

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

LAÍS PORTUGAL RIOS DA COSTA PEREIRA

PRODUÇÃO INTEGRADA DE ETANOL 1G/2G UTILIZANDO MEIOS
INDUSTRIAIS E LEVEDURAS RECOMBINANTES

SÃO CARLOS, SP
2021

LAÍS PORTUGAL RIOS DA COSTA PEREIRA

PRODUÇÃO INTEGRADA DE ETANOL 1G/2G UTILIZANDO MEIOS
INDUSTRIAIS E LEVEDURAS RECOMBINANTES

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

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

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 Dissertação de Mestrado da candidata Laís Portugal Rios da Costa Pereira, realizada em 27/04/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves (UNIFEI)

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.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor e carinho, por me proporcionarem as melhores oportunidades e por sempre apoiarem minhas decisões.

À minha família, por torcer por mim e por comemorar minhas vitórias.

Às minhas amigas de Alfenas, por todo companheirismo apesar da distância e, muitas vezes, da ausência.

Aos meus amigos de São Carlos, pela receptividade, por todo o apoio e por todas as vivências.

Aos meus colegas de laboratório, por toda a ajuda na realização dos experimentos.

A todos os meus professores, por todos os ensinamentos e, em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Teresa Cristina Zangirolami.

Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein (KU Leuven/VIB, Bélgica), pela cessão das leveduras, e ao Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva (EEL-USP), pela doação do hidrolisado de hemicelulose.

Às empresas Ipiranga Agroindustrial, pela doação do melaço, e Kerry, pela doação da peptona.

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).

RESUMO

O etanol de segunda geração (2G) configura-se como uma alternativa para aumentar a oferta do biocombustível sem expansão da área de plantio da cana-de-açúcar e para aproveitar o excedente de bagaço de cana-de-açúcar disponível no Brasil devido à intensa atividade sucroalcooleira. Em decorrência dos avanços da Biologia Molecular, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* capazes de assimilar e fermentar xilose, principal açúcar presente na fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos, vêm sendo desenvolvidas. Entretanto, a baixa tolerância dessas leveduras aos inibidores (ácido acético, hidroximetilfurfural, furfural e compostos fenólicos) presentes nos hidrolisados de hemicelulose e ao etanol levam à perda de viabilidade das células e à baixa velocidade de fermentação e produtividade em etanol, comprometendo o desempenho e a viabilidade econômica do processo fermentativo. Assim, o desenvolvimento de processos produtivos mais eficientes para obtenção de altas concentrações de etanol, compatíveis com as requeridas na etapa de destilação, a partir de hidrolisados de hemicelulose com altas concentrações de açúcares, é necessário. A melhoria do processo depende tanto da disponibilidade de linhagens de leveduras mais tolerantes aos inibidores quanto de estratégias de operação que minimizem os efeitos dos inibidores. Por outro lado, a incorporação de subprodutos da indústria sucroalcooleira, como o melaço, na formulação do meio para a produção de etanol 2G favorece a flexibilidade e a viabilidade do processo. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar estratégias visando estabelecer um processo robusto e escalonável para obtenção de etanol 2G em condições industriais de fermentação e promover a integração da produção de etanol 1G e 2G. O desempenho de três leveduras recombinantes de última geração (*S. cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130), imobilizadas em gel de alginato de cálcio, foi avaliado em hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar *in natura*, obtido a partir de pré-tratamento ácido (não concentrado), suplementado ou não com melaço. Meios sintéticos também foram avaliados como controle. Os experimentos foram realizados em batelada repetida em minirreatores e em reator de leito fixo com acompanhamento das fermentações por medida da produção de CO₂ e por análise da concentração de açúcares redutores, respectivamente. A concentração de açúcares e metabólitos no sobrenadante foi determinada por cromatografia de alta performance (CLAE) e a viabilidade das células por contagem de células coradas com azul de metileno. Constatou-se que, ao contrário dos hidrolisados de hemicelulose concentrados, a concentração dos inibidores presentes no hidrolisado de hemicelulose *in natura* não impacta severamente o desempenho da fermentação. Por sua vez, a adição de melaço mostrou-se uma estratégia eficiente para alcançar elevada concentração de açúcares fermentáveis, permitindo obter produtividades de até 23 g/L/h e operação prolongada em batelada repetida, compatíveis com a operação industrial. O efeito tóxico das altas concentrações de etanol (acima de 80 g/L) sobre a viabilidade das células foi observado para todas as linhagens e limitou o ciclo das células a, no máximo, cinco bateladas repetidas. O desempenho das linhagens em termos de conversão de açúcares fermentáveis e produtividade e rendimento em etanol foi similar, com exceção da MDS 130, que se mostrou incapaz de assimilar eficientemente xilose na presença de altas concentrações de hexoses (glicose e/ou frutose).

Palavras-chave: Etanol 2G. Hidrolisado de hemicelulose. *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

ABSTRACT

Second generation (2G) ethanol is an alternative to increase the supply of this biofuel without expanding the sugarcane plantation area and to utilize the excess of sugarcane bagasse available in Brazil due to the intense economic activity related to sugar and alcohol production. Due to the advances in Molecular Biology, *Saccharomyces cerevisiae* strains capable of assimilating and fermenting xylose, the main sugar present in the hemicellulosic fraction of lignocellulosic materials, have been developed. However, the low tolerance of these yeasts to hemicellulose hydrolysates inhibitors (acetic acid, hydroxymethylfurfural, furfural and phenolic compounds) and to ethanol leads to loss of cell viability and to low fermentation rates and ethanol productivities, compromising the performance and economic viability of the fermentation process. Thus, the development of more efficient production processes to obtain high ethanol concentrations, compatible with those required in the distillation step, from hemicellulose hydrolysates with high sugar concentrations, is necessary. Process improvement depends both on the availability of yeast strains that are more tolerant to inhibitors and on operating strategies that minimize the effects of the inhibitors. On the other hand, the incorporation of by-products from the sugar and alcohol industry, such as molasses, in the composition of the medium for the production of 2G ethanol favors the flexibility and economic viability of the process. In this context, the present study aimed to evaluate strategies to establish a robust and scalable process for obtaining 2G ethanol under industrial fermentation conditions and to promote the integration of 1G and 2G ethanol production. The performance of three latest generation recombinant yeasts (*S. cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 and MDS 130), immobilized on calcium alginate gel, was evaluated in *in natura* sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate, obtained from acid pre-treatment (not concentrated), supplemented or not with molasses. Synthetic media were also evaluated as a control. The experiments were carried out in repeated batches in minireactors and in a fixed bed reactor and fermentations were accompanied by carbon dioxide production and by analysis of reducing sugar concentration, respectively. The concentration of sugars and metabolites in the supernatant was determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and the viability of the cells by the methylene blue technique. It was found that, unlike concentrated hemicellulose hydrolysates, the concentration of inhibitors present in *in natura* hemicellulose hydrolysate does not severely impact the fermentation performance. The supplementation with molasses proved to be an efficient strategy to achieve high fermentable sugar concentration, allowing to obtain productivities of up to 23 g/L/h and prolonged operation in repeated batches, compatible with the industrial operation. The toxic effect of high ethanol concentrations (above 80 g/L) on cell viability was observed for all strains and limited cell recycling to a maximum of five repeated batches. The performance of the strains in terms of conversion of fermentable sugars and productivity and yield in ethanol was similar, with the exception of MDS 130, which was unable to efficiently assimilate xylose in the presence of high hexose (glucose and/or fructose) concentration.

Keywords: 2G ethanol. Hemicellulose hydrolysate. Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Fermentação em minirreatores.....	30
Figura 4.2. Fermentação em reator de leito fixo.	31
Figura 5.1. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPD _{XHB} pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	42
Figura 5.2. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB1 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	48
Figura 5.3. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em reator de leito fixo operado em bateladas repetidas pela levedura MDS em meio MHB2. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de <i>beads</i> : 40g, volume do reator: 100 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.....	53
Figura 5.4. Perfil de consumo de açúcares fermentáveis (AF) e de produção de etanol (Et[OH]) durante a primeira batelada em reator de leito fixo pela levedura MDS em meio MHB2. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de <i>beads</i> : 40g, volume do reator: 100 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	54
Figura 5.5. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPSX pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	58
Figura 5.6. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPS _{HB} pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	62
Figura 5.7. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPM _{HB} pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35°C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 ml, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	65
Figura 5.8. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB3 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	69
Figura 5.9. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB4 pela levedura HAA1. (A) <i>Beads</i> mantidos em solução de cura por 12h, (B) <i>beads</i> mantidos em solução de cura	

suplementada com CaCl_2 por 120h. Condições de fermentação: $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,6$, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, $\text{DO}_{600} = 100$, $[\text{AF}]_{\text{reator}} = 155\text{ g/L}$ 74

Figura 5.10. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em meio YPDX, YPFX e YPSX pela levedura MDS. Condições de fermentação: $T = 35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 5,6$, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, $\text{DO}_{600} = 100$, $[\text{AF}]_{\text{reator}} = 155\text{ g/L}$ 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Composição aproximada do melão de cana-de-açúcar.....	8
Tabela 3.2. Desempenho de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante (células livres) em cultivos (batelada) em meio sintético contendo xilose.....	15
Tabela 4.1. Composição (g/L) do melão.....	26
Tabela 4.2. Composição (g/L) do hidrolisado ácido de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado).	27
Tabela 4.3. Composição (g/L) dos meios YPDXHB, MHB1 e MHB2.....	27
Tabela 4.4. Composição (g/L) dos meios YPSX, YPSHB, YPMHB e MHB3.....	28
Tabela 4.5. Composição (g/L) dos meios MHB4, YPDX, YPFX e YPSX.....	28
Tabela 5.1. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPHC com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	39
Tabela 5.2. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPHD com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	40
Tabela 5.3. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPDXHB com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.....	43
Tabela 5.4. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB1 com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.	49
Tabela 5.5. Pontuação das leveduras T18, HAA1 e MDS nos meios industriais YPHC, YPHD e MHB1.	52
Tabela 5.6. Concentração inicial e final de etanol e produtividade e rendimento em etanol para cada reciclo em meio MHB2 com a levedura MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de <i>beads</i> : 40g, volume do reator: 100 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 75 g/L.....	55
Tabela 5.7. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPSX com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	59
Tabela 5.8. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPSHB com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.....	63

Tabela 5.9. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPMHB com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.....	66
Tabela 5.10. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB3 com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	70
Tabela 5.11. Conversão (%) de xilose pela levedura MDS nos meios YPSX, YPSHB, YPMHB e MHB3.	71
Tabela 5.12. Pontuação das leveduras T18 e HAA1 no meio industrial MHB3.....	71
Tabela 5.13. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB4 com a levedura HAA1. (A) <i>Beads</i> mantidos em solução de cura por 12h, (B) <i>beads</i> mantidos em solução de cura suplementada com CaCl ₂ por 120h. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	75
Tabela 5.14. Conversão de xilose, conversão de açúcares fermentáveis (AF), concentração de etanol e rendimento em etanol das fermentações em meio sintético com a levedura MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de <i>beads</i> : 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO ₆₀₀ = 100, [AF] _{reator} = 155 g/L.	77
Tabela 5.15. Produção de etanol 2G em meios industriais com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante imobilizada.....	80

NOMENCLATURA

1G	Primeira geração	
2G	Segunda geração	
AF	Açúcares fermentáveis	
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico	
HMF	5-hidroximetil-2-furaldeído (hidroximetilfurfural)	
MS	Matéria seca	
UV	Ultravioleta	
VPF	Via das pentoses fosfato	
XI	Xilose isomerase	
Y	Extrato de levedura	
P	Peptona	
S	Sacarose	
F	Frutose	
D	Glicose	
X	Xilose	
M	Melaço	
HB	Hidrolisado de hemicelulose bruto (não concentrado)	
HC	Hidrolisado de hemicelulose bruto concentrado	
HD	Hidrolisado de hemicelulose concentrado e destoxificado	
T18	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GSE16-T18	
HAA1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> GSE16-T18 HAA1	
MDS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> MDS 130	
[AF] _{reator}	Concentração de açúcares fermentáveis no reator	g/L
C_{S_i}	Concentração de açúcares no meio fermentativo no início da batelada	g/L
C_{S_f}	Concentração de açúcares no meio fermentativo no fim da batelada	g/L
C_{P_i}	Concentração de etanol no meio fermentativo no início da batelada	g/L
C_{P_f}	Concentração de etanol no meio fermentativo no fim da batelada	g/L
C_X	Concentração de células livres	g/L
DO	Densidade ótica	
Et[OH] _i	Concentração de etanol no meio fermentativo no início da batelada	g/L
Et[OH] _f	Concentração de etanol no meio fermentativo no fim da batelada	g/L
m_{CO_2}	Massa de CO ₂ liberada até o tempo da medida	g
m_{CO_2f}	Massa de CO ₂ liberada durante a batelada	g
m_{reator_0}	Massa do minireator no tempo zero	g

m_{reator_t}	Massa do minirreator no tempo da medida	g
$m_{controle_0}$	Massa do controle no tempo zero	g
$m_{controle_t}$	Massa do controle no tempo da medida	g
Q_P	Produtividade volumétrica em etanol	g/L/h
X	Conversão de açúcares em função do tempo	%
X_f	Conversão final de açúcares	%
$Y_{P/S}$	Coefficiente de rendimento em etanol	g _{etanol} /g _{AF}
Δt	Tempo de duração da batelada	h

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	6
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
3.1	Meios industriais para produção de etanol	7
3.1.1	Melaço	7
3.1.2	Hidrolisado ácido de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar.....	9
3.2	Características gerais do metabolismo de xilose por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante e outras leveduras	12
3.3	Inibidores e efeitos sobre o metabolismo celular.....	15
3.3.1	Inibidores presentes no hidrolisado ácido de hemicelulose	15
3.3.2	Etanol.....	18
3.4	Estratégias de cultivo para amenizar o efeito dos inibidores.....	19
3.4.1	Imobilização das células	19
3.4.2	Temperatura.....	20
3.5	Reatores de leito fixo para produção de etanol 2G.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Microrganismo e inóculo	25
4.2	Imobilização das células	25
4.3	Meios fermentativos	26
4.4	Ensaio fermentativos	29
4.4.1	Ensaio em minirreatores.....	29
4.4.2	Ensaio em reator de leito fixo.....	30
4.5	Descrição da estratégia experimental	31
4.6	Métodos analíticos	33
4.6.1	Concentração de células	33
4.6.2	Viabilidade das células	33
4.6.3	Concentração de açúcares, metabólitos e inibidores	34
4.7	Cálculos	34
4.7.1	Conversão	34
4.7.2	Coeficiente de rendimento.....	35
4.7.3	Produtividade.....	35
4.7.4	Cálculo de pontuação para escolha da levedura com melhor desempenho	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37

5.1	Caracterização das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> em meios fermentativos com 100 g/L de açúcares fermentáveis.....	37
5.1.1	Fermentação em meios contendo hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrados e não concentrados	38
5.1.2	Fermentação em meio industrial contendo melaço e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado)	46
5.2	Caracterização das linhagens recombinantes de <i>S. cerevisiae</i> em meios fermentativos com 220 g/L de açúcares fermentáveis.....	56
5.2.1	Fermentação em meio de referência contendo sacarose e xilose	57
5.2.2	Fermentação em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) suplementado com sacarose.....	61
5.2.3	Fermentação em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) suplementado com melaço e nutrientes..	64
5.2.4	Fermentação em meio industrial contendo melaço e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado)	68
5.3	Estudos complementares: influência das condições de imobilização na tolerância ao etanol	72
5.4	Estudos complementares: assimilação de xilose por <i>S. cerevisiae</i> MDS 130 na presença de hexoses	76
5.5	Visão geral da produção de etanol 2G usando meios industriais	79
6	CONCLUSÕES.....	82
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

O acúmulo de gás carbônico na atmosfera e seus efeitos negativos sobre o clima e o meio ambiente têm estimulado a busca por alternativas aos combustíveis derivados de petróleo. Considerando-se o aspecto ambiental, pode-se dizer que os biocombustíveis pouco interferem no efeito estufa da atmosfera, uma vez que o dióxido de carbono emitido durante a queima é reabsorvido no processo de fotossíntese para gerar mais biomassa (MOTA; MONTEIRO, 2013). Assim, devido à sustentabilidade e ao baixo impacto no meio ambiente e na saúde, os combustíveis fósseis estão sendo substituídos por biocombustíveis (YUSUF; GAUR, 2017). Vários biocombustíveis vêm sendo considerados (biogás, biodiesel, biometanol, biobutanol, por exemplo) (CALLEGARI et al., 2019), mas o bioetanol mantém-se como a alternativa mais amplamente utilizada por apresentar, entre outras características, alta octanagem e combustão eficiente (MOYSÉS et al., 2016).

O bioetanol pode ser produzido a partir de qualquer biomassa que contenha quantidades significativas de amido ou açúcares. No caso do bioetanol de cana-de-açúcar, o processo de produção baseia-se na extração do caldo (por moagem ou difusão) e na fermentação dos açúcares presentes nesse caldo por leveduras industriais. Após a fermentação, o vinho é destilado, obtendo-se o etanol de primeira geração (1G) (BNDES; CGEE, 2008). O Brasil ocupa a posição de segundo maior produtor mundial de etanol 1G e tem como principal matéria-prima a cana-de-açúcar. Na safra 2019/2020, foram produzidos 34 bilhões de litros de etanol de cana-de-açúcar, maior produção da história do setor sucroenergético nacional (CONAB, 2020; RFA, 2020).

Uma alternativa para aumentar a produção de etanol é promover o aproveitamento total da cana-de-açúcar (incluindo palha e bagaço) por meio da hidrólise das frações de celulose e hemicelulose em açúcares que podem ser fermentados em etanol, originando o etanol de segunda geração (2G) (DE ANDRADE et al., 2013). Sendo assim, o etanol 2G constitui uma alternativa para aproveitar o excedente de bagaço de cana-de-açúcar das usinas sucroalcooleiras do país e aumentar a oferta do combustível sem expansão da área de plantio de cana-de-açúcar, não competindo, portanto, com a produção de alimentos (ÖZÜDOGRU et al., 2019).

Apesar de amplamente estudado, o processo de produção de etanol 2G depende da superação de desafios para atingir a viabilidade econômica. A presença de inibidores (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, entre outros) nos hidrolisados de hemicelulose e a baixa tolerância da levedura a esses compostos levam à perda de viabilidade das células, à baixa velocidade de fermentação, à redução da produtividade em etanol e à formação de subprodutos (CANILHA et al., 2012; NOGUÉ; KARHUMAA, 2015; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Esses efeitos podem ser atenuados com a imobilização da levedura em suportes adequados, em razão da formação de uma camada de sacrifício, de um gradiente de concentração dos inibidores e de um microambiente nas partículas de biocatalisador, o que auxilia na proteção das células (MILESSI et al., 2020a).

Outro desafio é a incapacidade de linhagens selvagens da levedura *Saccharomyces cerevisiae* – microrganismo mais utilizado para a obtenção de etanol 1G – assimilarem pentoses, açúcares presentes em quantidades significativas nos hidrolisados hemicelulósicos (NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Graças aos avanços da engenharia metabólica, diversas linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas capazes de assimilar xilose eficientemente vêm sendo disponibilizadas (DEMEKE et al., 2013a,b; MEIJNEN et al., 2016). Ainda assim, é necessário o desenvolvimento de processos produtivos mais eficientes; de etapas de pré-tratamento que promovam uma hidrólise eficaz da biomassa com menor consumo energético, resultando em hidrolisados de hemicelulose concentrados em açúcares e adequados para o processo; e de leveduras assimiladoras de pentoses mais resistentes aos inibidores e ao etanol (CANILHA et al., 2012).

Da mesma forma, estratégias de fermentação que garantam alta produtividade em condições industriais de operação são imprescindíveis e vêm sendo pouco abordadas na literatura. Estudos relatam a utilização de hidrolisados de hemicelulose concentrados para a obtenção de etanol (ANTUNES et al., 2019; MILESSI et al., 2020a,b; ZHAO; XIA, 2010). A etapa de concentração é necessária para possibilitar que a concentração de etanol que torna a etapa de destilação viável (entre 60 e 90 g/L) (DELLA-BIANCA et al., 2012) seja atingida, uma vez que o teor de açúcares presentes nos hidrolisados de hemicelulose obtidos por pré-tratamento com ácido diluído é baixo (DE ANDRADE et al., 2013; XI et al., 2013). No entanto, além dos gastos energéticos envolvidos na operação de concentração por evaporação, alguns inibidores do hidrolisado também têm suas

concentrações aumentadas (ZHAO; XIA, 2010). Uma alternativa para contornar essas limitações é integrar os processos de produção de etanol 1G e 2G. A concentração de açúcar no hidrolisado pode ser aumentada adicionando-se melaço, um subproduto da indústria açucareira rico em sacarose, usualmente empregado na produção de etanol 1G (DE ANDRADE et al., 2013), favorecendo, assim, a flexibilidade e a viabilidade econômica do processo de produção de etanol 2G.

No âmbito 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), no qual o presente projeto de mestrado se insere, os grupos de pesquisa Laboratório de Fábricas Celulares (LaFaC) e Laboratório de Engenharia Enzimática (LabEnz) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (DEQ/UFSCar), que têm 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, vêm estudando leveduras recombinantes de última geração em condições industriais para a produção de etanol 2G em processos implementáveis em escala industrial.

Nesse contexto, em virtude da parceria com o Prof. Dr. Johan M. Thevelein, da KU Leuven (Bélgica), três leveduras recombinantes de alto desempenho (*S. cerevisiae* GSE16-T18, *S. cerevisiae* GSE16-T18 HAA1 e *S. cerevisiae* MDS 130) vêm sendo avaliadas em condições industriais, utilizando meios formulados com hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrados. Sandri (2019) realizou experimentos com células livres da linhagem MDS 130 em hidrolisado concentrado bruto (HC) e destoxificado (HD), suplementados com extrato de levedura (Y) e peptona (P). Apesar de o processo de destoxificação ter sido eficiente na redução da concentração dos principais inibidores (diminuição de 86, 92 e 80% na concentração de furfural, hidroximetilfurfural e compostos fenólicos, respectivamente), os efeitos da toxicidade foram apenas atenuados. Nos dois meios, apenas aproximadamente 30% da xilose foi convertida em 80h de fermentação, enquanto no experimento controle, em meio YPDX (extrato de levedura, peptona, glicose e xilose), a conversão de açúcares foi completa em menos de 40h. Além disso, o rendimento em etanol nos meios YPHC e YPHD foi 50 e 25%, respectivamente, menor do que o observado no meio YPDX.

Perez (2021) também utilizou os meios compostos por extrato de levedura, peptona, glicose e xilose (YPDX); extrato de levedura, peptona e hidrolisado de hemicelulose concentrado bruto (YPHC) e extrato de levedura, peptona e hidrolisado de hemicelulose concentrado destoxificado (YPHD) para estudar o desempenho das linhagens GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130, imobilizadas em alginato de cálcio, em fermentações em batelada repetida. Comparado ao experimento controle (meio YPDX), o processo fermentativo em meio YPHC apresentou número de reciclo de células, produtividades em etanol e viabilidade final das células menores (em média 40, 70 e 60%, respectivamente) para as três linhagens. Conforme observado por Sandri (2019), os resultados alcançados em meio YPHD foram ligeiramente superiores aos obtidos em meio YPHC, mas ainda inferiores ao experimento controle em número de reciclo de células (30%) e em produtividade em etanol (aproximadamente 50%) para todas as linhagens.

A influência da concentração de etanol no desempenho das fermentações também foi relatada. Sandri (2019) constatou redução de 50% na produtividade em etanol da cepa MDS 130 como consequência da suplementação de 40 g/L de etanol em meio YPX (extrato de levedura, peptona e xilose). Ainda, em experimentos realizados com a cepa GSE16-T18 em meio YPHC em batelada repetida, Milessi e colaboradores (2020a) observaram redução da produtividade em etanol a cada reciclo de células, fato atribuído ao aumento gradativo da concentração de etanol no meio. Além disso, em fermentações conduzidas em meio YPHC suplementado com 60 g/L de etanol, Perez e colaboradores (2021) demonstraram a ocorrência de forte sinergia entre os inibidores do hidrolisado e o etanol, levando à drástica redução no número de bateladas repetidas (80%), na produtividade em etanol (90% na segunda batelada) e na viabilidade celular (50% na segunda batelada), em comparação ao experimento controle em meio YPDX.

Esses resultados revelam o impacto negativo do etanol e dos inibidores presentes nos hidrolisados de hemicelulose concentrados, cuja intensidade no comprometimento do desempenho do processo fermentativo está relacionada com a concentração, o tempo de exposição e, ainda, a sinergia entre esses compostos. Assim, a utilização de hidrolisados concentrados compromete a viabilidade do processo de produção de etanol 2G em escala industrial, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para contornar o efeito dos inibidores e do etanol e, ainda, possibilitar a realização de

fermentações em condições de elevada concentração de açúcares e alta produtividade em etanol.

Dessa forma, este projeto de mestrado teve como objetivo avaliar diferentes estratégias visando estabelecer um processo robusto e escalonável para produção de etanol 2G em condições industriais de fermentação, empregando meio formulado a partir de hidrolisado de hemicelulose obtido através de pré-tratamento ácido (não concentrado) suplementado com melaço, reproduzindo, assim, as condições usualmente empregadas nas usinas para a produção de etanol 1G e promovendo a integração da produção de etanol 1G e 2G. Até o momento, a fermentação de hidrolisados de hemicelulose suplementados com melaço por linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* não foi reportada na literatura.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo a avaliação da produção de etanol 2G em condições industriais de fermentação por leveduras recombinantes de última geração, imobilizadas em gel de alginato de cálcio, em meio composto por hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melaço.

Como objetivos específicos, destacam-se:

- i. Avaliação do desempenho fermentativo de três cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes em meios contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado), suplementados ou não com melaço, com diferentes concentrações iniciais de açúcares fermentáveis (AF);
- ii. Seleção da cepa mais promissora;
- iii. Avaliação de estratégias para atenuação dos efeitos tóxicos do etanol;
- iv. Escalonamento em reator de leito fixo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Meios industriais para produção de etanol

3.1.1 Melaço

O melaço (ou mel final) é o líquido viscoso e escuro remanescente do estágio final de cristalização do açúcar, a partir do qual nenhum açúcar adicional pode ser cristalizado de forma econômica pelos métodos usuais (CLARKE, 2003). O melaço não retorna ao processo de fabricação do açúcar, consistindo, portanto, em um subproduto inevitável da indústria açucareira (BNDES; CGEE, 2008; XU; XU, 2014). A disponibilidade de melaço é determinada pela produção de açúcar e sua composição varia amplamente, dependendo da origem e das etapas de processamento (BNDES; CGEE, 2008; JONES et al., 1994; PALMONARI et al., 2020).

Recentemente, Palmonari e colaboradores (2020) avaliaram a composição química de 16 amostras de melaço de cana-de-açúcar adquiridas em todo o mundo. A porcentagem média de matéria seca (MS) encontrada nas amostras foi de 76,8. Na análise de açúcares, a sacarose foi detectada em maior quantidade, com uma concentração média de 48,8% da MS, seguida pela glicose e pela frutose, com médias de 8,1 e 5,3% da MS, respectivamente. Os outros açúcares analisados (rafinose, galactose, arabinose e xilose) foram quase indetectáveis, com soma dos valores máximos encontrados inferior a 1% da MS (PALMONARI et al., 2020).

Em razão do elevado teor de açúcares em sua composição, o melaço pode ser usado como fonte de carbono em fermentações microbianas (BNDES; CGEE, 2008). Entretanto, fontes de nitrogênio também são importantes para a fermentação, uma vez que compreendem proteínas, aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas, essenciais para o crescimento celular (XU; XU, 2014). Na análise do melaço de cana-de-açúcar, Jones e colaboradores (1994) observaram um teor de nitrogênio total relativamente alto (3,6 g/L). Contudo, a concentração de amino nitrogênio livre (ANL) determinada foi de 1,0 g/L, sendo que apenas aproximadamente 45% possuía peso molecular suficientemente baixo para ser usado por células de levedura para crescimento. A composição aproximada do melaço de cana-de-açúcar encontra-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Composição aproximada do melaço de cana-de-açúcar.

Constituintes principais	Componentes	Intervalo normal
Água		17-25%
Açúcares	Sacarose	30-40%
	Glicose (dextrose)	4-9%
	Frutose (levulose)	5-12%
	Outras substâncias redutoras	1-4%
	Total de substâncias redutoras	10-25%
Outros carboidratos	Gomas, amido, pentosanos, também vestígios de hexitóis; mioinositol, D-manitol e ácidos urônicos	2-5%
Cinzas	Como carbonatos ^a	7-15%
	Bases:	
	Óxido de potássio (30-50%)	
	Óxido de cálcio (7-15%)	
	Óxido de magnésio (2-14%)	
	Óxido de sódio (0,3-9%)	
	Óxidos metálicos (como férrico) (0,4-2,7%)	
	Ácidos:	
	Trióxido sulfúrico (7-27%)	
	Cloreto (12-20%)	
	Pentóxido fosfórico (0,5-2,5%)	
	Silicatos e insolúveis (1-7%)	
Compostos nitrogenados	Proteína bruta	2,5-4,5%
	Proteína verdadeira	0,5-1,5%
	Aminoácidos, principalmente ácidos aspártico e glutâmico, incluindo alguns ácidos carboxílicos de pirrolidina	0,3-0,5%
	Compostos nitrogenados não identificados	1,5-3,0%
Compostos não nitrogenados	Ácidos aconítico (1-5%), cítrico, málico, oxálico, glicólico	1,5-6,0%
	Ácidos mesacônico, succínico, fumárico e tartárico	0,5-1,5%
Ceras, esteróis e fosfatídeos		0,1-1,0%
Vitaminas	Tiamina (B1)	2-10 ppm
	Riboflavina (B2)	1-6 ppm
	Piridoxina (B6)	1-10 ppm
	Nicotinamida	1-25 ppm
	Ácido pantotênico	2-25 ppm
	Ácido fólico	10-50 ppm
	Biotina	0,1-2 ppm

^aPorcentagem de cinzas dada entre parênteses.

Fonte: Clarke (2003).

Além disso, a eliminação dos efeitos tóxicos do alumínio sobre células de levedura em meios fermentativos ricos em melão sugere a presença de compostos quelantes em sua composição. O alumínio em sua forma tóxica (Al^{3+}) atua na redução dos níveis de trealose celular, da viabilidade das células e da velocidade de fermentação (BASSO et al., 2008).

A presença de íons metálicos e compostos orgânicos (compostos fenólicos e ácidos orgânicos) na composição do melão pode inibir o metabolismo de microrganismos no processo de fermentação (KUNDU et al., 1984; PRADEEP; REDDY, 2010; XU; XU, 2014). Ainda, embora as etapas de tratamento químico realizadas durante o processo de produção de açúcar promovam a remoção de impurezas, podem restar no caldo sais inorgânicos, cinzas sulfatadas, agentes corantes, entre outros, que, conseqüentemente, aparecem na composição do melão e também podem afetar o desempenho da fermentação microbiana (KASENO; KOKUGAN, 1997).

O melão é extensivamente usado para produção de bioetanol 1G nas destilarias anexas às usinas (BNDES; CGEE, 2008; PRADEEP; REDDY, 2010). No Brasil, a produção de bioetanol baseia-se na fermentação da mistura do caldo de cana-de-açúcar (ou água) e do melão, denominada mosto (BNDES; CGEE, 2008; WHEALS et al., 1999). No entanto, o melão também pode ser empregado como substrato nos processos biotecnológicos de obtenção de ácido cítrico (insumo utilizado na conservação e acidulação de alimentos e na fabricação de produtos de higiene e de limpeza), de lisina (aminoácido essencial usado na formulação de fármacos e rações) e dos ácidos indolacético e jasmônico (fitorreguladores), por exemplo. O melão também encontra aplicação ampla na alimentação de animais (BNDES; CGEE, 2008).

3.1.2 Hidrolisado ácido de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar

Ácidos podem ser usados como catalisadores na hidrólise da biomassa lignocelulósica por liberarem prótons que quebram as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas de celulose e hemicelulose (AGUILAR et al., 2002). O ácido comumente empregado é o sulfúrico, embora os ácidos clorídrico, nítrico e trifluoroacético também tenham sido avaliados (AGUILAR et al., 2002; GÍRIO et al., 2010; MOSIER et al., 2005). Hidrólises catalisadas com ácidos podem ser

conduzidas a partir de duas abordagens distintas: ácido concentrado/temperatura moderada e ácido diluído/temperatura alta (AZHAR et al., 2017; GÍRIO et al., 2010).

Processos com ácido concentrado possibilitam a hidrólise da celulose e da hemicelulose (GÍRIO et al., 2010). Comparados aos processos com ácido diluído, apresentam maior eficiência na recuperação de açúcar, que pode atingir mais de 90% do rendimento teórico para glicose e xilose (WIJAYA et al., 2014). As condições operacionais de temperatura e pressão mais amenas reduzem a decomposição dos monômeros, o que contribui positivamente para o rendimento em açúcar, bem como os custos de operação (GÍRIO et al., 2010; WIJAYA et al., 2014). No entanto, a recuperação do ácido é indispensável para a viabilidade econômica do processo. Além disso, a hidrólise conduzida com ácidos concentrados exige o emprego de reatores resistentes à corrosão (GÍRIO et al., 2010; SUN; CHENG, 2002).

No processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica, a hemicelulose tem as ligações entre os monômeros mais facilmente quebradas do que a celulose por ser amorfa. Processos com ácido diluído permitem a hidrólise principalmente da fração hemicelulósica e resultam em um hidrolisado que contém sobretudo açúcares, como xilose, glicose e arabinose. Entretanto, também são formados subprodutos que atuam como inibidores do crescimento e da fermentação microbiana (AGUILAR et al., 2002; CANILHA et al., 2012; TIZAZU; MOHOLKAR, 2018). Esses compostos compreendem o ácido acético, proveniente da hidrólise de grupos acetila ligados aos monômeros hemicelulósicos; o 5-hidroximetil-2-furaldeído (hidroximetilfurfural ou HMF) e o 2-furaldeído (furfural), gerados pela desidratação de hexoses e pentoses, respectivamente; os ácidos levulínico e fórmico, resultantes da degradação do HMF e do furfural; e compostos fenólicos, originados pela decomposição da lignina (NOGUÉ; KARHUMAA, 2015; TIZAZU; MOHOLKAR, 2018). A hidrólise com ácido diluído apresenta vantagens associadas ao consumo relativamente mais baixo de ácido, à demanda reduzida de energia para recuperação e à corrosão limitada dos equipamentos (GÍRIO et al., 2010).

No estudo da hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar, Aguilar e colaboradores (2002) encontraram condições ótimas de concentração de ácido, temperatura e tempo de 2% m/m de H₂SO₄, 122°C e 24 min, respectivamente. O procedimento resultou em uma solução com 21,6 g/L de xilose, 3,00 g/L de glicose, 3,65 g/L de ácido acético e 0,52 g/L de furfural, correspondendo a uma hidrólise de aproximadamente 90% da hemicelulose. Já na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar com

H₂SO₄ 10% m/m a 140°C por 20 min, Carvalho e colaboradores (2004) atingiram concentrações de 17,2 g/L de xilose, 0,8 g/L de glicose, 1,8 g/L de arabinose, 3,2 g/L de ácido acético, 0,10 g/L de furfural e 0,03 g/L de HMF no hidrolisado de hemicelulose. Por sua vez, Chandel e colaboradores (2007) obtiveram um hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar composto por 21,5 g/L de xilose, 5,84 g/L de glicose, 2,95 g/L de arabinose, 5,45 g/L de ácido acético, 1,89 g/L de furanos (HMF e furfural) e 2,75 g/L de compostos fenólicos no processo conduzido com HCl 2,5% v/v a 140°C por 30 min. Em todos os estudos, a razão sólido/líquido utilizada foi 1:10.

Apesar de ser um método amplamente empregado, a hidrólise com ácido diluído resulta em soluções com baixa concentração total de açúcares, o que limita a utilização dos hidrolisados em sistemas de fermentação industriais (XI et al., 2013). Para que se atinja uma concentração mais elevada de açúcares, o hidrolisado é geralmente concentrado por evaporação. No entanto, alguns dos inibidores também têm suas concentrações aumentadas, o que pode afetar o desempenho das células de levedura no processo de fermentação. Assim, após a etapa de concentração, pode ser necessário incluir etapas de destoxificação do hidrolisado para diminuir o teor desses compostos (ZHAO; XIA, 2010).

Alves e colaboradores (1998) analisaram a composição de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar nas formas bruta (não concentrada), concentrada e destoxificada. No processo conduzido com H₂SO₄ 10% (m/m) a 121°C por 10 min, os autores obtiveram um hidrolisado composto por 2,1 g/L de glicose, 15,7 g/L de xilose, 2,3 g/L de arabinose, 3,9 g/L de ácido acético, 0,06 g/L de furfural e 0,05 g/L de HMF. Após filtração e concentração sob vácuo a 70°C, o hidrolisado resultante continha 5,9 g/L de glicose, 50,2 g/L de xilose, 6,5 g/L de arabinose, 6,9 g/L de ácido acético, 0,03 g/L de furfural e 0,15 g/L de HMF em sua composição. O hidrolisado concentrado ainda foi submetido a um processo de destoxificação. Nesse procedimento, o pH foi elevado para 7,0 com CaO e reduzido para 5,5 com H₃PO₄, e carvão ativado foi adicionado na proporção de 2,4% (m/v), com posterior incubação a 200 rpm e 30°C por 1h. No fim de cada etapa, o precipitado foi removido por filtração a vácuo. Segundo os autores, a concentração de furfural e de HMF foi reduzida, mas a de ácido acético não foi significativamente afetada. Por sua vez, Sandri (2019), utilizando procedimento de destoxificação semelhante, verificou a remoção de 15% do ácido acético, 92% do HMF e 86% do furfural, porém houve perda de 12% de xilose.

Uma alternativa para solucionar os problemas relacionados à baixa concentração de açúcares nos hidrolisados de hemicelulose é integrar os processos de produção de etanol de primeira geração (a partir de caldo de cana e/ou melaço) e de segunda geração (a partir de biomassa lignocelulósica). Assim, a concentração de açúcares no hidrolisado pode ser aumentada misturando-o com melaço ou com caldo de cana antes da etapa de fermentação (DE ANDRADE et al., 2013).

3.2 Características gerais do metabolismo de xilose por *Saccharomyces cerevisiae* recombinante e outras leveduras

Para que seja empregado na produção industrial de etanol 2G, um microrganismo deve apresentar alta atividade fermentativa para carboidratos simples (hexoses e pentoses), altos rendimentos em etanol, resistência a estressores presentes no ambiente, habilidade de crescer em diferentes meios e facilidade para a introdução de modificações genéticas (ROBAK; BALCEREK, 2017).

O microrganismo mais comumente utilizado para obtenção de etanol 1G é a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em razão de sua robustez e alta produtividade (DE ANDRADE et al., 2013). No entanto, as cepas de *S. cerevisiae* selvagens não são capazes de metabolizar pentoses eficientemente, o que impossibilita sua utilização em processos de produção de etanol a partir de hidrolisados de hemicelulose. Embora a fermentação de pentoses seja realizada por outras leveduras, como *Kluyveromyces marxianus*, *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*, *Pachysolen tannophilus* e *Scheffersomyces shehatae*, elas ainda não foram exploradas em processos em larga escala, em razão da baixa produtividade em etanol (MOYSÉS et al. 2016; YUSUF; GAUR, 2017).

Dessa forma, grande parte dos trabalhos envolvendo a fermentação de pentoses por leveduras tem buscado o desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas assimiladoras de xilose (DEMEKE et al., 2013a,b; HOANG et al.; 2018; KOBAYASHI et al., 2018; LI et al., 2016; WANG et al., 2017). Há diferentes estratégias para que *S. cerevisiae* converta xilose em intermediários metabólicos que podem ser canalizados para a via das pentoses fosfato (VPF). A inserção do gene de xilose isomerase (XI), presente em bactérias, destaca-se por possibilitar que a xilose seja convertida diretamente em xilulose. Em seguida, a xilulose é fosforilada em xilulose-5-fosfato, que

é metabolizada pela VPF. Então, a molécula de xilulose-5-fosfato é convertida em gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato, intermediários da via glicolítica. Esses intermediários originam o piruvato, que, através de reações de fermentação alcoólica, forma o etanol (MATSUSHIKA et al., 2009; MOYSÉS et al., 2016; YUSUF; GAUR, 2017).

Embora inúmeros avanços com relação à assimilação de xilose por *S. cerevisiae* tenham sido alcançados, o transporte desse açúcar através da membrana celular ainda é uma limitação para sua utilização eficiente (YOUNG et al., 2010). A xilose é carregada para o interior das células de *S. cerevisiae* por meio de proteínas de transporte de hexoses, uma vez que a levedura não possui transportadores específicos para pentoses. No entanto, a maioria desses transportadores nativos tem alta preferência por glicose, o que pode provocar inibição no transporte de xilose. Além disso, os transportadores específicos de xilose encontrados em outros microrganismos possuem atividades muito baixas (MOYSÉS et al., 2016; WANG et al., 2016; YOUNG et al., 2010; YUSUF; GAUR, 2017). Assim, técnicas de engenharia evolutiva também podem ser aplicadas para obtenção de cepas que consumam xilose mais eficientemente (MOYSÉS et al., 2016; YUSUF; GAUR, 2017).

Dos Santos e colaboradores (2016) utilizaram engenharia evolutiva para obter duas linhagens capazes de consumir xilose e produzir etanol. Em experimentos em meio contendo extrato de levedura, peptona e xilose 30 g/L, a linhagem parental *S. cerevisiae* LVY27 não foi capaz de consumir xilose, enquanto as cepas recombinantes adaptadas LVY34.4 e LVY41.5 consumiram toda a xilose em menos de 24h. Os rendimentos em etanol foram próximos (0,46 g de etanol/g de xilose para LVY34.4 e 0,45 g de etanol/g de xilose para LVY41.5), com velocidade de consumo de xilose 28% maior para LVY34.4 (1,32 g/g/h).

Li e colaboradores (2016) inseriram o gene de XI do fungo *Orpinomyces* sp. e da bactéria *Prevotella ruminicola* na cepa industrial floculante *S. cerevisiae* YC-8, originando as linhagens YCOA1 e YCPA1, respectivamente. Em meio YPX 2% (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L e xilose 20 g/L), YCOA1 consumiu 10,93 g/L de xilose e produziu 4,33 g/L de etanol em 48h, resultando em produtividade e rendimento em etanol de 0,090 g/L/h e 0,396 g de etanol/g de xilose, respectivamente. A cepa YCPA1 apresentou desempenho levemente inferior, com consumo de xilose, produção de etanol, produtividade e rendimento em etanol de 10,30 g/L, 3,94 g/L, 0,082 g/L/h e 0,382 g

etanol/g de xilose, respectivamente. Por sua vez, a cepa adaptada YCPA2E assimilou 16,95 g/L de xilose e produziu 6,98 g/L de etanol em 48h (produtividade em etanol de 0,146 g/L/h e rendimento de 0,412 g de etanol/g de xilose), apresentando o melhor desempenho na fermentação de xilose em etanol.

Demeke e colaboradores (2013a) desenvolveram a cepa *S. cerevisiae* GS1.11-26 a partir da levedura industrial *Ethanol Red*, empregando técnicas de engenharia metabólica e evolutiva. Em meio sintético composto por extrato de levedura e peptona (YP) e 35 g/L de xilose como única fonte de carbono, a cepa consumiu toda xilose disponível em cerca de 17h com velocidade máxima de consumo de xilose 1,10 g/g_{MS}/h e de produção de etanol de 0,48 g/g_{MS}/h.

Mais recentemente, Tran e colaboradores (2021), através da combinação de técnicas de edição genética e de engenharia evolutiva, desenvolveram a linhagem XUSE, capaz de fermentar xilose pela via XI. Durante 72h de fermentação em meio sintético contendo 20 g/L de xilose, XUSE converteu 18,7 g/L de xilose em 8,3 g/L de etanol com rendimento de 0,44 g/g. Por sua vez, a linhagem XUSEA, que teve o metabolismo de xilose aprimorado através de modificações genéticas (inserção de uma cópia adicional do gene de XI e superexpressão de genes da VPF) na cepa XUSE, converteu 19,6 g/L de xilose em 9,0 g/L de etanol com rendimento de 0,46 g/g. A velocidade específica de consumo de xilose e de produção de etanol de XUSEA foram de 0,39 g_{xilose}/g_{MS}/h e 0,17 g_{etanol}/g_{MS}/h, respectivamente, correspondendo a aumentos de 26 e 21%, respectivamente, em comparação com os valores obtidos por XUSE (0,31 g_{xilose}/g_{MS}/h e 0,14 g_{etanol}/g_{MS}/h). Tais resultados encontram-se resumidos na Tabela 3.2.

Modificações genéticas vêm sendo amplamente aplicadas visando a obtenção de microrganismos assimiladores de pentose adequados para produção de etanol a partir de hidrolisados de hemicelulose (DEMEKE ET AL., 2013a,b; HOANG et al.; 2018; KOBAYASHI et al., 2018). Linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes têm alcançado rendimentos em etanol próximos aos teóricos na fermentação de xilose (DEMEKE et al., 2013a; DOS SANTOS et al., 2016; HOANG et al.; 2018; LI et al., 2016). No entanto, estudos em condições industriais de fermentação, que envolvem elevadas concentrações de açúcares redutores e de etanol e a presença de inibidores, são fundamentais para avaliar o verdadeiro potencial das linhagens recombinantes desenvolvidas e têm sido pouco abordados na literatura.

Tabela 3.2. Desempenho de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (células livres) em cultivos (batelada) em meio sintético contendo xilose.

<i>S. cerevisiae</i>	Xilose (g/L)	Conversão (%)	Rendimento ^a (g _{etanol} /g _{xilose})	Produtividade em etanol (g/gMS/h)	Referência
LVY34.4	30	100	0,46	0,62	Dos Santos et al. (2016)
LVY41.5	30	100	0,45	0,45	
YCOA1	20	54,7	0,396	0,43	Li et al. (2016)
YCPA1	20	51,5	0,382	0,45	
YCPA2E	20	84,8	0,412	0,70	
GS1.11-26	35	100	0,46	0,48	Demeke et al. (2013a)
XUSE	20	93,5	0,44	0,14	Tran et al. (2021)
XUSEA	20	98,0	0,46	0,17	

^aRendimento teórico: 0,511 g_{etanol}/g_{xilose}.

3.3 Inibidores e efeitos sobre o metabolismo celular

3.3.1 Inibidores presentes no hidrolisado ácido de hemicelulose

A presença de ácidos fracos, furaldeídos e compostos fenólicos limita a utilização eficiente dos hidrolisados de hemicelulose em processos fermentativos. De maneira geral, esses compostos inibem o metabolismo das células, afetando o desempenho da levedura (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; NOGUÉ; KARHUMAA, 2015).

Ácidos orgânicos fracos afetam a homeostase do pH intracelular (pHi). Em pH abaixo do pKa, os ácidos fracos ocorrem predominantemente na forma não dissociada, que é permeável à membrana celular. Após atingir o citosol (quase neutro), o ácido se dissocia, provocando uma redução no pHi. A célula consome ATP para expelir os íons H⁺ do citoplasma e elevar o pHi, o que leva a um aumento do consumo de energia para manutenção e a uma diminuição da quantidade de ATP disponível para o crescimento celular e outras funções metabólicas (DE ANDRADE et al., 2013; BELISSIMI et al., 2009). Em faixas de concentração de ácido típicas de hidrolisados lignocelulósicos, observa-se uma redução no rendimento de biomassa e especialmente na velocidade de consumo de xilose. O ácido acético é predominante, mas os ácidos fórmico e levulínico

também podem apresentar efeito inibitório significativo (NOGUÉ; KARHUMAA, 2015), devido ao menor tamanho da molécula do ácido fórmico e à maior lipofilicidade do ácido levulínico (LARSSON et al., 1999).

Em experimentos realizados com duas linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, Narendranath e colaboradores (2001) constataram uma redução exponencial no crescimento, no consumo de substrato e na produção de etanol e uma ampliação na duração da fase *lag* com o aumento da concentração de ácido acético em meio mínimo composto por sais minerais, glicose e vitaminas a 30°C. Belissimi e colaboradores (2009) observaram um impacto negativo acentuado e específico na velocidade de consumo de xilose em experimento realizado com a cepa recombinante *S. cerevisiae* RWB 218 em meio sintético contendo 20 g/L de glicose e xilose e 3 g/L de ácido acético a 30°C e pH 3,5. Após o esgotamento da glicose, a velocidade de consumo de xilose diminuiu drasticamente, restando 50% da xilose após 48h de fermentação.

Os efeitos dos furaldeídos, especialmente furfural e hidroximetilfurfural (HMF), sobre o metabolismo de microrganismos foram amplamente estudados (ALMEIDA et al., 2009; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Palmqvist e colaboradores (1999) observaram a inativação da replicação de *S. cerevisiae* sem inibição da atividade celular na presença de furfural. O furfural provocou a redução do rendimento de células em relação ao ATP, da velocidade de crescimento e da produtividade, tendo o crescimento se mostrado mais sensível ao composto do que a produção de etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Apesar do potencial inibitório, o furfural e o HMF podem ser metabolizados por *S. cerevisiae* e convertidos em álcoois menos tóxicos. Durante a fermentação, o furfural é reduzido com altos rendimentos a álcool furfúrico, causando uma fase *lag* na produção de etanol. Na presença de álcool furfúrico, foi constatada apenas uma ligeira inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (LARSSON et al., 1999; PALMQVIST et al., 1999). O HMF é convertido em álcool 5-hidroximetilfurfúrico a velocidades mais baixas que o furfural (aproximadamente quatro vezes). Por esse motivo, embora sua toxicidade seja menor, o efeito do HMF sobre as células é prolongado. Assim como o furfural, o HMF afeta as velocidades de crescimento e de fermentação e a extensão da fase *lag* (TAHERZADEH et al., 2000).

Compostos fenólicos também inibem a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos a etanol por *S. cerevisiae* (LARSSON et al., 2000). Embora presentes em níveis baixos em comparação aos compostos provenientes da degradação de

carboidratos, como o furfural e o HMF, os compostos fenólicos possuem potencial inibitório aproximadamente 10 vezes maior, principalmente os de baixo peso molecular (CLARCK; MACKIE, 1984). Adeboye e colaboradores (2014) classificaram 13 compostos fenólicos comumente encontrados em hidrolisados lignocelulósicos de acordo com o efeito no crescimento de *S. cerevisiae*. Os autores identificaram que a influência dos compostos fenólicos sobre a levedura seguiu três padrões principais. O grupo 1, formado por 4-hidroxi-3-metoxicinamaldeído, álcool homovanílico, vanilina, ácido siríngico e ácido dihidroferúlico, provocou prolongamento da fase *lag* e decréscimo na velocidade máxima específica de crescimento com o aumento da concentração até que o crescimento cessasse. O grupo 2, constituído por ácido p-cumarílico, hidroquinona, ácido ferúlico, ácido homovanílico e ácido 4-hidroxibenzoico, não causou acréscimo na fase *lag*, somente redução da velocidade máxima específica de crescimento com o aumento da concentração até que não houvesse mais crescimento. No grupo 3, composto por ácido vanílico, ácido gálico e vanilidenacetona, não houve alteração na duração da fase *lag* e na velocidade máxima específica de crescimento, que permaneceu constante até que se atingisse a concentração máxima tolerada pelas células (ADEBOYE et al., 2014). Os autores também observaram que a concentração que induz efeitos inibitórios é variável entre os compostos fenólicos e que diferentes compostos têm efeitos distintos não apenas na formação de biomassa, mas também na produção de etanol, acetato e glicerol.

Larsson e colaboradores (2000) estudaram a influência de 20 compostos aromáticos encontrados em diferentes hidrolisados de lignocelulose no crescimento e na produção de etanol de *S. cerevisiae* em meio definido contendo 20 g/L de glicose. Nas concentrações testadas (0,02, 0,20 e 1,00 g/L), a inibição do crescimento foi observada para todos os compostos examinados (vanilina, isovanilina, ortovanilina, catecol, hidroquinona, p-benzoquinona, ácido cinâmico, ácido p-cumarílico, ácido 4-metoxi-cinâmico, ácido 3-metoxi-cinâmico, ácido ferúlico, aldeído coniferílico, isoeugenol, eugenol, ácido 3-(3,4-dimetoxi-fenil)-propanoico, ácido 3,4-dimetoxi-cinâmico, ácido 3-hidroxi-4-metoxi-cinâmico e ácido 3,5-dimetoxi-cinâmico), exceto para ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinâmico e álcool coniferílico. O crescimento celular, determinado pelo rendimento de biomassa e pela velocidade de crescimento, foi mais influenciado pelos compostos inibidores do que o rendimento em etanol (LARSSON et al., 2000).

3.3.2 Etanol

Saccharomyces cerevisiae é um produtor natural de etanol, porém é sensível a altas concentrações do produto. Elevadas concentrações de etanol são altamente tóxicas para o crescimento e o metabolismo das células, sendo a principal razão de fermentações lentas e da conversão incompleta de açúcares (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; CHEN; XU, 2014; YANG et al., 2012).

O etanol se difunde livremente através da membrana celular e, em altas concentrações, afeta sua integridade e fluidez e aumenta a permeabilidade de íons, o que resulta em inibição do crescimento e redução da viabilidade das células. Além disso, ocorrem mudanças no fluxo de carbono para fornecer energia adicional para a manutenção das células. Como resultado, o metabolismo é desviado da via de produção de etanol para aumentar a produção de ATP (YANG et al., 2012).

Sandri e colaboradores (2018) estudaram a influência do etanol sobre a fermentação de xilose pela cepa recombinante *S. cerevisiae* MDS 130. Em experimentos realizados com células livres em meio contendo extrato de levedura, peptona e xilose (20 g/L) não suplementado e suplementado com 20 g/L de etanol, foram obtidas produtividades de 0,189 e 0,180 g/L/h e viabilidades de 98 e 97% no fim das fermentações, indicando que o etanol não foi tóxico ao metabolismo celular em concentrações abaixo de 20 g/L. Em contrapartida, os cultivos suplementados com 40 e 60 g/L de etanol alcançaram produtividades e viabilidades finais de 0,092 e 0,030 g/L/h e 88 e 33%, respectivamente, reforçando o efeito tóxico das altas concentrações de etanol sobre as células.

Mais recentemente, Perez e colaboradores (2021) analisaram o efeito do etanol e da sinergia entre etanol e inibidores do hidrolisado em experimentos conduzidos em batelada repetida com *S. cerevisiae* GSE16-T18 HAA1 imobilizada em alginato de cálcio. Em meio sintético contendo aproximadamente 20 g/L de extrato de levedura, 40 g/L de peptona, 19 g/L de glicose e 112 g/L de xilose (YPDX), as células reproduziram nove bateladas repetidas com conversão de açúcares superior a 90% e, após 123h de processo, apresentaram viabilidade de 85%. Por sua vez, em meio YPDX suplementado com 50 g/L de etanol, as células reproduziram apenas três bateladas repetidas com conversão total de açúcares. A exposição às altas concentrações de etanol por aproximadamente 24h foi suficiente para afetar o desempenho das células, que terminaram o processo de quatro

bateladas repetidas com 76% de viabilidade e conversão de açúcares de 60%. Entretanto, o pior cenário foi observado em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrado, nas mesmas concentrações de açúcares, extrato de levedura, peptona e etanol do experimento com meio YPDx suplementado com etanol. Apenas 6h de exposição ao etanol e aos inibidores presentes no hidrolisado foram suficientes para afetar o desempenho das células. Já na segunda batelada, a conversão de açúcares não passou de 40% e a viabilidade caiu para 43%, indicando o efeito sinérgico desses compostos.

3.4 Estratégias de cultivo para amenizar o efeito dos inibidores

3.4.1 Imobilização das células

A imobilização de microrganismos em suportes oferece um efeito de proteção às células em decorrência da formação de uma camada celular de sacrifício, que atua como uma barreira contra fatores externos nocivos; de um gradiente de concentração dos inibidores, devido às limitações de transferência de massa dentro da partícula; e de um microambiente no interior das partículas de biocatalisador (MILESSI et al., 2020a). Além disso, a imobilização facilita a recuperação das células para operação em batelada repetida e possibilita a utilização de elevadas densidades celulares. Todos esses fatores contribuem para o aumento da produtividade (AZHAR et al., 2017; MILESSI et al., 2020a,b; ZHAO; XIA, 2010). O suporte empregado na imobilização deve ser apropriado para preservar a viabilidade das células e ter permeabilidade adequada para a difusão de oxigênio, de nutrientes essenciais e de produtos e resíduos metabólicos através da rede polimérica (AZHAR et al., 2017).

Dentre os diferentes métodos de imobilização (adsorção, reticulação e encapsulamento, por exemplo) (AZHAR et al., 2017), o aprisionamento em polímeros naturais, como o gel de alginato, tem se mostrado um método eficaz, que permite a retenção simples e eficiente das células sem perda de suas propriedades inerentes (ANTUNES et al., 2019). Além disso, comparada com outros métodos, a imobilização com alginato de cálcio parece ser mais efetiva na redução do efeito de inibidores da fermentação, como o ácido acético e o furfural presentes nos hidrolisados de hemicelulose

(ZHAO; XIA, 2010). No entanto, o gel tem estabilidade mecânica limitada, que pode ser facilmente danificada pela produção intensa de dióxido de carbono, e enfraquecida pela presença de fosfatos (AZHAR et al. 2017; MISHRA et al., 2016).

Visando analisar o efeito protetor da imobilização, Milessi e colaboradores (2020a) realizaram experimentos com a cepa recombinante *Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18 na forma livre e imobilizada, na concentração de 50 g de células secas/L, em meio contendo extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, xilose 40 g/L e ácido acético 8 g/L. A produtividade alcançada com a levedura encapsulada (1,317 g/L/h) mais que dobrou em relação às células livres (0,638 g/L/h). Já em experimentos com hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar não destoxificado (21,4 g/L de glicose, 92,8 g/L de xilose, 7,8 g/L de arabinose, 4,7 g/L de manose, 7,6 g/L de ácido acético, 0,29 g/L de furfural e 0,67 g/L de hidroximetilfurfural) suplementado com ureia 2 g/L, Milessi e colaboradores (2020b) observaram que a levedura *S. cerevisiae* GSE16-T18 encapsulada apresentou melhor desempenho do que a livre, com rendimento de 0,47 g de etanol/ g de açúcares (28 g/L de etanol) e 0,40 g de etanol/ g de açúcares (24 g/L de etanol), respectivamente. Além disso, a viabilidade das células imobilizadas não foi alterada (99,6%), enquanto a das células livres caiu para 2% ao final do processo. Tais resultados confirmaram o efeito protetor do gel de alginato de cálcio.

A fim de fortalecer as partículas de biocatalisador e evitar a liberação de células, Mishra e colaboradores (2016) incubaram a cepa nativa *S. cerevisiae* NRRL2034 imobilizada em alginato de cálcio em solução de CaCl₂ 2,0% (m/v) separadamente por 16h (*normal bead*, NB) e 120h (*extra hardened bead*, EHB), proporcionando o aumento do tempo de reação com os íons de cálcio. O NB foi reutilizado em até 24 ciclos com rendimento em etanol médio de 69% do teórico, enquanto o EHB produziu etanol com rendimento médio de 73% do teórico por 36 ciclos. Em termos de fermentação, nos ciclos iniciais, o EHB foi um pouco mais lento em comparação com o NB, visto que a estrutura gelatinosa provavelmente se tornou mais compacta, resultando em menor porosidade e maior resistência à transferência de massa (MISHRA et al., 2016).

3.4.2 Temperatura

Uma das dificuldades no processo de obtenção de etanol é encontrar a condição ótima de temperatura de fermentação para maximização da produtividade, do rendimento, da concentração de etanol e da viabilidade celular e para minimização do custo energético (ALDIGUIER et al., 2004).

No estudo da influência da temperatura de fermentação sobre cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, Torija e colaboradores (2003) verificaram alteração no crescimento com a variação da temperatura durante experimentos realizados a 15, 20, 25, 30 e 35°C. A curva de crescimento usual, formada pelas fases *lag*, exponencial, estacionária e de declínio, foi observada a 25 e a 30°C. A 35°C, ocorreu morte mais acentuada, possivelmente em decorrência do maior acúmulo de etanol intracelular em temperaturas mais altas, que altera a estrutura da membrana e causa toxicidade às células. Já nas temperaturas de 15 e 20°C, a fase de declínio não foi observada e a fase estacionária durou até o final da fermentação. A temperatura também afetou o metabolismo das células. A concentração final de etanol diminuiu com o aumento da temperatura, em razão do aumento da formação de subprodutos por outras vias metabólicas, como glicerol e ácido acético, uma vez que o substrato foi consumido em totalidade.

A realização da fermentação em temperaturas inferiores às utilizadas nos processos convencionais aumenta a resistência da levedura ao etanol, resultando em vinhos com maior teor alcóolico e, conseqüentemente, demandando menor consumo de vapor durante a etapa de destilação (VELOSO et al., 2019).

Aldiguier e colaboradores (2004) estudaram os efeitos do etanol e da temperatura no comportamento dinâmico de *S. cerevisiae* durante a produção de etanol. Em experimentos realizados em batelada alimentada em cinco temperaturas diferentes, os autores identificaram concentrações de etanol críticas para a viabilidade das células. Até a concentração de etanol atingir o valor de cerca de 80 g/L a 27°C, 100 g/L a 30 e 33°C e 50 g/L a 36°C, mais de 90% das células encontravam-se viáveis. Acima deste valor, a viabilidade caiu drasticamente. A 39°C, observou-se uma rápida queda na viabilidade celular logo no início da fermentação. Como resultado do impacto da temperatura e da velocidade de produção de etanol na viabilidade celular e na produção de biomassa e de etanol, as temperaturas de 30 e 33°C levaram a melhores desempenhos, com produtividade média em etanol de 4 g/L/h, com pequeno benefício para o crescimento a 30°C e para a produção de etanol a 33°C.

Mais recentemente, Veloso e colaboradores (2019) avaliaram a fermentação em batelada alimentada em baixas temperaturas como forma de obter vinhos alcóolicos altamente concentrados. Em comparação com a fermentação realizada em condições operacionais próximas às empregadas nas destilarias brasileiras (temperatura de 34°C e concentração de substrato na alimentação de 180 g/L), os autores alcançaram um aumento de 64,4% na produção de etanol, correspondendo a uma concentração final de etanol de 134,7 g/L, na fermentação conduzida a 28°C com 305,4 g/L de sacarose na alimentação. A redução da temperatura de fermentação permitiu o aumento da concentração de substrato na alimentação e, conseqüentemente, da concentração de etanol no vinho, em decorrência do aumento da resistência da levedura ao etanol, uma vez que temperaturas mais baixas dificultam o transporte de substâncias tóxicas para o interior das células. No entanto, a produtividade caiu de 10,15 g/L/h a 34°C para 4,99 g/L/h a 28°C, o que pode comprometer a viabilidade econômica do processo conduzido à baixa temperatura.

3.5 Reatores de leito fixo para produção de etanol 2G

Biorreatores de leito fixo são amplamente utilizados na indústria bioquímica em razão de sua eficiência, do baixo custo de construção e operação e da facilidade de automação, operação e manutenção (GRUBECKI, 2018; KARAGOZ et al., 2019; RIVALDI et al., 2008).

Esse equipamento consiste em um reator no qual células (ou enzimas) imobilizadas são empacotadas em um leito através do qual o meio de cultivo é escoado (KARAGOZ et al., 2019). Comparados aos biorreatores tipo tanque agitado, os biorreatores de leito fixo oferecem menor risco de desintegração das partículas de biocatalisador por cisalhamento mecânico (GRUBECKI, 2018). Entretanto, sua capacidade de mistura é limitada e pode haver formação de caminhos preferenciais de escoamento no interior do leito, prejudicando a conversão de substrato (KARAGOZ et al., 2019; CASCAVAL et al., 2011).

Em processos empregando biorreatores de leito fixo, o meio de cultivo pode ser alimentado e retirado continuamente, configurando modo de operação contínuo. Também é possível conduzir o processo com volume definido de meio, sem adição de nutrientes e remoção de produtos até que a fermentação seja concluída (modo de operação em

batelada) (KARAGOZ et al., 2019). O biorreator de leito fixo pode ser ainda operado em bateladas repetidas. Dessa forma, o microrganismo pode ser reutilizado em um novo ciclo de fermentação sem a necessidade de centrifugação, reduzindo o tempo e o custo do processo e, conseqüentemente, melhorando a produtividade (MILESSI et al., 2020a).

Mishra e colaboradores (2016) estudaram a produção de etanol lignocelulósico em reator de leito fixo operado em modo contínuo a 30°C utilizando *Saccharomyces cerevisiae* GSE1618 (recombinante) imobilizada em alginato de cálcio (cerca de 70% do volume total do leito). A partir da alimentação de meio sintético (glicose 60 g/L e xilose 30 g/L) seguida da alimentação de hidrolisado de palha de arroz não destoxificado (69,85 g/L de glicose, 13,77 g/L de xilose, 1,42 g/L de ácido acético, 0,52 g/L de furfural e 0,46 g/L de HMF) a uma taxa de diluição máxima de 0,61 h⁻¹, os autores obtiveram uma concentração máxima de etanol de 42,72 g/L com rendimento de 99,96% do teórico e uma produtividade máxima de 26,06 g/L/h.

Mais recentemente, Perez e colaboradores (2021) também utilizaram um reator de leito fixo operado em modo contínuo a 35°C para realizar a fermentação de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto concentrado (46,45 g/L de xilose, 7,36 g/L de glicose, 5,86 g/L de arabinose, 8,27 g/L de ácido acético, 0,18 g/L de furfural e 0,15 g/L de HMF e 2,45 g/L de compostos fenólicos), suplementado com extrato de levedura e peptona, por *S. cerevisiae* GSE16-T18 HAA1 imobilizada em alginato de cálcio. Após aproximadamente 4,3 tempos de residência, a produtividade e o rendimento em etanol atingiram valores de 1,86 g/L/h e 0,33 g/g, respectivamente, seguidos por um declínio acentuado. A concentração máxima de etanol foi de apenas 8,89 g/L. O processo fermentativo foi interrompido após aproximadamente 16 tempos de residência com 24% de viabilidade das células. Tal comportamento foi atribuído ao efeito sinérgico dos inibidores presentes no hidrolisado e do etanol, intensificado pelo tempo de exposição, sobre as células da levedura.

Por sua vez, Milessi e colaboradores (2020b) conduziram a fermentação de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto concentrado (100,0 g/L de xilose, 9,7 g/L de glicose, 6,5 g/L de ácido acético, 0,368 g/L de furfural e 0,016 g/L de HMF), suplementado com extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L), em batelada, utilizando um reator de leito fixo. As células de *S. cerevisiae* GSE16-T18, imobilizadas em alginato de cálcio, assimilaram 96,0% dos açúcares disponíveis no meio (após a diluição provocada pela adição das partículas de biocatalisador), atingindo uma

concentração de etanol de 17,6 g/L, com produtividade e rendimento em etanol de 4,4 g/L/h e 0,39 g/g, respectivamente.

De maneira geral, a utilização de biorreatores de leito fixo favorece a viabilidade do processo, uma vez que esses reatores apresentam elevada conversão por peso de biocatalisador, alta produtividade e custo reduzido de operação e manutenção, devido à capacidade de operação por longos períodos e à facilidade de recuperação do biocatalisador, consistindo em uma boa opção para a produção de bioetanol (MILESSI et al., 2020a).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismo e inóculo

Nos ensaios fermentativos, foram utilizadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18 (DEMEKE et al., 2013a,b), GSE16-T18 HAA1 (MEIJNEN et al., 2016) e MDS 130 (LIAO et al., 2020), desenvolvidas e gentilmente cedidas pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Johan M. Thevelein (KU Leuven/VIB, Bélgica).

Inicialmente, uma alçada da cultura estoque, armazenada em criotubos e mantida em ultrafreezer a -80°C , foi estriada em placa contendo extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, xilose 20 g/L e ágar 1,5% m/v. A placa foi incubada a 35°C por aproximadamente 48h. Em seguida, uma colônia isolada foi transferida para 30 mL de meio YPDX 2% (extrato de levedura 10 g/L, peptona 20 g/L, glicose 10 g/L e xilose 10 g/L) suplementado com ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$, para evitar a proliferação de bactérias em caso de contaminação. A suspensão foi colocada em incubadora rotatória a 200 rpm e 30°C e, quando a densidade óptica desejada, referente à fase exponencial de crescimento, foi alcançada, 10 mL foram transferidos para 250 mL de meio YPDX 2% suplementado com ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$. A suspensão resultante foi mantida em incubadora rotatória a 200 rpm e 30°C até atingir a densidade óptica desejada, relativa à fase exponencial de crescimento. As células foram recuperadas por centrifugação (4500 rpm e 4°C por 30 min) (MILESSI, 2017).

4.2 Imobilização das células

A imobilização foi realizada conforme procedimento descrito por Da Silva (2013) e Milessi (2017). A suspensão de biomassa concentrada obtida após a centrifugação foi adicionada na proporção de 10 % m/m a uma solução contendo alginato de sódio 1% m/m. A suspensão resultante, contendo células e alginato, foi então gotejada em solução de coagulação (CaCl_2 0,25M e MgCl_2 0,25M), de modo a se formarem os *beads*. Ao final da imobilização, os *beads* foram recolhidos por peneiramento e mantidos a 4°C por 12h

em solução de cura (extrato de levedura 20 g/L, peptona 40 g/L, CaCl₂ 4 g/L, pH 5,6) ou por 120h em solução de cura suplementada com CaCl₂ 2,0% m/v (MISHRA et al., 2016).

4.3 Meios fermentativos

Nos ensaios, foram usados sete meios fermentativos, listados a seguir. A utilização de diferentes meios está relacionada com a estratégia experimental adotada, detalhada na seção 4.5.

1. Extrato de levedura, peptona, glicose, xilose e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (YPDXHB);
2. Extrato de levedura, peptona, glicose e xilose (YPDX);
3. Extrato de levedura, peptona, frutose e xilose (YPFX);
4. Extrato de levedura, peptona, sacarose e xilose (YPSX);
5. Extrato de levedura, peptona, sacarose e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (YPSHB);
6. Extrato de levedura, peptona, melão e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (YPMHB);
7. Melão e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (MHB).

A composição do melão e dos hidrolisados de hemicelulose empregados na formulação dos meios é apresentada nas Tabelas 4.1 e 4.2, respectivamente. Os hidrolisados de hemicelulose foram produzidos pela equipe do Prof. Dr. Sílvio Silvério da Silva, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), por hidrólise ácida de bagaço de cana-de-açúcar, conforme procedimento descrito por Milessi e colaboradores (2013). O bagaço de cana-de-açúcar usado para obtenção do hidrolisado e o melão foram cedidos pela Ipiranga Agroindustrial (Descalvado, SP).

Tabela 4.1. Composição (g/L) do melão.

Sacarose	Frutose	Glicose
718,20	79,25	79,25

Tabela 4.2. Composição (g/L) do hidrolisado ácido de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado).

Lote	Glicose	Xilose	Arabinose	Ácido acético	Furfural	HMF
1	1,69	19,46	1,11	4,60	0,302	0,006
2	1,17	15,00	1,82	4,51	0,130	ND

ND: não detectado.

Foram formulados meios YPDXHB e MHB com concentração de açúcares fermentáveis (AF) de aproximadamente 100 g/L (Tabela 4.3) e meios YPSX, YPSHB, YPMHB e MHB com concentração de AF de aproximadamente 220 g/L (Tabela 4.4). Também foram preparados meios MHB, YPDX, YPFX e YPSX com concentração de AF de aproximadamente 220 g/L (Tabela 4.5) para estudos complementares. Na formulação dos meios YPDXHB, MHB1 e MHB2 (Tabela 4.3) e dos meios YPSHB, YPMHB e MHB3 (Tabela 4.4), foi empregado o hidrolisado de hemicelulose do lote de número um (Tabela 4.2), enquanto, na formulação do meio MHB4 (Tabela 4.5), foi usado o hidrolisado de hemicelulose do lote de número dois.

Tabela 4.3. Composição (g/L) dos meios YPDXHB, MHB1 e MHB2.

Componente	YPDXHB	MHB1 ^a	MHB2 ^b
Extrato de levedura	10	-	-
Peptona	20	-	-
Sacarose	-	63,77	61,22
Frutose	-	6,09	5,94
Glicose	9,28	6,94	6,78
Xilose	88,76	17,18	16,17
Arabinose	0,80	0,98	0,92
Ácido acético	3,33	4,06	4,11
Furfural	0,219	0,267	0,251
HMF	0,004	0,005	0,005
AF	98,04	97,34	93,33

^a: meio usado em ensaio com as cepas GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130 em minirreatores;

^b: meio usado em ensaio com a cepa MDS 130 em reator de leito fixo.

Tabela 4.4. Composição (g/L) dos meios YPSX, YPSHB, YPMHB e MHB3.

Componente	YPSX^a	YPSX^b	YPSHB	YPMHB^a	YPMHB^b	MHB3^a	MHB3^b
Extrato de levedura	20	20	20	20	20	-	-
Peptona	40	40	40	40	40	-	-
Sacarose	188,19	181,44	189,99	160,26	151,62	169,98	158,67
Frutose	-	-	5,05	13,11	12,11	15,46	14,01
Glicose	-	-	3,72	14,36	16,10	12,93	14,37
Xilose	18,87	20,97	12,51	12,50	13,26	16,68	17,88
Arabinose	-	-	0,71	0,71	0,75	0,95	1,02
Ácido acético	-	-	2,96	2,95	3,13	3,94	4,23
Furfural	-	-	0,194	0,194	0,206	0,259	0,278
HMF	-	-	0,004	0,004	0,004	0,005	0,006
AF	216,96	211,96	221,27	208,66	201,07	224,00	213,28

^a: meio usado em ensaio com as cepas GSE16-T18 e GSE16-T18 HAA1 em minirreatores;

^b: meio usado em ensaio com a cepa MDS 130 em minirreatores.

Tabela 4.5. Composição (g/L) dos meios MHB4, YPDX, YPFX e YPSX.

Componente	MHB4	YPDX	YPFX	YPSX
Extrato de levedura	-	20	20	20
Peptona	-	40	40	40
Sacarose	179,30	-	-	177,18
Frutose	8,06	-	187,34	-
Glicose	17,66	185,96	-	-
Xilose	12,00	18,02	18,16	19,16
Arabinose	1,46	-	-	-
Ácido acético	3,60	-	-	-
Furfural	0,104	-	-	-
HMF	ND	-	-	-
AF	226,46	203,98	205,05	205,67

ND: não detectado.

Para a preparação dos meios contendo melaço (YPMHB, MHB1, MHB2, MHB3 e MHB4), cuja composição é detalhada nas Tabelas 4.3, 4.4 e 4.5, foi adotado um procedimento específico, em razão da dificuldade de manipular o melaço, que é altamente viscoso. Primeiramente, o melaço era aquecido em banho-maria até aproximadamente 50°C. Então, com auxílio de duas provetas, os volumes de melaço e de hidrolisado de hemicelulose, previamente calculados com base na concentração de AF (100 ou 220 g/L)

e no volume de meio desejados, eram transferidos para um frasco reagente com tampa, sendo o hidrolisado de hemicelulose usado para remover o excedente de meloço da respectiva proveta. Após homogeneização, a concentração de AF era, ainda, checada por análise com ácido 3-dinitrosalicílico (DNS) (SAQIB; WHITNEY, 2011) ou Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência (CLAE). No caso do meio YPMHB, a mistura de meloço e hidrolisado de hemicelulose era posteriormente suplementada com extrato de levedura e peptona.

Todos os meios foram submetidos a ajuste de pH até 5,6 e suplementados com CaCl_2 4 g/L.

4.4 Ensaios fermentativos

4.4.1 Ensaios em minirreatores

Os ensaios em minirreatores foram realizados em tubos tipo Falcon com vedação e dotados de saída de gás para o ambiente (MESQUITA et al., 2021; MILESSI et al., 2020a,b). Os minirreatores (14 mL de volume total) foram preenchidos com 3 mL de meio fermentativo e 3 mL de *beads* e incubados a 35°C em condição estática (Figura 4.1). A fim de acompanhar as fermentações, os minirreatores foram pesados periodicamente em balança analítica. A diferença entre a massa inicial e a massa em cada tempo corresponde à massa de gás carbônico liberada. Também foi incluído um minirreator de controle, contendo o volume total (6 mL) de meio sem células imobilizadas, para monitoramento da perda de massa por evaporação e correção da perda de massa total, como mostrado na Equação 1 (MILESSI, 2017).

$$m_{CO_2} = (m_{reator_0} - m_{reator_t}) - (m_{controle_0} - m_{controle_t}) \quad (1)$$

Em que:

m_{CO_2} : massa de CO_2 liberada até o tempo da medida;

m_{reator_0} : massa do minirreator no tempo zero;

m_{reator_t} : massa do minirreator no tempo da medida;

$m_{controle_0}$: massa do controle no tempo zero;

$m_{controle_t}$: massa do controle no tempo da medida.

Figura 4.1. Fermentação em minirreatores.

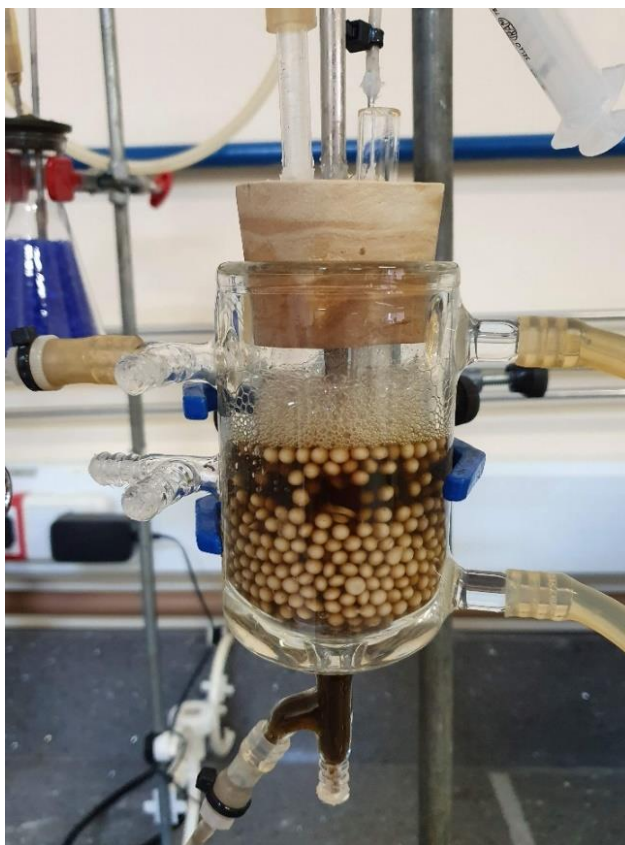


Quando a massa do minirreator se estabilizava, o meio fermentado era retirado por separação simples e meio fresco frio (4°C) era adicionado. A sequência de experimentos com reciclo de células era concluída quando o perfil de produção de CO₂ apresentava inclinação significativamente menor que os anteriores ou quando a perda de viabilidade das células era observada. No início e no fim de cada batelada, uma alíquota de meio foi coletada para quantificação de açúcares e metabólitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Também foi retirada uma amostra de *bead* ao final de cada batelada para análise de viabilidade.

4.4.2 Ensaio em reator de leito fixo

O ensaio em biorreator de leito fixo foi realizado em um reator encamisado, com vedação e dotado de amostrador, acesso para alimentação e retirada de meio (na parte inferior) e saída de gás para o ambiente (MILESSI et al., 2020a,b). O reator (5 cm de diâmetro) foi carregado com 40 g de *beads* e, com auxílio de uma bomba peristáltica, alimentado com 40 mL de meio. O processo fermentativo foi conduzido a 35°C em condição estática (Figura 4.2).

Figura 4.2. Fermentação em reator de leito fixo.



A fim de acompanhar as fermentações, alíquotas de meio foram retiradas para análise da concentração de açúcares redutores pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (SAQIB; WHITNEY, 2011). Ao fim de cada batelada, indicada pela ausência de açúcares na amostra, o meio fermentado era escoado e 40 mL de meio fresco frio (4°C) eram novamente bombeados para o interior do reator. Posteriormente, açúcares e metabólitos presentes nas amostras coletadas ao longo do processo fermentativo foram quantificadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Também foi retirada uma amostra de *bead* ao final do experimento para análise de viabilidade (MILESSI et al., 2020a).

4.5 Descrição da estratégia experimental

Inicialmente, foram realizados ensaios fermentativos com as três leveduras recombinantes (*Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130), imobilizadas e mantidas por 12h em solução de cura, em meios contendo

aproximadamente 100 g/L de açúcares fermentáveis (AF). Primeiramente, foi utilizado o meio YPDXHB, para analisar o desempenho das linhagens em meio contendo hidrolisado de hemicelulose bruto (não concentrado) em comparação com meios contendo hidrolisados concentrados, estudados por Perez (2021). Depois, foi usado o meio MHB1, a fim de avaliar o desempenho das cepas mediante estratégia de aumentar a concentração de açúcares fermentáveis do meio através da adição de melão ao hidrolisado não concentrado. Então, com base no desempenho das cepas em meio MHB1, o processo fermentativo foi escalonado em reator de leito fixo com a levedura que se destacou.

Posteriormente, visando atingir concentrações de etanol similares às alcançadas industrialmente, foram realizados ensaios fermentativos com as três leveduras recombinantes, imobilizadas e mantidas por 12h em solução de cura, em meios contendo aproximadamente 220 g/L de AF. Primeiramente, foi utilizado o meio sintético YPSX, isento de inibidores, como referência para estudar o comportamento das linhagens em condições de concentrações de etanol elevadas. Em seguida, foram usados os meios YPSHB e YPMHB, com a finalidade de analisar o desempenho das linhagens tendo o hidrolisado bruto (não concentrado) como fonte de xilose e o melão como fonte de sacarose. Nesse caso, o meio YPSHB foi empregado como meio de referência para avaliar os efeitos do melão sobre a fermentação.

Por fim, foi utilizado o meio MHB3, objetivando avaliar a performance das cepas no meio industrial de interesse para obtenção de etanol 2G e integração da produção de etanol 1G e 2G. Com base no desempenho das cepas em meio MHB3, a levedura que se destacou foi empregada em estudos complementares para analisar o efeito da condição de cura dos *beads* na tolerância ao etanol. Dessa forma, parte das células foi imobilizada e mantida por 12h em solução de cura (procedimento análogo ao adotado em todos os experimentos anteriores), enquanto outra parte das células foi imobilizada e mantida por 120h em solução de cura suplementada com CaCl_2 .

Outro conjunto de estudos fermentativos complementares foi conduzido especificamente com a cepa MDS 130 para investigar o metabolismo de xilose na presença de altas concentrações de hexoses. Nesse caso, as células da levedura, imobilizadas e mantidas por 12h em solução de cura, foram avaliadas nos meios YPDX, YPFX e YPSX, contendo aproximadamente 220 g/L de AF e razão entre as concentrações de pentose e hexoses de aproximadamente 1:10, em batelada simples.

Todos os experimentos foram realizados em bateladas repetidas, exceto os estudos complementares realizados com os meios YPDX, YPFX e YPSX, conforme procedimento descrito nas seções 4.1, 4.2 e 4.4, utilizando os meios descritos na seção 4.3.

4.6 Métodos analíticos

4.6.1 Concentração de células

A concentração de células livres (C_X) de *Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130 a ser imobilizada foi determinada por turbidimetria e correlacionada com a densidade ótica (DO), lida em espectrofotômetro ajustado ao comprimento de onda de 600 nm, através das curvas de calibração dadas nas Equações 2, 3 e 4, respectivamente. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas, após centrifugação, lavagem e ressuspensão das células em água destilada (MILESSI, 2017; SANDRI, 2019).

$$C_X = (0,490 \pm 0,014) \cdot DO \quad (2)$$

$$C_X = (0,555 \pm 0,007) \cdot DO \quad (3)$$

$$C_X = (0,624 \pm 0,010) \cdot DO \quad (4)$$

4.6.2 Viabilidade das células

Para analisar a viabilidade das células imobilizadas, inicialmente, os *beads* foram dissolvidos em citrato de sódio 8% m/v, na proporção de 100 mg de *beads*/mL de solução, sob agitação magnética. A viabilidade das células foi determinada por coloração das células não viáveis com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer, sendo definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) presentes em um espaço definido da câmara de contagem (DA SILVA, 2013).

4.6.3 Concentração de açúcares, metabólitos e inibidores

Xilose, glicose, frutose, sacarose, etanol, xilitol, glicerol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram quantificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando o cromatógrafo *Waters Breeze 2* equipado com detectores de índice de refração e de UV-visível. As análises de xilose, glicose, frutose, sacarose, etanol, xilitol e glicerol foram realizadas na coluna *Sugar-Pak I*, a 80°C, com EDTA cálcio (50 mg/L) em água Milli-Q a 0,5 mL/min. As concentrações de ácido acético foram determinadas na coluna *Aminex HPX87-H* conectada ao detector UV-visível (210 nm) com 0,6 mL/min de ácido sulfúrico (5mM) em água Milli-Q. Por fim, furfural e HMF foram quantificados na coluna *C-18 (Beckman)* conectada ao detector UV-visível (274 nm) usando 0,8 mL/min de acetonitrila/água Milli-Q 1:8 com 1% (v/v) de ácido acético. Antes das análises, as amostras foram centrifugadas a 14500 rpm e 4°C por 10 min e devidamente filtradas em membranas de 0,22 µm para remoção de sólidos insolúveis (MILESSI, 2017; MILESSI et al., 2020a).

4.7 Cálculos

4.7.1 Conversão

A conversão final de açúcares, X_f (%), foi calculada através da Equação 5 (SHULER et al., 2017).

$$X_f = \frac{C_{S_i} - C_{S_f}}{C_{S_i}} \cdot 100 \quad (5)$$

Em que:

C_{S_i} : concentração de açúcares no meio fermentativo no início da batelada (g/L) determinada por CLAE;

C_{S_f} : concentração de açúcares no meio fermentativo no fim da batelada (g/L) determinada por CLAE.

Por sua vez, a conversão de açúcares em função do tempo, X (%), foi determinada através da Equação 6.

$$X = \frac{m_{CO_2}}{m_{CO_2f}} \cdot X_f \quad (6)$$

Em que:

m_{CO_2f} : massa de CO_2 liberada durante a batelada.

4.7.2 Coeficiente de rendimento

O coeficiente de rendimento global em etanol, $Y_{P/S}$, foi determinado por meio da Equação 7 (SHULER et al., 2017).

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta C_P}{-\Delta C_S} = \frac{C_{P_f} - C_{P_i}}{C_{S_i} - C_{S_f}} \quad (7)$$

Em que:

C_{P_f} : concentração de etanol no meio fermentativo no fim da batelada (g/L) determinada por CLAE;

C_{P_i} : concentração de etanol no meio fermentativo no início da batelada (g/L) determinada por CLAE;

4.7.3 Produtividade

A produtividade volumétrica em etanol, Q_P (g/L/h), foi calculada usando a Equação 8 (SHULER et al., 2017).

$$Q_P = \frac{C_{P_f} - C_{P_i}}{\Delta t} \quad (8)$$

Em que:

Δt : tempo de duração da batelada (h).

4.7.4 Cálculo de pontuação para escolha da levedura com melhor desempenho

Para a escolha da levedura com melhor desempenho, os parâmetros produtividade em etanol, rendimento em etanol e viabilidade final das células em cada reciclo foram comparados através de testes de Tukey (nível de confiança de 95%), realizados no *software OriginPro*. Para fazer os testes de Tukey, erros relativos do processo fermentativo conduzido por Perez (2021), em duplicata, nas mesmas condições dos experimentos relatados no presente trabalho foram propagados. De acordo com os resultados dos testes de Tukey, cada parâmetro comparado entre as três leveduras foi pontuado da seguinte forma: para resultados com diferença significativa, foram atribuídas as pontuações 1 (maior valor), 0,5 (valor intermediário) e 0 (menor valor); no caso de somente uma média significativamente diferente, foram usados apenas os valores 1 e 0; para análises sem diferença significativa, não foram atribuídos pontos. A levedura com a maior soma total de pontos foi selecionada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos últimos anos, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes de última geração foram desenvolvidas pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Johan M. Thevelein (KU Leuven/VIB, Bélgica), visando aprimorá-las para utilização em processos industriais de produção de etanol 2G, que exigem assimilação eficiente dos açúcares fermentáveis, formação mínima de subprodutos (xilitol, glicerol e ácido acético) e tolerância ao etanol e aos inibidores presentes nos meios fermentativos. Como exemplo, têm-se as leveduras *S. cerevisiae* GSE16-T18 (T18), GSE16-T18 HAA1 (HAA1) e MDS 130 (MDS), utilizadas no presente trabalho.

A linhagem T18 foi geneticamente modificada para o consumo de xilose através da inserção de múltiplas cópias do gene de xilose isomerase (XI) de *Clostridium phytofermentans* na levedura industrial *Ethanol Red* e de técnicas de recombinação gênica (DEMEKE et al., 2013a,b). A fim de melhorar a tolerância da T18 ao ácido acético, técnicas de análise poligênica foram aplicadas para elucidar as bases genéticas da tolerância a esse ácido orgânico, identificando o gene HAA1. Uma mutação pontual foi inserida em duas cópias do alelo HAA1 da cepa T18, originando a linhagem HAA1 (MEIJNEN et al., 2016). A cepa MDS também descende da T18 e foi melhorada para fermentação de xilose e tolerância a inibidores (LIAO et al., 2020).

5.1 Caracterização das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* em meios fermentativos com 100 g/L de açúcares fermentáveis

A performance das três linhagens em meios fermentativos contendo aproximadamente 100 g/L de açúcares fermentáveis (AF) foi avaliada e os resultados são apresentados a seguir. Embora os meios YPDXHB, MHB1 e MHB2 tenham sido formulados com uma concentração de AF de aproximadamente 100 g/L (Tabela 4.3), a adição dos *beads* provoca uma diluição nos meios, de forma que, nos ensaios fermentativos relatados a seguir, a concentração de AF no reator era de, em média, 75 g/L.

5.1.1 Fermentação em meios contendo hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrados e não concentrados

A utilização de hidrolisados de hemicelulose concentrados para obtenção de etanol 2G tem sido abordada na literatura (ANTUNES et al., 2019; MILESSI et al., 2020a,b; PEREZ, 2021; PEREZ et al., 2021; ZHAO; XIA, 2010). Nesse contexto, Perez (2021) avaliou o desempenho das linhagens T18, HAA1 e MDS em hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrado bruto (HC) e destoxificado (HD), suplementados com extrato de levedura (Y) e peptona (P), em fermentações conduzidas nas mesmas condições do presente trabalho. Os principais resultados obtidos pela autora são apresentados na seção 5.1.1.1, para permitir comparação com o processo fermentativo em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (HB), conduzido no presente trabalho.

5.1.1.1 Estudos anteriores: fermentação em meios contendo hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrados

De acordo com Perez (2021), o processo fermentativo em meio formulado com HC, composto por 86,80 g/L de xilose, 9,15 g/L de glicose, 6,47 g/L de ácido acético, 0,37 g/L de furfural e 0,016 g/L de HMF, foi interrompido na sexta batelada repetida, quando a conversão de AF não ultrapassou 10, 20 e 40% para T18, HAA1 e MDS, respectivamente. O açúcar disponível no meio foi totalmente consumido apenas nos dois primeiros ciclos pela T18 e nos quatro primeiros ciclos pela HAA1 e pela MDS.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada ciclo em meio YPHC com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Com relação à produtividade em etanol, os valores variaram entre 3,44 e 5,15 g/L/h, 3,56 e 4,51 g/L/h e 3,51 e 5,07 g/L/h para T18, HAA1 e MDS, respectivamente, nas três primeiras bateladas e entre 0,26 e 1,40 g/L/h, 0,26 e 1,87 g/L/h e 0,46 e 1,79 g/L/h nas três últimas (PEREZ, 2021). A redução na produtividade reflete a perda de viabilidade das células. No fim do processo fermentativo, a porcentagem de células viáveis era de 35,0 para a T18, 30,0 para a HAA1 e 40,0 para a MDS. A análise estatística via teste de Tukey apontou diferença significativa

para os parâmetros produtividade em etanol e viabilidade final das células, com destaque para a MDS, e igualdade para o rendimento em etanol para as três leveduras na maioria das bateladas (PEREZ, 2021).

Tabela 5.1. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPHC com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100,

$$[AF]_{\text{reator}} = 75 \text{ g/L.}$$

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	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	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	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	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	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	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	13,49 ± 0,13	24,16 ± 0,23	0,46 ± 0,03 ⁿ	0,42 ± 0,04 ^w	40,0 ± 0,9 ^K

Q_P^{a-n}, Y_{P/S}^{o-w}, Viabilidade final^{x-k}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Fonte: Perez (2021).

Por sua vez, nas fermentações em meio formulado com HD (98,80 g/L de xilose, 7,60 g/L de glicose, 2,81 g/L de ácido acético, 0,011 g/L de furfural e 0,002 g/L de HMF), o perfil de conversão de AF foi semelhante para as três linhagens. Praticamente 100% do açúcar presente no meio foi consumido até o quarto reciclo, com redução para aproximadamente 80% de conversão a partir da quinta batelada. A Tabela 5.2 apresenta

os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPHD com as leveduras T18, HAA1 e MDS.

Tabela 5.2. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPHD com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100,

$$[AF]_{\text{reator}} = 75 \text{ g/L.}$$

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	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	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	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	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	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	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	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 ^{z,A}	73,0 ± 1,8 ^P
	MDS	13,37 ± 0,13	41,37 ± 0,40	0,64 ± 0,04 ^p	0,48 ± 0,02 ^A	88,0 ± 2,1 ^Q

Q_P^{a-q}, Y_{P/S}^{r-A}, Viabilidade final^{B-Q}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Fonte: Perez (2021).

Conforme reproduzido na Tabela 5.2, as produtividades em etanol permaneceram entre 6,72 e 8,64 g/L/h nos três primeiros ciclos, passando para 3,32; 4,33 e 4,63 g/L/h no quarto e não ultrapassando 0,64 g/L/h na sétima e última batelada repetida (PEREZ,

2021). As células de T18, HAA1 e MDS chegaram ao fim do processo com viabilidades de 82,0, 73,0 e 88,0%, respectivamente. A análise estatística via teste de Tukey apontou diferença significativa para os parâmetros produtividade em etanol e viabilidade final das células, com destaque para a T18, e igualdade para o rendimento em etanol para as três leveduras na maioria das bateladas (PEREZ, 2021).

5.1.1.2 Fermentação em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) suplementado com glicose e xilose

Introduzidos os resultados obtidos por Perez (2021) nas fermentações conduzidas em meios formulados a partir de hidrolisados de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrados, inicia-se a apresentação dos resultados referentes às fermentações de meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado), realizadas no presente trabalho.

Com o propósito de comparação, o meio YPDXHB foi formulado através da adição de xilose e glicose ao hidrolisado de hemicelulose não concentrado de forma que a composição em açúcares fosse compatível com a dos hidrolisados concentrados utilizados por Perez (2021). Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio YPDXHB, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.1. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células de cada ciclo encontram-se na Tabela 5.3.

Na Figura 5.1, observa-se que todas as linhagens reproduziram dez bateladas repetidas com consumo praticamente total dos açúcares fermentáveis (AF) presentes no meio. Entre as três linhagens, a HAA1 apresentou perfil de conversão de açúcares mais acelerado, seguida da MDS e da T18. Em todos os ciclos, a conversão de AF permaneceu acima de 95, 98 e 96% para T18, HAA1 e MDS, respectivamente.

Figura 5.1. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPD_{XHB} pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 75 g/L.

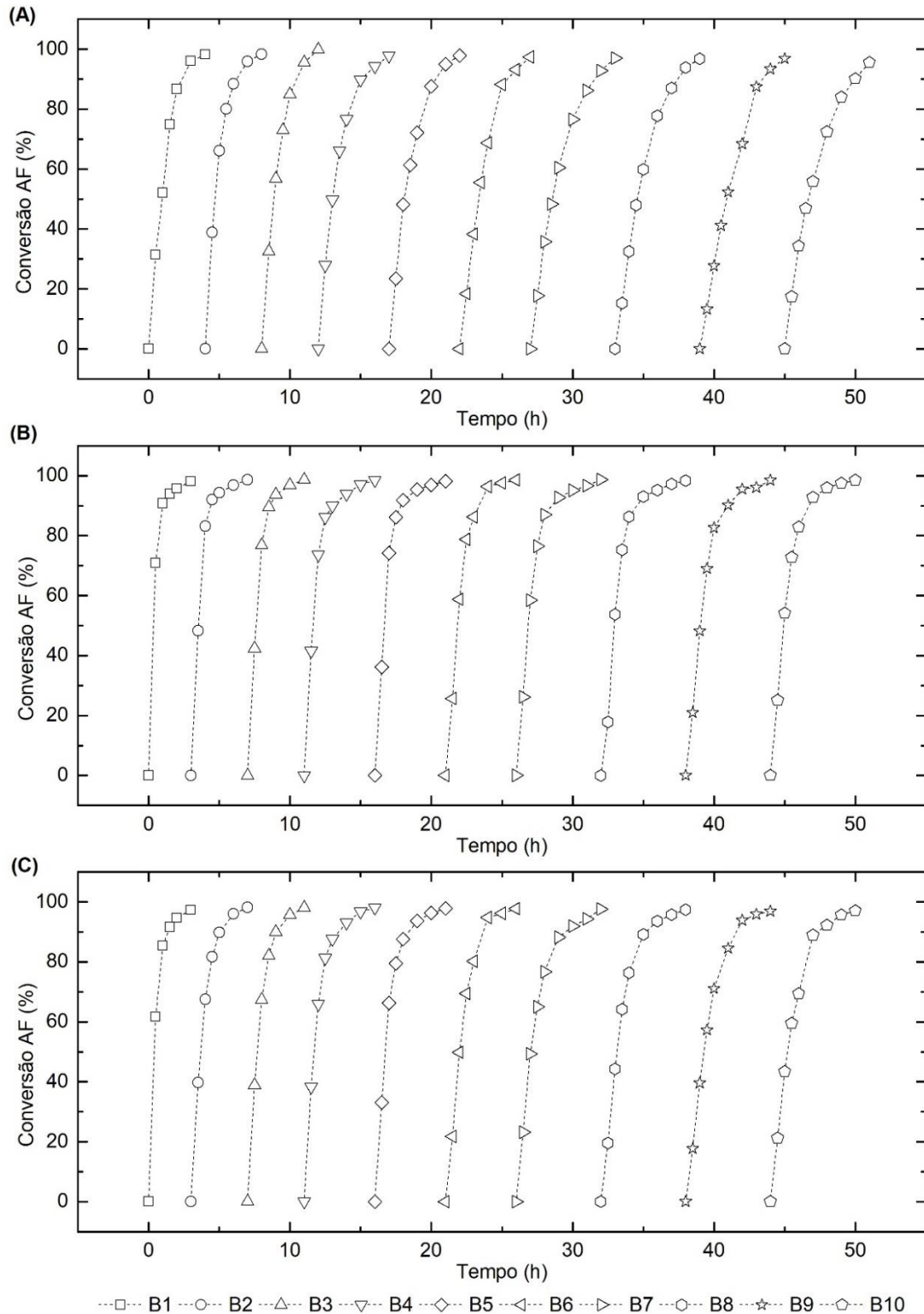


Tabela 5.3. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPD_{XHB} com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100,

$$[AF]_{\text{reator}} = 75 \text{ g/L.}$$

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	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	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	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	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 ± 0,12	47,70 ± 0,46	8,97 ± 0,01 ^j	0,49 ± 0,06 ^F	99,8 ± 0,4 ^T
	MDS	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	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	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	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	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 ± 0,21	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	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	15,46 ± 0,15	52,31 ± 0,51	7,37 ± 0,35 ^z	0,48 ± 0,01 ^{O,P}	91,0 ± 0,7 ^Z

Q_P^{a-z}, Y_{P/S}^{A-P}, Viabilidade final^{Q-Z}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Na Tabela 5.3, vê-se que as três leveduras mantiveram produtividades em etanol elevadas durante todas as bateladas, com valores entre 5,10 e 7,39 g/L/h para a T18, 7,77 e 9,53 g/L/h para a HAA1 e 6,92 e 9,88 g/L/h para a MDS. As linhagens apresentaram produtividades em etanol com diferença estatisticamente significativa em todas as bateladas, destacando-se a HAA1 e a MDS. As cepas alcançaram o último ciclo fermentativo com alta porcentagem de células viáveis (90,0, 86,2 e 91,0 para T18, HAA1 e MDS, respectivamente), porém com valores estatisticamente iguais em todas as bateladas. Em todos os ciclos, o rendimento em etanol ficou acima de 80% do teórico, sendo que também não houve diferença estatisticamente significativa entre as linhagens na maioria das bateladas. Além disso, a formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 2,0 g/L para as três leveduras.

O desempenho superior das cepas HAA1 e MDS já era esperado. As modificações genéticas necessárias para a expressão da enzima xilose isomerase (XI) tornaram a T18 menos tolerante a inibidores do metabolismo das células, como etanol e ácido acético (DEMEKE et al., 2013b). Assim, visando aumentar a tolerância da T18 ao ácido acético, Meijnen e colaboradores (2016) desenvolveram a cepa HAA1. Em fermentações em meio sintético composto por extrato de levedura, peptona e 20% de glicose, suplementado com ácido acético nas concentrações de 1; 1,2; 1,4; 1,6 e 2%, o desempenho da HAA1 foi consistentemente melhor do que o da T18. A fase *lag* foi consideravelmente reduzida, mas a velocidade de fermentação também foi melhorada. Da mesma forma, a cepa MDS, que também tem como precursora a T18, foi desenvolvida para maior eficiência no consumo de xilose e maior resistência a inibidores (LIAO et al., 2020).

O desempenho inferior nos meios YPHC e YPHD pode ser atribuído à maior concentração de inibidores nos hidrolisados concentrados. Zhao e Xia (2010) analisaram a composição de hidrolisado de hemicelulose de palha de milho antes e após o processo de destoxificação. O hidrolisado ácido, que originalmente continha 12,1 g/L de xilose, 0,9 g/L de glicose, 2,9 g/L de arabinose, 0,40 g/L de ácido acético e 0,08 g/L de furfural, teve as concentrações de xilose, glicose, arabinose e ácido acético aumentadas para 71,8; 4,8; 14,3 e 1,16 g/L, respectivamente, após as etapas de concentração e destoxificação. Apesar de o processo de destoxificação ter removido todo furfural e mais de 50% do ácido acético do hidrolisado concentrado (ZHAO; XIA, 2010), observa-se que a concentração de ácido acético no hidrolisado destoxificado ainda é maior do que no hidrolisado não concentrado. Na fermentação do hidrolisado concentrado e destoxificado, suplementado

com extrato de levedura, pela cepa recombinante *S. cerevisiae* ZU-10 imobilizada em alginato de sódio com diatomita, a levedura assimilou mais de 92,1% da xilose com rendimento em etanol acima de 0,393 g/g e produção máxima de etanol de 30,1 g/L durante cinco bateladas repetidas com duração de 72h cada, valores inferiores aos obtidos no presente trabalho (ZHAO; XIA, 2010).

O efeito inibitório dos compostos gerados no processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica sobre o metabolismo de *S. cerevisiae* é bastante relatado (ADEBOYE et al., 2014; ALMEIDA et al., 2009; ASK et al., 2013; BELISSIMI et al., 2009; LARSSON et al., 2000; NARENDRANATH et al., 2001; PALMQVIST et al., 1999; TAHERZADEH et al., 2000). Ácidos orgânicos fracos afetam o pH intracelular, o que resulta no aumento do consumo de energia para manutenção e na diminuição da quantidade de ATP disponível para o crescimento celular (DE ANDRADE et al., 2013; BELISSIMI et al., 2009). Na presença dos ácidos acético, fórmico e levulínico em concentrações características de hidrolisados lignocelulósicos, observa-se uma redução no rendimento em biomassa e na velocidade de consumo de xilose por *S. cerevisiae* (NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Por sua vez, furfural e hidroximetilfurfural provocam uma diminuição nas velocidades de crescimento e de fermentação e um prolongamento da fase *lag* na produção de etanol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TAHERZADEH et al., 2000). Já os compostos fenólicos afetam a integridade da membrana celular, prejudicando a função de barreira seletiva e de matriz enzimática (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Assim, embora o processo de destoxificação tenha sido eficaz na redução das concentrações de ácido acético, furfural e HMF, nada se pode afirmar quanto à eficiência na remoção de outros compostos inibidores presentes no hidrolisado concentrado, dado que não foram quantificados pela autora.

Quando se analisa a composição do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar destoxificado (HD), estudado por Perez (2021), percebe-se que as concentrações de ácido acético, furfural e HMF são inferiores às encontradas no hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (HB), utilizado no presente trabalho. Entretanto, conforme apresentado anteriormente, o desempenho do processo fermentativo conduzido em meio composto por HD foi inferior ao das fermentações em meio contendo HB. Assim, embora o ácido acético, o furfural e o HMF venham sendo extensivamente relatados como os principais responsáveis por

inibir o metabolismo das células de levedura (ALMEIDA et al., 2009; DE ANDRADE et al., 2013; BELISSIMI et al., 2009; LARSSON et al., 2000; NARENDRANATH et al., 2001; NOGUÉ; KARHUMAA, 2015; PALMQVIST et al., 1999; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000; TAHERZADEH et al., 2000), os resultados obtidos no processo fermentativo com meio formulado com hidrolisado bruto (não concentrado) sugerem que o desempenho inferior das fermentações em hidrolisados concentrados deve-se, possivelmente, a compostos inibitórios gerados no processo de hidrólise ácida, que tiveram suas concentrações aumentadas no processo de concentração por evaporação e que não foram removidos no procedimento de destoxificação empregado por Perez (2021), assim como à possível sinergia entre todos os inibidores, que se intensifica com o aumento da concentração.

Tendo em vista os resultados obtidos em hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e em hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar concentrado (destoxificado ou não), nos quais aproximadamente as mesmas concentrações máximas de etanol foram atingidas, percebe-se que os inibidores presentes nos hidrolisados concentrados (destoxificados ou não) impactam severamente o desempenho da levedura, diferentemente do que foi observado no processo fermentativo em hidrolisado não concentrado. Assim, a utilização do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) parece ser uma alternativa promissora para a produção de etanol 2G.

5.1.2 Fermentação em meio industrial contendo melaço e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado)

5.1.2.1 Estudos em minirreatores operados em batelada repetida

Os resultados obtidos nas fermentações em meio YPDXHB, descritos na seção 5.1.1, mostraram que o hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) pode ser empregado diretamente em processos fermentativos, sem afetar o desempenho da levedura. Entretanto, o meio YPDXHB não é adequado para processos em escala industrial, uma vez que o extrato de levedura e a peptona são insumos de custo relativamente alto. Além disso, a concentração de açúcares fermentáveis (AF)

próxima de 100 g/L foi alcançada através da adição de glicose e xilose, o que tampouco é viável em condições industriais. Por outro lado, as usinas brasileiras dispõem do melaço, um subproduto da produção de açúcar, rico em sacarose, que já é rotineiramente empregado na produção de etanol 1G. Dessa maneira, o meio industrial MHB1 foi formulado a partir da adição de melaço de cana-de-açúcar ao hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado).

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio MHB1, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.2. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células de cada reciclo encontram-se na Tabela 5.4.

Na Figura 5.2, observa-se que, assim como no processo fermentativo conduzido no meio YPDXHB (seção 5.1.1), todas as linhagens reproduziram dez bateladas repetidas com consumo praticamente total dos açúcares fermentáveis presentes no meio. Em todos os ciclos, a conversão de AF permaneceu acima de 98%.

Na Tabela 5.4, verifica-se que as três linhagens mantiveram produtividades em etanol elevadas durante todas as bateladas. As produtividades variaram entre 11,34 e 12,90 g/L/h até o terceiro reciclo, entre 7,89 e 9,89 g/L/h do quarto ao sétimo reciclo e entre 6,55 e 7,38 g/L/h da oitava à décima batelada repedida. A queda da produtividade em etanol acompanha a diminuição gradual da viabilidade das células, possivelmente devido à exposição prolongada ao etanol (MILESSI, 2017). Ainda assim, as linhagens alcançaram o último ciclo fermentativo com alta porcentagem de células viáveis (73,8, 87,6 e 80,0 para T18, HAA1 e MDS, respectivamente). Além disso, o rendimento em etanol permaneceu acima de 0,44 g de etanol/g de AF em todos os reciclos. A formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 2,0 g/L, para as três linhagens. A análise estatística via teste de Tukey apontou diferença significativa para os parâmetros produtividade em etanol e viabilidade final das células, com destaque para MDS e HAA1, respectivamente, e igualdade para o rendimento em etanol para as três leveduras na maioria das bateladas.

Figura 5.2. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB1 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 75 g/L.

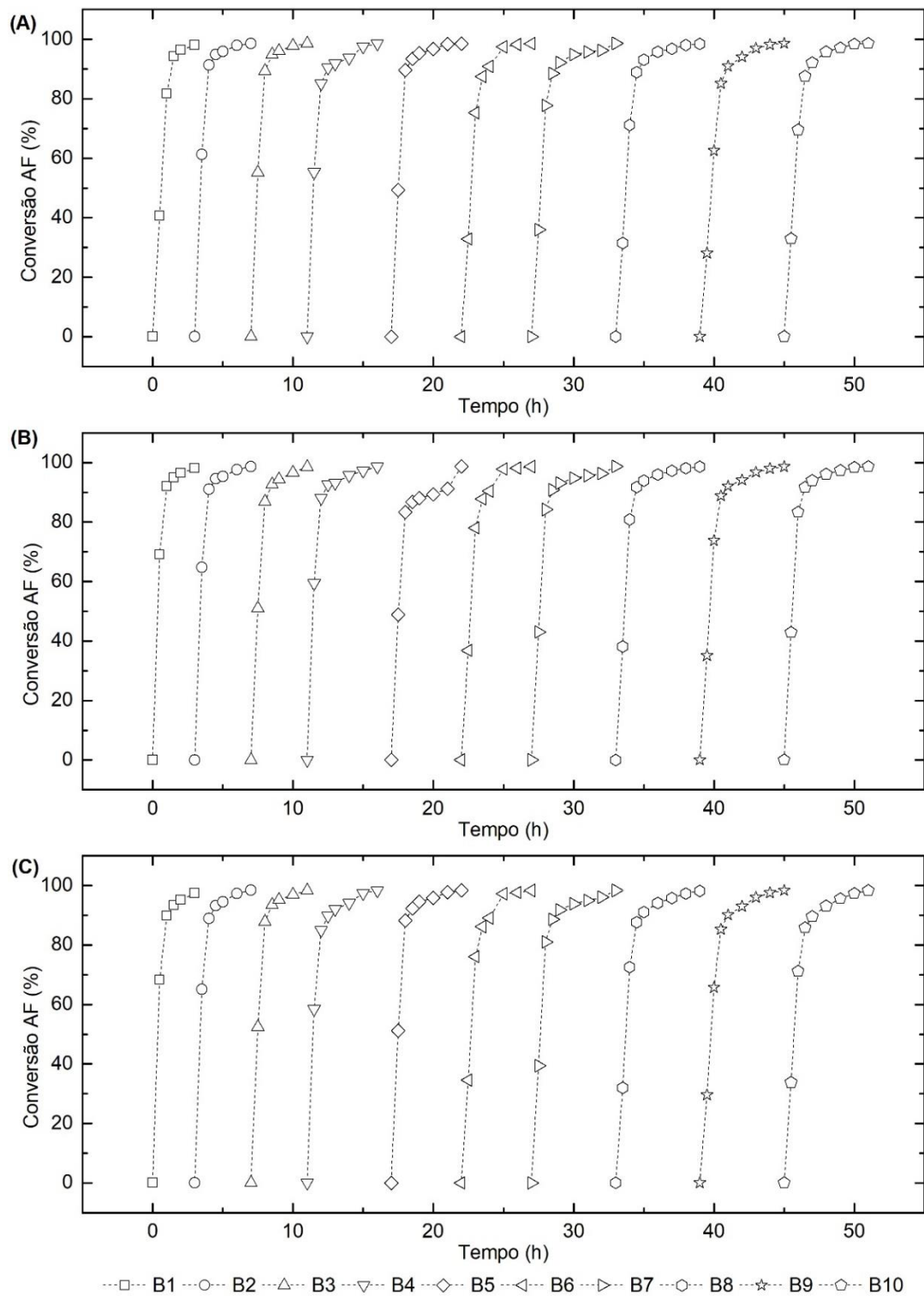


Tabela 5.4. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB1 com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100,

$$[AF]_{\text{reator}} = 75 \text{ g/L.}$$

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

Q_P^{a-s}, Y_{P/S}^{t-F}, Viabilidade final^{G-W}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Em comparação ao processo fermentativo conduzido em meio YPDXHB, verifica-se que, na presença de MHB1, as linhagens apresentaram perfil de conversão de açúcares mais acelerado, em razão da presença de melão no meio, resultando em menor tempo de fermentação e, conseqüentemente, maior produtividade. O melão é composto majoritariamente por sacarose (PALMONARI et al., 2020), açúcar hidrolisado por *S. cerevisiae*, através da enzima invertase presente na membrana periplasmática das células, em glicose e frutose, que são então fermentadas (BASSO et al., 2011). Além das hexoses, que são assimiladas com maior velocidade que as pentoses (PEREZ et al., 2021), o melão contém nutrientes que favorecem o metabolismo celular, o que explica aumento de produtividade em relação à alcançada no meio YPDXHB (Tabela 5.1).

Estudos sugerem ainda que a presença de hexoses no meio fermentativo pode aumentar a velocidade de consumo de pentoses por *S. cerevisiae* (DEMEKE et al., 2013a; HOANG et al., 2018; ROMANÍ et al., 2014). Hoang e colaboradores (2018) estudaram a cofermentação de glicose e xilose pela cepa recombinante *S. cerevisiae* XUSE. Nas primeiras 24h de fermentação em meio sintético contendo 20 g/L de xilose, a velocidade de consumo do açúcar foi de 0,29 g/L/h. Quando suplementado com 20 g/L de glicose, a velocidade de consumo de xilose aumentou para 0,34 g/L/h nas primeiras 24h do processo fermentativo. Demeke e colaboradores (2013a) também avaliaram a fermentação de xilose e de xilose e glicose pela cepa recombinante *S. cerevisiae* GS1.11-16. Em meio sintético composto por extrato de levedura e peptona (YP) e 35 g/L de xilose como única fonte de carbono, a cepa consumiu toda xilose disponível em cerca de 17h com velocidade máxima de consumo de xilose 1,10 g/g_{MS}/h e de produção de etanol de 0,48 g/g_{MS}/h. Já em meio YP contendo 36 g/L de glicose e 37 g/L de xilose, ambos os açúcares foram quase completamente consumidos em apenas 13h, resultando em uma produtividade em etanol de 1,4 g/g_{MS}/h. Romaní e colaboradores (2014) também realizaram experimentos em meio YP suplementado com 44,0 g/L de xilose e com 26,9 g/L de xilose e 17,3 g/L de glicose. Nas primeiras 48h de fermentação, as produtividades em etanol foram de 0,17 e 0,23 g/L/h para o meio contendo apenas xilose como fonte de carbono e para o meio suplementado com xilose e glicose. Em termos de produtividade, esses resultados também indicam a eficiência da assimilação de xilose pelas leveduras utilizadas e da estratégia de fermentação adotada (células imobilizadas, alta carga de células e alta concentração de substrato) nesta seção.

De acordo com Hoang e colaboradores (2018), no contexto da biorrefinaria lignocelulósica, o principal desafio na cofermentação de xilose e glicose não é a utilização simultânea dos açúcares, mas a melhoria da eficiência de fermentação da xilose. Tendo em vista o desempenho das leveduras em termos de produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células, percebe-se que a suplementação do hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar com melaço, visando aumentar a concentração de açúcares fermentáveis, aparenta ser uma alternativa viável para a obtenção de etanol 2G e a integração da produção de etanol 1G e 2G.

5.1.2.2 Estudo em reator de leito fixo operado em batelada repetida

Conforme demonstrado anteriormente, as fermentações conduzidas em meio MHB1 apresentaram desempenho superior às realizadas nos meios YPHC e YPHD. Assim, o meio MHB foi diretamente selecionado para o escalonamento do processo fermentativo em reator de leito fixo. Entretanto, quando se analisa o comportamento das leveduras nesses três meios industriais, percebe-se uma performance semelhante, com pequenas vantagens de uma determinada linhagem, dependendo do parâmetro avaliado. Dessa maneira, de acordo com os resultados dos testes de Tukey, apresentados nas Tabelas 5.2, 5.3 e 5.4, os parâmetros produtividade em etanol, rendimento em etanol e viabilidade das células de cada cepa em cada reciclo foram pontuados (Tabela 1, Apêndice). A Tabela 5.5 apresenta a pontuação final para cada levedura.

Considerando-se a pontuação total da Tabela 5.5, pode-se observar uma vantagem da MDS sobre as linhagens T18 e HAA1. Conforme já discutido, a cepa MDS foi desenvolvida a partir da T18 para maior eficiência no consumo de xilose e maior resistência a inibidores (LIAO et al., 2018), sendo esse, portanto, um resultado esperado. Dessa forma, a cepa foi selecionada, juntamente com o meio MH, para a fermentação em batelada repetida em reator de leito fixo, visando avaliar a escalabilidade e estabilidade do processo.

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com a linhagem MDS em meio MHB2 em reator de leito fixo, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.3. A Figura 5.4 mostra o perfil de consumo de açúcares e de produção de etanol referente ao primeiro ciclo do processo fermentativo (nas demais

bateladas, os perfis de consumo de açúcares e de produção de etanol foram semelhantes aos da primeira). Os resultados em concentração inicial e final de etanol e produtividade e rendimento em etanol de cada reciclo encontram-se na Tabela 5.6.

Tabela 5.5. Pontuação das leveduras T18, HAA1 e MDS nos meios industriais YPHC, YPHD e MHB1.

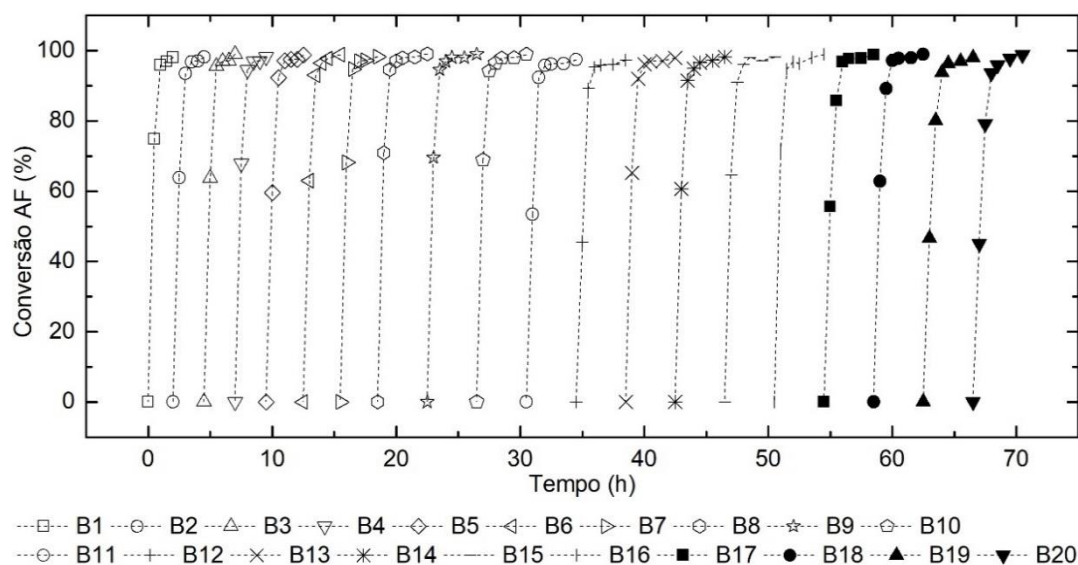
Cepa	YPHC	YPHD	MHB1	Total
T18	3,5	13	4	20,5
HAA1	4	4,5	10	18,5
MDS	11	8	6,5	25,5

Na Figura 5.3, observa-se que a levedura reproduziu 20 bateladas repetidas com perfil de conversão de açúcares fermentáveis (AF) semelhante. Em todos os reciclos, a conversão de AF ultrapassou 97%. Da mesma forma, as produtividades e os rendimentos em etanol mantiveram-se elevados durante todo o processo fermentativo. Como pode ser visto na Tabela 5.6, as produtividades foram superiores a 14,07 g/L/h, atingindo um máximo de 22,81 g/L/h, e o rendimento em etanol permaneceu acima de 70% do teórico. A formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 2,0 g/L. Ainda, as células chegaram ao fim do processo com viabilidade de aproximadamente 75%.

Comparando-se as Tabelas 5.4 e 5.6, observa-se uma diferença nas produtividades em etanol obtidas nas fermentações conduzidas em minirreator e em reator de leito fixo. Minirreatores demonstraram ser adequados para a obtenção de dados de fermentação confiáveis em escala de laboratório (MESQUITA et al., 2021; MILESSI et al., 2020a). Milessi e colaboradores (2020a) verificaram reprodutibilidade dos resultados obtidos em minirreator em relação ao reator de leito fixo no processo fermentativo conduzido nas mesmas condições do presente trabalho, porém utilizando xilose como principal substrato, açúcar mais lentamente assimilado que hexoses. Mesquita e colaboradores (2021) também obtiveram resultados reprodutíveis na fermentação de glicose em minirreator e em biorreator, porém empregando concentração inicial de células de 3,0 g/L, temperatura de 30°C e modo de operação em batelada simples. Dessa maneira, a diferença nas produtividades em etanol observadas nas Tabelas 5.4 e 5.6 deve-se, possivelmente, à dificuldade de acompanhamento das fermentações em menor escala nas condições empregadas no presente trabalho, que envolvem a fermentação de altas concentrações de sacarose, açúcar rapidamente assimilado pelas células de levedura,

presentes em alta concentração, em temperatura elevada e modo de operação em batelada repetida.

Figura 5.3. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em reator de leito fixo operado em bateladas repetidas pela levedura MDS em meio MHB2. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de *beads*: 40g, volume do reator: 100 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 75 g/L.

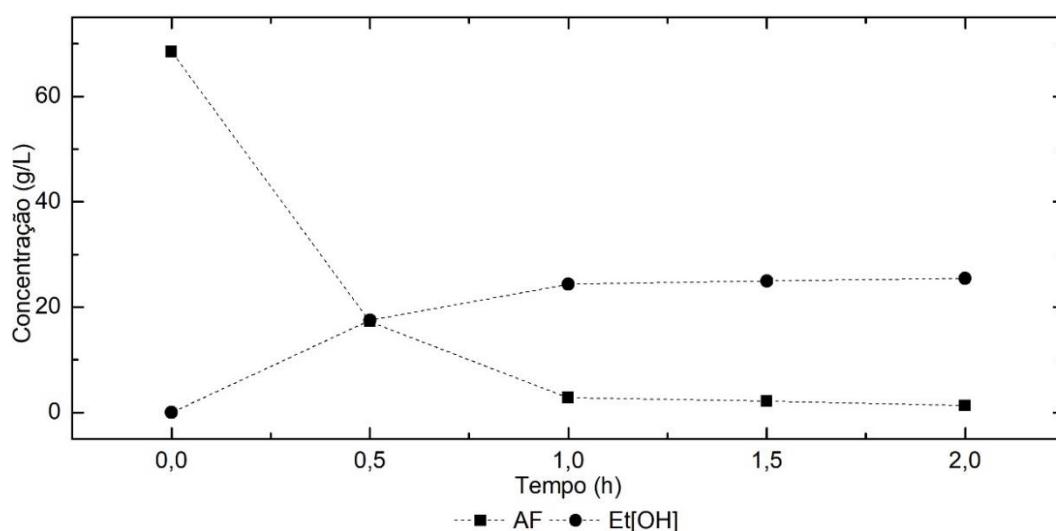


Especificadamente, uma das causas dessa dificuldade no monitoramento de fermentações rápidas pode estar relacionada à aquisição da massa do reator no tempo zero. Como a fermentação da sacarose acontece muito rapidamente, pode haver uma perda de massa de gás carbônico entre os momentos da adição de meio e da pesagem inicial. Ainda, a partir da segunda batelada repetida, mesmo o meio fresco estando a 4°C, o meio fermentado restante no minirreator e as partículas de biocatalisador estão em alta temperatura, o que favorece a velocidade da fermentação.

Além disso, durante o processo fermentativo, ocorre a expansão dos *beads*, devido à pressão provocada pela intensa produção de gás carbônico. Consequentemente, a velocidade de difusão do CO₂ para fora da partícula não reflete a velocidade de produção do gás, comprometendo o acompanhamento da fermentação. Também é observada a retenção de bolhas de gás carbônico entre as partículas de biocatalisador e o meio fermentativo. Como o CO₂ retido se desprende aos poucos, a velocidade de liberação não representa a velocidade de formação do gás, contribuindo também para a falsa impressão

de que o processo está ocorrendo mais lentamente. Assim, as células já podem ter atingido determinada conversão de açúcares, mas a massa de CO₂ liberada não corresponde a essa conversão. Por outro lado, no reator de leito fixo, o acompanhamento da fermentação é feito diretamente através da análise quantitativa de açúcares e metabólitos presentes nas amostras retiradas ao longo do processo.

Figura 5.4. Perfil de consumo de açúcares fermentáveis (AF) e de produção de etanol (Et[OH]) durante a primeira batelada em reator de leito fixo pela levedura MDS em meio MHB2. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de *beads*: 40g, volume do reator: 100 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 75 g/L.



Por fim, há uma limitação no controle da retirada de meio fermentado do minirreator. Enquanto, no reator de leito fixo, o meio é drenado através de uma saída na parte inferior do equipamento, no minirreator, o meio é retirado através de pipeta automática, processo dificultado pela presença dos *beads*. Dessa maneira, pode restar mais meio fermentado nos minirreatores, de modo que o acúmulo de etanol é maior e as células ficam expostas a maiores concentrações do produto ao longo dos ciclos. Como pode ser visto nas Tabelas 5.4 e 5.6, a concentração de etanol atingiu o máximo de 52,31 g/L no minirreator e de 47,16 g/L no reator de leito fixo. Mesquita e colaboradores (2021) observaram forte inibição do etanol sobre células de levedura, mesmo para cepas industriais e concentrações moderadas de etanol (30 g/L), causando perda de viabilidade e redução das velocidades de absorção de açúcar, fatores que interferem na produtividade em etanol.

Tabela 5.6. Concentração inicial e final de etanol e produtividade e rendimento em etanol para cada reciclo em meio MHB2 com a levedura MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 40 mL, massa de *beads*: 40g, volume do reator: 100 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 75 g/L.

Reciclo	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g/g)
1	0,00 ± 0,00	25,43 ± 0,25	16,12	0,36
2	7,77 ± 0,08	38,18 ± 0,37	20,27	0,45
3	8,79 ± 0,09	39,61 ± 0,39	20,55	0,45
4	8,22 ± 0,08	42,43 ± 0,41	22,81	0,49
5	15,30 ± 0,15	43,87 ± 0,43	19,05	0,48
6	10,34 ± 0,10	42,28 ± 0,41	21,29	0,48
7	8,10 ± 0,08	46,98 ± 0,46	19,44	0,51
8	5,74 ± 0,06	42,21 ± 0,41	18,24	0,47
9	10,01 ± 0,10	44,60 ± 0,43	17,30	0,47
10	9,11 ± 0,09	41,53 ± 0,40	16,21	0,46
11	14,26 ± 0,14	38,48 ± 0,37	15,96	0,50
12	17,23 ± 0,17	42,48 ± 0,41	14,07	0,49
13	9,03 ± 0,09	46,67 ± 0,45	18,82	0,48
14	10,39 ± 0,10	33,83 ± 0,33	16,22	0,46
15	8,57 ± 0,08	44,80 ± 0,44	18,12	0,50
16	6,83 ± 0,07	41,55 ± 0,40	17,36	0,46
17	12,89 ± 0,13	47,16 ± 0,46	17,14	0,49
18	8,53 ± 0,08	45,20 ± 0,44	18,31	0,48
19	12,28 ± 0,12	45,13 ± 0,44	16,43	0,47
20	13,09 ± 0,13	44,05 ± 0,43	15,48	0,43

No contexto da produção de etanol 2G em reator de leito fixo, Milessi e colaboradores (2020a) observaram queda significativa na produtividade em etanol e na viabilidade celular após apenas 12h de processo ao avaliarem a fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar bruto concentrado (100,0 g/L de xilose, 9,7 g/L de glicose, 6,5 g/L de ácido acético, 0,368 g/L de furfural e 0,016 g/L de HMF), suplementado com extrato de levedura e peptona. Ao longo de três bateladas repetidas, conduzidas nas mesmas condições do presente trabalho, a levedura T18 converteu praticamente todo o açúcar presente no meio com rendimento em etanol entre 0,32 e 0,35 g de etanol/g de açúcares. A concentração máxima de etanol atingida ficou próxima de 30 g/L (no último reciclo) e a produtividade foi de 4,6; 3,5 e 2,9 g/L/h no primeiro, segundo e terceiro ciclos, respectivamente.

Fermentações empregando meios formulados a partir da mistura de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar e melaço são pouco relatadas na literatura. Farias e Maugeri Filho (2019) estudaram a fermentação de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto concentrado e melaço (100 g/L de AF no meio fermentativo) por diferentes combinações de cepas fermentadoras de xilose e de hexoses (glicose e frutose). A maior produtividade em etanol (4,44 g/L/h) foi obtida usando as cepas selvagens *Spathaspora passalidarum* e *Saccharomyces cerevisiae*. Nessa situação, 30,2 g/L de etanol foram produzidos com rendimento de 0,296 g de etanol/g de açúcares. Por outro lado, a maior concentração de etanol (49,2 g/L com rendimento de 0,472 g de etanol/g de açúcares) foi obtida com a cepa selvagem *Scheffersomyces stipitis* e uma cepa mutante de *S. cerevisiae*. Entretanto, a produtividade em etanol foi de 0,6 g/L/h, devido ao baixo desempenho da cepa mutante.

Conforme apresentado anteriormente, mesmo após 70h de operação em alta concentração de açúcares e de etanol (concentração máxima atingida de 47 g/L), o processo fermentativo utilizando a levedura MDS e meio formulado a partir de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melaço, conduzido em reator de leito fixo, manteve-se estável, com produtividades e rendimentos em etanol elevados. Esses resultados são promissores e mostram a robustez do processo.

5.2 Caracterização das linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* em meios fermentativos com 220 g/L de açúcares fermentáveis

A concentração final de etanol alcançada nos meios MHB1 e MHB2 (seção 5.1.2), que possuíam cerca de 100 g/L de açúcares fermentáveis (AF), foi de aproximadamente 50 g/L nas últimas bateladas. No entanto, na produção industrial de etanol 1G, procura-se operar com concentração de AF em torno de 200 g/L, a fim de alcançar uma concentração de etanol acima de 9 % (v/v) (aproximadamente 70 g/L) ao final de cada batelada (VELOSO et al., 2019) e reduzir o impacto da destilação no custo do processo. Assim, a performance das três linhagens em meios fermentativos contendo aproximadamente 220 g/L de AF (Tabela 4.4) foi avaliada e os resultados são

apresentados a seguir. Devido à diluição causada pela adição dos *beads*, a concentração de AF no reator era de 155 g/L, em média.

5.2.1 Fermentação em meio de referência contendo sacarose e xilose

A condução de fermentações em meio sintético, isento de inibidores, é fundamental para avaliar o desempenho das leveduras na presença de altas concentrações de açúcar e, conseqüentemente, de altas concentrações de etanol, e também para analisar o desempenho das células em meios industriais, por meio da comparação entre os dois meios fermentativos. Dessa maneira, foram realizados ensaios fermentativos em meio sintético composto por extrato de levedura, peptona, sacarose e xilose, simulando a composição em açúcares fermentáveis (AF) que seria obtida a partir da mistura de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melaço para fermentação em condições industriais.

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio de referência YPSX, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.5. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol de cada reciclo e viabilidade final das células encontram-se na Tabela 5.7.

Na Figura 5.5, observa-se que as linhagens T18 e HAA1 reproduziram quatro bateladas repetidas com consumo praticamente total dos açúcares fermentáveis (AF) presentes no meio. Em todos os ciclos, a conversão de AF foi superior a 96% para as duas linhagens. Por sua vez, a linhagem MDS reproduziu cinco bateladas repetidas. No entanto, a conversão de açúcares ficou abaixo de 92% em todas elas, em razão de a levedura ter consumido apenas parte da xilose presente no meio. A conversão de xilose não ultrapassou 18%, o que não era esperado, tendo em vista que a MDS foi desenvolvida a partir da T18 justamente para ser mais eficiente na assimilação desse açúcar (LIAO et al., 2020) e que a cepa consumiu a xilose em meio contendo sacarose, com concentração de açúcares fermentáveis inferior (seção 5.1.2). Entretanto, sabe-se que modificações genéticas podem afetar características presentes na levedura parental (DEMEKE et al., 2013a).

Figura 5.5. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPSX pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

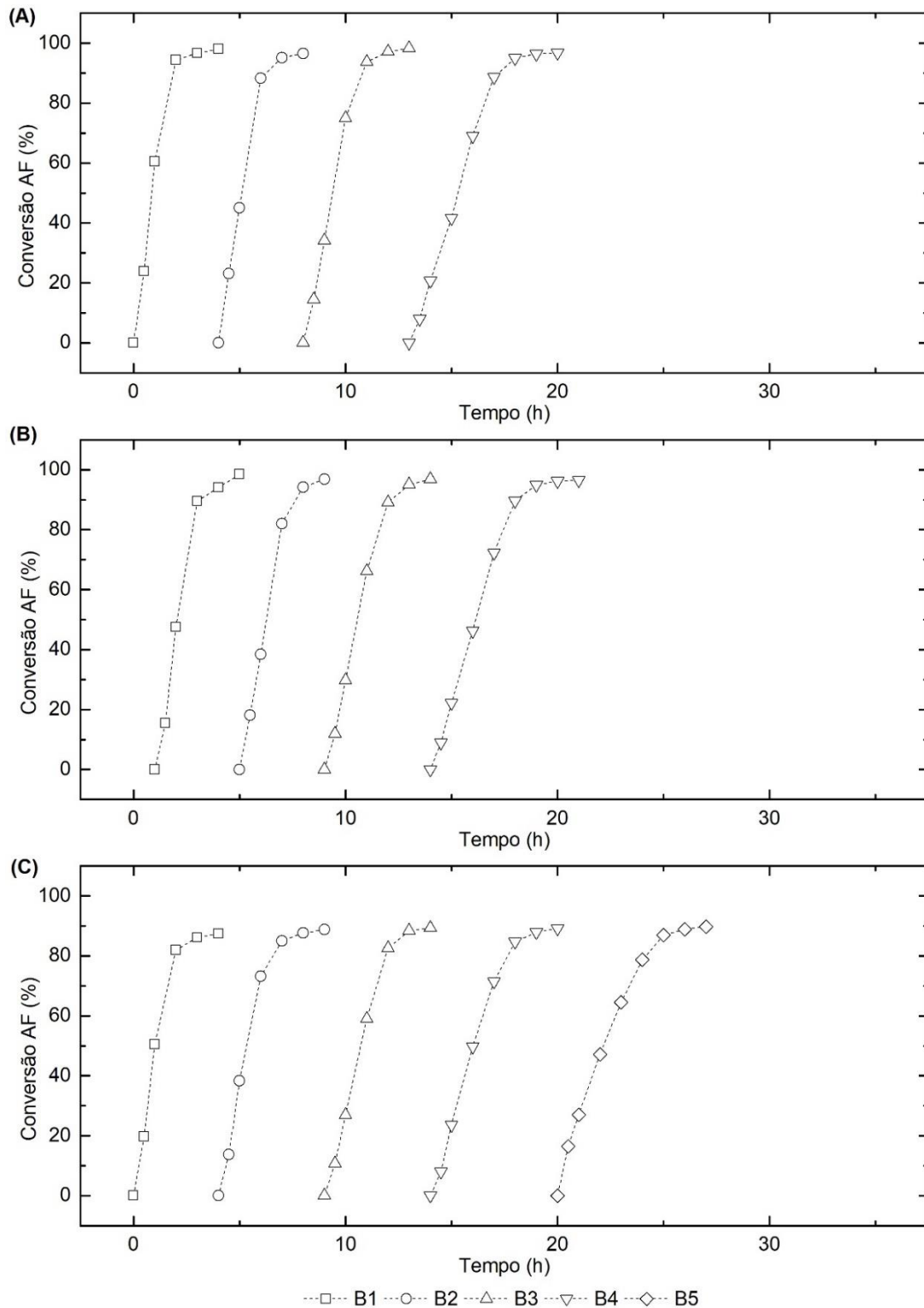


Tabela 5.7. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPSX com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	56,54 ± 0,55	18,85 ± 0,31 ^a	0,48 ± 0,05 ^m	-
	HAA1	0,00 ± 0,00	60,78 ± 0,59	15,20 ± 0,25 ^b	0,41 ± 0,04 ^m	-
	MDS	0,00 ± 0,00	50,28 ± 0,49	12,57 ± 0,21 ^c	0,43 ± 0,04 ^m	-
2	T18	19,60 ± 0,19	85,04 ± 0,83	16,36 ± 0,07 ^d	0,49 ± 0,01 ⁿ	-
	HAA1	25,70 ± 0,25	85,34 ± 0,83	14,91 ± 0,06 ^e	0,39 ± 0,00 ^o	-
	MDS	18,01 ± 0,18	73,26 ± 0,71	11,05 ± 0,04 ^f	0,38 ± 0,00 ^o	-
3	T18	32,36 ± 0,31	93,12 ± 0,91	15,19 ± 0,37 ^g	0,47 ± 0,05 ^p	-
	HAA1	36,24 ± 0,25	98,88 ± 0,96	12,53 ± 0,31 ^h	0,41 ± 0,04 ^p	-
	MDS	23,03 ± 0,22	80,70 ± 0,78	11,53 ± 0,28 ⁱ	0,38 ± 0,04 ^p	-
4	T18	27,73 ± 0,27	96,26 ± 0,94	11,42 ± 0,01 ^j	0,49 ± 0,06 ^q	49,2 ± 0,5
	HAA1	38,78 ± 0,38	98,00 ± 0,95	9,87 ± 0,01 ^k	0,44 ± 0,05 ^q	55,2 ± 0,6
	MDS	31,54 ± 0,31	88,13 ± 0,86	9,43 ± 0,01 ^l	0,38 ± 0,05 ^q	-
5	T18	-	-	-	-	-
	HAA1	-	-	-	-	-
	MDS	23,79 ± 0,23	82,73 ± 0,80	8,42 ± 0,01	0,39 ± 0,00	39,8 ± 0,5

Q_P^{a-l}, Y_{P/S}^{m-q}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Na Tabela 5.7, verifica-se que as três linhagens apresentaram produtividades em etanol elevadas durante todos os ciclos fermentativos, com queda gradual nos valores ao longo das bateladas repetidas. A partir do terceiro reciclo, os tempos de fermentação aumentaram gradativamente (motivo pelo qual o processo fermentativo foi encerrado), influenciando a produtividade. Nesse contexto, como mostram os resultados dos testes de Tukey, a T18 se destacou, com produtividades variando entre 11,42 e 18,85 g/L/h, seguida da HAA1, que apresentou valores entre 9,87 e 12,20 g/L/h. Já a MDS alcançou produtividades entre 8,42 e 12,47 g/L/h. As linhagens chegaram ao último ciclo fermentativo com porcentagem de células viáveis de 49,2, 55,2 e 39,8 para T18, HAA1 e MDS, respectivamente. O rendimento em etanol ficou acima de 75% do teórico, porém sem diferença estatisticamente significativa entre os valores na maioria dos reciclos.

Além disso, a formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 4,0 g/L, respectivamente, para as três linhagens.

Nota-se que elevadas concentrações de etanol foram atingidas ao longo do processo fermentativo, com valores máximos de 96,26; 98,88 e 88,13 g/L para T18, HAA1 e MDS, respectivamente (Tabela 5.7). Elevadas concentrações de etanol são altamente tóxicas para o metabolismo das células (ANSANAY-GALEOTE et al., 2001; CHEN; XU, 2014; YANG et al., 2012), o que pode explicar o fato de as leveduras não terem reproduzido o ciclo de dez fermentações sucessivas obtido por Perez (2021) na fermentação de meio sintético YPDX (extrato de levedura 20 g/L, peptona 40 g/L, glicose 10 g/L e xilose 100 g/L) e relatado para o meio YPDXHB (seção 5.1.1). O etanol se difunde livremente através da membrana celular e, em altas concentrações, afeta sua integridade e fluidez e aumenta a permeabilidade de íons, o que resulta em inibição do crescimento e redução da viabilidade das células. Além disso, ocorrem mudanças no fluxo de carbono para fornecer energia adicional para a manutenção das células. Como resultado, o metabolismo é desviado da via de produção de etanol para aumentar a produção de ATP (YANG et al., 2012).

Ao analisar o efeito letal do etanol sobre as células das leveduras T18, HAA1 e MDS, imobilizadas em alginato de cálcio, Perez (2021) observou que o efeito da exposição ao etanol sobre a viabilidade das células é uma função não só da concentração, mas também do tempo de exposição. Em experimentos em solução hidroalcolica (concentração final de etanol de aproximadamente 60 g/L) a 35°C, a cepa HAA1 apresentou maior resistência ao etanol, apresentando viabilidades celulares superiores à T18 e à MDS ao longo do tempo, assim como observado no fim do processo fermentativo em meio YPSX.

No contexto da fermentação de meios contendo elevada concentração de sacarose, Veloso e colaboradores (2019) realizaram experimento em batelada em condições próximas às empregadas nas destilarias brasileiras (temperatura de 34°C e concentração de substrato de 180 g/L) e concentração inicial de células viáveis de 12 g/L, obtendo concentração final de etanol de 79,2 g/L com rendimento de 0,448 g de etanol/g de substrato e produtividade de 10,56 g/L/h. Comparando-se esses valores com os dados da Tabela 5.7, observam-se menores concentrações de etanol na primeira batelada devido à menor concentração de açúcares fermentáveis disponível, em razão da diluição do meio

com a adição dos *beads*. Por sua vez, as maiores produtividades em etanol devem-se à operação com elevada carga de células.

5.2.2 Fermentação em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) suplementado com sacarose

Fermentações em meio YPSHB foram realizadas para avaliar a influência dos inibidores presentes no hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) através da comparação com os resultados obtidos na fermentação de meio YPSX, isento de inibidores, com a mesma composição em açúcares fermentáveis (AF) (seção 5.2.1). Da mesma forma, o meio YPSHB é referência para avaliar o desempenho do meio formulado com extrato de levedura, peptona, melaço e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado), que será discutido na próxima seção.

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio YPSHB, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.6. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol de cada reciclo e viabilidade final das células encontram-se na Tabela 5.8.

Conforme observado na Figura 5.6, o processo fermentativo foi interrompido na quinta batelada repetida, quando a conversão de AF não ultrapassou 70%. O açúcar presente no meio foi totalmente consumido nos quatro primeiros ciclos pelas linhagens, exceto pela MDS, cuja conversão de AF foi de aproximadamente 93% em todos eles. Assim como na fermentação de meio YPSX, a cepa não consumiu toda a xilose disponível e as conversões desse açúcar não ultrapassaram 16%.

Figura 5.6. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPSHB pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: $T = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 5,6$, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, $\text{DO}_{600} = 100$, $[\text{AF}]_{\text{reator}} = 155\text{ g/L}$.

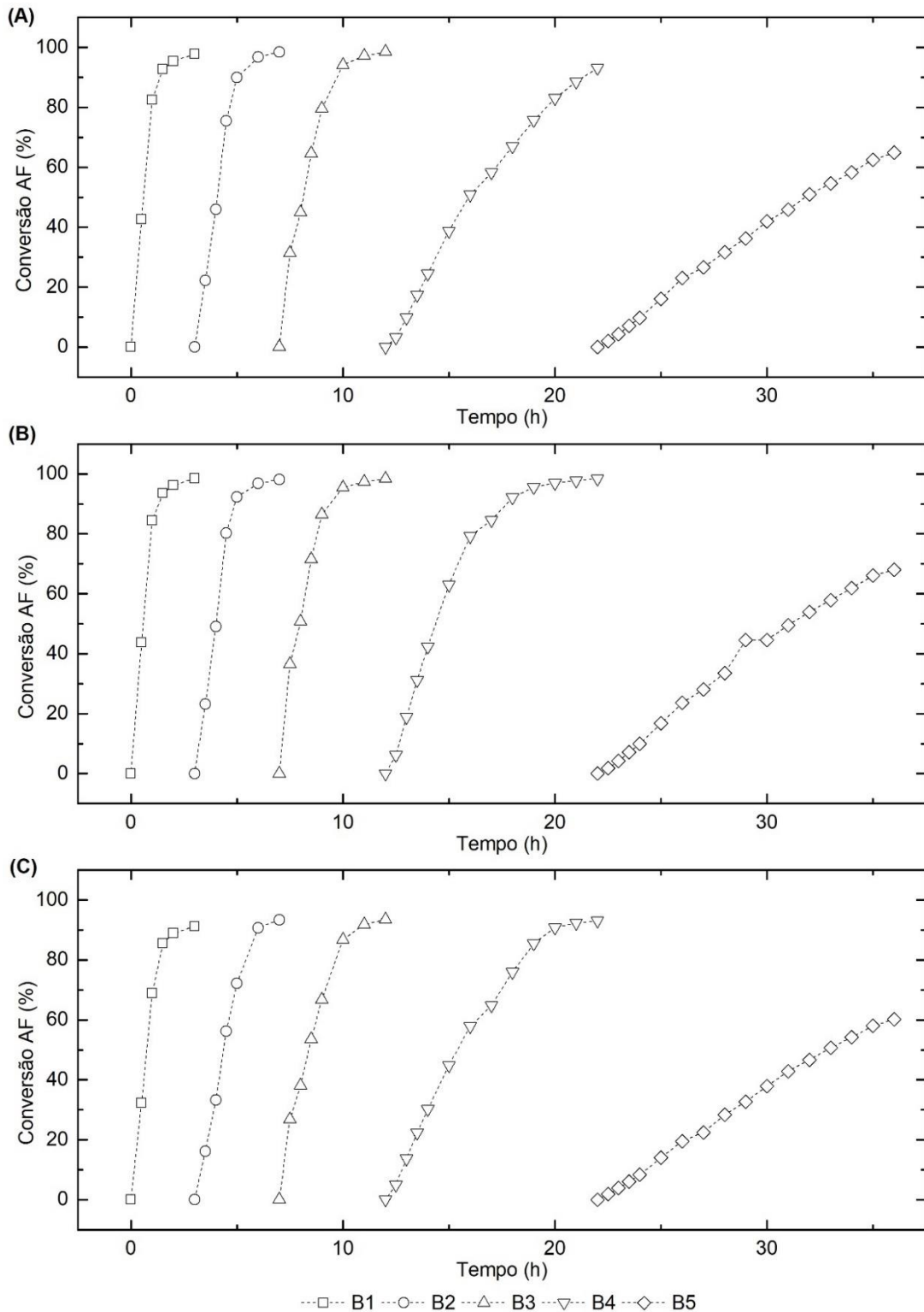


Tabela 5.8. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPSHB com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	39,96 ± 0,39	22,46 ± 0,37 ^a	0,43 ± 0,04 ^m	-
	HAA1	0,00 ± 0,00	35,92 ± 0,35	19,91 ± 0,33 ^b	0,42 ± 0,04 ^m	-
	MDS	0,00 ± 0,00	29,84 ± 0,29	16,42 ± 0,27 ^c	0,44 ± 0,04 ^m	-
2	T18	13,26 ± 0,13	75,36 ± 0,73	15,53 ± 0,06 ^d	0,42 ± 0,00 ⁿ	-
	HAA1	12,04 ± 0,12	67,56 ± 0,66	13,88 ± 0,06 ^e	0,45 ± 0,00 ^o	-
	MDS	11,77 ± 0,11	75,30 ± 0,73	15,88 ± 0,06 ^f	0,41 ± 0,00 ⁿ	-
3	T18	20,08 ± 0,20	94,14 ± 0,92	14,81 ± 0,36 ^g	0,45 ± 0,04 ^p	-
	HAA1	18,12 ± 0,18	80,65 ± 0,78	15,63 ± 0,38 ^g	0,44 ± 0,04 ^p	-
	MDS	17,70 ± 0,17	83,37 ± 0,81	13,13 ± 0,32 ^h	0,41 ± 0,04 ^p	-
4	T18	25,74 ± 0,25	96,04 ± 0,93	7,03 ± 0,01 ⁱ	0,46 ± 0,06 ^q	-
	HAA1	28,80 ± 0,28	93,74 ± 0,91	8,12 ± 0,01 ^j	0,43 ± 0,05 ^q	-
	MDS	27,10 ± 0,26	91,44 ± 0,89	7,15 ± 0,01 ^k	0,42 ± 0,05 ^q	-
5	T18	24,40 ± 0,24	72,32 ± 0,70	3,42 ± 0,00 ^l	0,43 ± 0,00 ^r	31,2 ± 0,4
	HAA1	29,44 ± 0,29	74,56 ± 0,72	3,22 ± 0,00 ^l	0,41 ± 0,00 ^s	30,4 ± 0,4
	MDS	23,00 ± 0,22	56,96 ± 0,55	2,43 ± 0,00 ^l	0,33 ± 0,00 ^t	29,9 ± 0,4

Q_P^{a-l}, Y_{P/S}^{m-t}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

As três leveduras apresentaram produtividades em etanol elevadas durante as três primeiras bateladas repetidas, com valores entre 14,81 e 22,46 g/L/h para a T18, 13,88 e 19,91 g/L/h para a HAA1 e 13,13 e 16,42 g/L/h para a MDS (Tabela 5.8). A partir do quarto reciclo, as fermentações ficaram mais lentas e a produtividade caiu para 7,03; 8,12 e 7,15 g/L/h para T18, HAA1 e MDS, respectivamente, atingindo 4,42; 3,22 e 2,43 g/L/h na última batelada. As cepas apresentaram produtividades em etanol com diferença estatisticamente significativa na maioria das bateladas, destacando-se a HAA1. As linhagens chegaram ao último ciclo fermentativo com porcentagem de células viáveis de 31,2, 30,4 e 29,9 para T18, HAA1 e MDS, respectivamente. Além disso, o rendimento em etanol permaneceu acima de 0,41 g de etanol/g de AF, exceto no último ciclo com a

MDS, sem diferença estatisticamente significativa entre os valores na maioria dos ciclos. A formação de xilitol e glicerol não passou de 3,5 g/L para as três linhagens.

De maneira geral, as fermentações em meio YPSX, isento de inibidores, e em meio YPSHB apresentaram produtividades em etanol com diferença estatisticamente significativa (comparação entre a mesma levedura no mesmo ciclo via teste de Tukey com 95% de nível de confiança; dados não apresentados), porém com uma diferença entre os valores de 25%, em média, possivelmente associada à variabilidade das bateladas, decorrente da limitação na retirada de meio fermentado dos minirreatores. Esses resultados reforçam o fato de que os compostos inibidores dos hidrolisados não concentrados não impactam o desempenho da fermentação como os dos hidrolisados concentrados, conforme discutido na seção 5.1.1. Ainda assim, a maior queda nas produtividades da terceira para a quarta batelada pode ser decorrente da exposição a inibidores que, mesmo em pequenas concentrações, podem ser tóxicos ao metabolismo das células, e da sinergia com a alta concentração de etanol.

5.2.3 Fermentação em meio contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) suplementado com melão e nutrientes

A adição de nutrientes ao meio é utilizada como recurso para melhorar o desempenho da fermentação (JONES et al., 1992; PRADEEP, REDDY, 2010). Dessa forma, o meio industrial de maior potencial para a produção integrada de etanol 1G e 2G, formulado a partir de melão e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado), foi suplementado com extrato de levedura e peptona. A condução de fermentações em meio YPMHB também facilita a comparação com os resultados obtidos nas fermentações em meios YPSX, YPSHB e MHB3, cujos resultados serão discutidos no próximo tópico.

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio YPMHB, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.7. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células de cada ciclo encontram-se na Tabela 5.9.

Figura 5.7. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio YPMHB pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35°C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 ml, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

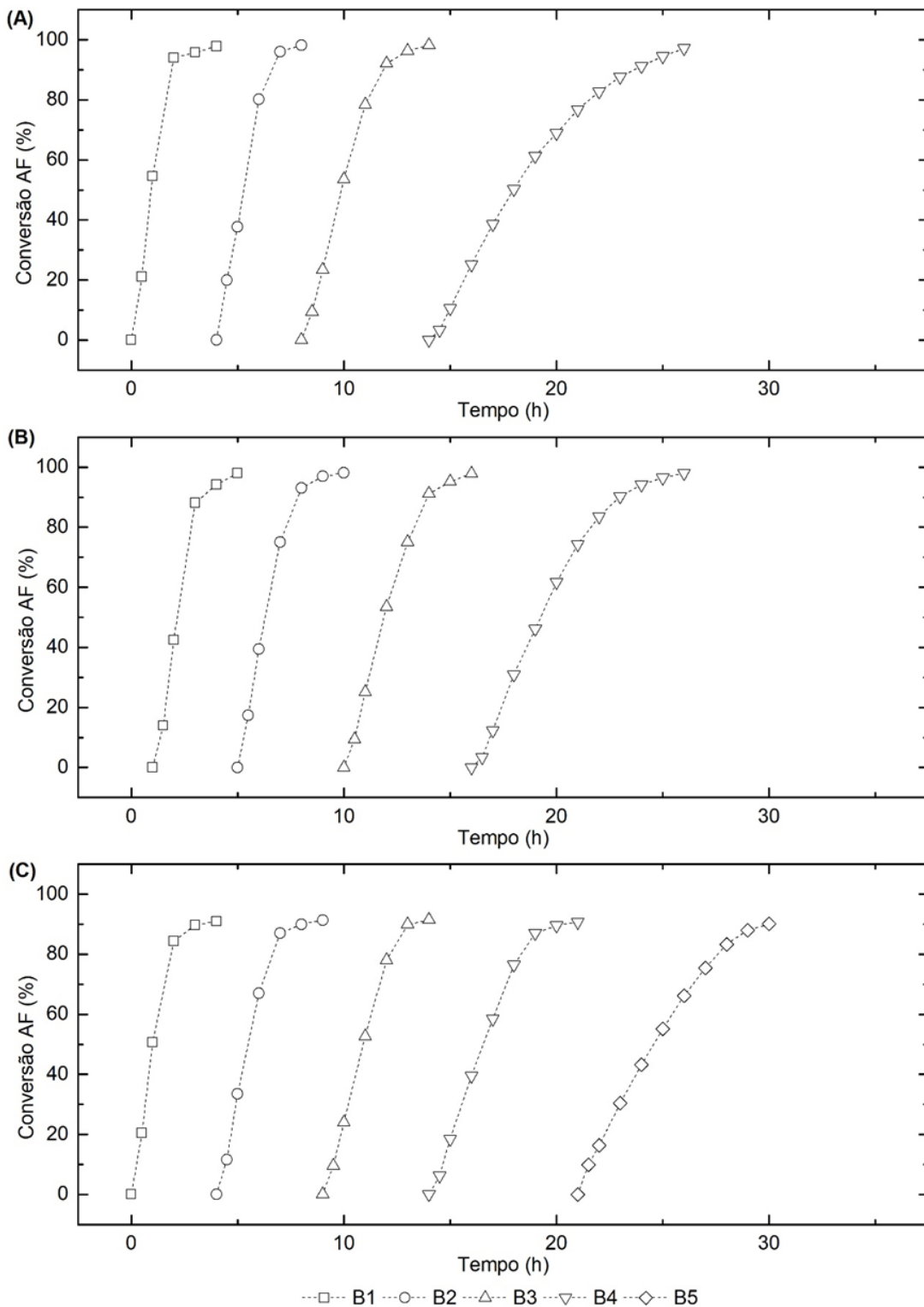


Tabela 5.9. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio YPMHB com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	57,16 ± 0,56	19,05 ± 0,31 ^a	0,50 ± 0,05 ^m	-
	HAA1	0,00 ± 0,00	52,36 ± 0,51	13,09 ± 0,22 ^b	0,45 ± 0,05 ^m	-
	MDS	0,00 ± 0,00	49,82 ± 0,48	12,46 ± 0,21 ^c	0,40 ± 0,04 ⁿ	-
2	T18	17,10 ± 0,17	90,98 ± 0,88	18,47 ± 0,07 ^d	0,49 ± 0,01 ^o	-
	HAA1	12,08 ± 0,12	73,22 ± 0,71	15,29 ± 0,06 ^e	0,46 ± 0,00 ^p	-
	MDS	17,02 ± 0,17	74,34 ± 0,72	11,46 ± 0,05 ^f	0,38 ± 0,00 ^q	-
3	T18	14,34 ± 0,14	88,66 ± 0,86	14,86 ± 0,37 ^g	0,49 ± 0,05 ^r	-
	HAA1	28,84 ± 0,28	98,82 ± 0,96	11,66 ± 0,29 ^h	0,49 ± 0,05 ^r	-
	MDS	22,08 ± 0,21	86,40 ± 0,84	12,86 ± 0,32 ⁱ	0,42 ± 0,04 ^r	-
4	T18	15,72 ± 0,15	92,50 ± 0,90	6,40 ± 0,01 ^j	0,51 ± 0,06 ^s	48,2 ± 0,5
	HAA1	38,37 ± 0,37	104,68 ± 1,02	7,37 ± 0,01 ^k	0,47 ± 0,06 ^s	55,4 ± 0,6
	MDS	18,85 ± 0,18	81,54 ± 0,79	8,96 ± 0,01 ^l	0,44 ± 0,05 ^s	-
5	T18	-	-	-	-	-
	HAA1	-	-	-	-	-
	MDS	19,38 ± 0,19	78,84 ± 0,77	6,61 ± 0,01	0,44 ± 0,00	52,6 ± 0,6

Q_P^{a-l}, Y_{P/S}^{m-s}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança.

Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Mais uma vez, as linhagens T18 e HAA1 reproduziram quatro bateladas repetidas com consumo praticamente total dos açúcares fermentáveis (AF) presentes no meio (conversão de AF superior a 97%). Por sua vez, a linhagem MDS reproduziu cinco bateladas repetidas com conversão de AF de aproximadamente 90% (Figura 5.7) e conversão de xilose inferior a 15% em todas elas.

As três linhagens apresentaram produtividades em etanol elevadas durante as três primeiras bateladas, destacando-se a T18, com variação entre 14,86 e 19,05 g/L/h e queda para 6,40 g/L/h no último reciclo, seguida da HAA1 (produtividades entre 11,66 e 15,29 g/L/h nos três primeiros reciclos e 7,37 g/L/h no último), como mostram os resultados dos testes de Tukey (Tabela 5.9). As menores produtividades na última batelada acompanham as viabilidades celulares, que foram de 48,2 e 55,4% para T18 e HAA1,

respectivamente. A cepa MDS apresentou produtividades entre 11,46 e 12,86 g/L/h nos três primeiros ciclos e 8,96 e 6,61 g/L/h nos últimos, com porcentagem de células viáveis de 52,6 no fim do processo. Assim como na fermentação conduzida em meio YPSHB, a queda na viabilidade possivelmente está relacionada com a exposição prolongada a elevadas concentrações de etanol e a inibidores presentes no hidrolisado, ainda que em pequenas concentrações. Além disso, o rendimento em etanol ficou acima de 0,38 g de etanol/g de AF, com diferença estatisticamente significativa entre os valores apenas nos dois primeiros ciclos e leve vantagem da T18. A formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 5,0 g/L para as três linhagens.

A suplementação do melaço com nutrientes, visando melhorar o desempenho da fermentação, é abordada na literatura. Jones e colaboradores (1992) avaliaram a fermentação de melaço (76,6% m/m de sólidos totais), suplementado ou não com extrato de levedura, por *S. cerevisiae*. No melaço diluído em água destilada (33,8% m/v) suplementado com extrato de levedura, os açúcares fermentáveis foram completamente utilizados em 48h, enquanto cerca de 72 h foram necessárias para o controle não suplementado. Na presença e na ausência de extrato de levedura, a concentração de etanol foi de 11,5% (v/v). No entanto, em melaço 47,6% (m/v), a suplementação com extrato de levedura reduziu a porcentagem em volume de etanol de 13,3% para 12,1%. Na fermentação de melaço (34°Bx) por *S. bayanus*, Pradeep e Reddy (2010) obtiveram concentração final de etanol de 72,9 g/L. A suplementação com peptona, ureia e extrato de levedura aumentou as concentrações finais de etanol para 99,8; 98,9 e 100,2 g/L, respectivamente. Além disso, a duração da fermentação também foi reduzida de 72 para 48h, melhorando a produtividade em etanol.

De maneira geral, comparado à fermentação em meio YPSHB, o processo fermentativo em meio YPMHB apresentou perfil de conversão de açúcares mais lento e produtividades levemente inferiores (diferença estatisticamente significativa na comparação entre a mesma levedura no mesmo ciclo feita com teste de Tukey com 95% de nível de confiança; dados não apresentados), mas ainda satisfatórias, indicando que, na presença de extrato de levedura e peptona, o melaço consiste em uma boa fonte de sacarose para a levedura.

5.2.4 Fermentação em meio industrial contendo melação e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado)

Embora sejam ricos em nutrientes que podem favorecer a atividade celular, o extrato de levedura e a peptona são insumos de custo relativamente alto e seu uso para suplementação de meios industriais prejudicaria a viabilidade econômica do processo. Dessa forma, foram realizadas fermentações a partir da mistura de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melação, apenas, de forma que a concentração de açúcares fermentáveis (AF) fosse aproximadamente a mesma dos meios YPSX, YPSHB e YPMHB.

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com as três linhagens em meio MHB3, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.8. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células de cada reciclo encontram-se na Tabela 5.10.

Como pode ser observado na Figura 5.8, seguindo a tendência dos processos fermentativos apresentados anteriormente, as linhagens T18 e HAA1 reproduziram quatro bateladas repetidas com conversão praticamente total dos açúcares presentes no meio (aproximadamente 98% de conversão de AF em todos os ciclos), enquanto a linhagem MDS realizou cinco bateladas repetidas com conversão máxima de AF e de xilose de 91% e 17%, respectivamente.

As produtividades em etanol alcançadas pela T18 e pela HAA1 variaram entre 15,53 e 17,68 g/L/h e entre 17,05 e 20,13 g/L/h, respectivamente, nos três primeiros reciclos (Tabela 5.10). No quarto reciclo, as produtividades caíram para 7,13 e 7,92 g/L/h, acompanhando a viabilidade final das células, que chegou a 41,8 e 49,8% para T18 e HAA1, respectivamente. Por sua vez, a MDS apresentou produtividades entre 11,56 e 13,60 g/L/h nos quatro primeiros ciclos, atingindo 8,21 g/L/h com viabilidade celular de 47,4% no quinto ciclo. Os resultados dos testes de Tukey apontam diferença estatisticamente significativa para a produtividade em etanol das três cepas em todas as bateladas, com destaque para a HAA1. Além disso, os rendimentos em etanol permaneceram acima 0,38 g de etanol/g de AF, porém com valores estatisticamente iguais para as três linhagens em todas bateladas. A formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 4,0 g/L para as três leveduras.

Figura 5.8. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB3 pelas leveduras: (A) T18, (B) HAA1, (C) MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

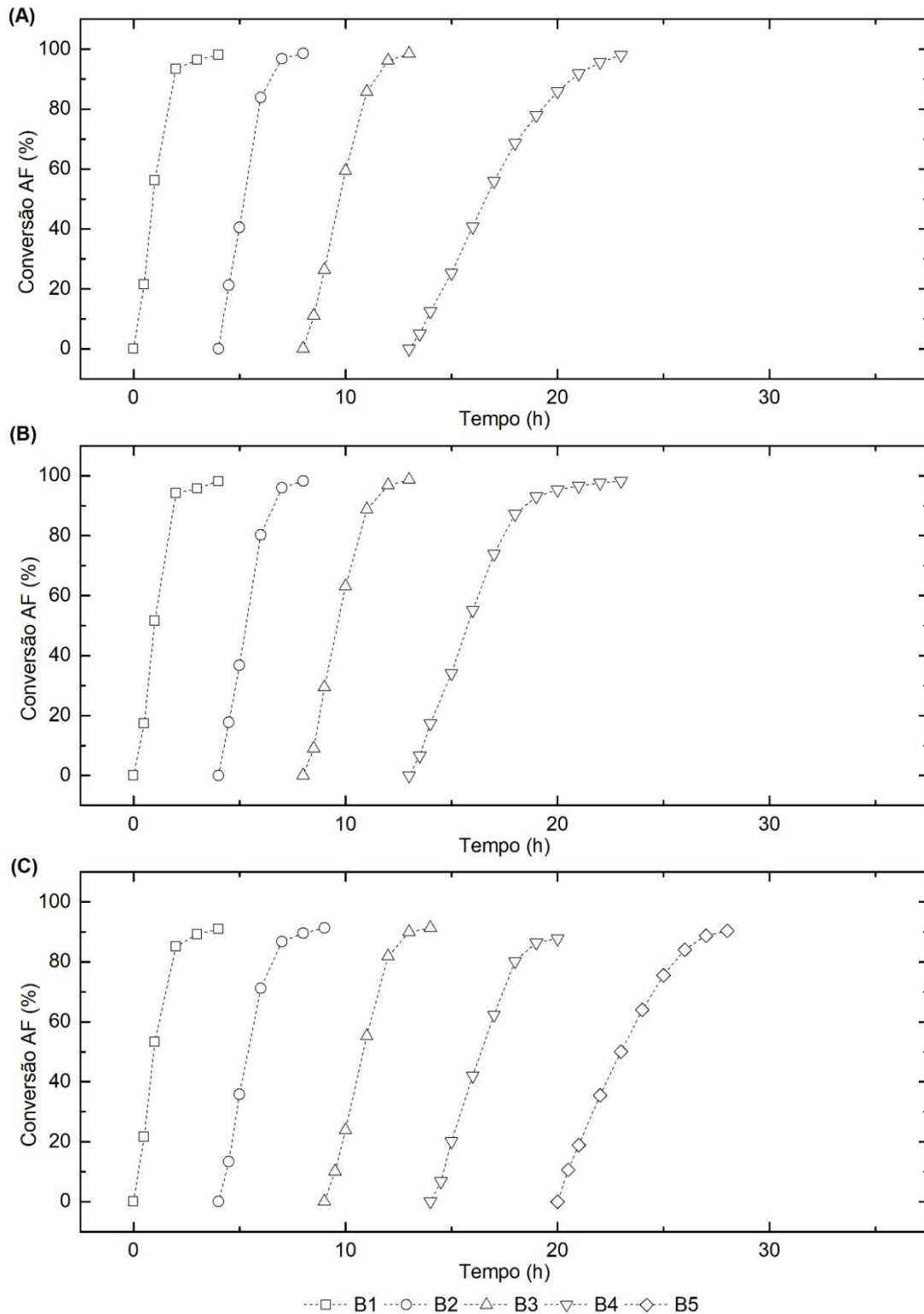


Tabela 5.10. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB3 com as leveduras T18, HAA1 e MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Reciclo	Cepa	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	T18	0,00 ± 0,00	46,58 ± 0,45	15,53 ± 0,26 ^a	0,38 ± 0,04 ^l	-
	HAA1	0,00 ± 0,00	56,64 ± 0,55	18,88 ± 0,31 ^b	0,45 ± 0,05 ^l	-
	MDS	0,00 ± 0,00	49,70 ± 0,48	12,43 ± 0,21 ^c	0,40 ± 0,04 ^l	-
2	T18	22,38 ± 0,22	93,10 ± 0,91	17,68 ± 0,07 ^d	0,44 ± 0,00 ^m	-
	HAA1	18,89 ± 0,18	79,28 ± 0,77	20,13 ± 0,08 ^e	0,44 ± 0,00 ^m	-
	MDS	13,00 ± 0,13	72,18 ± 0,70	11,84 ± 0,05 ^f	0,41 ± 0,00 ⁿ	-
3	T18	20,70 ± 0,20	88,90 ± 0,86	13,64 ± 0,34 ^g	0,42 ± 0,04 ^o	-
	HAA1	15,76 ± 0,15	93,08 ± 0,90	19,33 ± 0,47 ^h	0,43 ± 0,04 ^o	-
	MDS	22,72 ± 0,22	90,70 ± 0,88	13,60 ± 0,33 ^g	0,44 ± 0,04 ^o	-
4	T18	25,50 ± 0,25	96,76 ± 0,94	7,13 ± 0,01 ⁱ	0,44 ± 0,05 ^p	41,8 ± 0,4 ^q
	HAA1	37,96 ± 0,37	101,34 ± 0,99	7,92 ± 0,01 ^j	0,47 ± 0,06 ^p	49,8 ± 0,5 ^r
	MDS	25,38 ± 0,25	94,74 ± 0,92	11,56 ± 0,01 ^k	0,51 ± 0,06 ^p	-
5	T18	-	-	-	-	-
	HAA1	-	-	-	-	-
	MDS	20,98 ± 0,20	86,62 ± 0,84	8,21 ± 0,01	0,46 ± 0,00	47,4 ± 0,5

Q_P^{a-l}, Y_{P/S}^{m-s}, Viabilidade final^{q,r}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

A assimilação eficiente de xilose é um ponto crucial para a produção de etanol 2G (NOGUÉ; KARHUMAA, 2015). Em todos os experimentos com meios contendo xilose e sacarose (ou glicose e frutose) em concentração acima de 150 g/L no minirreator (devido à diluição provocada pela adição dos *beads*), a cepa MDS não foi capaz de assimilar eficientemente a xilose, conforme mostrado na Tabela 5.11. Na tentativa de elucidar a causa da menor conversão de xilose pela MDS, foram realizados estudos complementares, que serão apresentados posteriormente. Independentemente da causa, considerando-se o baixo desempenho da MDS na conversão de xilose, a cepa foi excluída para a produção de etanol 2G a partir de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melão em elevadas concentrações de açúcares fermentáveis.

Tabela 5.11. Conversão (%) de xilose pela levedura MDS nos meios YPSX, YPSHB, YPMHB e MHB3.

Reciclo	YPSX	YPSHB	YPMHB	MHB3
1	17,9	15,3	14,4	17,3
2	0,4	5,7	11,5	15,0
3	8,5	7,9	11,5	11,2
4	2,5	9,8	3,7	4,9
5	6,7	9,7	12,7	5,1

Por sua vez, a fim de identificar a levedura que se destacou na fermentação do meio industrial de interesse, a performance das linhagens T18 e HAA1 foi pontuada (Tabela 2, Apêndice), com base nos resultados dos testes de Tukey apresentados na Tabela 5.10. Conforme mostrado na Tabela 5.12, a cepa HAA1 obteve vantagem sobre a T18 na pontuação final, resultado coerente com os valores apresentados na Tabela 5.5, em que a HAA1 se destacou na fermentação do meio formulado com os mesmos componentes, porém com concentração de AF inferior (MHB1). Conforme já discutido, a linhagem HAA1 foi desenvolvida visando aumentar a tolerância ao ácido acético da T18, que se tornou menos tolerante a inibidores do metabolismo celular após as modificações genéticas para expressão da enzima xilose isomerase (XI) (DEMEKE et al., 2013b; MEIJNEN et al., 2016). Dessa forma, a levedura HAA1 foi considerada para o processo nas condições em questão.

Tabela 5.12. Pontuação das leveduras T18 e HAA1 no meio industrial MHB3.

Cepa	MHB3
T18	0
HAA1	4

De maneira geral, os processos fermentativos nos meios YPMHB e MHB3 apresentaram produtividades em etanol com diferença estatisticamente significativa (comparação entre a mesma levedura no mesmo reciclo via teste de Tukey com 95% de nível de confiança; dados não apresentados), porém com uma diferença entre os valores de 20%, em média, possivelmente associada à variabilidade das bateladas, decorrente da limitação na retirada de meio fermentado dos minirreatores. Esses resultados podem ser considerados satisfatórios, visto que a necessidade de suplementação do meio com extrato

de levedura e peptona traria custos adicionais ao processo em escala industrial, prejudicando a viabilidade econômica. Apesar de estudos mostrarem melhora no desempenho da fermentação de melão com a adição de nutrientes (JONES et al., 1992; PRADEEP; REDDY, 2010), o melão contém fontes de nitrogênio em sua composição (Tabela 3.1). Fontes de nitrogênio são essenciais para a fermentação, visto que compreendem aminoácidos, nucleotídeos e vitaminas, necessários para o crescimento celular (XU; XU, 2014). Dessa maneira, o meio formulado com melão e hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) (MHB) foi escolhido para a continuidade dos estudos.

Com relação à literatura, Liang e colaboradores (2008) empregaram a cepa comercial *S. cerevisiae* AS2.1190 imobilizada em pedaços de cana-de-açúcar (4×10^9 células/60g de pedaços de cana-de-açúcar), na proporção de 60g de biocatalisador/150 mL de meio, na fermentação de melão. Durante quatro bateladas repetidas, com média de 154,1 g/L de açúcar no meio, a cepa converteu, em média, 98,5% do açúcar disponível, resultando em concentração de etanol de 77,1 g/L e produtividade de 2,6 g/L/h, valor muito abaixo dos obtidos no presente trabalho.

5.3 Estudos complementares: influência das condições de imobilização na tolerância ao etanol

Conforme demonstrado anteriormente, o efeito tóxico das altas concentrações de etanol sobre a viabilidade celular limitou o reciclo das células a, no máximo, cinco bateladas repetidas. As condições de imobilização (concentração de alginato de sódio, adição de quitosana, tamanho dos *beads*) podem intensificar o efeito protetivo conferido pelo gel de alginato (MISHRA et al., 2016; NAJAFPOUR et al., 2004; WESTMAN et al., 2012). Mishra e colaboradores (2016) relataram que o aumento do tempo de cura dos *beads* em solução concentrada de CaCl_2 pode alterar a estrutura do gel de alginato, tornando-o menos poroso e mais compacto e melhorando a tolerância das células a altas concentrações de etanol. Dessa forma, foram realizados ensaios fermentativos com a levedura HAA1 e o meio MHB, selecionados anteriormente (seção 5.2.4), em duas condições:

- A. *Beads* mantidos em solução de cura contendo 4 g/L de CaCl₂ por 12h (procedimento padrão de cura, descrito na seção 4.2);
- B. *Beads* mantidos em solução de cura suplementada com CaCl₂ 2,0% (m/v) por 120h (procedimento adaptado de cura, a partir do proposto por Mishra e colaboradores (2016), também descrito na seção 4.2).

Nos ensaios fermentativos conduzidos em batelada repetida com a linhagem HAA1 em meio MHB4, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.9. Os resultados em concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células de cada reciclo encontram-se na Tabela 5.13.

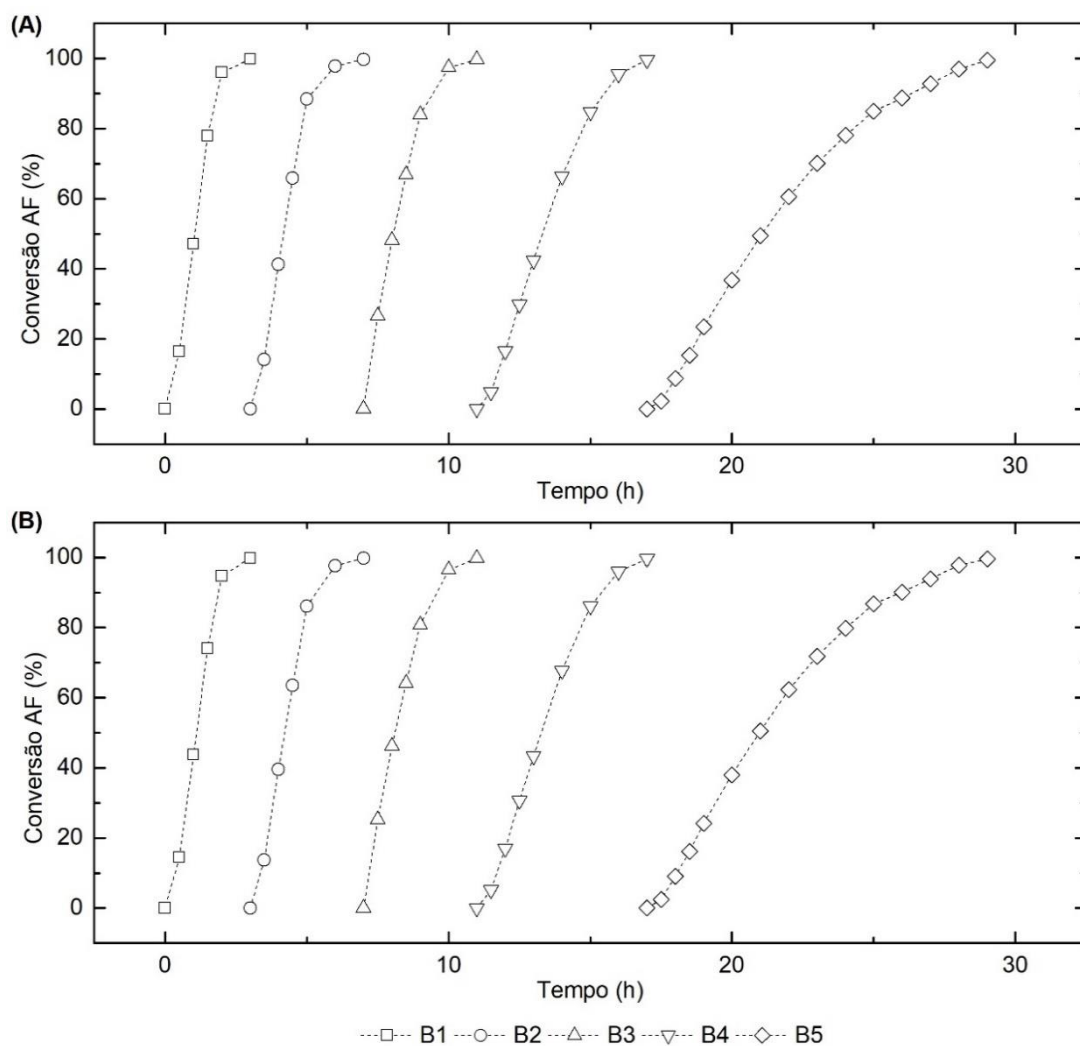
Na Figura 5.9, observa-se que, em ambas as situações, a levedura reproduziu cinco bateladas repetidas com consumo praticamente total dos açúcares fermentáveis (AF) disponíveis no meio. Comparando-se as Figuras 5.9 A e B, percebe-se que o perfil de conversão de açúcares nas duas condições foi similar.

Já na Tabela 5.13, verifica-se que, para a condição A, as produtividades em etanol variaram entre 21,28 e 24,08 g/L/h nos três primeiros ciclos, caindo para 15,05 g/L/h no quarto reciclo. O processo fermentativo terminou com produtividade de 7,96 g/L/h e viabilidade das células de 66,2%. Para a condição B, vê-se que as produtividades em etanol permaneceram entre 21,29 e 24,09 g/L/h nos três primeiros ciclos, diminuindo para 15,15 no quarto reciclo. O processo chegou ao fim com produtividade de 8,08 g/L/h e porcentagem de células viáveis de 66,8. Em ambas as situações, o rendimento em etanol manteve-se acima de 80% do teórico e a formação de xilitol e glicerol não ultrapassou 2,0 e 5,0 g/L, respectivamente. De maneira geral, considerando-se os parâmetros produtividade e rendimento em etanol e viabilidade final das células, verifica-se igualdade estatística entre os valores na maioria dos ciclos, com diferença estatisticamente significativa apenas para a produtividade em etanol das bateladas de número quatro e cinco, porém com diferença inferior a 2% entre os valores, e para o rendimento em etanol do segundo reciclo (diferença inferior a 10% entre os valores).

Além disso, comparando-se as Tabelas 5.10 (cepa HAA1) e 5.13 (condição A), observa-se uma divergência no número de bateladas repetidas, nas produtividades em etanol e na viabilidade final das células. Dado que o processo fermentativo foi realizado

nas mesmas condições, tal fato deve-se, possivelmente, à diferença no hidrolisado de hemicelulose utilizado (seção 4.3).

Figura 5.9. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em bateladas repetidas em meio MHB4 pela levedura HAA1. (A) *Beads* mantidos em solução de cura por 12h, (B) *beads* mantidos em solução de cura suplementada com CaCl₂ por 120h. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.



Diferentemente do que foi observado no presente estudo, Mishra e colaboradores (2016) obtiveram um aumento de 50% no número de bateladas e de 6% no rendimento médio em etanol ao utilizarem células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* NRRL2034 incubadas em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 120h, em comparação aos

beads de referência, mantidos em solução de CaCl₂ 2% (m/v) por 16h. Em ambos os casos, a suspensão de células e alginato foi imobilizada em solução de CaCl₂ 2% (m/v).

Tabela 5.13. Concentração inicial e final de etanol, produtividade e rendimento em etanol e viabilidade celular final para cada reciclo em meio MHB4 com a levedura HAA1. (A) *Beads* mantidos em solução de cura por 12h, (B) *beads* mantidos em solução de cura suplementada com CaCl₂ por 120h. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Reciclo	Condição	Et[OH] _i (g/L)	Et[OH] _f (g/L)	Q _P (g/L/h)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})	Viabilidade final (%)
1	A	0,00 ± 0,00	53,20 ± 0,52	21,28 ± 0,35 ^a	0,41 ± 0,04 ^h	100,0 ± 0,0 ⁿ
	B	0,00 ± 0,00	53,22 ± 0,52	21,29 ± 0,35 ^a	0,42 ± 0,04 ^h	100,0 ± 0,0 ⁿ
2	A	11,52 ± 0,11	83,66 ± 0,81	24,05 ± 0,10 ^b	0,46 ± 0,00 ⁱ	97,2 ± 3,0 ^o
	B	12,32 ± 0,12	84,44 ± 0,82	24,04 ± 0,10 ^b	0,42 ± 0,00 ^j	100,0 ± 0,0 ^o
3	A	21,18 ± 0,21	105,46 ± 1,03	24,08 ± 0,59 ^c	0,48 ± 0,05 ^k	95,4 ± 0,9 ^p
	B	23,30 ± 0,23	105,16 ± 1,02	23,39 ± 0,57 ^c	0,42 ± 0,04 ^k	96,4 ± 1,3 ^p
4	A	19,06 ± 0,19	101,86 ± 0,99	15,05 ± 0,02 ^d	0,48 ± 0,06 ^l	86,6 ± 1,7 ^q
	B	18,62 ± 0,18	101,92 ± 0,99	15,15 ± 0,02 ^e	0,46 ± 0,06 ^l	87,2 ± 1,8 ^q
5	A	20,12 ± 0,20	107,66 ± 1,05	7,96 ± 0,01 ^f	0,50 ± 0,00 ^m	66,2 ± 2,2 ^r
	B	19,42 ± 0,19	108,26 ± 1,05	8,08 ± 0,01 ^g	0,50 ± 0,00 ^m	66,8 ± 2,9 ^r

Q_P^{a-g}, Y_{P/S}^{h-m}, Viabilidade final^{n,r}: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores em cada reciclo.

Por sua vez, Milessi e colaboradores (2013) investigaram o efeito das variáveis concentração de alginato de sódio (1,0, 1,5 e 2,0%), concentração de CaCl₂ (0,1, 0,15 e 0,2M) e tempo de condicionamento (12, 18 e 24h) na imobilização de células de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. A análise estatística mostrou que o tempo de condicionamento foi significativo (nível de confiança de 95%) para a variável consumo de xilose, indicando maior assimilação de substrato para as células incubadas por maior tempo, e não exerceu influência na produtividade e no rendimento em etanol, diferentemente do que foi observado por Mishra e colaboradores (2016). Outros fatores não apresentaram influência nas variáveis de resposta. Além disso, as condições de imobilização concentração de alginato de sódio de 2,0%, concentração de cloreto de cálcio de 0,1M e tempo de condicionamento de 12h foram responsáveis pela maior estabilidade das células imobilizadas, possibilitando a produção máxima de etanol (7,2

g/L com rendimento de 0,26 g/g) de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (xilose 33,03 g/L, furfural 0,017 g/L e HMF 0,007 g/L).

Como pode ser observado na Figura 5.9 e na Tabela 5.13, os resultados dos dois experimentos, realizados com células submetidas a diferentes condições de cura, apresentaram semelhança entre si, com diferenças inferiores a 3% entre os valores de conversão de AF, etanol produzido e produtividade em etanol. Esse comportamento pode ter ocorrido devido à maior concentração de íons cálcio na solução de coagulação utilizada, em comparação com a solução de CaCl_2 utilizada por Mishra e colaboradores (2016) no processo de imobilização. A concentração de CaCl_2 (27,7 g/L) e MgCl_2 (23,8 g/L) e de CaCl_2 (4 g/L) usada nas etapas de imobilização e de cura, respectivamente, no procedimento padrão adotado no presente trabalho e em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (MILESSI et al., 2020a,b; PEREZ et al., 2021; SILVA et al., 2012) já pode ter sido suficiente para gerar *beads* com estrutura mais compacta e menos porosa. Por essa razão, o desempenho das fermentações não foi melhorado com a adoção das condições (aumento da concentração de CaCl_2 na solução de cura e do tempo de cura) propostas por Mishra e colaboradores (2016), mantendo-se o máximo de cinco bateladas repetidas alcançado anteriormente. Dessa forma, é necessário avaliar outras formas de atenuar os efeitos tóxicos das altas concentrações de etanol sobre a levedura, como a lavagem das células entre um determinado número de bateladas durante o processo fermentativo (PEREZ et al., 2021).

5.4 Estudos complementares: assimilação de xilose por *S. cerevisiae* MDS 130 na presença de hexoses

Conforme já relatado, a levedura MDS não foi capaz de assimilar eficientemente a xilose disponível no meio fermentativo nos experimentos envolvendo a fermentação de xilose e sacarose com concentração acima de 150 g/L no minirreator (devido à diluição provocada pela adição dos *beads*). Dessa forma, foram realizados ensaios fermentativos com a cepa MDS em meios contendo xilose e glicose, frutose ou sacarose, mantendo-se a proporção pentose/hexose e a concentração total de açúcares de aproximadamente 1:10 e 220 g/L, respectivamente, com o objetivo de avaliar se a menor conversão de xilose

pela levedura está relacionada à alta concentração de hexoses no meio ou à presença da sacarose ou da frutose em alta concentração.

Nas fermentações conduzidas com a linhagem MDS nos meios sintéticos YPDX, YPFX e YPSX, obteve-se o perfil de conversão de açúcares apresentado na Figura 5.10. Os resultados em conversão de açúcares, concentração final de etanol e rendimento em etanol encontram-se na Tabela 5.14.

Figura 5.10. Acompanhamento da conversão de açúcares fermentáveis (% AF) durante fermentações em meio YPDX, YPFX e YPSX pela levedura MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

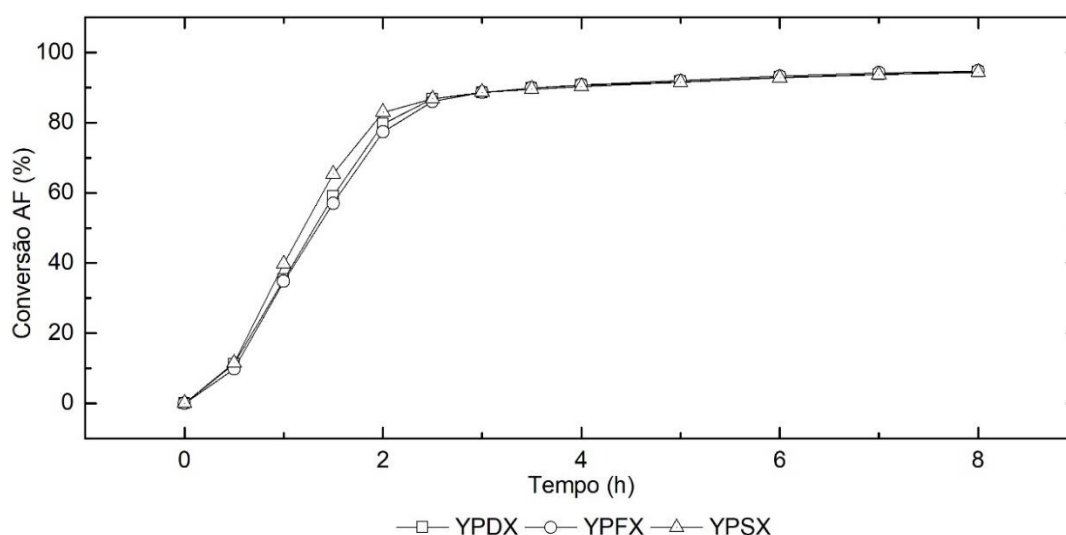


Tabela 5.14. Conversão de xilose, conversão de açúcares fermentáveis (AF), concentração de etanol e rendimento em etanol das fermentações em meio sintético com a levedura MDS. Condições de fermentação: T = 35 °C, pH = 5,6, estático, volume de meio: 3 mL, volume de *beads*: 3 mL, volume do minirreator: 14 mL, DO₆₀₀ = 100, [AF]_{reator} = 155 g/L.

Meio	X _{xilose} (%)	X _{AF} (%)	Et[OH] (g/L)	Y _{P/S} (g _{Et[OH]} /g _{AF})
YPDX	38,0 ± 0,24 ^a	94,5 ± 0,68 ^d	48,50 ± 0,47 ^e	0,31 ± 0,03 ^g
YPFX	40,2 ± 0,25 ^b	94,7 ± 0,68 ^d	46,45 ± 0,45 ^f	0,29 ± 0,03 ^g
YPSX	34,1 ± 0,21 ^c	94,4 ± 0,68 ^d	48,01 ± 0,47 ^e	0,30 ± 0,03 ^g

X_{xilose}^{a-c}, X_{AF}^d, Et[OH]^{e,f}, Y_{P/S}^g: médias comparadas usando teste de Tukey com 95% de nível de confiança. Letras iguais sobrescritas significam que não há diferença estatisticamente significativa entre os valores.

Na Figura 5.10, vê-se que a cepa apresentou perfil de conversão de açúcares fermentáveis (AF) semelhante para os três meios. Após aproximadamente 2,5h de fermentação, observa-se um perfil estacionário, caracterizado por lento consumo de xilose. Em 8h de processo, a levedura alcançou conversões de xilose estatisticamente diferentes em cada meio (Tabela 5.14), porém menos de 50% da pentose foi assimilado em todos eles, enquanto as hexoses foram completamente utilizadas. A conversão de AF ficou em torno de 94,5%, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre os três meios. Além disso, a produção de etanol variou entre 46,45 e 48,50 g/L com rendimento médio de 0,30 g de etanol/g de açúcares, com diferença estatisticamente significativa apenas para a produção de etanol referente ao meio YPFX.

Na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o crescimento, o metabolismo e a expressão gênica são regulados em função da disponibilidade da fonte de carbono. Na presença de glicose, a expressão de genes que codificam enzimas glicolíticas, transportadores de glicose e proteínas ribossômicas é induzida. Por outro lado, genes envolvidos na utilização de fontes alternativas de carbono, na gliconeogênese, na respiração, entre outros, têm sua expressão reprimida, em um fenômeno conhecido como repressão catabólica ou repressão da glicose. Dessa forma, quando *S. cerevisiae* é cultivada em misturas de glicose e outro açúcar fermentável, o outro açúcar é metabolizado somente quando a concentração de glicose se torna baixa ou nula. Além da glicose, as hexoses frutose e manose podem desencadear a repressão catabólica (CARLSON, 1998; CARLSON, 1999; DYNESEN et al., 1999).

Além disso, a levedura *S. cerevisiae* não possui transportadores específicos para pentoses, de forma que a xilose é levada para o interior das células através de proteínas de transporte de hexoses. Entretanto, a maioria desses transportadores nativos tem alta preferência por glicose, o que pode causar inibição no transporte de xilose (MOYSÉS et al., 2016; WANG et al., 2016; YOUNG et al., 2010; YUSUF; GAUR, 2017). Ainda, embora os transportadores de hexoses endógenos possam ser transformados em transportadores específicos de pentoses, eles permanecem sujeitos à degradação de proteínas regulada pela glicose. Assim, na ausência de glicose, algumas proteínas com capacidade de transporte de pentose são degradadas, o que pode levar a uma deficiência no metabolismo da xilose em cepas recombinantes assimiladoras desse açúcar (NIJLAND et al., 2016).

Ao avaliarem o desempenho da levedura recombinante *S. cerevisiae* XUSE na cofermentação de pentoses e hexoses, Hoang e colaboradores (2018) realizaram fermentações em meios compostos por 20 g/L de xilose e 10, 20, 30 e 40 g/L de glicose. Embora a utilização simultânea dos açúcares ainda tenha sido observada, a assimilação de xilose foi inibida na presença de concentrações de glicose maiores que 30 g/L, sugerindo que a inibição pela glicose deveria ser aliviada, especialmente em altas concentrações do açúcar, no contexto de modificações genéticas.

As modificações genéticas que originaram a linhagem MDS 130 não se encontram descritas detalhadamente na literatura. Dessa maneira, não é possível identificar a causa do fenômeno observado exclusivamente com essa cepa na presença de hexoses em alta concentração. Pode-se afirmar que a deficiência na assimilação de xilose ocorreu para os três açúcares estudados (glicose, frutose e sacarose) em concentrações acima de 150 g/L. Estudos mais aprofundados, envolvendo diferentes concentrações desses açúcares e de xilose, assim como o acompanhamento da cinética de consumo dos mesmos, são necessários para um melhor entendimento do fenômeno, mas estão fora do escopo do presente trabalho.

5.5 Visão geral da produção de etanol 2G usando meios industriais

A obtenção de etanol de segunda geração vem sendo amplamente abordada na literatura (ANTUNES et al., 2019; DE ANDRADE et al., 2013; FARIAS; MAUGERI FILHO, 2019; MILESSI et al., 2020a,b; MISHRA et al., 2016; PEREZ et al., 2021,b; ROBAK; BALCEREK, 2018; ZHAO; XIA, 2010). Nesse contexto, alguns resultados obtidos no presente trabalho encontram-se resumidos na Tabela 5.15, juntamente com dados extraídos da literatura. Na Tabela 5.15, destacam-se as produtividades em etanol acima de 20 g/L/h, alcançadas devido à alta concentração de hexoses no meio fermentativo usado no presente trabalho e de glicose no hidrolisado de palha de arroz utilizado por Mishra e colaboradores (2016).

Os resultados obtidos reforçam a utilização de meio composto apenas por hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) e melaço como uma alternativa promissora para a obtenção de etanol 2G e para a integração da produção de etanol 1G/2G. A estratégia de fermentação adotada, que envolve a

incorporação de sacarose ao meio fermentativo e a operação com alta carga de células, resultou em produtividade compatível com a operação industrial. A utilização de hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar bruto (não concentrado) também contribui para a viabilidade econômica do processo, uma vez que elimina os gastos energéticos envolvidos na etapa de concentração por evaporação e contribui para o desempenho da levedura, em razão da menor concentração de inibidores em relação aos hidrolisados concentrados. Além disso, a estratégia abordada pode ser facilmente adaptada ao processo Melle-Boinot (BNDES; CGEE; 2008; MUSSATO et al., 2010), tradicionalmente empregado nas usinas brasileiras para a obtenção de etanol 1G, permitindo a produção de etanol 2G com alterações mínimas de processo.

Tabela 5.15. Produção de etanol 2G em meios industriais com *Saccharomyces cerevisiae* recombinante imobilizada.

Cepa	Modo de operação	Meio	Produtividade máx. (g/L/h)	Etanol (g/L)	Referência
ZU-10	Batelada repetida	HD (palha de milho)	0,4	-	Zhao; Xia (2010)
GSE1618	Contínuo	Hidrolisado de palha de arroz	26,1	42,7	Mishra et al. (2016)
GSE16-T18	Batelada repetida	HC (bagaço de cana-de-açúcar)	5,7	30,0	Milessi et al. (2020a)
GSE16-T18	Batelada	HC (bagaço de cana-de-açúcar)	4,4	17,6	Milessi et al. (2020b)
GSE16-T18 HAA1	Contínuo	HC (bagaço de cana-de-açúcar)	1,9	8,9	Perez et al. (2021)
MDS 130	Batelada repetida	M + H (bagaço de cana-de-açúcar)	22,8	47,2	Presente trabalho
GSE16-T18 HAA1	Batelada repetida	M + H (bagaço de cana-de-açúcar)	24,1	107,7	Presente trabalho

No entanto, é necessária a análise econômica das duas estratégias avaliadas nas seções 5.1.2 e 5.2.4 (menor concentração de AF/menor concentração final de etanol/maior número de ciclos ou maior concentração de AF/maior concentração final de etanol/menor número de ciclos) para definir a opção mais viável. Ainda, para favorecer a viabilidade do processo, é preciso aumentar a resistência da levedura aos inibidores presentes nos hidrolisados e ao etanol, incluindo os efeitos sinérgicos desses

compostos e do tempo de exposição, que provavelmente não foram o objetivo nas modificações genéticas para obtenção das linhagens avaliadas no presente trabalho.

6 CONCLUSÕES

O desempenho fermentativo de três leveduras recombinantes de última geração (*Saccharomyces cerevisiae* GSE16-T18, GSE16-T18 HAA1 e MDS 130) em meios industriais contendo hidrolisado de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar obtido por pré-tratamento ácido (não concentrado), suplementados ou não com melação, foi avaliado. De maneira geral, *S. cerevisiae* GSE16-T18 HAA1 mostrou ser a linhagem mais adequada para obtenção de etanol 2G. Ainda, a adição de melação ao hidrolisado de hemicelulose não concentrado mostrou ser uma estratégia de grande potencial para a obtenção de etanol 2G e integração da produção de etanol 1G/2G. A utilização desses insumos possibilitou a obtenção de altas concentrações de etanol (acima de 50 g/L) com elevada produtividade e a operação prolongada em batelada repetida, diferentemente dos processos fermentativos com hidrolisados de hemicelulose concentrados. Entretanto, para concentrações finais de etanol entre 80 e 100 g/L, observou-se toxicidade do produto sobre o metabolismo celular, o que limitou o número de ciclos e a viabilidade final das células.

A integração da produção de etanol 1G/2G, através da suplementação de hidrolisado de hemicelulose não concentrado com melação, visando aumentar a concentração de açúcares fermentáveis (AF), leva a altas produtividades e menor custo. Entretanto, é necessária a análise das estratégias fermentativas (menor concentração de AF/ menor concentração final de etanol /maior número de ciclos e maior concentração de AF/maior concentração final de etanol/menor número de ciclos) para definir a opção mais viável. Ainda, para favorecer a viabilidade do processo, é preciso aumentar a resistência da levedura aos inibidores e ao etanol, considerando os efeitos sinérgicos e o tempo de exposição.

Para dar continuidade ao trabalho, sugerem-se:

- i. Determinação de um fator de correção para a conversão estimada pelos dados de gás carbônico, através da realização de fermentações em um número de minirreatores (nas mesmas condições) e retirada de um minirreator em intervalos determinados, para quantificação da massa de CO₂ liberada e da concentração de açúcares.

- ii. Avaliação de hidrolisados provenientes de outros materiais lignocelulósicos (palha de cana-de-açúcar, por exemplo);
- iii. Avaliação da lavagem das células imobilizadas após um determinado número de ciclos como estratégia para atenuação dos efeitos tóxicos do etanol;
- iv. Avaliação do desempenho da levedura selecionada em meios contendo concentração de AF intermediária às estudadas no presente trabalho;
- v. Escalonamento da melhor condição em reator de leito fixo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBOYE, P. T.; BETTIGA, M.; OLSSON, L. The chemical nature of phenolic compounds determines their toxicity and induces distinct physiological responses in *Saccharomyces cerevisiae* in lignocellulose hydrolysates. **AMB Express**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2014.

AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 309–318, 2002.

ALDIGUIER, A. S.; ALFENORE, S.; CAMELEYRE, X.; GOMA, G.; URIBELARREA, J. L.; GUILLOUET, S. E.; MOLINA-JOUVE, C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 4, p. 217–222, 2004.

ALMEIDA, J. R. M.; BERTILSSON, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; GORSICH, S.; LIDÉN, G. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 625–638, 2009.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate for Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

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.

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.

ASK, M.; BETTIGA, M.; DURAISWAMY, V. R.; OLSSON, L. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2013.

AZHAR, S. H.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52–61, 2017.

BASSO, L. C.; DE AMORIM, H. V.; DE OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Research**, v. 8, n. 7, p. 1155–1163, 2008.

BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; DO ESPIRITO-SANTO, J. C. A.; MÜLLER, G.; SCHLÖLG, P. S.; SILVA, C. P.; TONSO, A.; DARAN, J. M.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; STAMBUK, B. U. Engineering topology and

kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694–703, 2011.

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.

BANCO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL; CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. 1 ed. Rio de Janeiro: Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social, 2008. 314 p.

CALLEGARI, A; BOLOGNESI, S; CECCONET, D; CAPODAGLIO, A. G. Production technologies, current role, and future prospects of biofuels feedstocks: A state-of-the-art review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 384-416, 2019.

CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; FREITAS, W. L. C. F, FELIPE, M. G. A.; 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.

CARLSON, M. Regulation of glucose utilization in yeast. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 8, p. 560-564, 1998.

CARLSON, M. Glucose repression in yeast. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, p. 202-207, 1999.

CARVALHO, W.; BATISTA, M. A.; CANILHA, L.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Sugarcane bagasse hydrolysis with phosphoric and sulfuric acids and hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 1308-1312, 2004.

CASCAVAL, D.; GALACTION, A. I.; ROTARU, R. Effect of glucose internal diffusion on alcoholic fermentation in a stationary basket bioreactor with immobilized yeast cells. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 3, p. 6200-6208, 2011.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R. C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.

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

CLARK, T. A.; MACKIE, K. L. Fermentation Inhibitors in Wood Hydrolysates Derived from the Softwood *Pinus Radiata*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34B, n. 2, p. 101–110, 1984.

CLARKE, M. A. Syrups. In: CABALLERO, B.; TRUGO, L. C.; FINGLAS, P. M. (org.). **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. Amsterdam: Academic Press. 2003. p. 5711-5717.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. Brasília, v. 6, n. 4, p. 1-58. 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 16 set. 2020.

DA SILVA, C. R. **Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glicose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae***. 2013. 138 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.

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, 2012.

DELLA-BIANCA, B. E.; BASSO, T. O.; STAMBUK, B. U.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. What do we know about the yeast strains from the Brazilian fuel ethanol industry? **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 3, p. 979–991, 2013.

DEMEKE, M. M.; DIETZ, H., LI, Y.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; MUTTURI, S.; DEPREZ, S.; DEN ABT, T.; 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**, v. 6, n. 1, p. 1–24, 2013a.

DEMEKE, M. 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 Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 1–17, 2013b.

DOS SANTOS, L. V.; CARAZZOLLE, M. F.; NAGAMATSU, S. T.; SAMPAIO, N. M. V.; ALMEIDA, L. D.; PIROLLA, R. A. S.; BORELLI, G.; CORRÊA, 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, p. 1–14, 2016.

DYNESEN, J.; SMITS, H. P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 579-582, 1998.

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, p. 29-38, 2019.

- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-LUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4775–4800, 2010.
- GRUBECKI, I. Optimal feed temperature for an immobilized enzyme fixed-bed reactor: A case study on hydrogen peroxide decomposition by commercial catalase. **Chemical and Process Engineering**, v. 39, n. 1, p. 39-57, 2018.
- HOANG, P.; KO, J. K.; GONG, G.; UM, Y.; LEE, S. M. Genomic and phenotypic characterization of a refactored xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain for lignocellulosic biofuel production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 1–13, 2018.
- JONES, A. M.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Ethanolic Fermentation of Blackstrap Molasses and Sugarcane Juice Using Very High Gravity Technology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1242–1246, 1994.
- KARAGOZ, P.; BILL, R. M.; OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, v. 143, p. 741-752, 2019.
- KASENO; KOKUGAN, T. The Effect of Molasses Pretreatment by Ceramic Microfiltration Membrane on Ethanol Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 6, p. 577-582, 1997.
- KOBAYASHI, Y.; SAHARA, T.; OHGIYA, S.; KAMAGATA, Y.; FUJIMORI, K. E. Systematic optimization of gene expression of pentose phosphate pathway enhances ethanol production from a glucose/xylose mixed medium in a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.
- KUNDU, S.; PANDA, T; MAJUMDAR, S. K.; GUHA, B.; BANDYOPADHYAY, K. K. Pretreatment of Indian Cane Molasses for Increased Production of Citric Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1114-1121, 1984.
- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N. O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 3–4, p. 151–159, 1999.
- LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JÖNSSON, L. J. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, 617–632, 2000.
- LI, Y. C.; LI, G. Y.; GOU, M.; XIA, Z. Y.; TANG, Y. Q.; KIDA, K. Functional expression of xylose isomerase in flocculating industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 685–691, 2016.
- LIANG, L.; ZHANG, Y. P.; ZHANG, L.; ZHU, M. J.; LIANG, S. Z.; & HUANG, Y. N. Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 12, p. 1605–1613, 2008.

LIAO, Y.; KOELEWIJN, S.-F.; VAN DEN BOSSCHE, G.; VAN AELST, J.; VAN DEN BOSCH, S.; RENDERS, T.; NAVARE, K.; NICOLAÏ, T.; VAN AELST, K.; MAESEN, M.; MATSUSHIMA, H.; THEVELEIN, J.; ACKER, K.; LAGRAN, B.; VERBOEKEND, D.; SELS, B. A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production. **Science**. v. 367, n. 6484, p. 1385-1390, 2020.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 37-53, 2009.

MEIJNEN, J. P.; RANDAZZO, P.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; VAN DEN BRINK, J.; VANDECRUYS, P.; STOJILJKOVIC, M.; DUMORTIER, F.; ZALAR, P.; BOEKHOUT, T.; GUNDE-CIMERMAN, N.; KOKOŠAR, J.; ŠTAJDOHAR, M.; CURK, T.; PETROVIČ, U.; THEVELEIN, J. M. 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.

MESQUITA, T. J. B.; SANDRI, J. P.; GIORDANO, R. C.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C. A High-Throughput Approach for Modeling and Simulation of Homofermentative Microorganisms Applied to Ethanol Fermentation by *S. cerevisiae*. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 13-26, 2021.

MILESSI, T. S. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e geneticamente modificada imobilizadas**. 2017. 190 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.

MILESSI, T. S. S.; CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; DA SILVA, S. S. Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioethanol**, n. 1, v. 1, p. 1–8, 2013.

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, 2020a.

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, 2020b.

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.

- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, 2005.
- MOTA, C. J. A.; MONTEIRO, R. S. Química e sustentabilidade: novas fronteiras em biocombustíveis. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1483-1490, 2013. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422013001000002&script=sci_arttext>. Acesso em: 16 set. 2020.
- MOYSÉS, D. N.; REIS, V. C. B.; DE ALMEIDA, J. R. M.; DE MORAES, L. M. P.; TORRES, F. A. G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 3, p. 1–19, 2013.
- MUSSATO, 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, p. 817-830, 2010.
- NAJAFPOUR, G.; YOUNESI, H.; ISMAIL, K. S. K. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 251-260, 2004.
- NARENDRANATH, N. V.; THOMAS, K. C.; INGLEDEW, W. M. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 171–177, 2001.
- NIJLAND, J. G.; VOS, E.; SHIN, H. Y.; DE WAAL, P. P.; KLAASSEN, P.; DRIESSEN, A. J. M. Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 158, p. 1-10, 2016.
- NOGUÉ, V. S.; KARHUMAA, K. Xylose fermentation as a challenge for commercialization of lignocellulosic fuels and chemicals. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 4, p. 761–772, 2015.
- ÖZÜDOĞRU, H. M. R.; NIEDER-HEITMANN, M.; HAIGH, K. F.; & GÖRGENS, J. F. Techno-economic analysis of product biorefineries utilizing sugarcane lignocelluloses: Xylitol, citric acid and glutamic acid scenarios annexed to sugar mills with electricity co-production. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 259–268, 2019.
- PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C. J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; BIAGI, G.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L. Short communication: Characterization of molasses chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 10, n. 10, 2020.
- 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. 447–454, 1999.
- 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.

PEREZ, C. L. **Produção de etanol 2G em reator de leito fixo e por bioprocessamento consolidado utilizando leveduras recombinantes de alta performance**. 2021. Tese (Doutorado em Engenharia Química – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, 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. C. L.; 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**, v. 169, p. 1–12, 2021.

PRADEEP, P.; REDDY, O. V. S. High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: Effect of nutrients. **Indian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 82–87, 2010.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; DA SILVA, S. S. An Evaluation of Different Bioreactor Configurations with Immobilized Yeast for Bioethanol Production. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 6, 2008.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. 2020 Pocket Guide to Ethanol. p. 1-20, 2020. Disponível em: <<https://ethanolrfa.org/wp-content/uploads/2020/02/2020-Outlook-Pocket-Guide-for-Web.pdf>>. Acesso em: 16 set. 2020.

ROBAK, K.; BALCEREK, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. **Food Technology and Biotechnology**, v. 56, n. 2, 174–187, 2018.

ROMANÍ, A.; PEREIRA, F.; JOHANSSON, B.; DOMINGUES, L. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* ethanol strains PE-2 and CAT-1 for efficient lignocellulosic fermentation. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 150–158, 2015.

SANDRI, J. P. **Obtenção e caracterização de levedura recombinante com elevada tolerância a etanol por Engenharia Evolutiva**. 2019. 150 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química). Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos.

SANDRI, J.P.; PEREZ, C.L.; MESQUITA, T.J.B.; MILESSI, T.S.S.; GIORDANO, R.L.C.; ZANGIROLAMI, T.C. Fermentação da xilose por *S. cerevisiae* recombinante: tolerância ao etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 22., 2018, São Paulo, Anais eletrônicos, São Paulo, 2018. p. 1-4.

SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono- and di-saccharide sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4748-4750, 2011.

SHULER, M. L.; KARGI, F.; DELISA, M. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. Third Edition. United States of America: Pearson, 2017.

SILVA, C. R.; ZANGIROLAMI, T. C.; RODRIGUES, J. P.; MATUGI, K.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 35-42, 2012.

- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, 2002.
- 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.
- TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis of dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 197–203, 2018.
- TORIJA, M. J.; ROZÈS, N.; POBLET, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 47–53, 2003.
- TRAN, P. H. N.; KO, J. K.; GONG, G.; UM, Y.; LEE, S. Improved simultaneous co-fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulosic biorefinery. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 12, p. 1-14, 2021.
- VELOSO, I. I. K.; RODRIGUES, K. C. S.; SONEGO, J. L. S.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 141, p. 60–70, 2019.
- WANG, M.; YU, C.; ZHAO, H. Directed Evolution of Xylose Specific Transporters to Facilitate Glucose-Xylose Co-Utilization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 484-491, 2016.
- WANG, C.; ZHAO, J.; QIU, C.; WANG, S.; SHEN, Y.; DU, B.; DING, Y.; BAO, X. Co-utilization of D-Glucose, D-Xylose, and L-Arabinose in *Saccharomyces cerevisiae* by Coexpressing the Metabolic Pathways and Evolutionary Engineering. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
- WESTMAN, J. O.; TAHERZADEH, M. J.; FRANZÉN, C. J. Proteomic Analysis of the Increased Stress Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* Encapsulated in Liquid Core Alginate-Chitosan Capsules, **PLOS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1-12, 2012.
- WHEALS, A. E.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends in Biotechnology**, v. 17, P. 482–487, 1999.
- WIJAYA, Y. P.; PUTRA, R. D. D.; WIDYAYA, V. T.; HA, J. M.; SUH, D. J.; KIM, C. S. Comparative study on two-step concentrated acid hydrolysis for the extraction of sugars from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 164, p. 221–231, 2014.
- XI, Y. L.; DAI, W. Y.; XU, R.; ZHANG, J. H.; CHEN, K. Q.; JIANG, M.; WEI, P.; OUYANG, P. K. Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, 1779–1785, 2013.
- XU, K.; XU, P. Efficient production of L-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources. **Bioresource Technology**, v. 153, p. 23–29, 2014.
- YANG, K. M.; LEE, N. R.; WOO, J. M.; CHOI, W.; ZIMMERMANN, M.; BLANK, L. M.; PARK, J. B. Ethanol reduces mitochondrial membrane integrity and thereby impacts

carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 12, n. 6, p. 675–684, 2012.

YOUNG, E.; LEE, S.; ALPER, H. Optimizing pentose utilization in yeast: the need for novel tools and approaches. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 24, p. 1-12, 2010.

YUSUF, F.; GAUR, N. A. Engineering *Saccharomyces cerevisiae* for C5 Fermentation: a Step Towards Second-Generation Biofuel Production. In: KALIA, V. C.; SAINI, A. K. (org.). **Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes**. Singapore: Springer, 2017. p. 157-172.

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.

APÊNDICE

Tabela 1. Pontuação atribuída aos parâmetros produtividade em etanol, rendimento em etanol e viabilidade final das células referentes às leveduras T18, HAA1 e MDS nos meios industriais YPHC, YPHD e MHB1.

Reciclo	Cepa	YPHC			YPHD			MHB1		
		Q _P	Y _{P/S}	Viab.	Q _P	Y _{P/S}	Viab.	Q _P	Y _{P/S}	Viab.
1	T18	1	0	0	1	0	1	0	0	0
	HAA1	0	0	0	0,5	0	0	0	0	0
	MDS	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0
2	T18	1	0	0	1	1	1	0	0	0
	HAA1	0	0	1	0,5	1	0	0	0	0
	MDS	1	1	1	0	0	1	1	1	0
3	T18	0	0	0	1	0	1	1	0	0
	HAA1	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0
	MDS	0	0	1	0	0	1	1	0	0
4	T18	0	0	0	0,5	0	1	0	0	0,5
	HAA1	1	0	1	1	0	0	0,5	0	1
	MDS	0,5	0	1	0	0	1	1	0	0
5	T18	0,5	0	0,5	0,5	1	0,5	0	0	0
	HAA1	0	0,5	0	1	0	0	0,5	0	0
	MDS	1	1	1	0	0	1	1	0	0
6	T18	0	0	0,5	0	0	1	0	0	0
	HAA1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	MDS	1	0	1	0	0	1	0	0	0
7	T18	-	-	-	1	0	0,5	1	0	0,5
	HAA1	-	-	-	0	0,5	0	1	0	1
	MDS	-	-	-	1	1	1	0	0	0
8	T18	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	HAA1	-	-	-	-	-	-	1	0	1
	MDS	-	-	-	-	-	-	1	0	0
9	T18	-	-	-	-	-	-	0,5	0,5	0
	HAA1	-	-	-	-	-	-	1	0	0
	MDS	-	-	-	-	-	-	0	1	0
10	T18	-	-	-	-	-	-	0	0	0
	HAA1	-	-	-	-	-	-	0	0	1
	MDS	-	-	-	-	-	-	0	0	0,5

Tabela 2. Pontuação atribuída aos parâmetros produtividade em etanol e rendimento em etanol referentes às leveduras T18 e HAA1 no meio industrial MHB3.

Reciclo	Cepa	Q_P	Y_{P/S}
1	T18	0	0
	HAA1	1	0
2	T18	0	0
	HAA1	1	0
3	T18	0	0
	HAA1	1	0
4	T18	0	0
	HAA1	1	0