42,10 ± 0,41	12,45 ± 0,31 ^d	0,49 ± 0,05 ^w	99,0 ± 0,7 ^I
4	T18	11,64 ± 0,12	46,98 ± 0,47	8,83 ± 0,01 ^f	0,49 ± 0,06 ^x	97,2 ± 0,8 ^{J,K}
	HAA1	11,24 ± 0,11	47,38 ± 0,47	9,04 ± 0,01 ^g	0,48 ± 0,06 ^x	98,4 ± 0,5 ^J
	MDS 130	8,64 ± 0,08	47,47 ± 0,47	9,71 ± 0,01 ^h	0,51 ± 0,06 ^x	96,0 ± 1,0 ^K
5	T18	13,96 ± 0,14	48,40 ± 0,48	8,61 ± 0,01 ⁱ	0,47 ± 0,00 ^y	95,0 ± 1,0 ^L
	HAA1	13,06 ± 0,13	48,83 ± 0,48	8,94 ± 0,01 ^j	0,46 ± 0,00 ^y	95,8 ± 0,8 ^L
	MDS 130	12,23 ± 0,12	48,99 ± 0,49	9,19 ± 0,01 ^k	0,47 ± 0,00 ^y	93,2 ± 2,2 ^L
6	T18	13,25 ± 0,13	49,36 ± 0,49	9,03 ± 0,57 ^l	0,50 ± 0,05 ^z	90,8 ± 2,3 ^M
	HAA1	12,33 ± 0,12	50,06 ± 0,50	9,43 ± 0,59 ^l	0,50 ± 0,05 ^z	95,0 ± 0,7 ^N
	MDS 130	12,93 ± 0,13	49,97 ± 0,50	9,26 ± 0,58 ^l	0,50 ± 0,05 ^z	89,4 ± 1,5 ^M
7	T18	11,79 ± 0,12	49,33 ± 0,49	9,38 ± 0,53 ^m	0,51 ± 0,02 ^A	88,0 ± 1,6 ^O
	HAA1	8,37 ± 0,08	47,92 ± 0,47	9,89 ± 0,56 ^m	0,50 ± 0,02 ^A	92,6 ± 1,3 ^P
	MDS 130	10,97 ± 0,11	50,39 ± 0,50	7,89 ± 0,45 ⁿ	0,50 ± 0,02 ^A	84,0 ± 1,4 ^Q
8	T18	16,28 ± 0,16	49,02 ± 0,49	6,55 ± 0,05 ^o	0,47 ± 0,01 ^B	84,0 ± 4,1 ^R
	HAA1	12,98 ± 0,13	48,90 ± 0,48	7,18 ± 0,06 ^p	0,48 ± 0,01 ^B	96,4 ± 0,5 ^S
	MDS 130	14,44 ± 0,14	49,76 ± 0,49	7,06 ± 0,06 ^p	0,48 ± 0,01 ^B	83,2 ± 2,4 ^R
9	T18	13,08 ± 0,13	48,44 ± 0,48	7,07 ± 0,08 ^{q,r}	0,47 ± 0,00 ^C	82,6 ± 6,3 ^T
	HAA1	12,48 ± 0,12	48,82 ± 0,48	7,27 ± 0,09 ^q	0,49 ± 0,00 ^D	88,6 ± 3,1 ^T
	MDS 130	13,71 ± 0,13	48,50 ± 0,48	6,96 ± 0,08 ^r	0,44 ± 0,00 ^E	83,0 ± 2,8 ^T
10	T18	15,41 ± 0,15	51,67 ± 0,51	7,25 ± 0,34 ^s	0,49 ± 0,01 ^F	73,8 ± 2,2 ^U
	HAA1	13,99 ± 0,14	51,86 ± 0,51	7,57 ± 0,36 ^s	0,50 ± 0,01 ^F	87,6 ± 0,5 ^V
	MDS 130	15,44 ± 0,15	52,31 ± 0,52	7,38 ± 0,35 ^s	0,49 ± 0,01 ^F	80,0 ± 1,4 ^W

Fonte: Pereira (2021)