

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

**“AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL 2G, XILITOL E
BIOMASSA CELULAR EM MEIOS SINTÉTICOS E
HIDROLISADOS LIGNOCELULÓSICOS PELA LEVEDURA
Meyerozyma guilliermondii”**

Michelle dos Santos Cordeiro Perna

Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de
DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de
concentração: QUÍMICA

Orientador: Prof. Dr. Jean Marcel Ribeiro Gallo

Co-orientador: Dra. Dulce Helena Ferreira De Souza

São Carlos – SP

2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Michelle dos Santos Cordeiro Perna, realizada em 30/05/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza (UFSCar)

Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves (UFSCar)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Daniel Ibraim Pires Atala (Bioprocess)

Prof. Dr. Marcelo Ventura Rubio (Bioprocess)

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

Ao meu querido marido André, meus pais Sandra e Marcos (in memorian), meus irmãos Kléber, Tiago e Eduardo, as minhas irmãs Tatiane e Josiane, a todos com amor, sinceridade e gratidão dedico.

“Aprenda com o ontem, viva o hoje, espere pelo amanhã. O importante é não parar de questionar.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o meu caminho e permitir perseverar sobre cada obstáculo enfrentado.

Ao Professor Dr. Jean Marcel Ribeiro Gallo pela oportunidade, apoio, exemplo, orientação atenção, conhecimentos compartilhados, fé e paciência, os quais foram imprescindíveis para meu crescimento científico, intelectual.

A Professor Dra. Dulce Helena Ferreira De Souza pelo apoio, orientação e conhecimentos compartilhados ao longo desta trajetória.

A Universidade Federal de São Carlos – pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Química pelos conhecimentos compartilhados.

Ao SENAI SP e especialmente à unidade de Sertãozinho “Ettore Zanini” por todo o apoio e incentivo imprescindíveis ao sucesso desta realização.

Ao amigo e assistente de apoio técnico do Senai de Sertãozinho Juan Carlos Silva, pelo apoio técnico e pessoal em todas as etapas práticas.

A toda a equipe do grupo Grupo de Energias Renováveis, Nanotecnologia e Catálise (GreenCat) pelo apoio e amizade.

Aos amigos Dr. Pedro Henrique Finger, Dr. Raimundo Gamela e Bruna Soares Dionízio pela parceria e pelo apoio intelectual e emocional ao longo desta trajetória.

Ao meu amado marido André Luís Perna, pelo apoio incondicional durante os muitos fins de semana e madrugadas que passei me dedicando a este projeto.

A toda minha família por acreditarem em mim, pela compreensão em todos os momentos em que estive ausente e pelo carinho e apoio de sempre.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1- Resumo das vantagens e desvantagens de pré-tratamento e hidrólise do material celulósico. ¹²⁵	13
Tabela 4.1 - Composição química do meio de cultivo YNB, Sigma®, Y1250.....	46
Tabela 4.2 – Definição dos tempos de exposição à luz UV das culturas de <i>M. guilliermondii</i>	47
Tabela 4.3 – Descrição dos inóculos aplicados nos experimentos cinéticos e fermentativos de <i>M. guilliermondii</i>	49
Tabela 4.4 – Matrix de planejamento fatorial 2 ⁴	57
Tabela 5.1 - Resultados da análise de variância das velocidades médias de crescimentos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/l) + extrato de levedura (10g/l), pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.....	70
Tabela 5.2 - Teste de Tukey dos resultados das velocidades específica máxima de crescimento dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> original (311_P), e adaptadas (311_EN e 311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.....	75
Tabela 5.3 - Resultados da constante Monod (ks) e de inibição (ki) dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> original (311_P), e adaptadas (311_EN e 311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55 g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.	77
Tabela 5.4 - Análise de variância do consumo de pentoses por <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de pentoses, 20	

g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.	83
Tabela 5.5 - Resultados do teste de Tukey das velocidades médias de crescimento (μ_x , h ⁻¹) dos experimentos realizados com a levedura <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.....	86
Tabela 5.6 - Parâmetros de conversão de xilose em xilitol dos experimentos realizados com a levedura <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 e 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.	88
Tabela 5.7 - Resultados do teste de Tukey das médias dos valores de xilitol produzidos nos experimentos realizados com a levedura <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 e 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.....	89
Tabela 5.8 - Xilose consumida pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h em 30°C em rotações de 60 ou 160 rpm.	93
Tabela 5.9 - Biomassa celular produzida pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou	

sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	100
Tabela 5.10 - Análise de variância do modelo de regressão do rendimento em biomassa celular produzida pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	102
Tabela 5.11 - Valores de xilitol produzidos (g/L), conversão e rendimento em xilitol dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	108
Tabela 5.12 - valores de etanol produzidos (g/L), conversão e rendimento em etanol dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20g/l de xilose, 20 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	112
Tabela 5.13 - Caracterização dos açúcares e dos inibidores presentes nos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar e resíduos da fabricação de lápis coloridos, obtidos a partir de hidrólise enzimática e concentrados.	119
Tabela 5.14 - Resultados do teste de Tukey dos parâmetros de fermentação dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.....	138
Tabela 5.15 - Parâmetros fermentativos de <i>M. guilliermondii</i> CCT7783(311_EN), presente estudo, e leveduras convencionais reportadas na literatura.....	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1- Descrição dos efeitos criados pela etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico. ¹²¹	12
Figura 3.2 – Mecanismo de hidrólise do material celulósico catalisado por ácido, (a) protonação do oxigênio glicosídico, (b) quebra da ligação C ₁ -O (formando um carbocátion), (c) estabilização do carbocátion, (d) ataque nucleofílico da água sobre C ₁ , (e) regeneração do ácido (Adaptado de Ogeda e Petri) ¹²⁵	16
Figura 3.3 – Descrição da ação enzimática sobre a celulose com a geração de glicose (OGEDA e Petri). ¹²⁵	17
Figura 3.4 – Vias metabólicas envolvidas na metabolização de pentoses por microrganismos. ^{36,98}	19
Figura 3.5 – Exemplo da produção integrada de etanol de segunda e primeira geração aplicando o bagaço excedente. ⁶⁶	25
Figura 3.6 – Exemplo de rota química de obtenção de xilitol. ⁷⁹	28
Figura 3.7 – Gráfico comparativo da aplicação de xilitol como adoçante natural. ⁷⁹	29
Figura 3.8 – Exemplo de produtos que podem ser produzidos a partir de xilitol como plataforma. ⁷⁹	30
Figura 3.9 – Rota metabólica de conversão de xilose em leveduras. ⁸¹	31
Figura 3.10 - Descrição gráfica do modelo de Monod (Monod apud Paixão). ⁹⁷	36
Figura 4.1 – Montagem do aparato experimental para geração de condições de hipoxia.....	58
Figura 4.2 – Preparo das biomassas secas e trituradas para a etapa de pré-hidrólise alcalina	63
Figura 4.3 – Etapas do pré-tratamento alcalino das biomassas lignocelulósicas ...	64
Figura 4.4 – Preparo dos hidrolisados lignocelulósicos	64

Figura 5.1 - Curvas de crescimento de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/L) + extrato de levedura (10g/L), pH de 5,5 incubadas a 30°C, 160 rpm por 96 h.....	69
Figura 5.2 - Resultado do teste de Tukey das velocidades médias de crescimentos de <i>M. guilliermondii</i> em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/l) + extrato de levedura (10g/l), pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.....	71
Figura 5.3 - Velocidades específicas de crescimento de <i>M. guilliermondii</i> (311_P), <i>M. guilliermondii</i> após crescimento adaptativo (311_EN) e <i>M. guilliermondii</i> após exposição a luz UV + crescimento adaptativo (311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.....	74
Figura 5.4 - Consumo de pentoses e crescimento celular de <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.....	79
Figura 5.5 - Consumo de pentoses e crescimento celular de <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 20 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.	81
Figura 5.6 - Produção de biomassa celular de <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 20 e 40 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.	83

Figura 5.7 - Teste de Tukey dos resultados do consumo de pentoses por <i>M. guilliermondii</i> original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/l de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.	84
Figura 5.8 - Gráfico de pareto dos efeito padronizados no consumo de xilose nos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	94
Figura 5.9 - Gráfico de distribuição normal dos efeitos, padronizados, no consumo de xilose por <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	95
Figura 5.10 - Gráfico de efeitos principais das médias ajustadas do consumo de xilose pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	96
Figura 5.11 - Gráfico de porcentagem dos efeitos das variáveis V1-concentração de xilose (g/L) , V2-fluxo de N ₂ , V3-concentração de inóculo e V4-rotação, na produção de biomassa celular pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	100

Figura 5.12 - Gráfico de superfície de resposta do rendimento em biomassa celular versus concentração inicial de xilose (g/L) e Fluxo de N ₂ pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	104
Figura 5.13 - Gráfico de superfície de contorno considerando os efeitos das variáveis rotação e fluxo de N ₂ , no rendimento em biomassa celular pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	105
Figura 5.14 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados das variáveis no rendimento em xilitol (g/L) dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	109
Figura 5.15 - Gráfico de interação das variáveis fluxo de N ₂ e rotação no rendimento em xilitol (g/g) dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	110
Figura 5.16 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados das variáveis na produção de etanol (g/L) dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N ₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.	113

- Figura 5.17 - Gráfico de interação das variáveis concentração inicial de xilose inóculo no rendimento em etanol (g/g) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.114
- Figura 5.18 - Gráfico de efeitos principais da variável fluxo de N₂ no rendimento em etanol (g/g) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.116
- Figura 5.19 - Curvas de consumo de substratos e produção de bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.....121
- Figura 5.20 - Velocidade de consumo de substratos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.....122
- Figura 5.21– Rendimentos em bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados com 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), em pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm126
- Figura 5.22 – Exemplo do balanço de massa da fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos de palha de cana-de-açúcar pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.....129
- Figura 5.23 - Curvas de consumo de substratos e produção de bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da

fabricação de lápis (RFL) suplementado com nutrientes, inoculados 1 g/L <i>M. guilliermondii</i> (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.....	132
Figura 5.24 - Velocidade de consumo de substratos dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.	133
Figura 5.25 - Rendimentos em bioprodutos dos cultivos de <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.	134
Figura 5.26 - Exemplo do balanço de massa da fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos de resíduos da fabricação de lápis pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.....	136

Avaliação da produção de etanol 2G, xilitol e biomassa celular em meios sintéticos e hidrolisados lignocelulósicos pela *Meyerozyma guilliermii*. A biomassa lignocelulósica é a segunda maior fonte de carbono disponível no planeta. Entretanto a viabilidade das biorrefinarias depende da superação de desafios como a busca por microrganismos capazes de converter pentoses em etanol 2G e produtos de alto valor agregado. Desta forma o presente trabalho objetivou avaliar a produção de etanol 2G e xilitol pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783) a partir de resíduos da produção de lápis e palha de cana-de-açúcar. A levedura *M. guilliermondii* foi adaptada em xilose e os resultados demonstraram que a velocidade específica de crescimento foi 75% maior para linhagens adaptadas de forma espontânea. Na segunda fase do estudo, as linhagens adaptadas, foram aplicadas em um estudo do efeito das condições de fermentação e os resultados demonstraram que altas condições de hipoxia e altas rotações levam a redução na produção de biomassa e aumento na produção de xilitol. A produção de etanol foi maior com o aumento da concentração de pentoses e de inóculo. Na fermentação dos hidrolisados aproximadamente 50% dos açúcares foram convertidos em etanol 2G e 7% em xilitol para ambos os hidrolisados estudados, havendo um efeito de inibição no tempo de fermentação para os hidrolisados de resíduos de lápis. A levedura *M. guilliermondii* apresenta potencial para aplicação em processos de biorrefinaria e condições otimizadas podem levar a uma biossíntese direcionada e com maiores rendimentos.

Evaluation of the production of second generation ethanol, xylitol and cellular biomass in synthetic media and hydrolyzed lignocellulosic by yeast *Meyerozyma guilliermondii*. Lignocellulosic biomass is the second largest source of carbon available on the planet. However, the viability of biorefineries depends on overcoming challenges such as the search for microorganisms capable of converting pentoses into 2G ethanol and high added value products. Thus, the present work aimed to evaluate the production of 2G ethanol and xylitol by the yeast *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783) from residues from the production of pencils and sugarcane straw. The yeast *M. guilliermondii* was adapted on xylose and the exact results that the specific growth rate was 75% higher for spontaneously adapted strains. In the second phase of the study, the adapted strains were applied in a study of the effect of fermentation conditions and the required results that high hypoxic conditions and high rotations lead to a reduction in biomass production and an increase in xylitol production. Ethanol production was higher with increasing concentration of pentoses and inoculum. In the fermentation of the hydrolysates approximately 50% of the sugars were converted into 2G ethanol and 7% into xylitol for both considered hydrolysates, having a controlled effect on the fermentation time for the hydrolysates from pencil residues. The yeast *M. guilliermondii* has potential for application in biorefinery processes and optimized conditions can lead to a targeted biosynthesis with higher yields.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo geral.....	7
2.2 Objetivos específicos	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
3.1 Sustentabilidade ambiental e econômica da produção de etanol 2G.....	9
3.2 Obtenção de hidrolisados lignocelulósicos.....	10
3.2.1 Pré-tratamento.....	11
3.2.2 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos	15
3.3 Metabolização de pentoses	18
3.3.1 Leveduras não convencionais fermentadoras de pentoses.	20
3.3.2 Levedura não convencional <i>Meyerozyma guilliermondii</i> CCT7783.....	22
3.4 Produtos da fermentação da xilose	24
3.4.1 Etanol de segunda geração.....	24
3.4.2 Xilitol	28
3.5 Crescimento adaptativo.....	32
3.6 Cinética de crescimento de leveduras.....	34

3.7	Parâmetros de processo que influenciam na conversão de pentoses em xilitol, etanol e biomassa celular por leveduras.	36
3.7.1	Influência da concentração de oxigênio na bioconversão de pentoses por leveduras	37
3.7.2	Influência da concentração de substrato na bioconversão de pentoses por leveduras	39
3.7.3	Influência da agitação na conversão de xilitol e etanol	41
3.7.4	Influência da concentração inicial de células na fermentação alcoólica e de xilitol	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Avaliação dos efeitos do crescimento adaptativo sobre a cinética de crescimento e bioconversão de pentoses por <i>Meyerozyma guilliermondii</i> (CCT7783)	45
4.1.1	Preparo dos inóculos para os experimentos de crescimento adaptativo.....	45
4.1.2	Experimentos de crescimento adaptativo	47
4.1.3	Experimentos de cinética de crescimento	48
4.1.3.1	Preparo dos inóculos	48
4.1.3.2	Montagem dos experimentos	49
4.1.3.3	Preparo dos experimentos fermentativos	50
4.1.4	Metodologia analítica.....	51
4.1.5	Determinação dos parâmetros cinéticos	52
4.1.6	Análise estatística.....	54
4.2	Avaliação dos efeitos dos parâmetros hipoxia, concentração inicial de inóculo, concentração inicial de xilose e rotação na eficiência de bioconversão por <i>M. guilliermondii</i>	55
4.2.1	Preparo dos inóculos e meios de cultivo.....	55
4.2.2	Planejamento experimental.....	56

4.2.3	Montagem experimental	58
4.2.4	Análises das variáveis de resposta	59
4.2.5	Cálculo dos efeitos das variáveis	59
4.2.6	Análise estatística.....	61
4.3	Fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos por <i>M. guilliermondii</i> 311_EN	61
4.3.1	Preparo do inóculo	61
4.3.2	Preparo das biomassas lignocelulósicas	62
4.3.3	Preparo dos hidrólisados	63
4.3.4	Metodologia analítica.....	65
4.3.5	Análise estatística.....	66
4.3.6	Determinação dos parâmetros fermentativos.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	67
5.1	Modo de apresentação e de discussão dos resultados.....	67
5.2	Efeito do crescimento adaptativo na cinética de crescimento e na capacidade de bioconversão de <i>M. guilliermondii</i>	67
5.2.1	Avaliação da capacidade de crescimento em xilose e em extrato de levedura. 68	
5.2.2	Avaliação dos parâmetros cinéticos das leveduras obtidas por crescimento adaptativo em xilose.....	72
5.2.2.1	Crescimento em meio mínimo contendo concentrações crescentes de xilose como substrato.	73
5.3	Efeito do crescimento adaptativo no consumo de xilose, produção de biomassa celular e xilitol em meio semi-sintético YEPX.	78
5.3.1	Avaliação do consumo de pentoses e produção de biomassa em meio de cultivo rico (YEPX) contendo 20 ou 40 g/L de xilose.	79
5.3.1.1	Efeito do crescimento adaptativo na conversão em xilitol	87

5.4	Avaliação do efeito das condições fermentativas sobre a biossíntese de etanol, xilitol e biomassa celular por <i>M. guilliermondii</i> adaptada (311_EN)	91
5.4.1	Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N ₂ no meio de cultivo e rotação no consumo de xilose pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada 311_EN	92
5.4.2	Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N ₂ no meio de cultivo e rotação na produção de biomassa celular pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada 311_EN	99
5.4.3	Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N ₂ no meio de cultivo e rotação na produção de xilitol pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada 311_EN	107
5.4.4	Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N ₂ no meio de cultivo e rotação na produção de etanol pela levedura <i>M. guilliermondii</i> adaptada 311_EN	111
5.5	Avaliação da fermentação de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas por <i>M. guilliermondii</i> adaptada 311_EN	117
5.5.1	Fermentação de hidrolisado obtido a partir da palha da cana-de-açúcar..	120
5.5.2	Fermentação do hidrolisado obtido a partir dos resíduos da fabricação de lápis colorido (RFL).....	130
6	CONCLUSÕES	145
7	REFERÊNCIAS	147
8	ANEXOS	183
8.1	Curvas de calibrações utilizadas para determinar a concentração dos substratos e produtos dos experimentos em meios sintéticos e hidrolisados.	183

8.2	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 5g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	189
8.3	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 15g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	190
8.4	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 25g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	191
8.5	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 35g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	192
8.6	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 45g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	193
8.7	Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de <i>M. guilliermondii</i> nos cultivos em 55g/L de xilose, em meio mínimo YNB.....	194
8.8	Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (k_s) dos cultivos da linhagem original <i>M. guilliermondii</i> 311_P, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 35 g/L.	195
8.9	Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (k_s) dos cultivos da linhagem adaptada sem exposição a luz UV <i>M. guilliermondii</i> 311_EN, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 45 g/L.	196

8.10	Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (k_s) dos cultivos da linhagem adaptada com exposição a luz UV <i>M. guilliermondii</i> 311_UV, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 35 g/L.	197
------	---	-----

1 INTRODUÇÃO

A busca por alternativas renováveis de produção de combustíveis e bioprodutos de maior valor agregado tem se intensificado nas últimas décadas, devido a problemas ambientais, econômicos e sociais associados a cadeia de produção de produtos de origem fósseis, gerando demandas por novas pesquisas associadas aos avanços científicos e tecnológicos necessários para viabilizar a substituição dos inúmeros compostos que derivam da cadeia do petróleo.¹⁻²

Os processos em que se aplicam matérias-primas sustentáveis para a produção de biocompostos que podem ser aplicados em inúmeros segmentos em substituição àqueles de origem fósseis são denominados como biorrefinarias. Destacando-se os processos de produção de etanol de segunda geração (2G), como um dos principais combustíveis dentre aqueles que podem ser gerados em processos de biorrefinarias.¹⁻²

O etanol de segunda geração (2G) é um dos produtos mais importantes que podem ser produzidos a partir de resíduos lignocelulósicos, por via fermentativa. Sua denominação se deve ao fato de que os açúcares aplicados como substrato são oriundos da fração fibrosa da biomassa, enquanto a rota convencional, que produz o etanol denominado como 1G, utiliza os açúcares que estão solubilizados nas matrizes sacaríneas como cana-de-açúcar e beterraba açucareira.¹⁸⁻¹⁹

A produção de etanol 2G a partir de biomassa lignocelulósica ganhou destaque nos últimos anos devido ao aumento do consumo de etanol, especialmente em países como o Brasil onde a aplicação como combustível tem ampliado a demanda nas últimas décadas. A produção atual de etanol no Brasil é de cerca de 29 bilhões de litros e a demanda crescente do combustível estima que serão necessários até 46 bilhões de litros para suprir o mercado interno em 2030.²⁰⁻²¹

Um dos maiores desafios atuais em se aumentar a produção de etanol, para suprir a crescente demanda, está no fato de que não é possível alcançar este aumento sem comprometer terras férteis destinadas a produção de alimentos. E neste contexto o aproveitamento total da biomassa e não somente das frações sacaríneas pode gerar um aumento de produtividade com estimativa de até 50%.²²⁻²⁴

O processo de produção do etanol 2G depende de etapas onerosas como a separação de frações ligninas e a sacarificação das fibras, que aumenta os custos de processo. Desta forma, um dos limitadores atuais deste processo está no uso economicamente sustentável da biomassa lignocelulósica, que é apontada como uma das fontes mais promissoras para substituir as de origem fóssil.

A biomassa lignocelulósica se destaca pela sua composição simples, sendo 70% composta de celulose e hemicelulose que são estruturas poliméricas fibrosas que podem ser convertidas em glicose e outros açúcares de cinco carbonos denominados como pentoses. Tais açúcares têm uma ampla aplicação como substratos para rotas de biossíntese em processos de biorrefinarias.³

Outro aspecto que torna a biomassa lignocelulósica uma matriz importante no cenário mundial atual é a sua ampla disponibilidade. Trata-se de um componente de parede celular de organismos vegetais amplamente distribuídos, sendo desta forma a segunda maior fonte de carbono existente no planeta⁴. Além disso, a utilização de biomassas residuais oriundas dos processos industriais e urbanos reduz as emissões de dióxido de carbono, visto que o principal destino destes resíduos ainda é a queima ou o lançamento em aterros.⁵

Inúmeros desafios científicos e tecnológicos necessitam ser superados para que processos de biorrefinaria, aplicando biomassas lignocelulósicas de diferentes origens, se tornem econômica e ambientalmente viáveis. Do ponto de vista da conversão da matriz lignocelulósica nos açúcares fermentescíveis, os desafios são o desenvolvimento de processos de pré-hidrólise e hidrólise de baixo custo e baixo

impacto ambiental e da busca por microrganismos que possam resistir aos inibidores gerados nos processos de mais baixo custo.⁵⁻⁶

Dessa forma um dos gargalos científicos atuais é a fermentação eficiente de todas as frações de açúcares liberados durante o processo de hidrólise, por exemplo, micro-organismos convencionais comumente aplicados em escala industrial como *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de converter os açúcares liberados na hidrólise da fração hemicelulósica gerando uma perda na composição total dos açúcares acima de 40% a depender do tipo de biomassa.

Além disso, organismos geneticamente modificados têm sido aplicados na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, com baixo rendimento e robustez limitada para condições das plantas industriais, além da desvantagem de limitarem a aplicação dos coprodutos e mesmo da biomassa celular em mercados de maior valor agregado como a produção de alimentos e fármacos, prática que é comum em muitas biofabricas para aumentar a sustentabilidade do processo.^{4,9,22,25-28}

Leveduras não convencionais, isoladas de diferentes ecossistemas têm se destacado nas últimas décadas, por sua capacidade de fermentar pentoses e hexoses. Tais microrganismos têm sido estudados como alternativa ao uso de *Saccharomyces cerevisiae* em rotas de fermentação de hidrolisados de biomassa lignocelulósica em diferentes configurações. Além disso estas leveduras têm a vantagem de metabolizar diversas fontes de carbono e, a depender das condições ambientais e físico-químicas dos meios de cultivos, podem produzir diferentes bioprodutos e bicompostíveis.⁹⁻¹¹

Outro limitador notoriamente importante apontado na literatura é a viabilidade econômica dos processos de biorrefinaria para produzir combustíveis e bioprodutos e, neste contexto, a coprodução de bioprodutos de valor agregado, associados a condições ótimas de conversão tem sido reportada como uma abordagem de sucesso que permite aumentar a sustentabilidade econômica sobretudo

devido aos altos custos das etapas de hidrólise da biomassa e purificação dos bioprodutos.¹²⁻¹⁷

Dentre os bioprodutos que podem ser produzidos por rota fermentativa, a partir da biomassa lignocelulósica, destaca-se a cofermentação de xilose em xilitol, que é um poliálcool com características sensoriais compatíveis com a sacarose, de baixo índice glicêmico e efeito antimicrobiano em bactérias da saliva sendo considerado como anticariogênico. O xilitol é apontado como um dos coprodutos de maior valor agregado em rotas de biorrefinarias. O mercado global de xilitol é estimado em cerca de 900 milhões de dólares/ano com crescente estimativa em até 1,2 bilhões de dólares/ano até 2026.³⁰⁻³¹

A produção biotecnológica de xilitol, por rota fermentativa, apresenta inúmeras vantagens em relação a rota química convencional, sobretudo devido a redução de custos de produção e aumento da viabilidade ambiental. O xilitol pode ser produzido por leveduras fermentadoras de xilose e trata-se um produto intermediário da via de metabolização de xilose podendo ser, a depender das condições do meio, acumulado e posteriormente excretado como bioproduto. Todavia este é um processo que depende da busca por microrganismos e condições ideais de bioconversão.³¹⁻³²

A busca por microrganismos que são naturalmente capazes de cofermentar pentoses e hexoses é um dos desafios científicos apontados como uma solução para aumentar a sustentabilidade de biorrefinarias. Isto porque organismos naturalmente fermentadores, isolados de ecossistemas industriais, conferem uma resistência adquirida dos processos de evolução natural e podem resistir e apresentar melhor performance que os microrganismos modificados geneticamente.²⁹⁻³⁰

As leveduras não convencionais, destacam-se como microrganismos naturalmente capazes de fermentar pentoses e hexoses com alta taxa de eficiência. São referidas na literatura pela sua ampla capacidade de fermentar diversas fontes de

carbono e produzir diversos bioprodutos e biomassa celular sendo ideias para a uma rota de biossíntese otimizada com coprodução de etanol, biomassa e xilitol possibilitando o aumento da sustentabilidade econômica dos processos de biorrefinarias.²⁹⁻³⁰

A levedura *Meyerozyma guilliermondii* CCT7783 foi isolada e selecionada devido a sua capacidade de metabolizar açúcares de cinco carbonos como aqueles liberados da hidrólise de biomassas lignocelulósicas. Trata-se de uma levedura não convencional que naturalmente é capaz de metabolizar pentoses e hexoses. Os efeitos de possíveis condições agressivas de processo como a presença de ácido acético e furfural também foram investigados e a levedura demonstrou resistência e capacidade de metabolização dos açúcares em condições de concentrações elevadas destes inibidores.³³⁻³⁴

A aplicação de novos microrganismos em processos industriais requer um aumento da maturidade sobre os conhecimentos necessários para se escalonar tais plataformas. Tal conhecimento demanda entender os possíveis bioprodutos e as condições de biossíntese que afetam o metabolismo e a bioconversão, como aeração, concentração de substrato e concentração de inóculo. Além disso, é necessário se investigar ainda se há um padrão de comportamento da levedura em substratos próximos aqueles- aplicados em escala industrial.

Desta forma o presente trabalho visa avaliar o potencial de aplicação da levedura *M. guilliermondii* CCT7783, em rotas de bioconversão de biorrefinarias através da produção de conhecimento sobre a metabolização de pentoses, a necessidade de adaptação evolutiva e a capacidade de fermentar todos os açúcares existentes nos hidrolisados lignocelulósicos e bioconverter em compostos de interesse industrial como xilitol e etanol 2G.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a produção de xilitol e etanol pela levedura *Meyerozyma guilliermondii* em meios sintéticos e hidrolisados lignocelulósicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito do crescimento adaptativo da levedura *M. guilliermondii* CCT7783, em meio contendo xilose como única fonte de substrato, na cinética de crescimento, biossíntese de xilitol, biomassa celular e etanol.
- ✓ Avaliar o efeito do tempo de fluxo de nitrogênio (0 ou 1 h), da concentração inicial de xilose (20 ou 40 g/L), da concentração inicial de inóculo (0,2 ou 1,2 g/L) e da rotação (60 ou 160 rpm) na metabolização de xilose, produção de xilitol, etanol e biomassa celular por *M. guilliermondii* em meio sintético contendo xilose como fonte de substrato.
- ✓ Avaliar a capacidade de bioconversão dos açúcares liberados na hidrólise de palha de cana-de-açúcar e resíduos da fabricação de lápis em xilitol e etanol 2G por *M. guilliermondii*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Sustentabilidade ambiental e econômica da produção de etanol 2G.

O etanol tem sido um produto de extrema relevância para a econômica brasileira desde os períodos coloniais. Grandes marcos no desenvolvimento da produção de etanol do país tiveram seus pilares apoiados por políticas de incentivos do governo como o Programa Nacional do Álcool, o aumento da proporção de etanol anidro na gasolina e mais recentemente o programa RenovaBio, que estimula a produção de biocombustíveis com o objetivo de reduzir gases de efeito estufa.^{240,241}

Os principais produtos do processamento da cana-de-açúcar no Brasil são açúcar, etanol e energia elétrica. Entretanto, em 2017, foi criado um novo produto denominado Crédito de descarbonização (CBio), a partir do programa RenovaBio, com intuito de ativar os créditos de carbono tornando os negociáveis na bolsa de valores.²⁴²⁻²⁴⁵

Um dos principais impactos do CBio é tornar viável tecnologias que reduzem a emissão de gases de efeito estufa como o etanol 2G, visto que os desafios tecnológicos e as inúmeras etapas de processamento fazem com que a viabilização da produção de etanol 2G ainda seja um desafio a ser superado pelo setor.²⁴⁶

A produção viável de etanol 2G depende da superação científica e tecnológica de desafios como redução dos custos e aumento da produtividade dos processos físico-químicos e biológicos envolvidos em todas as etapas. Tais desafios dependem do escalonamento de pesquisas disruptivas que, em países em desenvolvimento como Brasil, enfrentam um cenário de extrema latência e recalcitrância. Desta forma a produção de bioprodutos e a créditos de carbono, associados a otimização de processos são citadas como estratégias de viabilização financeira na literatura.²⁴⁷⁻²⁴⁹

Embora a produção de etanol 2G esteja em escala comercial no Brasil e alguns países no mundo, este processo enfrenta dificuldades para se tornar viável devido aos elevados custos de produção, com custo de produção estimado sendo 2.37 vezes maior que o custo do etanol 1G. Todavia sua produção tem ganhado destaque, com aumento do número de plantas e da capacidade de produção no Brasil recentemente. Isto porque o etanol 2G porque o etanol lignocelulósico é apontado como um dos combustíveis de menor pegada de carbono do mundo, ou seja, com menor emissão de gases de efeito estufa ao longo do ciclo de produção.²⁴⁰⁻²⁴⁹

A emissão de gases de efeito estufa como o CO₂ no processo de produção de etanol de segunda geração chega a ser 30% menor comparada ao processo de primeira geração e 80% menor que os combustíveis fósseis. Sendo os produtores beneficiados pelo mercado de crédito de carbono, pois a cada 540 litros de etanol 2G produzidos o produtor pode receber 1 crédito de carbono (CBio), sendo esta quantidade aumentada para 670 litros, aproximadamente, em etanol 1G.^{240,242}

Os CBios devem ser comprados pelas indústrias que emitem gases de efeito estufa para completar suas metas de redução de emissão e são negociados em bolsa de valores. Desta forma o RenovaBio garante uma rentabilidade extra para a produção de etanol 2G, que supera outros biocombustíveis, e tais políticas de incentivo buscam atender as metas do Brasil no acordo de Paris, no qual o país precisa aumentar a participação dos biocombustíveis na matriz energética em 18% até 2030.²⁴⁰⁻²⁴⁹

3.2 Obtenção de hidrolisados lignocelulósicos

Para a aplicação da biomassa lignocelulósica como matéria-prima nos processos de biorrefinarias, uma importante etapa é a produção dos hidrolisados lignocelulósicos, pois durante a fermentação, muitos microrganismos são

severamente inibidos pela toxicidade dos compostos gerados no processo de pré-tratamento para remoção da lignocelulose. Sendo que a escolha do conjunto de operações e conhecimento dos principais tratamentos disponíveis atualmente se faz necessário para elaboração de uma rota de biorrefinaria economicamente viável e capaz de fornecer condições fermentativas ideais para os microrganismos empregados.^{89,121}

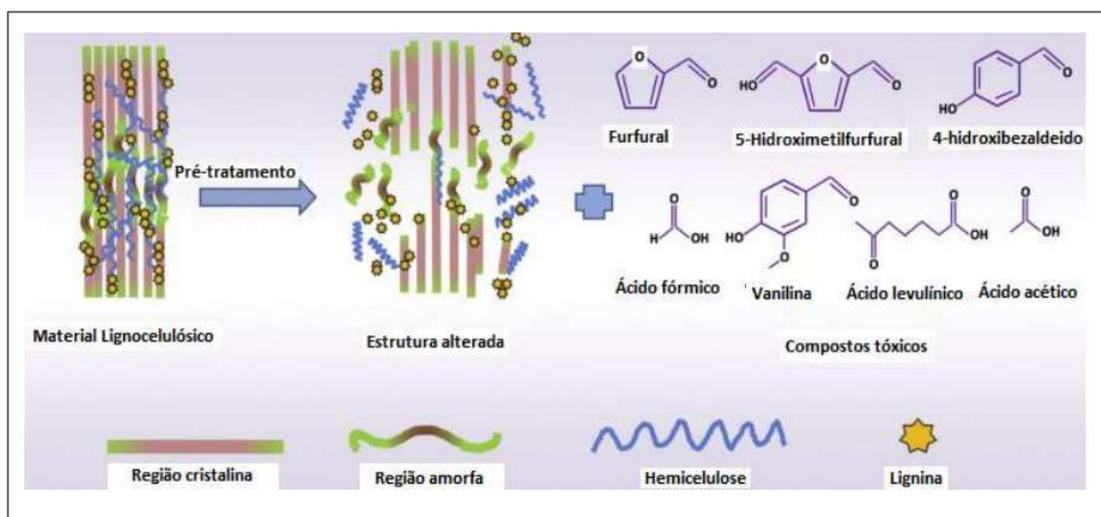
3.2.1 Pré-tratamento

A hidrólise da celulose sem a realização da etapa de pré-tratamento apresenta rendimentos baixos (inferior a 20%) principalmente devido à estrutura altamente cristalina e recalcitrante da celulose, a qual dificulta o acesso do substrato aos sítios ativos. Assim, a etapa de pré-tratamento é um primeiro passo na bioconversão dos materiais lignocelulósicos em biocombustíveis para a redução da recalcitrância da biomassa alterando as características estruturais da parede celular de modo que principalmente a fração celulósica fique mais acessível e suscetível a ação das enzimas na etapa de hidrólise enzimática.^{37,122}

A etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico têm as seguintes finalidades: (i) remover ou reduzir lignina e hemicelulose, (ii) diminuir a cristalinidade da celulose, (iii) aumentar a porosidade e as áreas superficiais do material para que o coquetel enzimático empregado possa acessar e hidrolisar a celulose aumentando assim o rendimento desta em glicose.^{123,125}

A Figura 3.1 mostra o efeito criado pela etapa de pré-tratamento, a qual altera a estrutura do material lignocelulósico e seus possíveis compostos tóxicos formados como ácido acético e ácido fórmico, furanos (furfural e hidroximetil furfural) e compostos fenólicos ácidos durante o processo.^{121,125}

Figura 3.1 - Descrição dos efeitos criados pela etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico.¹²¹



Atualmente, há uma grande quantidade de processos de pré-tratamento disponíveis, podendo ser físicos (trituração, moagem, microondas e extrusão), químicos (alcalino, ácido, oxidativo, organosolve e líquido iônico), biológicos (emprego de fungos ou bactérias), pré-tratamento físico-químico (explosão à vapor, hidrotérmico, explosão de fibra de amônia (AFEX) ou de fracionamento por solvente. A Tabela 3.1 resume as vantagens e desvantagens de cada pré-tratamento submetido ao material lignocelulósico. Nos quais destaca-se o pré-tratamento de oxidação alcalina devido a alta remoção de lignina e baixa geração de inibidores.¹²¹

Tabela 3.1 - Resumo das vantagens e desvantagens de pré-tratamento e hidrólise do material celulósico.¹²⁵

Método	Vantagens	Desvantagens
<i>Pré-tratamento físico</i>		
Mogaem ou vibração – seca ou úmida	<ul style="list-style-type: none"> - Diminui o tamanho da partícula, aumentando a área superficial - Em alguns casos, reduz o DP e a cristalinidade 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é suficiente para aumentar a taxa de conversão de açúcar - Não retira lignina
<i>Pré-tratamentos de Fracionamento por Solvente</i>		
Processo Organosolv	<ul style="list-style-type: none"> - Solubiliza ligninas e hemiceluloses (dependendo do solvente utilizado) - Aumento da digestibilidade da biomassa celulósica 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo dos solventes orgânicos, bem como na sua recuperação - Alto custo na recuperação de subprodutos - Taxa de líquido-sólido deve ser fixada com cuidado
Fracionamento por Ácido Fosfórico	<ul style="list-style-type: none"> - Resulta em fibras de celulose amorfas - Opera a baixa temperatura e pressão - Altos rendimentos de glicose e xilose 	<ul style="list-style-type: none"> - Alto custo na recuperação e purificação do ácido fosfórico, acetona e ácido acético
Líquidos Iônicos	<ul style="list-style-type: none"> - Reuso do líquido iônico após o processo - Substrato final com digestibilidade >90% 	<ul style="list-style-type: none"> - O líquido iônico deve ser completamente retirado antes da hidrólise (interfere na atividade hidrolítica das enzimas) - Alto custo dos líquidos iônicos

Pré-tratamentos Químicos

Explosão à Vapor (com/ sem adição de ácido como catalisador) - Ótimo para madeira macia (na presença de um catalisador ácido) - Formação de produtos de degradação
 - Altos rendimentos de glicose e açúcares de hemicelulose e remoção da lignina

Expansão da fibra com amônia (AFEX) - Pouco gasto de energia: pré-tratamento realizado a temperaturas de 60-140 °C - Alto custo: grande quantidade de amônia necessária, recuperação da amônia necessária, recuperação da amônia
 - Baixa formação de inibidores hidrolisada por enzimas
 - Remoção desprezível de ligninas
 - Formação mínima de inibidores - Custo de oxigênio e catalisador alcalino
 Remoção eficiente de lignina (Na₂ CO₃)
 - Processo exotérmico: pouca energia necessária no processo

Oxidação Úmida Alcalina

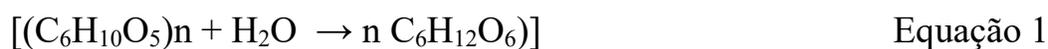
Pré-tratamentos Biológicos

Uso de Fungos (white rot basidiomycetes) ou bactérias (Actinomicetes) - Remove quantidade considerável de lignina - Maior tempo de residência
 - Pré-tratamento brando (ótimo para materiais com alto conteúdo de açúcar carboidratos) - Bactérias/fungos consomem um pouco do carboidrato disponível – menor rendimento de açúcar carboidratos)

3.2.2 Hidrólise de resíduos lignocelulósicos

Na produção do etanol da segunda geração (2G), existem propriedades inibidoras responsáveis pela característica complexa matriz lignocelulósica que pode ser quebrada através de pré-tratamentos em conjunto com uma etapa de hidrólise para potencializar a etapa fermentativa, através da liberação de açúcares fermentescíveis, obtendo o etanol de segunda geração propriamente dito.¹²⁴

Neste sentido, a hidrólise tem como objetivo converter a celulose em glicose, após a quebra das ligações glicosídicas, conforme a equação 1.

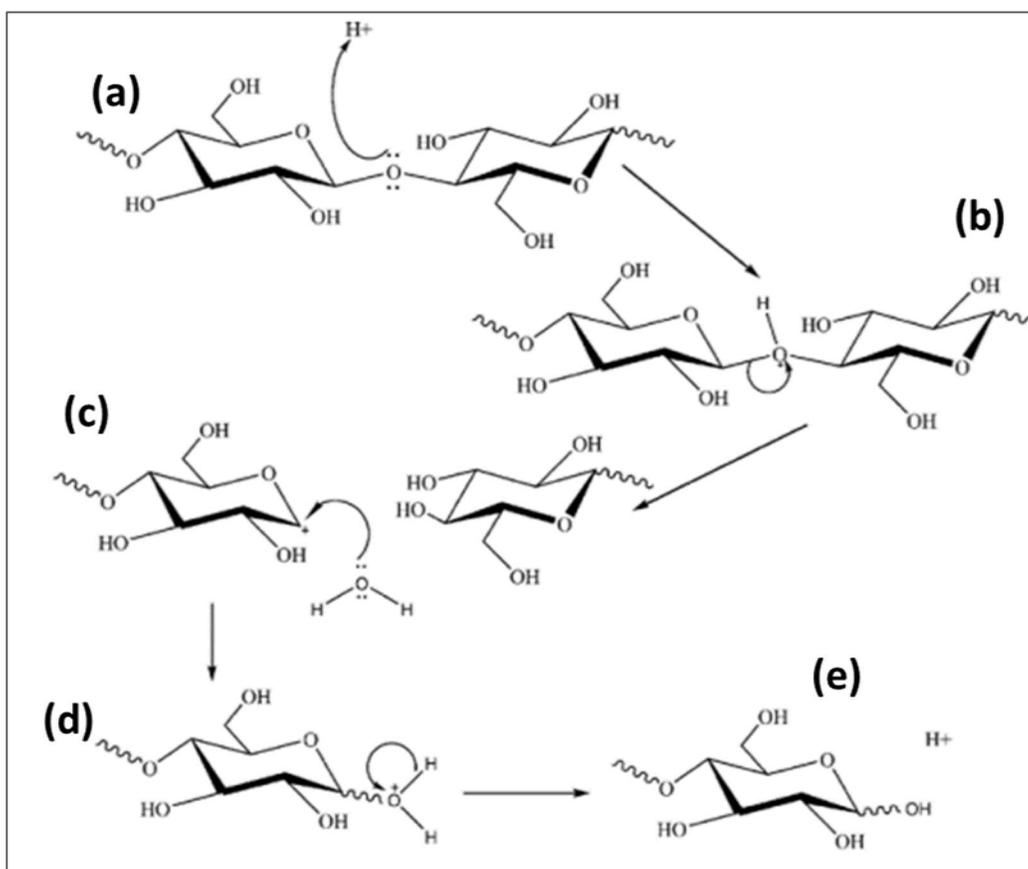


Existem duas rotas que são utilizadas para a hidrólise, sendo a primeira o uso de hidrólise ácida e a segunda a hidrólise enzimática do material pré-tratado. A escolha deve ser baseada em várias considerações como: (i) o produto bruto que será usado, (ii) o organismo usado para a fermentação dos açúcares liberados e, (iii) além da economia.¹²⁵

A hidrólise ácida é um dos métodos de pré-tratamento mais conhecido reportado na literatura, e pode ser feito utilizando ácido diluído ou concentrado. Ela se inicia com a protonação do oxigênio glicosídico com posterior quebra da ligação C₁-O, conforme mostra a Figura 3.2. Em seguida o carbocátion gerado na etapa b é estabilizado pela deslocalização do par de elétrons existente no oxigênio do anel glicosídico, adjacente ao C₁. A etapa de despolimerização (ocorre no interior da cadeia celulose, gerando novos terminais) ou de produção de glicose (quando ocorre hidrólise diretamente nos terminais da cadeia de celulose), encerra com o ataque nucleofílico da água sobre C₁, Figura 3.2, com regeneração do ácido. A etapa de despolimerização é então encerrada (se ocorrer no interior da célula de celulose,

gerando novos terminais) ou há produção de glicose (quando a hidrólise ocorre nos terminais da cadeia de celulose).^{36,121,125}

Figura 3.2 - Mecanismo de hidrólise do material celulósico catalisado por ácido, (a) protonação do oxigênio glicosídico, (b) quebra da ligação C₁-O (formando um carbocátion), (c) estabilização do carbocátion, (d) ataque nucleofílico da água sobre C₁, (e) regeneração do ácido (Adaptado de Ogeda e Petri)¹²⁵



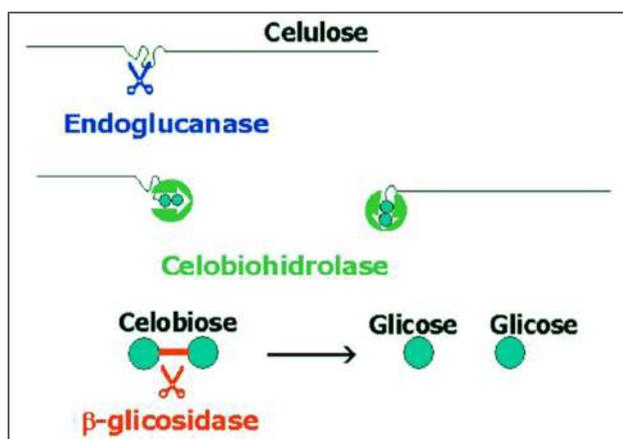
Embora a hidrólise ácida seja relativamente eficiente, ela apresenta algumas desvantagens, como a formação de subprodutos que podem afetar o rendimento e inibem a fermentação, sendo importante a separação e recuperação do ácido.

Por sua vez, a hidrólise enzimática, se caracteriza pela hidrólise do material lignocelulósico à glicose através do processo catalisado por enzimas

altamente específicas chamadas genericamente de celulases. As características do complexo enzimático assim como a do substrato escolhido determinam as condições de temperatura, pH, tempo de sacarificação, concentração de enzima e relação sólido-líquido em que o processo deve ser empregado. As características do processo devem ser determinadas e otimizadas experimentalmente para cada caso aplicado.¹²⁶ A hidrólise enzimática apresenta várias vantagens quando comparada à via ácida. As vantagens estendem-se desde o consumo de menor energia, uma vez que opera sob condições brandas de temperatura, pH e pressão, menores custos de equipamento (pelo fato da reação ser realizada em condições mais amenas) além de ser altamente específica e não formar produtos de degradação, como o furfural e o hidroximetilfurfural. Esses compostos causam efeitos indesejáveis durante a etapa de fermentação.¹²⁷

A Figura 3.3 mostra a ação do complexo enzimático sobre a celulose com a geração da glicose. Apesar das vantagens da hidrólise enzimática, diferentes fatores podem contribuir para elevado custo da sua aplicação a acessibilidade das enzimas ao substrato, a ligação não produtiva e efeitos de inibição das enzimas exigindo o uso de altas concentrações de enzimas.

Figura 3.3 - Descrição da ação enzimática sobre a celulose com a geração de glicose (OGEDA e Petri).¹²⁵



3.3 Metabolização de pentoses

Os açúcares de cinco carbonos, também conhecidos como pentoses podem ser metabolizados por leveduras, fungos e bactérias, sendo algumas leveduras amplamente citadas devido a alta taxa de assimilação de pentoses e alta produtividade quando comparada a bactérias e fungos. Todavia a metabolização por bactérias tem vantagens do ponto de vista metabólico, pois demanda uma etapa a menos, reduzindo a dependência de processos redox de regeneração de cofatores.³⁵

A Figura 3.4 mostra um exemplo de uma das vias envolvidas na metabolização da xilose por leveduras e fungos (pentose). A redução e oxidação são duas etapas envolvidas no metabolismo da xilose. A fase inicial ocorre quando a D-xilose é transportada através da membrana celular e subsequentemente é reduzida a xilitol, via xilose redutase que é uma enzima dependente de NAD(P)H (XR). O xilitol é na sequência oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase via NAD⁺ antes de passar pela etapa de fosforilação em xilulose-5-fosfato via xilulose quinase.

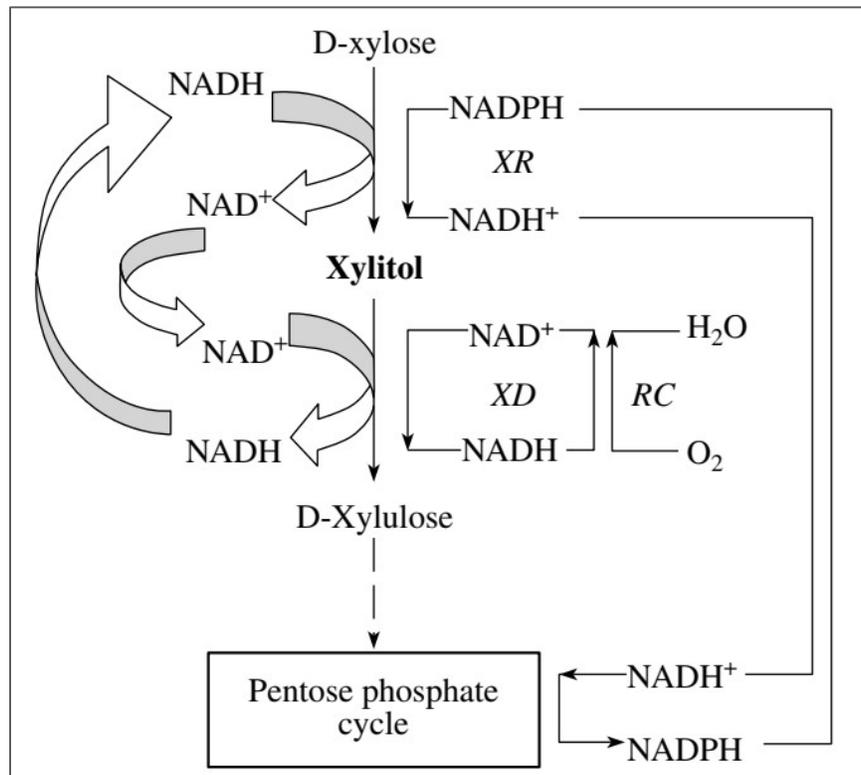
Nas vias metabólicas bacterianas a xilose é levada a xilulose pela ação da enzima xilose isomerase (XI) (Figura 3.4), e as demais etapas são iguais a via oxidativa de leveduras e fungos.³⁶

Os metabólitos frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, gerados na via das pentoses-fosfato, são também componentes da via glicolítica. Em leveduras produtoras de etanol, estão acoplados com a oxidação do NADH, após a descarboxilação do piruvato, gerando aldeído acético que, ao oxidar o NADH, resulta em etanol.³⁷

O metabolismo anaeróbio de pentoses, além da formação de etanol e CO₂, leva também à formação de outros compostos, tais como glicerol, ácidos orgânicos (succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído,

acetoína, butilenoglicol. Além disso, ocorre, ao mesmo tempo, o crescimento das leveduras. Calcula-se que 5% do açúcar metabolizado pelo microrganismo seja desviado para formação de metabólitos secundários da fermentação, resultando num rendimento de 95% em etanol (Chandel et al)³⁷. Contudo, em condições industriais, nas quais fatores químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos e inibidores), físicos (temperatura e pressão osmótica) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração do microrganismo e contaminação bacteriana) afetam a levedura, são obtidos rendimentos de 90% .

Figura 3.4 - Vias metabólicas envolvidas na metabolização de pentoses por microrganismos.^{36,98}



3.3.1 Leveduras não convencionais fermentadoras de pentoses.

Linhagens de *saccharomyces cerevisiae* são amplamente utilizadas em processos industriais para a produção de etanol, biomassa celular e seus derivados como extrato de levedura. Sobretudo na produção de etanol de primeira geração, pois apresentam alta produtividade, tolerância ao etanol e as condições requeridas nos processos industriais.³⁹⁻⁴⁰

Além disso, *S. cerevisiae* é capaz de crescer em pH relativamente baixo evitando contaminação por outras bactérias. São eficientes na fermentação de hexoses (glicose, manose e galactose), porém quando biomassas lignocelulósicas são utilizadas como matéria-prima, a fração de açúcares obtidos da hemicelulose, composta por pentoses, não pode ser fermentada por cepas nativas de *S. cerevisiae*, uma vez que não expressam as enzimas da via das pentoses.³⁹⁻⁴⁰

A modificação genética por meio de engenharia metabólica, por exemplo, tem sido utilizada para produzir linhagem de *S. cerevisiae* capazes de fermentar etanol a partir de xilose. Entretanto, seu uso limita a viabilidade industrial pois, os organismos geneticamente modificados são mais suscetíveis a contaminação, não resistem as condições de ciclo das fermentações industriais e tem restrições de aplicação em segmentos de valor agregado. Todavia, o uso de organismos naturalmente capazes de fermentar pentoses e que apresentam os requisitos desejáveis para o emprego em fermentações industriais ainda é um grande desafio a ser superado.^{41,184}

Linhagens de leveduras, como *Pichia stipitis* (NRRL-Y-7124), e *Kluyveromyces marxianus* têm sido relatadas como boas produtoras de etanol a partir de diferentes tipos de açúcares. Outro aspecto importante reportado por alguns autores é que para viabilizar a produção de etanol 2G, é necessário selecionar linhagens de leveduras que sejam termotolerantes, tolerantes ao etanol, resistentes

aos inibidores liberados durante o pré-tratamento do material lignocelulósico e capazes de utilizar um amplo espectro de substratos, produzindo grandes quantidades de etanol na temperatura ótima para a realização da sacarificação.⁴²⁻⁴⁴

Espécies naturalmente fermentadoras de pentoses têm sido reportadas na literatura e são denominadas como leveduras não convencionais. Dentre estas espécies a literatura destaca algumas como as mais empregadas na fermentação de pentoses, como por exemplo, *Scheffersomyces stipitis* (também conhecida como *Pichia stipitis*), *Zymomonas mobilis*, *Candida shehatae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces cellobivorus*, *Debaryomyces nepalensis*, *Debaryomyces polymorpha* e *Schizosaccharomyces pombe*, *E. Urograndis*.^{38,45-46}

Dentre alguns exemplos que se destacam na literatura podemos citar a a levedura *Scheffersomyces stipitis* (também conhecida como *Pichia stipitis*). Naturalmente capaz de fermentar xilose baseada na via de oxirredução, o que significa que não produz etanol em condições anaeróbicas. É amplamente estudada para utilização em processos de produção de etanol de segunda geração. No entanto, dependendo do nível da aeração, ou massa celular, o etanol pode ou não ser produzido. Por exemplo, o etanol é produzido quando a taxa de transferência de oxigênio é baixa (100–550 mmol O₂/L*h). No contexto do etanol 2G, *S. stipitis* é uma levedura interessante porque é capaz de fermentar glicose, xilose, manose, galactose e celobiose, que são açúcares já presente na lignocelulose sacarificada.⁴⁶⁻⁴⁹

Encontra-se ainda na literatura *Candida shehatae*, como leveduras não convencionais fermentadoras de xilose através da oxirredução, termotolerantes, representando uma alternativa à *S. cerevisiae*. Alguns exemplos interessantes descritos na literatura demonstraram a capacidade da *C. shehatae* ATY839 na produção do etanol a partir de xilose e glicose como fontes de carbono em temperaturas de até 37°C usando apenas um açúcar ou ambos durante cultivo em condições microaeróbicas.⁵⁰

Os trabalhos anteriores mostraram que os microrganismos descritos acima não possuem todas estas características, apresentando, cada um deles, vantagens e desvantagens para aplicações em fermentações industriais. Neste contexto, o uso de leveduras não convencionais selecionadas de fermentações industriais, associado a técnicas de melhoramento, como a evolução adaptativa, pode resultar em linhagens que atendem aos requisitos industriais com elevada eficiência de conversão dos diversos açúcares liberados na sacarificação da biomassa lignocelulósica e possibilidades de conversão em etanol 2G e bioprodutos de valor agregado.

3.3.2 Levedura não convencional *Meyerozyma guilliermondii* CCT7783.

Meyerozyma guilliermondii, é uma levedura não convencional, da espécie ascomicetosa pertencente à Saccharomycotina CTG, é o teleomorfo de *Candida guilliermondii* e considerado como *Pichia guilliermondii* até 2010, quando outro nome de espécie foi atribuído por Kurtzman e Suzuki⁵². *M. guilliermondii* é uma levedura amplamente difundida no ambiente, tem apresentado características de interesse para a biotecnologia, como produção de etanol, enzimas industriais e xilitol. Além disso linhagens de *M. guilliermondii* têm sido estudadas com potenciais aplicações para biodegradação de micotoxinas e controles biológicos^{51-53,55}

Dentre as leveduras não convencionais *M. guilliermondii* têm se destacado pela sua ampla capacidade de metabolizar diferentes fontes de carbono e de crescer em condições adversas, o que confere a esta espécie propriedades bioquímicas únicas, muitas ainda desconhecidas. Yan et al.⁵⁶ destacaram, por exemplo, a capacidade de metabolizar materiais hidrofílicos e hidrofóbicos, além da

sua ampla faixa de aplicação na produção de enzimas e metabólicos de interesse industrial.

Recentemente uma linhagem da levedura *M. Guilliermondii* foi isolada do processo de produção de etanol da Usina São João da cidade de Araras e foi selecionada devido a sua capacidade de conversão de diversos tipos de açúcares, incluindo as pentoses e hexoses encontradas nos hidrolisados lignocelulósicos. Tal microrganismo está depositado na Fundação André Toselo sob o código CCT-7783 e resultados obtidos nos estudos de isolamento apontaram a necessidade de se investigar demais características deste microrganismo visando sua aplicação em processos de biorrefinaria.³³

Além disso, a levedura *M. Guilliermondii* CCT-7783 foi recentemente estuada pela sua capacidade de resistir aos principais inibidores que podem ser encontrados em hidrolisados em escala industrial como Furfural, ácido acético e HMF. Este microrganismo demonstrou capacidade de assimilar parte de inibidores como o ácido acético e crescer mesmo em concentrações elevadas de HMF e furfural, sendo esta uma característica de resistência desejada para microrganismos que podem ser aplicados como plataforma de bioconversão industrial.³⁴

Todavia os estudos citados até aqui apresentaram baixa capacidade de produção de etanol. Além disso, não se tem registro da produção de outros metabólitos como o xilitol. Sabe-se que vias de fermentação de pentoses são mais dependentes de controle de variáveis como a aeração e a concentração de substrato do que as vias de metabolização de hexoses. Isto devido ao fato de que tais vias sofrem efeito de transportadores de baixa eficiência e limitações por equilíbrio redox. Desta forma estudos que demonstrem a capacidade de metabolização de pentoses e hexoses e a capacidade de produção de bioprodutos e bioconbustíveis em novas linhagens não convencionais como *M. Guilliermondii* CCT-7783 são de

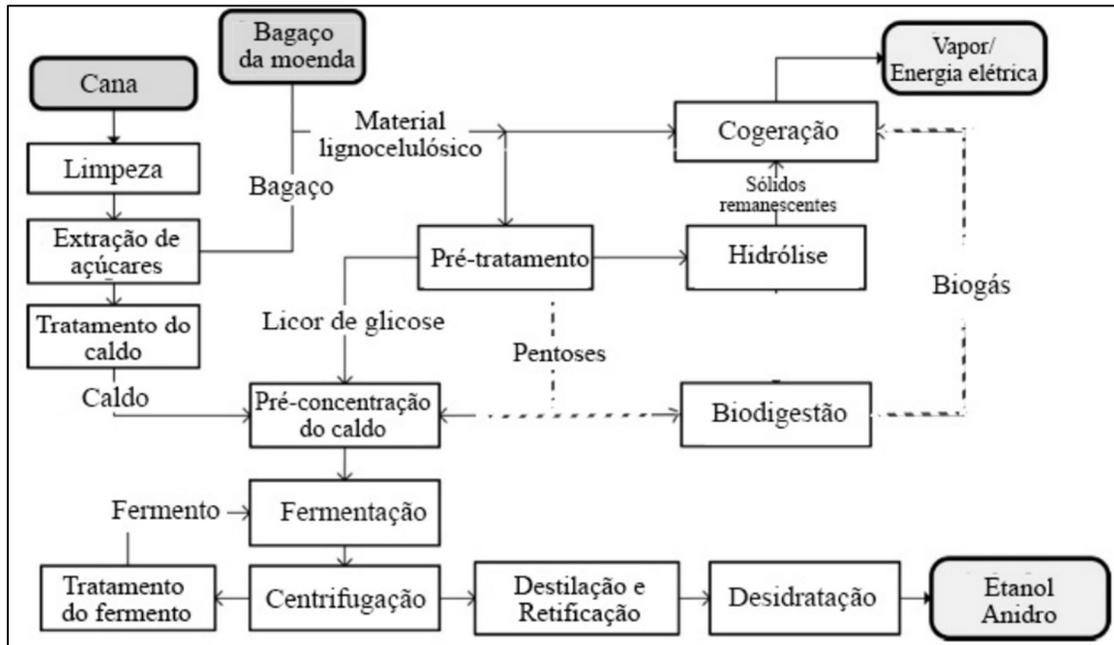
extrema relevância para ampliar o conhecimento sobre estas novas linhagens e aumentar a possibilidade de aplicação em processos de biorrefinarias.⁵⁷

3.4 Produtos da fermentação da xilose

3.4.1 Etanol de segunda geração.

O etanol de segunda geração, também referido como E2G, difere do etanol produzido tradicionalmente (1G), por ser produzido a partir da biomassa lignocelulósica, enquanto o etanol 1G pode ser produzido a partir de fontes sacaríneas e amiláceas como por exemplo, cana-de-açúcar, beterraba açúcares e frações amiláceas de milho (Figura 3.5). Sua produção viável a partir de diversos materiais lignocelulósicos tem recebido atenção, devido ao etanol 2G ser considerado um composto importante no atual cenário onde se busca a redução do uso de fontes fósseis devido a problemas ambientais e sócio-econômicos. Bem como pela possibilidade do uso de resíduos de diversas origens contribuindo para a redução da emissão de gás carbônico e economia circular.^{66-68,71}

Figura 3.5 - Exemplo da produção integrada de etanol de segunda e primeira geração aplicando o bagaço excedente.⁶⁶



A produção de etanol de segunda geração demanda etapas operacionais adicionais e onerosas ao se comparar com a produção de etanol de primeira geração (Figura 3.5). E por este motivo diversos estudos de desenvolvimento tecnológico apontam que a produção pode se tornar economicamente viável ao se operar o processo de forma sincronizada aproveitando todos os resíduos gerados nas etapas e utilizando a mesma estrutura industrial utilizada no processo de produção do etanol de primeira geração.⁶⁶

Além disso, o Brasil é apontado como um dos países com maior potencial para a produção de etanol 2G, devido ao fato de ter um amplo campo de pesquisas aplicadas na produção de etanol 1G, sendo o segundo maior país produtor de etanol no mundo e com a rota de produção mais viável. Todavia no que tange as tecnologias e produção de conhecimento para alavancar a produção de etanol 2G o

Brasil encontra-se em desvantagens a outros países, visto que apenas cerca de 5% das patentes depositadas até 2020 correspondem a pesquisas brasileiras.⁷²⁻⁷⁴

Dentre os gargalos científicos e tecnológicos para viabilizar a produção do etanol 2G destacam-se a necessidade da busca por microrganismos capazes de fermentar de forma eficiente todos os açúcares que são liberados das frações celulósicas e hemicelulósicas nos processos de hidrólise (Figura 3.5). Diferentes mono-açúcares podem ser liberados do hidrolisado, como glicose, xilose e arabinose, que podem ser convertidos em etanol e outros bioprodutos por microrganismos.⁶⁶

Na produção de etanol de primeira geração a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é uma das mais utilizadas, no entanto, *S. cerevisiae* não pode assimilar a xilose naturalmente, resultando em perda de parte de açúcares dos hidrolisados lignocelulósicos, reduzindo a viabilidade econômica da produção industrial de etanol 2G.^{70,76}

Na literatura, alguns autores reportam o uso de microrganismos geneticamente modificados para a produção de etanol usando como fonte de carbono a xilose. No trabalho de Sun et al.⁷¹ os autores produziram uma linhagem industrial da levedura *Saccharomyces cerevisiae* A31Z para produção de bioetanol 2G usando engenharia metabólica pela incorporação de grupos de genes envolvido no metabolismo da xilose combinado com a evolução adaptativa para evoluir suas propriedades anti-inibitórias. Esta linhagem superou seus ancestrais na utilização de xilose e subsequente produção de etanol e demonstrou maior tolerância contra inibidores de hidrolisados lignocelulósicos, e também baixou a produção de subproduto glicerol.

Outro trabalho interessante foi realizado por Kim et al.⁷⁷ que modificaram cepas específicas de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para utilização simultânea de glicose e xilose via mutagênese

ou introdução de uma xilose via metabólica. Outros micróbios, como *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri* e *Candida shehatae* possuem um mecanismo de repressão catabólica de carbono (CCR) relaxado, mostrando consumo simultâneo de glicose e xilose. Explorando Fenótipos CCR-negativos, vários processos integrados foram desenvolvidos que incorporam tanto a enzima de fermentação do material lignocelulósico e açúcar misto, permitindo assim uma maior produtividade e eficácia da fermentação.

Parachin e Almeida⁷⁸ empregaram cepas da bactéria *E. coli* obtidas através de engenharia genética são capazes de utilizar hexoses e pentoses e apresentam taxas de crescimento rápido, porém o uso em escala industrial ainda é limitado em função do baixo desempenho em meios ausentes de antibióticos.

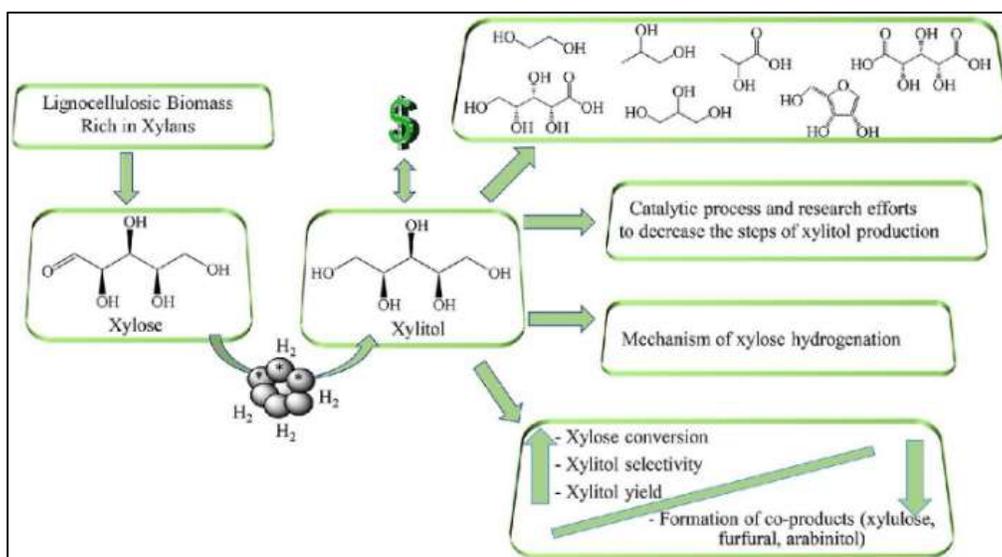
Todavia a produção de etanol 2G aplicando linhagens geneticamente modificadas tem limitações devido ao fato de que tais microrganismos não apresentam a robustez necessária para resistir aos inúmeros ciclos, condições de estresse e inibidores. Além disso, a biomassa celular é um dos bio-produtos que auxilia na sustentabilidade econômica da planta industrial e a aplicação de organismos geneticamente modificados limita a aplicação da biomassa e seus derivados em mercados de maior valor agregado devido a legislações e restrições em diversos países.⁷⁵⁻⁷⁶

Desta forma estudos que contribuam para a produção de conhecimento sobre novas linhagens não convencionais, naturalmente fermentadoras de pentoses, capazes de produzir etanol a partir de diversos hidrolisados lignocelulósicos se tornam essenciais para aumento da sustentabilidade da produção de etanol 2G no atual cenário.

3.4.2 Xilitol

O xilitol é um composto do metabolismo intermediário de microrganismos e plantas e por isso é amplamente encontrado em frutas e também pode ser acumulado e excretado por microrganismos fermentadores de pentoses, como a xilose e a arabinose. Trata-se de um poliálcool de cinco carbonos, produzido, majoritariamente pela hidrogenação catalítica da xilose (Figura 3.6). O xilitol pode ser encontrado na forma líquida e cristalina, sendo a cristalização a forma mais comum de purificação e comercialização do xilitol.^{79,84}

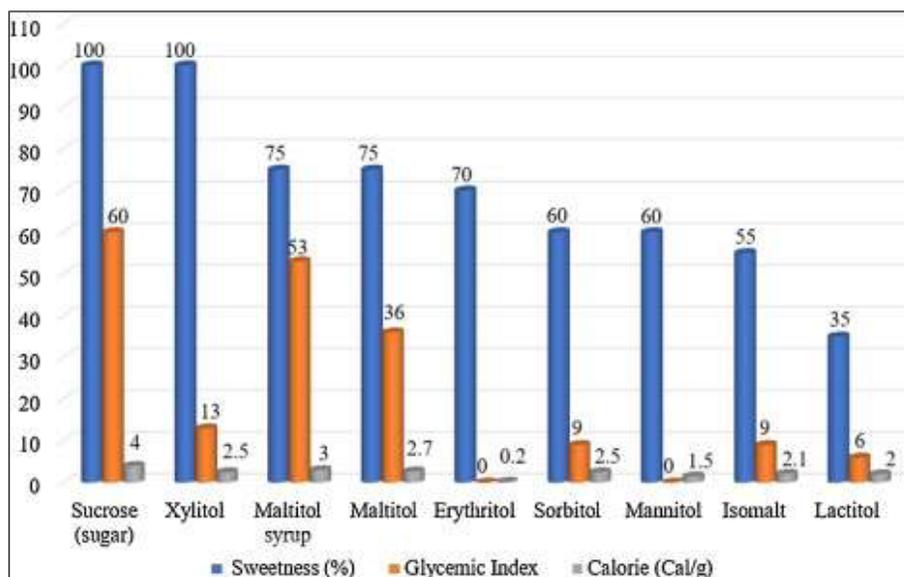
Figura 3.6 - Exemplo de rota química de obtenção de xilitol.⁷⁹



O xilitol é um composto atóxico, possui alta solubilidade e produz sensação adocicada e frescor ao paladar, por isso tem uma ampla aplicação na produção de balas e gomas de mascar. É considerado como um adoçante natural, por apresentar doçura compatível com a sacarose (Figura 3.7). Além disso o xilitol é apresenta inúmeros benefícios para a saúde como por exemplo, a inibição de

bactérias da saliva que provocam cáries e baixo índice glicêmico, sendo recomendado o seu consumo, bem como o uso em substituição a sacarose e glicose, em formulações farmacêuticas e alimentícias. O xilitol pode ainda ser encontrado como parte da composição de enxaguantes bucais, cremes dentais, hidratantes, colírios, excipientes de vários fármacos e na composição de produtos diabéticos.⁷⁹⁻⁸⁰

Figura 3.7 - Gráfico comparativo da aplicação de xilitol como adoçante natural.⁷⁹

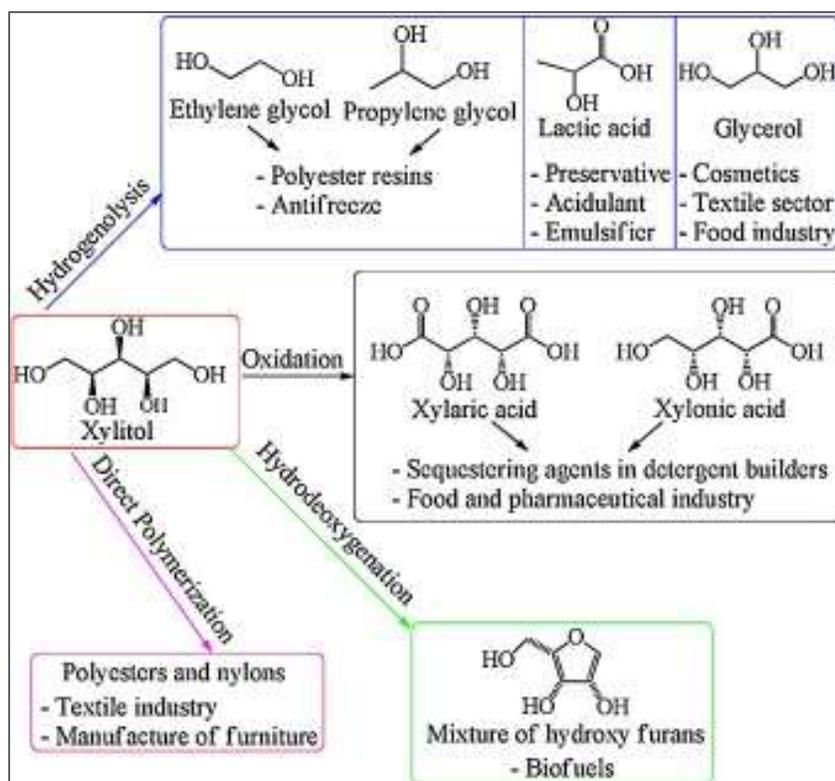


Trata-se de um derivado da xilose de alto valor agregado, sua produção no ano de 2022 foi de 266,5 mil toneladas com um mercado de cerca de 1 bilhão de dólares/ano. A estimativa para o mercado global de xilitol é de cerca de 1,37 bilhões de dólares até 2025 com preços variando entre 4 a 5 dólares por quilograma. No Brasil o consumo de xilitol vem crescendo nos últimos anos, sobretudo devido ao crescente interesse dos consumidores pela redução do consumo de açúcares como a sacarose e glicose associado aos benefícios à saúde atribuídos ao consumo do xilitol.⁷⁹⁻⁸²

Além dos diversos usos na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética o xilitol tem ainda uma ampla aplicação como molécula precursora da

rota de formação de inúmeros derivados de alto valor agregado como resinas e tecidos sintéticos para a indústria têxtil e cosmética. Diversos tipos de aditivos que podem ser aplicados na indústria alimentícia e farmacêutica como sequestrantes, preservativos, acidulantes e até componentes de mistura de biocombustíveis (Figura 3.8).^{79,84}

Figura 3.8 - Exemplo de produtos que podem ser produzidos a partir de xilitol como plataforma.⁷⁹



A rota de produção atual de xilitol é considerada de alto custo, pois demanda de etapas de purificação intensas e lentas dos hidrolisados antes da etapa de cristalização, opera em altas pressões e altas temperaturas e exige o uso de catalisadores a base de níquel. Por isso a produção biotecnológica de xilitol tem sido

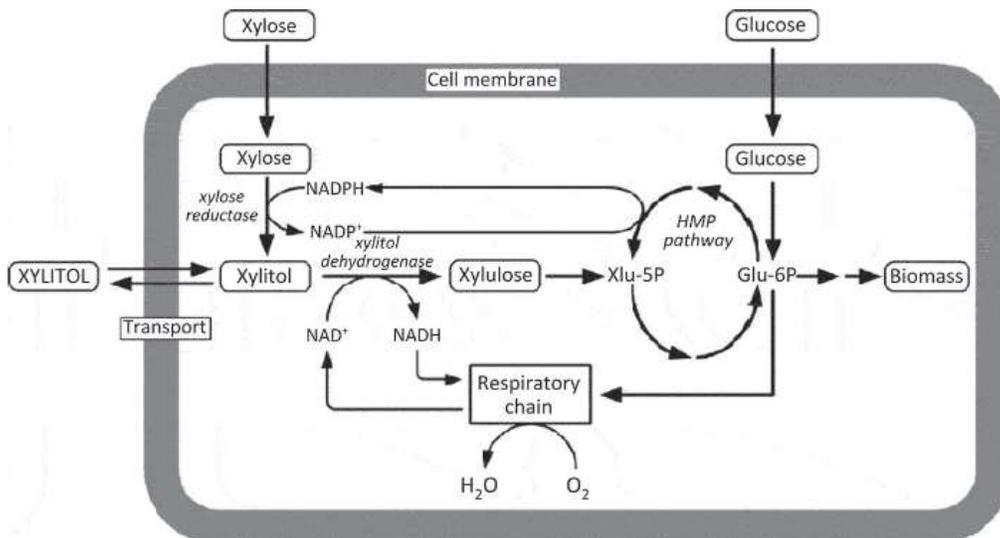
amplamente estudada e citada, em diversas literaturas, como uma alternativa para redução de custos agregando valor ambiental e econômico ao processo. ^{81-84,93-94}

A produção biotecnológica de xilitol tem como princípio de conversão a aplicação de microrganismos fermentadores que podem converter açúcares como a xilose em xilitol, em condições de baixas temperaturas e pressões, por isso trata-se de uma rota economicamente mais viável e com maior sustentabilidade ambiental.

^{81,86,93}

A síntese de xilitol acontece no meio intracelular, (Figura 3.9), sendo uma etapa intermediária da via de conversão de xilose em xilulose-cinco-fosfato (xlu-5P). Nesta via a xilose é transportada para o meio intra-celular e reduzida a xilitol por uma reação catalisada pela enzima xilitol desidrogenase, que é dependente do equilíbrio $NADP^+/NADPH$. Após esta etapa o xilitol pode ser acumulado ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, que depende do equilíbrio $NAD^+/NADH$, sendo o controle da regeneração de $NAD^+/NADH$ uma etapa crítica que afeta o rendimento em xilitol de diferentes formas em diferentes microrganismos. ^{81,86,93}

Figura 3.9 - Rota metabólica de conversão de xilose em leveduras. ⁸¹



Inúmeros microrganismos têm sido estudados devido ao seu potencial de aplicação em rotas de produção de xilitol. Dentre os microrganismos capazes de fermentar xilose em xilitol as leveduras destacam-se como um dos poucos grupos que apresentam eficiência na conversão com oportunidades de aplicação em processos industriais. As leveduras não convencionais como as do gênero *Meyerozyma*, *Pichia* e *Candida* têm sido apontadas como plataformas promissoras.^{87,90-93}

Carneiro et al.⁹² escanearam 960 linhagens isoladas do solo, madeira e insetos e, dentre estes organismos, seis apresentaram alto potencial para a conversão de xilose em xilitol e foram selecionadas e identificadas molecularmente como *Meyerozyma spp.* Além disso, os autores relataram o maior rendimento já reportado na história para conversão em xilitol, por uma das linhagens *Meyerozyma spp.*^{87,90-93}

Desta forma o estudo da aplicação de novas linhagens de leveduras não convencionais, como *M. guilliermondii* CCT 7783, citada no item 3.2.2 é de extrema relevância, visto que novas linhagens podem apresentar alternativas viáveis, sobretudo se foram capazes de metabolizar hexoses e pentoses e converter, em condições viáveis de processo, em diferentes bioprodutos capazes de aumentar a sustentabilidade da produção industrial, que é apontada na literatura como uma premissa para a viabilidade econômica dos processos de biorrefinaria baseados em biomassa lignocelulósica.^{82,85,89}

3.5 Crescimento adaptativo

O crescimento adaptativo, também conhecido como evolução adaptativa é uma técnica de melhoria desempenho de linhagens de microrganismos de interesse. Tal técnica se baseia na capacidade de mutação do microrganismo em

condições tendo como mecanismo de pressão seletiva, como a escassez de nutrientes preferenciais, toxicidade do meio estresse osmótico e inúmeros outros fatores de inibição. Sendo as mutações benéficas, geradas como resposta às condições seletivas, capazes de conferir sobrevivência da espécie ao longo das gerações, se tornando mutações permanentes, por isso esta técnica demanda o crescimento de linhagens ao longo de várias gerações nas condições de pressões seletivas desejadas.⁶⁰

Inúmeras características de linhagens de leveduras têm sido melhoradas a partir da aplicação de técnicas de evolução adaptativa. Sendo estas desde a produção de aromas de compostos voláteis de interesse na indústria alimentícia até o aumento da eficiência da conversão em xilose, tolerância à inibição por etanol e redução de fase inicial de crescimento em xilose.⁶³⁻⁶⁴

Dentro dos estudos de engenharia evolutiva as técnicas de crescimento adaptativo em um meio seletivo, xilose como única fonte de carbono, tem sido aplicado para se promover a evolução dirigida, selecionando através das gerações as células que tem maior potencial de crescer nas condições seletivas definidas.⁵⁸⁻⁵⁹

As técnicas de evolução adaptativa diferem quanto espontâneas ou induzidas, sendo a primeira baseada em submeter as células às condições de pressões seletivas durante longos ciclos de crescimento para que as mutações espontâneas gerem células com as características melhoradas desejadas. O processo natural difere das mutações induzidas por não se aplicar agentes como físicos e químicos indutores de mutações no DNA, como a radiação UV, que é uma das técnicas citadas na literatura pela capacidade de acelerar e gerar células mais aprimoradas, sendo referida como a melhor ferramenta de mutação induzida.^{60,64-65}

Quando um microorganismo foi recentemente isolado ou modificado geneticamente para a metabolização de uma nova fonte de substrato, as vias principais e processos paralelos podem apresentar baixa eficiência devido à baixa afinidade destes processos pelo substrato em questão e neste contexto a aplicação

de técnicas de evolução adaptativa é uma etapa importante, por permite direcionar as vias metabólicas de microrganismos e aumentar a eficiência de processos de transporte e regeneração.

3.6 Cinética de crescimento de leveduras

A cinética de crescimento de um microrganismo em meios em diferentes fontes de substrato é uma etapa importante para o estudo de novos microrganismos recém isolados e ou modificados. Pois a partir do estudo dos parâmetros cinéticos é possível se comparar a performance dos microrganismos em diferentes substratos e condições, bem como calcular as condições máximas e os limites os quais os microrganismos passam a sofrer inibição, bem como a afinidade. Tais parâmetros são de extrema relevância ao se alterar substratos e suas concentrações, pois permitem se prever o comportamento do microrganismo e estabelecer valores ótimos para produção de biomassa celular e bioprodutos.

Um modelo matemático é um conjunto de relações entre as variáveis em um sistema em estudo e geralmente pode prever as variáveis de saída e o estado do sistema a partir das variáveis de entrada. Entre os numerosos modelos desenvolvidos, a maioria dos modelos são baseados em conhecimentos bioquímicos, os quais consistem em conjunto de equações que descrevem o fenômeno que ocorre durante a fermentação. As principais vantagens destes tipos de modelos é que modelam os fenômenos biológicos. Os parâmetros dos modelos com a mesma significância biológica podem ser obtidos, mas suas estruturas podem ser fortemente não lineares, complexos e com dificuldades para verificar e validar.⁹⁵

Em geral, os modelos cinéticos de fermentação podem ser subdivididos em modelos de crescimento, modelos de substratos e modelos dos produtos. Existem

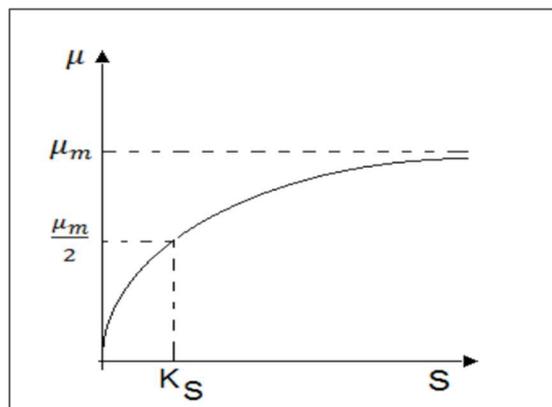
três diferentes equações derivadas para descrever o comportamento cinético da concentração de células de leveduras, açúcares (glicose ou sacarose, respectivamente), etanol e/ou xilitol.⁹⁵

Entre os diversos modelos que descrevem a cinética dos microrganismos, o modelo proposto por Monod em 1949 tem sido bastante empregado para explicar a relação entre a concentração do substrato (S) limitante no meio, com a velocidade específica μ_x de reprodução do microrganismo, onde μ_x representa a velocidade específica de crescimento celular, a máxima velocidade específica de crescimento ou reprodução, S a concentração de substrato inicial, e K_s a constante de saturação.⁹⁶

A Figura 3.10 representa graficamente a equação de Monod. O significado de K_s pode ser deduzido fazendo-se $S=K_s$, na equação 1, o que resulta imediatamente que a referida constante representa a concentração do substrato na qual a velocidade específica de crescimento é a metade do seu valor máximo. No início do cultivo, onde S é alto, o microrganismo apresenta uma velocidade específica próxima à máxima, podendo a mesma situar-se nesta região durante uma boa parte do processo, mesmo que o metabolismo celular provoque uma diminuição apreciável no valor de S.^{95,97}

$$\mu_x = \frac{\mu_m \cdot S}{K_s + S}$$

Equação 2

Figura 3.10 - Descrição gráfica do modelo de Monod (Monod apud Paixão).⁹⁷

3.7 Parâmetros de processo que influenciam na conversão de pentoses em xilitol, etanol e biomassa celular por leveduras.

O consumo de substratos, como a xilose e a produção de bioprodutos e biomassa celular pelas leveduras dependem qualitativa e quantitativamente das espécies utilizadas, da concentração do substrato, bem como da disponibilidade de oxigênio e outros parâmetros, como a presença de ácidos, por exemplo. O conhecimento sobre os fatores envolvidos na difusão dos fluxos de carbono e na formação de subprodutos ainda é bastante descritivo e limitado. Dessa forma, torna-se importante avaliar todos os fatores que possam afetar a eficiência de leveduras não convencionais, naturalmente conversoras de pentoses, e neste contexto um abordagem aplicando planejamento de experimentos em fatorial pode produzir conhecimentos de extrema relevância para uma o embasamento de pesquisas que visem maximizar as condições biossintese aplicando estas leveduras.¹⁰⁰

No item 3.2 e vimos que a metabolização de pentoses a etanol passa por uma sequência de etapas tendo o xilitol como produtos intermediário. Na Figura 3.1

vimos que as vias de obtenção de xilitol são moderadas pelo equilíbrio redox entre NAD^+/NADH , que por sua vez é regenerado pelo metabolismo respiratório.

Desta forma infere-se que fatores que afetam a dissolução de oxigênio no meio de cultivo, como a rotação e a aplicação de condições de hipoxia, como o fluxo de nitrogênio no meio de cultivo podem afetar a biossíntese de etanol, xilitol e o crescimento celular. O entendimento sobre como estes parâmetros afetam estas vias de conversão é de imperial importância para a aplicação de leveduras que naturalmente metabolizam pentoses.¹⁰¹

3.7.1 Influência da concentração de oxigênio na bioconversão de pentoses por leveduras

É reportado na literatura que em leveduras produtoras do xilitol, a atividade da enzima xilose redutase (XR) é preferencialmente NADPH dependente e a xilitol desidrogenase, especificamente NAD^+ dependente. A regeneração do cofator NADPH ocorre no ciclo das pentoses fosfato, enquanto a regeneração de NAD^+ , a partir de NADH , ocorre na cadeia respiratória, tendo oxigênio como acceptor final de elétrons. Assim, sob condições limitadas de oxigênio, não há a completa re-oxidação de NADH a NAD^+ , promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de NAD^+ diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a excreção do xilitol ao meio de cultura.¹⁰⁰⁻¹⁰¹

Dessa forma, sob condições limitadas de oxigênio, a xilose não é completamente metabolizada nas leveduras, levando à produção de xilitol e/ou etanol dependendo dos cofatores das enzimas envolvidas nas reações de metabolização da xilose, assim como a regeneração de tais cofatores de acordo com as condições de oxigênio empregadas no cultivo. No entanto, as leveduras que

fermentam xilose requerem oxigênio para o seu crescimento, sendo um dos grandes desafios a viabilidade comercial de fermentação de xilose o alcance do crescimento celular, assim como a produção do etanol sob condições anaeróbicas.¹⁰⁴

Em condições aeróbicas, grande parte da xilose metabolizada é convertida a xilitol, o principal coproduto formado nos cultivos de xilose sob condições limitadas de oxigênio, o qual compromete a produção do etanol. As causas da ineficiência incorporação das moléculas derivadas da metabolização da xilose na rota bioquímica central que resulta na formação de etanol. Dentre as várias causas, a principal está relacionada com o desequilíbrio redox entre os cofatores das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, o qual ocorre sob condições limitadas de oxigênio necessárias para que o substrato seja convertido em etanol e não biomassa.^{101,104}

Estudos empregando a levedura *Brettanomyces/Dekkera* foram utilizados para metabolizar diversas fontes de carbono, incluindo pentoses em condições limitadas de oxigênio e pH baixo. Nessas condições *D. bruxellensis* produziu etanol com alto rendimento comparativamente ao obtido por *S. cerevisiae*. Portanto, usando estratégias otimizadas de fermentação, assim como o controle metabólico e o desenvolvimento de linhagens modificadas podem melhorar a capacidade da levedura *Dekkera/Brettanomyces* para o uso em novas espécies.¹⁰⁵

Milessi et al.¹⁰⁶ avaliaram o efeito do oxigênio e a concentração inicial do inóculo na produção xilose redutase pela *Candida guilliermondii* do hidrolisado hemicelulose bagaço de cana-de-açúcar. No estudo os autores concluíram que a concentração inicial do inóculo é um fator importante na produção de xilose redutase, que juntamente com a combinação do oxigênio dissolvido em uma porcentagem apropriada interferiram significativamente no processo de produção.

Signori et al.¹⁰⁷ avaliaram o efeito de oxigenação e temperatura na fermentação da glicose-xilose empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus*

CBS712. No estudo, foi observado que tanto o suprimento de oxigênio quanto a temperatura mostraram ser parâmetros-chave afetando a capacidade de fermentação de açúcares utilizando a levedura *K. marxianus* CBS712. Em particular, uma correlação direta foi observada entre a diminuição da eficiência para consumir xilose com a redução da atividade específica das duas principais enzimas (KmXR e KmXDH) envolvidas em seu catabolismo. Esses dados sugerem que, além do comprometimento da sendo a via oxirredutora determinada pelo desequilíbrio do cofator, pós-transcricional e/ou pós-traducional.

Hor et al.¹⁰⁸ empregaram o bagaço de cana-de-açúcar e sua vinhaça para a produção do xilitol através da fermentação de *Candida guilliermondii*. O estudo demonstrou que em condições limitadas de oxigênio promove a produção do xilitol enquanto a aeração em excesso resulta em um baixo rendimento de xilitol.

3.7.2 Influência da concentração de substrato na bioconversão de pentoses por leveduras

O substrato é um material que contém nutrientes para o crescimento de microrganismos durante o processo de fermentação. As concentrações de substrato são importantes para tornar o processo mais econômico, mas uma concentração muito alta de substrato pode levar à inibição da formação do produto final.¹⁰⁹

A concentração de substrato é um dos parâmetros cruciais que afetam o consumo de substratos, como (D-xilose), o crescimento das leveduras e o processo de fermentação. A concentração inicial de xilose pode afetar a produção de xilitol. Tomando este modelo, no caso de microrganismos que podem crescer em condições de alta pressão osmótica ou na presença de concentrações elevadas de glicose, uma

alta concentração inicial de xilose pode presumivelmente levar a uma maior quantidade de xilitol. Como a concentração inicial de xilose aumenta, o nível de oxigênio aumenta e assim evitando a inibição do crescimento microbiano. No entanto, os autores explicam que a influência da concentração do substrato na conversão em etanol e xilitol não é trivial, isto é, os resultados podem variar de uma espécie para outra.¹¹⁰

Diversos trabalhos sobre a produção de etanol e xilitol são reportados na literatura, onde os autores avaliaram a influência da concentração do substrato no crescimento celular, na produção de xilitol e etanol. Krahulec et al.¹¹¹ avaliaram a fermentação da mistura do substrato glicose-xilose por levedura modificada *S. cerevisiae*. Neste estudo, os autores avaliaram também o papel da especificidade da coenzima da xilose redutase e os efeitos da glicose na utilização da xilose. Eles reportaram ainda que a linhagem *S. cerevisiae*, geneticamente modificada, foi capaz de converter xilose apenas quando as concentrações no meio de cultivo eram menores que 4 g/L, sendo este um exemplo de limitação que inviabiliza sua aplicação em processos industriais.

Mardawati et al.¹¹² avaliaram o efeito da concentração da glicose como substrato na produção microbiana do xilitol utilizando *Debaryomyces hansenii* ITBCC R85 a partir do hidrolisado de cachos vazios de óleo de palma. Os autores concluíram que a adição da glicose como co-substrato afetou a performance da fermentação da *D. hansenii* na produção do xilitol, onde foi encontrado 2,5 g/L da concentração da glicose ou proporção da concentração da glicose para xilose de 25% deu maior rendimento de xilitol.

Leveduras convencionais como *Saccharomyces cerevisiae* são têm seu metabolismo afetado para concentração dos açúcares de forma que em altas concentrações de substrato o fluxo de carbono é desviado para as vias de fermentação resultando na produção de etanol e gás carbônico, sendo estas

classificadas como Crabtree positivas. Todavia leveduras não convencionais têm sido reportadas na literatura, em sua grande maioria como Crabtree negativas indicando que a combinação que a concentração de substrato não é o principal parâmetro que direciona o fluxo de carbono. Bravo et al.¹¹³ reportou que concentrações iniciais de xilose acima de 25 g/L são necessárias para produção de xilitol. Em outro estudo Zhang e Geng¹¹⁴ reportaram que um aumento na produção de etanol a partir de xilose em concentrações variando de 100 a 250 g/L.¹¹³⁻¹¹⁵

3.7.3 Influência da agitação na conversão de xilitol e etanol

Outro fator importante que influencia as condições de operação durante a fermentação em escala de bancada e industrial é a agitação da mistura. Agitação é importante para a mistura uniforme dos componentes do meio dentro do fermentador, pois promove a dispersão de células e nutrientes. Bem como para promover uma transferência de massa eficaz. O efeito de agitação na produção de etanol é importante para o progresso bem-sucedido para a fermentação.¹¹⁶

A literatura descreve diversos trabalhos avaliando o efeito da agitação na conversão do etanol e xilitol. Rodmui et al.¹¹⁷ empregaram a co-cultura de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* para a produção do etanol em batelada em meio sintético contendo 20 g/L de glicose e xilose como fonte de carbono. Após a incubação a 30 °C por 18 h na proporção de glicose e xilose 1:0, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1 e 0:1, o rendimento de etanol ($Y_{P/S}$) foram 0,35, 0,35, 0,34, 0,32, 0,32, 0,27 e 0,05 g.g⁻¹, respectivamente. Neste estudo os autores avaliaram a taxa de agitação de 0-200 rpm na fermentação em lote, os resultados sugeriram que

a taxa de agitação de 50 rpm foi adequada para a produção de etanol pela co-cultura dos açúcares misturados.¹¹⁷

Silva et al.¹¹⁶ avaliaram os efeitos da agitação e aeração na produção de xilitol utilizando a levedura *Starmerella meliponinorum* FRP.09, previamente isolada e selecionada devido à sua capacidade de produzir etanol e xilitol a partir da xilose. As fermentações foram conduzidas em frascos de 125 mL com 15 mL de meio de cultura e agitadas a 150 rpm e 200 rpm sem aeração forçada e comparadas com a fermentação em sistema estático. Para avaliação da aeração forçada, foi utilizado biorreator com vazão de ar de 0,1 vvm e agitação de 100 rpm, 0,25 vvm/150 rpm e 0,5 vvm/200 rpm. Maior agitação e fluxo de ar aumentaram significativamente o consumo de xilose. A levedura *S. meliponinorum* FRP.09 obteve o melhor rendimento de xilitol de 0,6 g de xilitol por g de xilose consumido, quando a fermentação foi conduzida com um fluxo de ar/velocidade de rotação de 0,5 vvm / 200 rpm no biorreator e 150 rpm nos frascos de fermentação.

Prabhu et al.¹¹⁸ estudaram o aprimoramento na produção do xilitol usando pré-hidrolisado rico em xilose não desintoxicado do bagaço da cana-de-açúcar recém-isolados da *Pichia fermentans*. Neste estudo os autores avaliaram a velocidade de rotação da agitação entre 100 a 300 rpm com um intervalo de 50 rpm para a produção do xilitol, e foi observado um aumento de rendimento de produção do xilitol (36.6 g/L and 0.61 g.g⁻¹) até 250 rpm. No entanto, foi observado que com o aumento da velocidade de agitação até 300 rpm, resultou em maior produção de biomassa, mas reduziu a acumulação do xilitol. Portanto, a literatura sugere que a velocidade da agitação enriquece o crescimento dos microrganismos, enquanto velocidade de agitação moderada mostrou ser benéfica para acumulação do xilitol.

3.7.4 Influência da concentração inicial de células na fermentação alcoólica e de xilitol

A concentração de células viáveis é uma das principais características a serem monitoradas durante o desenvolvimento do bioprocesso e da otimização das condições de biossíntese. Em princípio, a quantificação celular pode ser obtida por enumeração direta e/ou por medição indireta por meio de um indicador mensurável, que é quantitativamente correlacionado com a concentração celular. Baixos níveis de oxigênio (1,5-5 mmol/L·h) são necessários para a conversão de xilose em etanol, a fim de manter a viabilidade celular e o equilíbrio NADH.¹¹⁹

Além disso, um alto nível de oxigênio leva à reassimilação do etanol e produção de biomassa e, portanto, baixos rendimentos. Sob condições anaeróbicas, o crescimento celular e a produção de etanol são severamente restringidos. É relatado, por exemplo, que o crescimento celular de *P. stipitis* é inibido em baixas concentrações de etanol (aproximadamente 34,0 g/L) e a maior tolerância do etanol para o crescimento celular é de 64,0 g/L.¹¹⁹

Estudos efetuados por Agbogbo et al.¹¹⁹ demonstraram os efeitos da concentração inicial das células de *Pichia stipitis* na taxa de fermentação, concentração do etanol e seu rendimento. Em concentrações baixas de células iniciais, o crescimento celular foi maior em comparação com fermentações com altas concentrações. A taxa de consumo de xilose, a produção de etanol e o rendimento de etanol foi alto quando a concentração inicial de células foi alta porque as células usaram o substrato para a produção de etanol em vez de para crescimento celular. No entanto, a seletividade do etanol foi baixa em altas concentrações de células iniciais.

Outro estudo realizado por Saputra et al.¹²⁰ avaliou a eficiência de produção do xilitol a partir de *Meyerozyma caribbica* Y67 variando a concentração das células iniciais e o volume na fermentação. Este estudo demonstrou que a concentração de células iniciais afetou a produção do xilitol, e sugere que seja utilizada um volume médio de 40% por 48 h de fermentação para a obtenção de rendimento máximo.

Além disso, dentre os inúmeros desafios percorridos, a busca por microrganismos e condições fermentativas que viabilizem a produção de etanol de segunda geração e co-produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas se destaca como um ponto chave. Pesquisas que produzam conhecimento sobre a capacidade fermentativa e sobre os fatores que influenciam a bioconversão por leveduras não convencionais são de imperial importância para o contexto atual dos processos de biorrefinarias no Brasil e no mundo.^{100,109,116,118,34}

A levedura *M. guilliermondii* CCT7783, detalhada no item 3.2.2, tem sido reportada na literatura como capaz de converter pentoses e hexoses com alta resistência aos compostos inibidores que podem ser encontrados nos hidrolisados industriais, entretanto, com baixo rendimento em produtos de interesse de biorrefinaria. Desta forma, estudos mais aprofundados sobre as condições que afetam a bioconversão de pentoses por esta levedura são necessários para o entendimento das condições ótimas que permitam sua aplicação como plataforma de conversão em processos de biorrefinaria.³³⁻³⁴

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação dos efeitos do crescimento adaptativo sobre a cinética de crescimento e bioconversão de pentoses por *Meyerozyma guilliermondii* (CCT7783)

4.1.1 Preparo dos inóculos para os experimentos de crescimento adaptativo.

A levedura *Meyerozyma guilliermondii* foi isolada, do processo industrial da Usina São João de Araras, e identificada conforme os procedimentos descritos em Martini et al.³³ e está depositada sob número CCT7783 na coleção de culturas da Fundação André Toselo, Campinas, SP. As culturas de *M. guilliermondii* foram denominadas como 311 e são mantidas em slants de YEPD (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 10 g/L ágar, em água destilada), sob condições de refrigeração, nas instalações do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), CCA-UFSCar – Campus de Arara. Para aplicação neste estudo tais culturas foram reativadas em placas de petri contendo YEPD, incubadas a 30 °C e utilizadas como fonte de inóculo nas etapas seguintes.³³

Após a reativação, as células de *M. guilliermondii* (311) foram transferidas para placas de petri contendo meio de cultivo mínimo composto por 20 g/L de D-xilose, 10 g/L de ágar-ágar e 0,67% de YNB (Sigma®, Y1250, **(Erro! Fonte de referência não encontrada.)**). A fração contendo xilose e ágar foi previamente esterilizada em autoclave a 120°C e 1atm por 20 min, sendo então suplementados de solução estoque de YNB, que foi previamente esterilizada por filtração utilizando membrana estéril de 0,2 microns. Todos os procedimentos foram realizados em ambiente estéril dentro de capela de fluxo laminar.

Tabela 4.1 - Composição química do meio de cultivo YNB, Sigma®, Y1250

Componente	Concentração
Sulfato de amônio	5 g/L
Biotina	2 g/L
LD-metionina	20 µg/L
LD-triptofano	20 µg/L
Pantotenato de cálcio	400 µg/L
Ácido fólico	2 µg/L
Inositol	2 µg/L
Ácido nicotínico	400 µg/L
Ácido p-aminobenzóico	200 µg/L
Piroxidina HCl	400 µg/L
Riboflavina	200 µg/L
Tiamina HCl	400 µg/L
Ácido bórico	500 µg/L
Sulfato de cobre	40 µg/L
Iodeto de potássio	100 µg/L
Cloreto férrico	200 µg/L
Sulfato de mangânes	400 µg/L
Molibdato de sódio	200 µg/L
Sulfato de zinco	400 µg/L
Fosfato de potássio monobásico	1 g/L
Sulfato de magnésio	0.5 g/L
Cloreto de sódio	0.1 g/L
Cloreto de cálcio	0.1 g/L

Após inoculação as placas foram incubadas a 30°C por 72 h e, em seguida uma fração das placas foram expostas à luz UV, por diferentes tempos, conforme definido na Tabela 4.2. A etapa de exposição a luz UV, foi realizada baseada na metodologia descrita por Moreno et al.¹²⁶, com modificações. Sendo que como fonte de luz UV utilizou-se um trans-iluminador ultravioleta, fabricante Spectroline, modelo: TVC-3123. O procedimento foi realizado com materiais

estéreis, dentro de capela de fluxo laminar nas instalações do Laboratório de Bioquímica Funcional e Estrutural da Universidade Federal de São Carlos.

Tabela 4.2 – Definição dos tempos de exposição à luz UV das culturas de *M. guilliermondii*

Placa	Tempo de exposição a luz uv
1	30s
2	30s
3	30s
4	60s
5	60s
6	60s
7	120s
8	120s
9	120s
10-12	Sem exposição

4.1.2 Experimentos de crescimento adaptativo

Os inóculos, preparados no item 4.1.1, foram utilizados como culturas iniciadoras nos experimentos de crescimento adaptativo. Nesta etapa inoculou-se duas alçadas das placas 1 a 9, que foram expostas a luz UV, conforme descrito na Tabela 4.2, em um mesmo frasco erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio de cultivo líquido, YNB (Sigma®, Y1250, (Tabela 4.1) + 20 g/L de xilose, previamente preparado e esterilizado por filtração, tais cultivos foram denominados como 311_UV. As placas que não foram expostas a luz UV, 10 a 12, Tabela 4.2, foram utilizadas para compor o inóculo denominado de 311_EN, que foi inoculado e propagado sob as mesmas condições e procedimentos das placas que foram exposição a luz UV.

Os frascos de YNB inoculados com culturas expostas a luz UV e culturas controle, foram preparados em triplicatas, incubados a 30°C, 160 rpm em incubadora shaker, marca SOLAB, modelo SL-223, e propagados durante 180 dias, em ciclos de 96 h. Ao final de cada ciclo uma alíquota de 0,5 ml de cada frasco era transferida para um novo frasco iniciando-se assim um novo ciclo de crescimento. Alíquotas de 10 mL eram retiradas ao final de cada 96 h de incubação para se monitorar a viabilidade celular, a morfologia e a contaminação por microscopia óptica. Todos os procedimentos descritos neste parágrafo foram realizados nos laboratórios de microbiologia e de análises instrumentais do SENAI de Sertãozinho.

4.1.3 Experimentos de cinética de crescimento

4.1.3.1 Preparo dos inóculos

Para os experimentos de cinética de crescimento utilizou como inóculo a levedura *M. guilliermondii*, que foi isolada e mantida conforme descrito no item 4.1.1 e para fins de comparação do efeito do crescimento adaptativo em meio mínimo, tal levedura será referida na apresentação e discussão dos resultados por 311_P, como sendo *M. guilliermondii* controle, ou seja não passou por crescimento adaptativo e 311_UV e 311_EN, para se referir a levedura *M. guilliermondii* resultante do crescimento adaptativo espontâneo e induzido por luz UV, respectivamente, conforme descrito na Tabela 4.3. As três diferentes culturas (311_P, 311_UV e 311_EN) foram inoculadas em YEPX (20 g/L xilose, 20 g/L de peptona e 10g/L de extrato de levedura) na concentração de 0,3 g/L e incubadas a 30°C, sob agitação de 160 rpm até obtenção da biomassa necessária para os experimentos cinéticos. Ao final dos ciclos de propagação as células foram

centrífugas e lavadas por duas vezes em água estéril, para se remover todos os resíduos de fontes de carbono, sendo então resuspendidas para compor o inóculo a ser aplicado nos experimentos cinéticos.

Tabela 4.3 – Descrição dos inóculos aplicados nos experimentos cinéticos e fermentativos de *M. guilliermondii*

Fonte do Inóculo	Tratamento e preparo	Denominação
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CCT7783	Exposição a luz UV e crescimento em YNB por 60 ciclos de 96 h	311_UV
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CCT7783	Crescimento em YNB por 60 ciclos de 96 h	311_EN
<i>Meyerozyma guilliermondii</i> CCT7783	Crescimento em YEPD	311_P

4.1.3.2 Montagem dos experimentos

Para avaliação da cinética de crescimento e efeito de inibição pelo substrato, frascos erlenmeyers de 500 mL foram esterilizados em autoclave, a 120°C e 1atm por 20 min, sendo que a cada frasco adicionou-se 150 mL de meio de cultivo, que consistiu em solução analiticamente preparada de xilose nas concentrações de 5, 15, 25, 35, 45 e 55 g/L, suplementadas com 0,67% de YNB (Sigma®, Y1250, Tabela 4.1). Para todas as concentrações os frascos foram preparados em triplicatas compondo 8 frascos para cada linhagem de *M. guilliermondii* avaliada (311_P, 311_UV e 311_EN).

Todas as etapas experimentais ocorreram dentro de capela de fluxo laminar e todos os materiais e utensílios também foram previamente esterilizados em autoclave a 120°C e 1atm por 20 min.

Os experimentos iniciaram-se pelos frascos de menor concentração (5 g/L), que, após correção do pH do meio de crescimento para 5,5, foram inoculados com células de *M. guilliermondii* (311_P, 311_UV e 311_EN) até a densidade óptica de 0,25 a 600nm e mantidos em incubadora a 160 rpm e 30°C. O pH do meio de cultivo foi ajustado com a adição de solução de NaOH (12 mol/L) em gotas com agitação, em condições assépticas.

Para monitoramento do crescimento celular foram retiradas amostras de 5 mL a cada 12 h por um período de 96 h. Ao término do ciclo de crescimento repetiu-se o mesmo procedimento para todas as concentrações descritas no parágrafo anterior, sendo 6 ciclos experimentais, um para cada concentração de xilose, com três inóculos diferentes (311_P, 311_UV e 311_EN), em triplicata, totalizando 54 cultivos.

4.1.3.3 Preparo dos experimentos fermentativos

Para se analisar o efeito do crescimento adaptativo na capacidade de bioconversão da levedura *M. guilliermondii*, foram preparados em frascos erlenmeyers de 500 mL, contendo 200 mL de meio de cultivo YPX composto de xilose (20g/L), peptona (20g/L) e extrato de levedura (10g/L). Em seguida os frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C e 1atm por 20 min. O pH do meio de cultivo foi então corrigido para 5,5 pela adição de gotas de NaOH (12 mol/L), em

condições assépticas. Após o ajuste de pH os frascos foram inoculados com os inóculos preparados conforme descrito no item 4.1.3.1.

A concentração inicial de células foi ajustada a partir da densidade óptica, medida em 600 nm, para 0,25. Nesta etapa também se avaliou o efeito do aumento do substrato e, para esta finalidade, uma sequência adicional de experimentos foi realizada seguindo o mesmo procedimento descrito acima, porém dobrando-se a quantidade de substrato disponível no meio de cultivo YEPX para 40g/l de xilose mantendo-se a concentração dos demais nutrientes.

Após inoculação os frascos foram amostrados e incubados em incubadora shaker, marca SOLAB, modelo SL-223 a 160 rpm e 30°C por 96 h com amostragem de 5 mL a cada 12 h para se analisar as concentrações de etanol, xilitol, ácido láctico, glicerol, ácido acético, ácido succínico, xilose, arabinose biomassa celular.

4.1.4 Metodologia analítica

A medição de pH foi realizada utilizando-se pHmetro digital, fabricante Metrohm, modelo 827.

A análise da concentração de biomassa celular foi realizada a partir da leitura de absorvância em espectrofotômetro, marca Analytik Jena, modelo SPECORD® 200 PLUS. Os valores de leitura de absorção a 600 nm foram convertidos em biomassa celular seca utilizando-se curva padrão de biomassa celular de *M. guilliermondii* seca, conforme equação:

$$[\text{Biomassa de } M. \text{ guilliermondii} \text{ seca (g/L)} = (\text{Absorbância} + 0,1378) / 1,1625] \times \text{diluição}$$

Equação 3

As amostras, retiradas a cada 12 h, foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min em centrífuga Eppendorf, sendo os sobrenadantes separados e armazenados a -20°C para as análises de pH, concentração de substratos e produtos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

As amostras foram filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas em HPLC Shimadzu, modelo LC- 10AD. A separação dos analitos ocorreu em coluna Bio-rad Aminex® HPX-87H 300.0 mm x 7.8 mm e as amostras foram eluídas por fase móvel de ácido sulfúrico em água na concentração de 0,005 mol/L, em temperaturas de 30°C para separação dos açúcares e xilitol e 50°C para separação de etanol, glicerol e ácidos orgânicos. Os analitos foram detectados por índice de refração em detector modelo RID-20A, fabricante Shimadzu. Para todos os analitos foram preparadas curvas de calibração utilizando soluções padrão HPLC, de concentrações conhecidas sendo os valores de área dos cromatogramas utilizados para cálculo das regressões lineares obtendo assim as curvas de calibração. Para todos os analitos as curvas foram preparadas em triplicatas para cálculo do erro experimental entre os coeficientes de regressão linear e entre os diferentes níveis das curvas de calibração. As análises por HPLC foram realizadas no laboratório do Grupo de Energias Renováveis, Nanotecnologia e Catálises (GreenCat) nas instalações na Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

4.1.5 Determinação dos parâmetros cinéticos

Para avaliar o efeito do crescimento adaptativo na cinética de crescimento de *M. guilliermondii*, em meio mínimo, YBN, contendo xilose como única fonte de carbono, calculou-se a velocidade máxima específica de crescimento (μ_{max} , h⁻¹) e através da regressão linear do logaritmo neperiano dos valores de

biomassa celular em função do tempo, na fase de crescimento exponencial, sendo o valor do coeficiente angular correspondente a velocidade específica de crescimento (μ , h^{-1}), conforme modelo citado por Perna et al.³⁴ que foi proposto por Pirt:^{34,76}

$$\ln[X]=\mu.t + b \quad \text{Equação 4}$$

onde:

$\ln[X]$ = logaritmo neperiano da concentração de biomassa da levedura;

μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

t = tempo (h);

b = coeficiente linear

O modelo cinético de Monod foi aplicado por se tratar de um modelo experimental no qual a concentração de substrato limitante se relaciona com a velocidade específica somente, portanto não havendo efeitos secundários de inibição, como se espera para leveduras crescendo em meio mínimo sintético com concentrações crescentes da única fonte de carbono disponível, sendo está a única variável capaz de afetar o crescimento celular. Desta forma, os resultados das velocidades específicas, em cada concentração de substrato, foram utilizados para se calcular o efeito de inibição pelo substrato e a velocidade específica máxima de crescimento. Para esta finalidade, calculou-se a constante de Monod, K_s (g/L) utilizando se os valores das velocidades específicas de crescimento (μh^{-1}) calculadas em concentrações crescentes de xilose (5, 15, 25, 35, 45 e 55 g/L) e aplicando-se a equação de Monod linearizada:^{34,76}

$$1/\mu = 1/\mu_m.S / (1/K_s + 1/S) \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

S = concentração de xilose;

μ = velocidade específica de crescimento;

μ_m = velocidade específica máxima de crescimento;

K_s = constante de saturação pelo substrato.

Todavia valores de inibição foram verificados nas concentrações mais elevadas e com objetivo de se avaliar o efeito dos altos valores iniciais de xilose na velocidade máxima de crescimento das linhagens adaptadas e controle, a equação de Monod modificada foi aplicada para se calcular a constante de inibição:²³⁶

$$\mu_x = \mu_m * (S / (K_s + S)) * K_i / (K_i + S) \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

K_s = Constante de saturação definida na equação de Monod;

μ_x = velocidade específica de crescimento;

μ_m = velocidade específica máxima de crescimento;

K_i = constante de inibição pelo substrato.

4.1.6 Análise estatística

Os resultados dos parâmetros cinéticos, da conversão em bioprodutos e consumo de substratos foram submetidos à análise de variância e os valores que apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância foram também

submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias. Foi utilizado linguagem Phyton com aplicação de biblioteca pandas para importação dos dados e *statsmodels* para os cálculos.

4.2 Avaliação dos efeitos dos parâmetros hipoxia, concentração inicial de inóculo, concentração inicial de xilose e rotação na eficiência de bioconversão por *M. guilliermondii*

4.2.1 Preparo dos inóculos e meios de cultivo

Nesta fase do estudo aplicou-se como inóculo a levedura *M. guilliermondii* denominada como 311_EN que foi adaptada por crescimento espontâneo após 45 ciclos de 96 h crescimento em meio mínimo, contendo xilose como única fonte de carbono, conforme descrito no item 4.1.3.1, tal levedura foi selecionada para ser aplicada neste experimento por ser o inóculo mais eficiente para crescer e converter xilose, dentre aqueles avaliados nos experimentos descritos na etapa 4.1. Para obtenção da biomassa celular necessária, a levedura 311_EN foi propagada em YEPX (xilose 20 g/L, peptona 20 g/L e extrato de levedura 10 g/L), e as células foram centrifugadas a 6000 rpm por 5 min e lavadas em água estéril, por duas vezes, e por fim ressuspensas para serem inoculadas nas concentrações determinadas pelo planejamento experimental.

Como meios de cultivo foram preparadas soluções de xilose nas concentrações de 20 e 40 g/L com adição de 20 g/L de peptona 10 g/L de extrato de levedura. Os frascos contendo 150 ml dos meios de cultivo foram autoclavados a 120°C e 1atm por 20 min.

4.2.2 Planejamento experimental

Para avaliar os efeitos da concentração de xilose, do fluxo de nitrogênio no meio de cultivo, da concentração inicial de inóculo e da rotação na capacidade de conversão de xilose pela levedura *M. guilliermondii* (311_EN) realizou-se um planejamento experimental em fatorial completo 2^4 . Cada um dos parâmetros estudados aqui foi considerado como uma variável independente com dois níveis de variação (-1 e +1), conforme descrito na Tabela 4.4. Também foram realizados experimentos em triplicata, no ponto central (0,0,0), para se calcular o erro experimental.

Desta forma foram realizados ao todo 19 experimentos, sendo que de 1 a 16 são os experimentos correspondentes aos níveis alto e baixo das variáveis aqui estudadas e de 17 a 19 correspondem as triplicatas realizadas nos valores centrais do planejamento. As variáveis dependentes, também denominadas como variáveis de resposta foram o consumo de xilose (g/l) e a produção e o rendimento em etanol, xilitol e biomassa celular.¹³²

Tabela 4.4 – Matrix de planejamento fatorial 2⁴

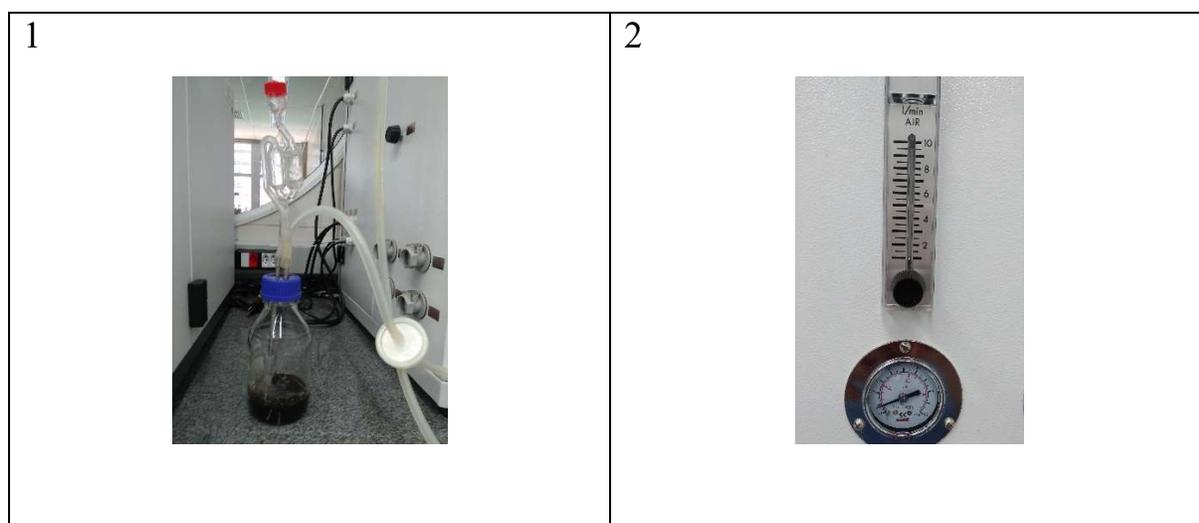
Variáveis		1		2		3		4	
Exp		Xilose		Hipoxia (horas de N ₂)		Inicial de inóculo (DO)		Rotação (rpm)	
		real	normalizado	Real	normalizado	real	normalizado	real	normalizado
1		20	-1	0	-1	0,2	-1	60	-1
2		40	-1	0	-1	0,2	-1	60	-1
3		20	1	1	1	0,2	-1	60	-1
4		40	1	1	1	0,2	-1	60	-1
5		20	-1	0	1	1,2	1	60	-1
6		40	-1	0	1	1,2	1	60	-1
7		20	1	1	1	1,2	-1	60	-1
8		40	1	1	1	1,2	-1	60	-1
9		20	-1	0	-1	0,2	-1	160	1
10		40	-1	0	-1	0,2	-1	160	1
11		20	1	1	1	0,2	-1	160	1
12		40	1	1	1	0,2	-1	160	1
13		20	-1	0	-1	1,2	1	160	1
14		40	-1	0	-1	1,2	1	160	1
15		20	1	1	1	1,2	1	160	1
16		40	1	1	1	1,2	1	160	1
17		30	0	0,5	0	0,7	0	110	0
18		30	0	0,5	0	0,7	0	110	0
19		30	0	0,5	0	0,7	0	110	0

4.2.3 Montagem experimental

Os experimentos foram executados em frascos de 500 mL, contendo 150 mL do meio de cultivo, que foi preparado conforme descrito no item 4.2.1, sendo a concentração de xilose nos meios de cultivo de 20, 40 ou 30 g/L. Tais frascos foram inoculados com 0,2, 0,7 ou 1,2 g/L de *M. guilliermondii* 311_EN e incubados a 60, 110 ou 160 rpm, conforme descrito na Tabela 4.4.

Para se avaliar o efeito de baixa aeração no meio de cultivo, ou seja, condições de hipoxia, os frascos, conforme definidos pelo planejamento experimental foram submetidos ao fluxo de nitrogênio analítico 5.0 (99,999%) , esterilizado por filtração, submetendo-se o fluxo através de membrana de 0,2 micron, com vazões de 1 litro por minuto e pressão de 1 atmosfera (Figura 4.1). Todas as condições foram testadas, em triplicatas, para vedação e contaminação antes do início dos procedimentos experimentais.

Figura 4.1 – Montagem do aparato experimental para geração de condições de hipoxia



1 - Montagem e filtração do fluxo de N₂

2 - Pressão e vazão do fluxo de N₂

Os frascos, com e sem etapa de fluxo de nitrogênio, conforme estabelecido pelo planejamento experimental (Tabela 4.4), foram incubados a 30°C por 96 h em rotações distintas de 60, 110 e 160 rpm, também de acordo com o planejamento experimental. Amostras foram coletadas no início e ao término dos experimentos e foram analisadas para determinação das concentrações de biomassa celular, consumo de xilose, produção de etanol e xilitol.

4.2.4 Análises das variáveis de resposta

O consumo de xilose, a produção de etanol e xilitol foram analisados por HPLC, conforme metodologia descrita no item 4.1.4. A produção de biomassa celular foi analisada por espectrometria na região do visível (600 nm) com conversão dos valores de absorbância através de curva de calibração também detalhado no item 4.1.4.

4.2.5 Cálculo dos efeitos das variáveis

O cálculo do efeito de cada variável independente, bem como de suas interações foi realizado para se identificar quais variáveis tem maior influência na conversão de pentoses por *M. guilliermondii* 311_EN. Cada variável isolada exerce um efeito de primeira ordem nas respostas analisadas. Para as quatro variáveis investigadas neste estudo os efeitos de primeira ordem foram calculados a partir da diferença entre as médias das respostas para os níveis altos e baixos de cada variável, por exemplo para a produção de etanol os efeitos de primeira ordem foram

calculados, conforme equação 6, a partir da média da soma dos valores de etanol dos experimentos de valor alto menos a média da soma dos valores de etanol dos experimentos de valor baixo. Desta forma para a variável 1 (concentração de xilose), seguindo a organização do planejamento experimental temos:

$$\text{Efeito 1, etanol} = \{(\Sigma [\text{etanol}] \text{ exp. 2,4,6,8,10,12,14,16}) / 8\} - \{(\Sigma [\text{etanol}] \text{ exp. (1,3,5,7,9,11,13,15)}) / 8\} \quad \text{Equação 7}$$

O mesmo cálculo foi aplicado para calcular o efeito das demais variáveis. Sendo então calculados quatro efeitos, de primeira ordem, na produção de etanol, no consumo de pentoses, na produção de xilitol e biomassa celular.

Os efeitos sinérgicos e antagônicos da combinação de duas ou mais variáveis também foram calculados a partir da média das diferenças da soma dos resultados obtidos nos experimentos em que as variáveis estão em mesmo nível e em níveis diferentes, por exemplo para o efeito gerado na produção de etanol pela interação entre as variáveis 1 e 2, concentração de xilose e hipoxia, respectivamente, temos:

$$\text{Efeito 12, etanol} = \{(\Sigma [\text{etanol}] \text{ exp. 1,5,9,13,4,8,12,16}) - (\Sigma [\text{etanol}] \text{ exp. 3,7,11,15,2,6,10,14}) / 8\} \quad \text{Equação 8}$$

O mesmo cálculo foi aplicado para interações de terceira e quarta ordem para todas as variáveis de resposta aqui estudadas, sendo um total de 15 efeitos sobre a produção de etanol, 15 efeitos sobre o consumo de xilose, 15 efeitos sobre a produção de xilitol e 15 efeitos sobre a produção de biomassa celular de *M. guilliermondii* 311_EN.

4.2.6 Análise estatística

A análise estatística do planejamento em fatorial foi realizada utilizando o software Minitab. Para as quatro respostas estudadas nesta etapa (consumo de pentoses, produção e rendimento de biomassa celular, etanol e xilitol) gráficos de paretos foram construídos, considerando os valores reais dos efeitos distribuídos dentro de uma curva gaussiana de área unitária, sendo os intervalos de confiança calculados a partir do teste t a 95% de confiança, considerando a amostragem, em triplicata, no ponto central na primeira análise de dados e após eliminar as variáveis de baixo impacto na resposta considerou-se ainda as réplicas geradas ao se rearranjar o planejamento experimental.

4.3 Fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos por *M. guilliermondii* 311_EN

4.3.1 Preparo do inóculo

Para avaliação da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos utilizou-se como inóculo a levedura *M. guilliermondii* 311_EN, resultante do crescimento adaptativo descrito no item 4.1, devido a sua melhor performance na conversão de pentoses nos produtos de interesse. Para obtenção da biomassa celular necessária para os experimentos de fermentação dos hidrolisados, a levedura 311_EN foi propagada em YEPX, 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10g/L de extrato de levedura em incubadora shaker a 160 rpm e 30°C por 72 h. As células

foram centrifugadas a 6000 rpm, por 5 min, o sobrenadante foi separado e as células foram ressuspensas em água estéril, sendo este procedimento repetido por 2 vezes para garantir a remoção dos açúcares e fontes de carbono aderidos nas paredes celulares das leveduras.

4.3.2 Preparo das biomassas lignocelulósicas

As biomassas lignocelulósicas aplicadas nesta fase do trabalho foram obtidas do processamento industrial de cana-de-açúcar e da produção de lápis colorido. A Palha de cana-de-açúcar foi doada pela Usina São Francisco e é oriunda das regiões aos redores da cidade de Sertãozinho, onde a usina cultiva cana-de-açúcar sem adição de agrotóxicos (orgânica) para produção de etanol, açúcar e outros derivados para o setor cosmético e alimentício. Os resíduos de madeira foram doados pela empresa Faber Castell, da cidade de São Carlos, e são oriundos das etapas finais de acabamento dos lápis coloridos.

As fibras de palha foram trituradas em moinhos de facas tipo Willey modelo MA340, fabricante Marconi, para redução do tamanho das partículas, sendo separadas em peneira vibratória marca Bronzinox, e selecionadas frações abaixo de 105 micrometros, para garantir maior superfície de contato e uniformidade do tamanho das partículas. As fibras de resíduos de lápis também foram classificadas em peneiras, mas por se tratar de partículas menores que a palha não foi necessário executar etapa de moagem. Em seguida todas as fibras foram secas em estufa a 110 °C até massa constante, distribuídas em béqueres para início da etapa de pré-tratamento alcalino (Figura 4.2).

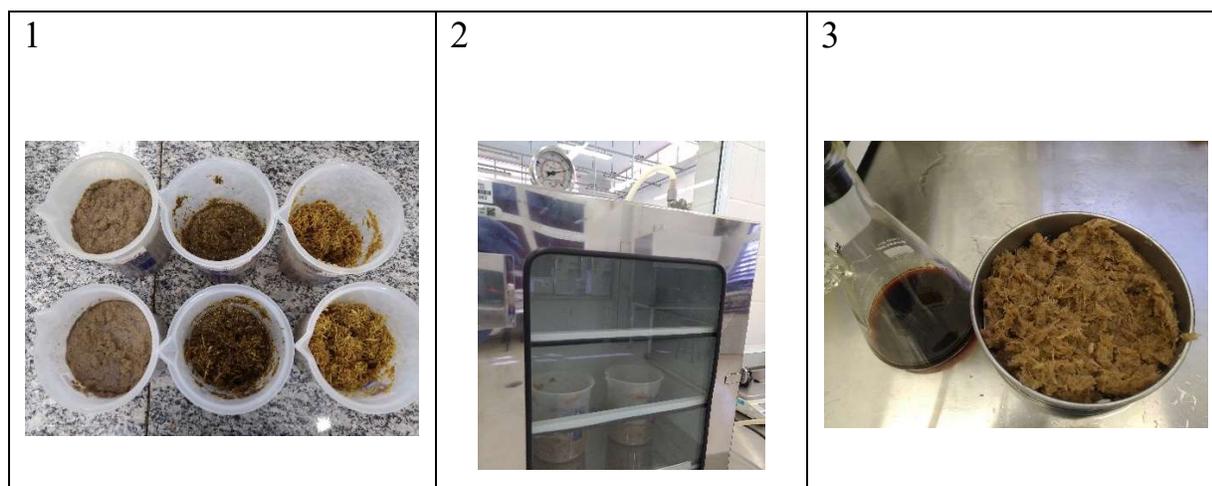
Figura 4.2 – Preparo das biomassas secas e trituradas para a etapa de pré-hidrólise alcalina



4.3.3 Preparo dos hidrolisados

O preparo dos hidrolisados se deu através de uma sequência de etapas conforme ilustrado na Figura 4.3. As fibras, após serem trituradas e secas, foram submetidas a pré-hidrólise alcalina conforme procedimento descrito em Mendes et al.¹²⁸ com modificações. Aos béqueres de 2 L, contendo 50g de biomassas, foram adicionadas soluções de sulfito-alcalina composta por mistura de NaOH e Sulfito de sódio nas proporções 5g de NaOH, 10g de sulfito de sódio por 100g de biomassa. As biomassas foram impregnadas com estas soluções numa relação 1:10 (p/v) por 30 min, sendo os béqueres então submetidos a vácuo (-200 mmHg), por mais 30 min em dessecador para aumentar a impregnação da solução as partes internas da fibra (Figura 4.3). Após esta etapa as fibras impregnadas foram submetidas a aquecimento sob pressão em autoclave a 120°C por 60 min.^{128,130-131}

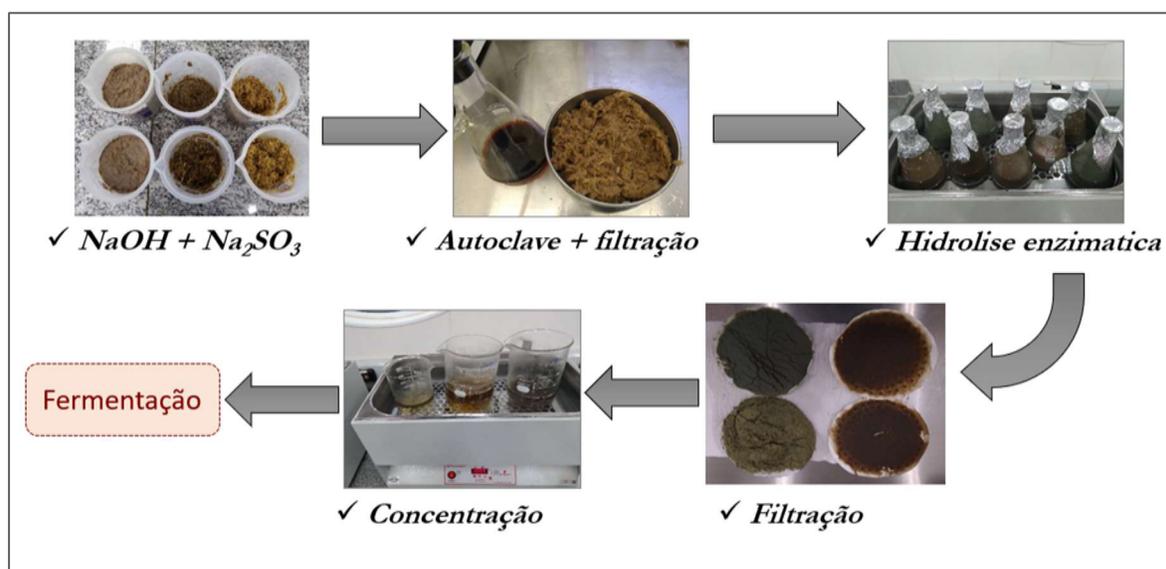
Figura 4.3 – Etapas do pré-tratamento alcalino das biomassas lignocelulósicas



- 1 – Adição de solução alcalina às fibras
 2 – Tempo de mistura em dessecador a vácuo
 2 – Separação da fibra do licor alcalino

Após a etapa de pré-tratamento alcalino as fibras foram então filtradas e lavadas com água destilada até pH da água de enxague igual 7. As fibras foram novamente secas em estufa a 110°C até massa constante para serem então submetidas a etapa de hidrólise enzimática (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Preparo dos hidrolisados lignocelulósicos



As frações sólidas dos pré-tratamentos alcalinos foram submetidas a hidrólise enzimática por enzimas celulolíticas presentes no coquetel enzimático Cellic Htec 3®, doado pela empresa Novozymes. A solução enzimática foi adicionada na concentração de 4% em massa, sendo o pH do meio ajustado para 5,0 pela adição de tampão de ácido acético e acetato de sódio. O tempo de reação foi de 48 h, sob agitação de 150 rpm a 45°C, sendo estas as condições ótimas recomendadas pelo fabricante e observadas na literatura.²⁰²

Após a etapa de hidrólise enzimática a fração líquida dos hidrolisados foi filtrada a vácuo e submetida a concentração em banho maria até redução de cerca de 50% do volume, o banho foi ajustado para 100 °C, (Figura 4.4), sendo retiradas amostras ao final do procedimento para determinação dos teores de açúcares e inibidores.

Aos hidrolisados concentrados foram adicionados sais minerais e nutrientes para compor o meio de cultivo nas proporções: 5 g/L de fosfato hidrogenado de potássio; 1 g/L de cloreto de potássio; 1,5 g/L de cloreto de amônio; 1 g/L de sulfato de magnésio heptahidratado; 6 g/L de extrato de levedura. 100 mL da solução composta por hidrolisados adicionados de nutrientes foram distribuídos em erlenmeyers de 500 mL, os quais foram autoclavados a 120°C e 1atm por 20 min.³⁴

4.3.4 Metodologia analítica

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, etanol, ácidos lácticos, succínicos e acéticos, xilitol, glicerol, furfural e HMF foram analisados por HPLC, conforme metodologia descrita no item 4.1.4.

4.3.5 Análise estatística

Os resultados da conversão em bioprodutos e consumo de substratos foram submetidos à análise de variância e os valores que apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de significância foram também submetidos ao teste de Tukey para comparação entre as médias. Foi utilizada linguagem Python com aplicação de biblioteca pandas para importação dos dados e statsmodels para os cálculos.

4.3.6 Determinação dos parâmetros fermentativos

Para se determinar a eficiência da bioconversão por *M. guilliermondii* 311_EN, os fatores de conversão dos açúcares em bioprodutos foram aplicados conforme descrito abaixo:

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad \text{Equação 9}$$

Onde P_i e P_f são as concentrações finais e iniciais dos produtos e S_i e S_f são as concentrações iniciais e finais dos substratos, podendo ser um açúcar individual ou a soma dos açúcares totais a depender do cálculo em aplicação.

A eficiência de conversão também foi calculada e expressa em % e para os cálculos de conversão em etanol utilizou-se o fator de conversão teórica de 0,511 e para xilitol 0,917, conforme calculado por Barbosa et al.¹³³

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Modo de apresentação e de discussão dos resultados

A etapa de análise e discussão dos resultados foi organizada de forma a apresentar uma sequência lógica de cada fase deste estudo, iniciando pelos experimentos que avaliaram o efeito do crescimento adaptativo na cinética de crescimento e na capacidade de conversão em bioprodutos e biomassa celular por *M. guilliermoni*. Na sequência serão apresentados e discutidos os resultados dos estudos que avaliaram os efeitos da variação da concentração inicial de substrato, aeração, concentração inicial de inóculo, na produção de biomassa celular, no consumo de pentoses, na produção de etanol e xilitol por *M. guilliermondii*. Por fim serão apresentados e discutidos os resultados dos experimentos de bioconversão dos açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos de palha de cana-de-açúcar e resíduos de fabricação de lápis em etanol 2G e xilitol.

5.2 Efeito do crescimento adaptativo na cinética de crescimento e na capacidade de bioconversão de *M. guilliermondii*

Em experimentos prévios^{33,34} a linhagem de levedura não convencional *M. guilliermondii* CCT7783 demonstrou capacidade de metabolizar pentoses e glicose em diversas condições, em meios sintéticos, contendo fontes complexas de nutrientes como o extrato de levedura.

Além disso, sabe-se que linhagens de leveduras não convencionais são citadas na literatura pela sua ampla capacidade de assimilar inúmeras fontes de carbono¹³⁴⁻

¹³⁵. Desta forma, antes do início dos experimentos de crescimento adaptativo se fez necessário avaliar a capacidade de metabolização de xilose como única fonte de carbono no meio de cultivo, bem como o efeito da adição de extrato de levedura, visto que para se obter um efeito evolutivo na eficiência de conversão de xilose é necessário que os ciclos de crescimento sejam seletivos garantindo que a xilose seja a única fonte de carbono a ser consumida.

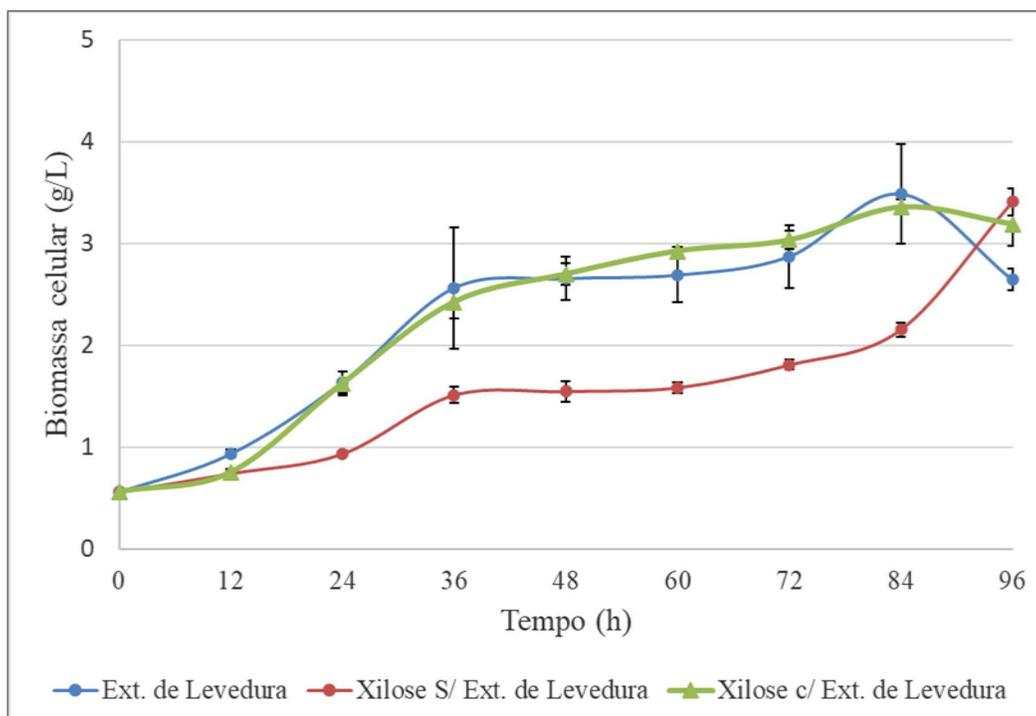
5.2.1 Avaliação da capacidade de crescimento em xilose e em extrato de levedura.

O experimento exploratório para se entender os efeitos da adição de extrato de levedura no crescimento de *M. guilliermondii* foi conduzido em triplicata, em três diferentes composições de meio de cultivo: (I) 30 g/L de xilose, (II) 20 g/L de xilose + 10g/L de extrato de levedura e (III) 30 g/L de extrato de levedura. As curvas de crescimento obtidas estão apresentadas na Figura 5.1. Verifica-se que a levedura foi capaz de assimilar e crescer em todas as condições avaliadas, comprovando a sua capacidade de metabolizar xilose como substrato.

Observa-se pelo perfil das curvas de crescimento que a levedura foi capaz de assimilar e crescer, na mesma proporção, quando o meio de cultivo continha 30 g/L extrato de levedura como único substrato (III) e 20 g/L de xilose + 10 g/L de extrato de levedura (II) demonstrando uma baixa seletividade da levedura pela xilose como substrato, pois em ausência de xilose e em concentração equivalente de extrato de levedura não se observou inibição na curva de crescimento (Figura 5.1).¹³⁷

O extrato de levedura é um nutriente complexo que pode conter diversas fontes orgânicas de nitrogênio e resíduos de carboidratos. Diversas linhagens de leveduras não convencionais como *M guilliermondii* têm sido destacadas na literatura devido a sua capacidade de assimilar diversas fontes de carbono. Os resultados obtidos nesta fase comprovam esta característica para esta levedura e corroboram com aqueles obtidos por Perna et al., nos quais se observou também a assimilação de ácidos orgânicos.^{33,31,134-135}

Figura 5.1 - Curvas de crescimento de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/L) + extrato de levedura (10g/L), pH de 5,5 incubadas a 30°C, 160 rpm por 96 h.



Além disso, observa-se ainda na Figura 5.1, que nas primeiras 12 h, para todas as curvas de crescimento, a produção de biomassa foi lenta com curvas apresentando perfil de inclinação baixo, denotando a necessidade de adaptação às fontes de carbono e condições do meio de cultivo. Ginovart e Marta¹³⁶ comentam

que a fase de adaptação é uma importante etapa de um processo de bioconversão e pode ser afetada pelas condições físicas e químicas do meio de cultivo, como por exemplo concentração de nutrientes e substratos. Os autores comentam ainda sobre a importância de estudos que permitam controlar e acelerar longas fases de adaptação, pois a concentração e o envelhecimento do inóculo são fatores que afetam diretamente o desempenho da bioconversão.¹³⁶⁻

Outro aspecto de destaque foi o perfil de crescimento da levedura tendo apenas xilose como fonte de carbono, no qual se observa que a fase de adaptação foi de 84 h, enquanto para o experimentos com adição de extrato de levedura a fase exponencial iniciou-se após 12 horas de cultivo. Tais observações podem ser atribuídas a escassez de nutrientes, como fontes de nitrogênio, que corresponde a cerca de 10% da massa seca das leveduras e em baixas concentrações tem papel de nutriente limitante no crescimento celular.¹²⁷

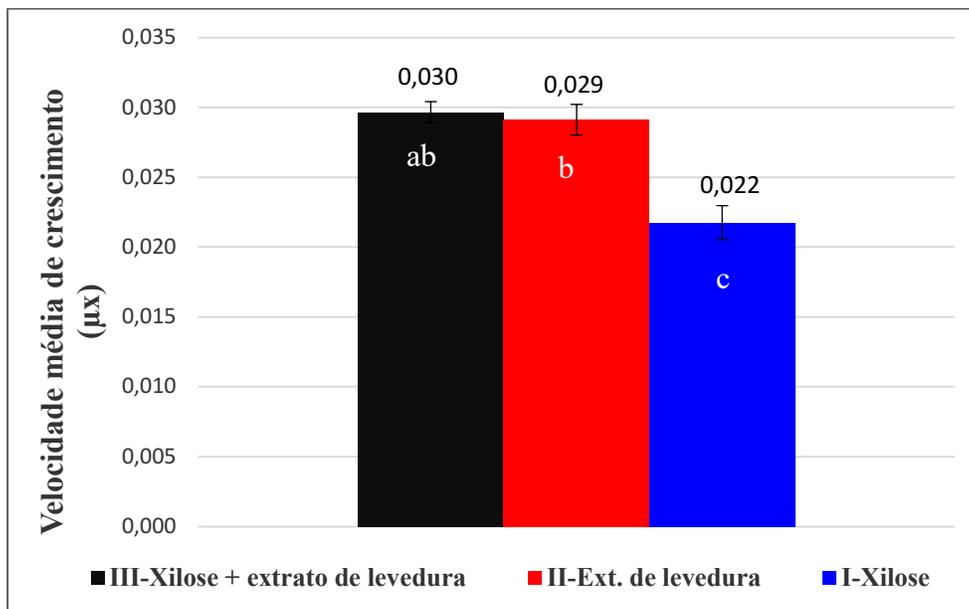
As velocidades médias de crescimento foram calculadas nos diferentes substratos e submetidas a análise de variância que demonstrou haver diferença significativa ao nível de 5% (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Resultados da análise de variância das velocidades médias de crescimentos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/l) + extrato de levedura (10g/l), pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	PR(>F)
Entre grupos	1,17.10 ⁻⁰⁴	2	5,85.10 ⁻⁰⁵	36.11	4,51.10 ⁻⁰⁴
Dentro dos grupos	1.10 ⁻⁰⁵	6	1,67.10 ⁻⁰⁶		
Total	1.27E ⁻⁰⁴	8			

O teste de Tukey foi aplicado e os resultados podem ser observados na Figura 5.2. Observa-se que houve diferença significativa para o meio de cultivo contendo apenas xilose como fonte de substrato, sendo este o menor valor de velocidade observado. Os fatores que afetam o crescimento das leveduras são complexos, podendo variar de acordo com a espécie estudada. Todavia, sabe-se que o nitrogênio tem papel limitante e desta forma meios de cultivo com escassez de nitrogênio leva a baixos valores de velocidade de crescimento, efeito este observado para o crescimento havendo apenas xilose no meio de cultivo.

Figura 5.2 - Resultado do teste de Tukey das velocidades médias de crescimentos de *M. guilliermondii* em meio sintético contendo I: xilose (30 g/L), II: extrato de levedura (30 g/L), III: Xilose (20g/l) + extrato de levedura (10g/l), pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.



Estudos avaliando o consumo de extrato de levedura como fonte única de carbono e nitrogênio são escassos na literatura. Todavia sabe-se que o percentual de carbono tanto em xilose quanto em extrato de levedura é de aproximadamente

40% e, como a concentração total do substratos foi a mesma em todos os experimentos (30 g/L), os resultados obtidos nesta fase do trabalho são de importância primordial pois permitem inferir que para direcionar a metabolização de xilose aumentando o fluxo metabólico que favorece condições de adaptação, se faz necessário garantir a ausência de nutrientes orgânicos complexos como o extrato de levedura, pois estes podem ser consumidos em mesma velocidade que a xilose pela levedura aqui estudada (Figura 5.2).^{205,221}

Os resultados discutidos até aqui confirmam a necessidade de adaptação da levedura em cultivos contendo xilose como fonte de carbono, porém com uma nutrição adequada a sua composição centesimal, como os meios com formulação minimamente definida e fontes inorgânicas de nitrogênio levando a levedura a consumir obrigatoriamente xilose como fator de pressão seletiva ao longo de sucessivos crescimentos na busca por melhorarias na metabolização de xilose.

5.2.2 Avaliação dos parâmetros cinéticos das leveduras obtidas por crescimento adaptativo em xilose.

Nesta etapa do trabalho serão apresentados e discutidos os resultados dos efeitos do crescimento adaptativo sobre a cinética de crescimento das linhagens da levedura *M. guilliermondii*, que foram obtidas após 45 ciclos de crescimento, durante 180 dias, em meio contendo xilose como única fonte de carbono. As linhagens foram denominadas como sendo 311_P, controle, 311_EN, adaptação sem exposição a luz uv e 311_UV, linhagens que foram expostas a luz UV e na sequência submetidas aos ciclos de crescimento.

A exposição à luz UV gera mutações randômicas.²⁰⁴ e estudos comparando os benefícios de se aplicar a luz UV em relação a evolução adaptativa

natural não foram encontrados na literatura, por isso os resultados obtidos no presente trabalho trazem um importante conhecimento sobre a evolução natural espontânea e seus impactos na linhagem *M. guilliermondii* aqui estudada.

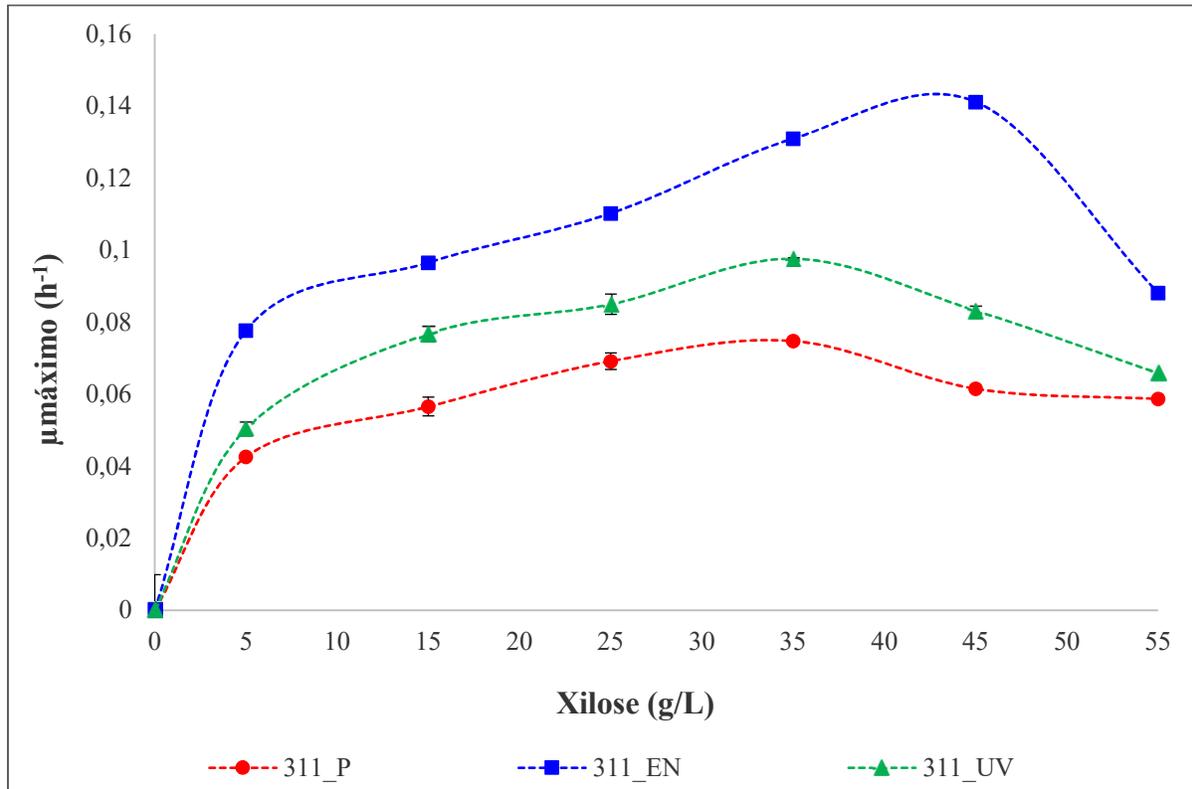
5.2.2.1 Crescimento em meio mínimo contendo concentrações crescentes de xilose como substrato.

As curvas que relacionam as velocidades específicas de crescimento, em concentrações crescentes de substrato, podem ser observadas na Figura 5.3.

O crescimento adaptativo aumentou a velocidade específica de crescimento para todas as concentrações de substrato testadas (Figura 5.3).

. Sharma et. al¹³⁸ reportaram um aumento de 3 vezes na velocidade específica de crescimento de linhagens de *Kluyveromyces marxianus* submetidas ao crescimento adaptativo, tendo xilose como única fonte de carbono após 60 ciclos de crescimento. No presente trabalho houve um aumento na velocidade específica de crescimento de 1,88 vezes para a linhagem 311_EN em relação a linhagem original, 311_P, após 45 ciclos de crescimento, sendo estes resultados promissores considerando que o número de ciclos pode ser aumentando levando a resultados muito próximos aqueles encontrados na literatura.

Figura 5.3 - Velocidades específicas de crescimento de *M. guillierondii* (311_P), *M. guilliermondii* após crescimento adaptativo (311_EN) e *M. guilliermondii* após exposição a luz UV + crescimento adaptativo (311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.



Para a análise do efeito da evolução adaptativa nos parâmetros específicos da cinética das linhagens de *M. guilliermondii*, o modelo de Monod foi aplicado aos dados apresentados na Figura 5.3.

Os intervalos utilizados foram aqueles nos quais não houve inibição de substrato, ou seja, a relação empírica entre o aumento da concentração do substrato e velocidade específica de crescimento foi linear. Sendo estes entre 5 e 35 g/L de xilose para as linhagens 311_P e 311_UV e de 5 a 45 g/L de xilose para a linhagem 311_EN.

As velocidades máximas de crescimento foram calculadas e submetidas a análise estatística, cujos valores estão apresentados na Tabela 5.2, na qual observa

se que o crescimento adaptativo aumentou significativamente a velocidade máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$, h^{-1}) em todas as concentrações de xilose testadas. Além disso, as leveduras que foram adaptadas sem exposição a luz UV (311_EN) apresentaram o melhor desempenho, sendo sua velocidade máxima 78% maior que as linhagens originais e 27% maior e que as linhagens que foram expostas a luz UV.

Tabela 5.2 - Teste de Tukey dos resultados das velocidades específica máxima de crescimento dos cultivos de *M. guilliermondii* original (311_P), e adaptadas (311_EN e 311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.

Velocidade específica máxima de crescimento	*$\mu_{\text{máximo}}(\text{h}^{-1})$
311_EN	0,137 a
311_UV	0,108 b
311_P	0,077 c

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

O uso de crescimento adaptativo para seleção de linhagens mais eficientes na conversão de xilose tem sido reportado na literatura como uma importante ferramenta, sobretudo para espécies recém isoladas e ou modificadas geneticamente. Promdonkoy et al.¹⁴⁰ obtiveram linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes com velocidade específica de crescimento em xilose aproximadamente 50% maiores que a linhagens originais aplicando ciclos sucessivos de crescimento em meio mínimo contendo 2% de xilose. Condições semelhantes foram aplicadas no presente estudo e o aumento observado na velocidade de crescimento foi de 78% para as linhagens 311_EN e 40% para as linhagens 311_UV corroborando assim com os resultados obtidos pelos autores.

Kuyper et al.¹⁴¹ reportaram um aumento de 30% na velocidade específica de crescimento, de $0,09 \text{ h}^{-1}$ para $0,12 \text{ h}^{-1}$, para linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ao crescimento adaptativo natural, em meio contendo xilose como substrato. Os resultados obtidos neste experimento apresentaram valores superiores aos reportados pelos autores sendo que um aumento de 40% foi observado para as linhagens 311_UV e de 78% para as linhagens 311_EN. Denotando o potencial de aplicação das linhagens de *M. guilliermondii* em rotas de bioconversão de xilose.

Oliveira et al.²²⁹ escanearam nove linhagens de leveduras não convencionais classificando-as devido ao seu potencial para crescimento em hidrolisados hemicelulósicos diluídos. Os autores reportam valores de crescimento em xilose entre 0.10 e 0.21 h^{-1} como as velocidades máximas de crescimento, sendo que os valores obtidos para as linhagens de *M. guilliermondii* adaptadas, 311_UV e 311_EN, encontram-se dentro do respectivo intervalo, $0,108$ e $0,137 \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

Além disso, outro aspecto que corrobora o presente trabalho com aquele realizado por Oliveira e colaboradores²²⁹ é o intervalo no qual a velocidade foi máxima e crescente (15 a 43 g/L de açúcares) para a maioria das linhagens, sendo reportado um efeito de inibição acima de 43 g/L pelos autores, no presente trabalho o mesmo efeito foi observado a partir de 45 g/L para a linhagem 311_EN e a partir de 35 g/L pelas demais linhagens estudadas.

Para se entender quais as concentrações mínimas e máximas de xilose que limitam a velocidade específica máxima de crescimento, a constante de Monod (k_s) e a constante de inibição foram calculadas (k_i) e estatisticamente analisadas. Os resultados dos valores de k_s e k_i , podem ser observados na Tabela 5.3. O aumento significativo no valor de k_s para, as linhagens 311_UV, demonstra que a exposição a luz UV gerou linhagens com menor afinidade por xilose como substrato. Baixos

valores de k_s são importantes pois auxiliam a manter uma cinética favorável e constante, especialmente em cultivos por batelada onde a concentração dos substratos varia com tempo. Além disso a capacidade de metabolizar o substrato mesmo em baixas concentrações reduz perdas e aumenta a sustentabilidade dos bioprocessos.¹⁴⁴

Tabela 5.3 - Resultados da constante Monod (k_s) e de inibição (k_i) dos cultivos de *M. guilliermondii* original (311_P), e adaptadas (311_EN e 311_UV), em meio mínimo (YNB) contendo xilose como única fonte de carbono nas concentrações iniciais de 5, 15, 25, 35, 45 e 55 g/L, pH de 5,5 a 30°C, 160 rpm incubadas por 96 h.

Linhagens de <i>M. guilliermondii</i>	k_s (g/L)	k_i (g/L)
311_UV	5,79a	48,89b
311_EN	4,36b	54,65a
311_P	4,14b	44,38c

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

O crescimento adaptativo espontâneo não afetou significativamente a afinidade da levedura pela xilose como substrato mantendo a concentração mínima de 4,36 g/L de xilose como k_s para a linhagem 311_EN, sendo que este valor não difere significativamente do valor calculado para a linhagem original, 311_P, cujo k_s foi de 4,14 g/L de xilose (Tabela 5.3). Tais resultados apresentam uma informação importante sobre as linhagens testadas, pois, sobretudo em condições de fermentação de hidrolisados em biorrefinarias, nos quais diversas fontes de carbono estão disponíveis e a grande maioria opera em regime de batelada, sendo necessário que os microrganismos aplicados apresentem alta afinidade pelo substrato aplicado em altas e baixas concentrações.^{139,206.221}

Além disso, as linhagens provenientes do crescimento adaptativo natural (311_EN) apresentaram menor efeito de inibição pelo aumento da concentração do substrato, com velocidades crescentes até 45 g/L de xilose, valores estes que corroboraram com os valores de k_i (54,65 g/L), sendo este valor superior ao comportamento observado para as demais linhagens, demonstrando que o crescimento adaptativo espontâneo promoveu melhorias em *M. guilliermondii* comparado ao crescimento adaptativo induzido por luz UV (311_UV) para as condições e linhagens aqui estudadas¹⁴¹

Os resultados obtidos nesta etapa denotam ainda a importância da adaptação à xilose como substrato por leveduras não convencionais naturalmente fermentadoras de pentoses, visto que os valores de velocidade específica de crescimento, em meio mínimo, aumentaram de 0,077 para 0,137 h⁻¹, com consequente aumento no intervalo de consumo de substrato, sendo uma característica desejada para leveduras industriais visando uma maior produtividade no processo de biorrefinarias.¹⁴³

5.3 Efeito do crescimento adaptativo no consumo de xilose, produção de biomassa celular e xilitol em meio semi-sintético YEPX.

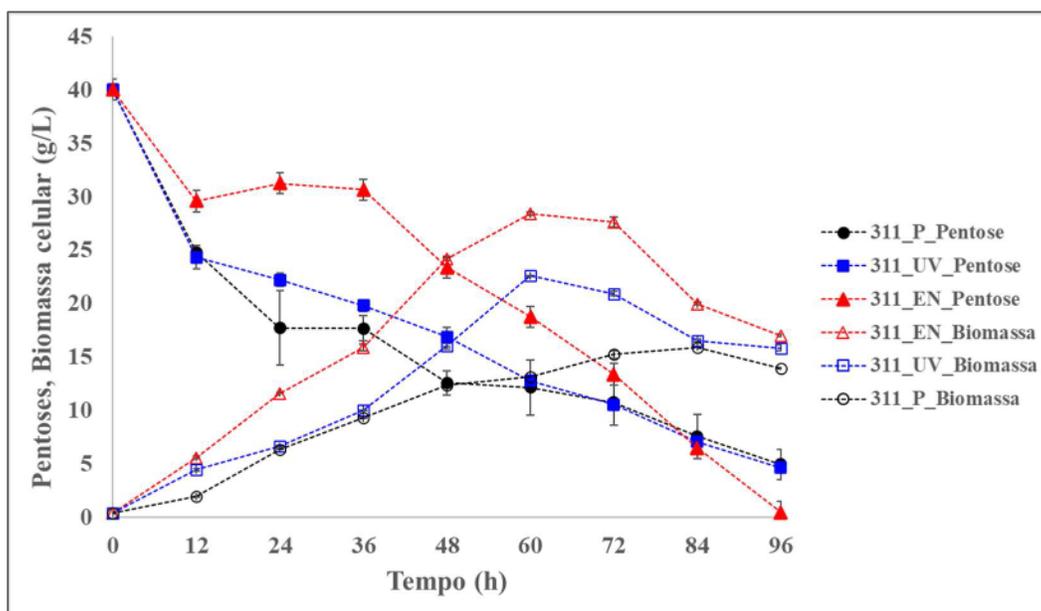
A limitação de nutrientes é uma condição importante para se entender e comprovar o desempenho de novos microrganismos em relação a uma fonte específica de substrato, Rollero et al.²⁰⁷ comentam que leveduras têm necessidades nutricionais complexas e limitações nas condições nutricionais, afetam o desempenho na conversão em bioprodutos. Desta forma, nesta etapa do estudo, procurou-se avaliar o crescimento das linhagens provenientes do crescimento adaptativo em duas concentrações de xilose como substrato, 40 e 20 g/L em meio de

cultivo contendo os nutrientes extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L). Tal meio de cultivo foi denominado neste trabalho como YEPX.

5.3.1 Avaliação do consumo de pentoses e produção de biomassa em meio de cultivo rico (YEPX) contendo 20 ou 40 g/L de xilose.

As curvas de consumo de pentoses e produção de biomassa pelas linhagens de *M. guilliermondii*, original e adaptadas, em meio YEPX contendo 40g/L de pentoses, estão apresentadas na Figura 5.4. Houve consumo de pentoses e produção de biomassa celular para as três linhagens testadas. Sendo o consumo de pentoses e a produção de biomassa observados no período de 0 a 60 h pelas linhagens adaptadas (311_EN e 311_UV) e de 0 a 84 h pela linhagem original.

Figura 5.4 - Consumo de pentoses e crescimento celular de *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.



Além disso, observa-se que as linhagens adaptadas apresentaram maiores valores de produção de biomassa, comprovando que o crescimento adaptativo gerou linhagens com melhor eficiência na conversão de pentose em biomassa celular em ambas as condições testadas neste experimento com destaque para as linhagens adaptadas naturalmente (311_EN) pelos maiores valores de consumo total de pentoses e maiores valores de biomassa.

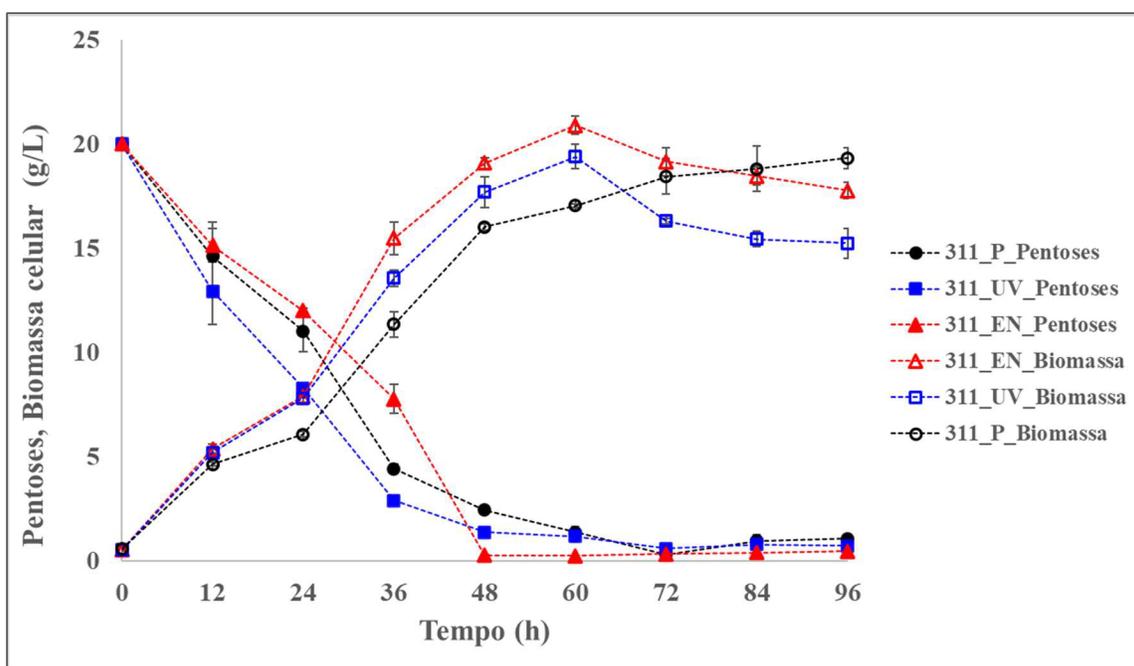
Laplace et al.²⁰⁸ realizaram um experimento com exposição a luz UV como mecanismos de adaptação e seleção de linhagens de *Pichia stipitis*, os autores reportaram que a exposição a luz UV aumentou a capacidade de consumo de pentoses, entretanto, não foi observado nenhum benefício na capacidade de conversão em biomassa e bioprodutos, resultados estes que corroboram com aqueles obtidos neste experimento.

A variação de concentração do substrato tem uma relação direta com o metabolismo das leveduras e por esta razão os experimentos realizados nesta fase do trabalho foram repetidos em 20 g/L de pentoses e as curvas, com os resultados da produção de biomassa e consumo de pentoses durante 96 h, para as linhagens de *M. guilliermondii* original (311_P) e adaptadas (311_EN e 311_UV), estão demonstrados na Tabela 5.5. O consumo de pentoses e a produção de biomassa celular foram observados para todas as linhagens testadas com curvas bem definidas até 60 h, embora a produção de biomassa celular, neste período também tenha sido maior para as linhagens evoluídas naturalmente, as curvas a 20 g/L de pentoses (Figura 5.5) demonstram um comportamento bastante distinto daquelas observadas a 40 g/L (Figura 5.4).

Nos experimentos a 40 g/L as linhagens apresentaram perfil de variações distintas de consumo de substrato e produção de biomassa celular, com destaque para as curvas de produção de biomassa e consumo de pentoses das

linhagens evoluídas naturalmente (311_EN) que apresentaram, novamente, maiores valores em biomassa celular e menores valores de pentose ao final do ciclo de crescimento.

Figura 5.5 - Consumo de pentoses e crescimento celular de *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 20 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.



Cadière et al.²⁰⁹ explicam que o crescimento de leveduras em substratos de lenta metabolização gera linhagens evoluídas com maior capacidade de metabolização deste substrato pela amplificação do fluxo de carbono na direção da via das pentose-fosfato, os autores verificaram um aumento de 17% no fluxo de metabolização de carbono em experimentos de evolução adaptativa.

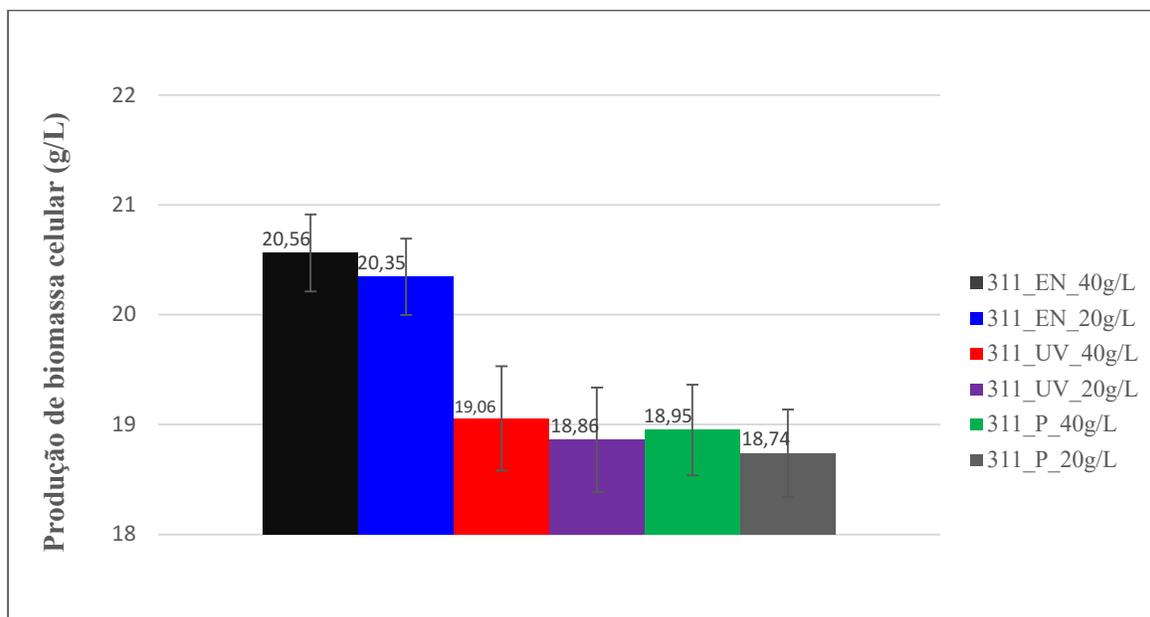
Dentre os resultados que se espera ao se submeter linhagens de microrganismos a sucessivos ciclos de crescimentos em um substrato novo, de

metabolismo lento, a redução da fase lag é um dos indicadores de melhoria evolutiva. O efeito na redução da fase lag, sobretudo para as linhagens evoluídas naturalmente (311_EN), foi notório tanto nos experimentos em 20 g/L de pentoses quanto naqueles em 40 g/L de pentoses, as linhagens evoluídas naturalmente apresentaram ausência de fase lag, iniciando seu crescimento exponencial a partir das primeiras horas experimentais.

Slininger et al.⁶³ Realizam experimentos com cepas nativas fermentadoras de pentoses de *Scheffersomyces stipitis*, os autores submeteram a linhagens a indução de mutação por Luz UV e pressões de aumento da concentração de inibidores e etanol afim de desenvolver linhagens robustas com capacidade de fermentar sob condições industriais, eles reportaram uma redução drástica na fase lag e outros benefícios como aumento do consumo de xilose e conversão em etanol.

A biomassa celular produzida pelas linhagens adaptadas (311_EN e 311_UV) e original (311_P) foram calculadas, e os resultados podem ser observados na Figura 5.6. Observa-se um aumento de cerca de 9% na produção de biomassa para as linhagens evoluídas naturalmente (311_EN) em relação a linhagem original (311_P), o mesmo aumento não foi observado para as linhagens expostas a luz UV, mesmo havendo um aumento no consumo de pentoses (Figura 5.4 e 5.5), tais resultados corroboram com aqueles observados na literatura no qual linhagens de *Pichia stipitis* tiveram a capacidade de consumo de xilose aumentada após exposição a luz UV, porém não houve benefícios na produção de biomassa celular.²¹⁰

Figura 5.6 - Produção de biomassa celular de *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 20 e 40 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.



A análise estatística comprovou haver variação significativa ao nível de 5% no consumo de pentoses apenas nos experimentos realizados em 40 g/L de pentoses como substratos (Tabela 5.44).

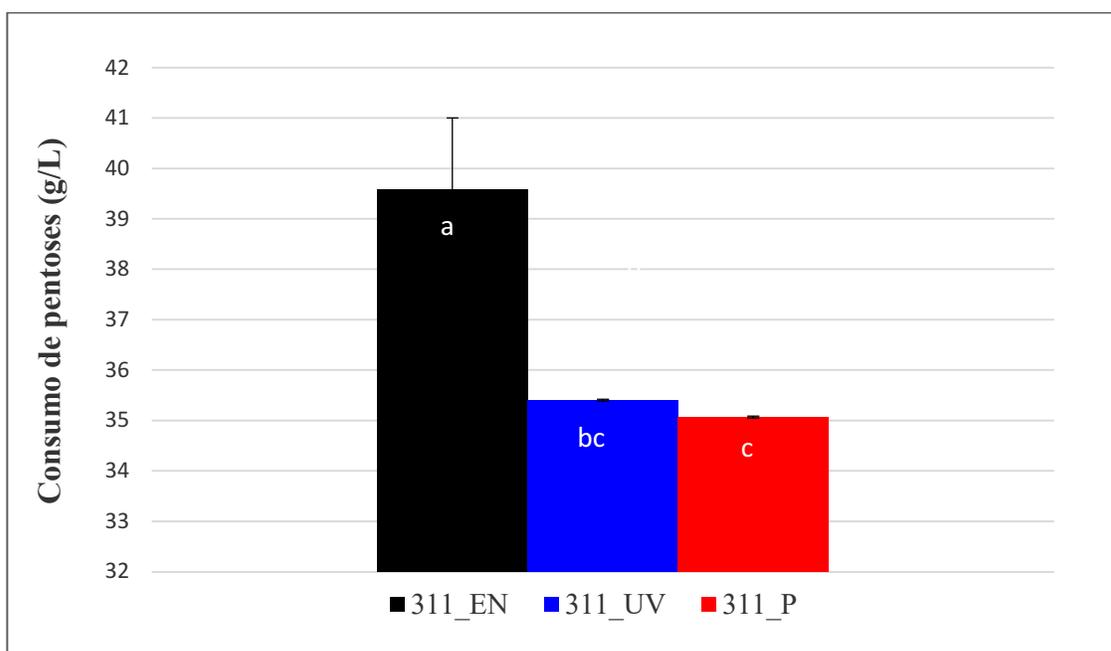
Tabela 5.4 - Análise de variância do consumo de pentoses por *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.

Fontes de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F	PR(>F)
Entre grupos	37,8	2,0	18,9	18,6	*0,0027
Dentro dos grupos	6,1	6,0	1,0		
Total	43,9	8,0			

*significativo a 5%

O teste de Tukey foi aplicado e comprovou que as linhagens adaptadas naturalmente foram as únicas com valores significativamente maiores, ou seja, com uma melhoria comprovada e significativa no consumo de pentoses (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Teste de Tukey dos resultados do consumo de pentoses por *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) ou com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 g/L de pentoses, 20 g/L de peptona e 10 g/l de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.



As velocidades médias de crescimento também foram calculadas e os resultados foram submetidos a análise estatística que demonstrou diferença significativa ao nível de 5% de significância para todos os valores de velocidade média. (Tabela 5.5). Destacam-se dos resultados as velocidades médias das linhagens de *M. guilliermondii* obtidas a partir do crescimento adaptativo espontâneo (311_EN), cujos valores foram superiores aos obtidos para as demais linhagens de *M. guilliermondii* nas duas concentrações de substrato testadas neste

experimento, tais resultados comprovam e corroboram com os maiores valores de produção de biomassa (Figura 5.5) e consumo de pentoses (Figura 5.7).

Além disso, é importante ressaltar que tanto nas condições em meio mínimo quanto em meio complexo o padrão de comportamento das linhagens se mantém estável, sendo os resultados mais expressivos obtidos para as linhagens adaptadas de forma espontânea. Matsushika et al.¹³⁹ reportaram que o crescimento adaptativo aumenta a capacidade de utilização de xilose por leveduras, pois é capaz de promover a otimização as reações enzimáticas das vias metabólicas promovendo um maior fluxo de conversão de xilose.²¹¹

Os efeitos do aumento da concentração do substrato na velocidade média de crescimento também foram notórios, pois para a linhagem original (311_P) a velocidade reduziu cerca de 5%, variando de 0,1952h⁻¹ em 20 g/L de xilose, para 0,1852h⁻¹ em 40 g/L de xilos (Tabela 5.5), tais resultados corroboram com aqueles observados nos experimentos de cinética em meio mínimo nos quais se observou um efeito de inibição na velocidade específica máxima de crescimento, de 311_P, nas concentrações de xilose acima de 35 g/L de xilose (Figura 5.3)

Ambas as linhagens provenientes do crescimento adaptativo tiveram um aumento na velocidade média de crescimento com o aumento da concentração de xilose no meio de cultivo, sendo este aumento cerca de 38% para as linhagens adaptadas naturalmente (311_EN) e 18% para as linhagens que foram expostas a luz UV (311_UV), respectivamente (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 - Resultados do teste de Tukey das velocidades médias de crescimento (μ_x , h^{-1}) dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.

Pentoses 20 g/l	Média $\mu_x(h^{-1})$
311_EN	0,3391 a
311_UV	0,3143 b
311_P	0,1952 c

Pentoses 40 g/l	Média de $\mu_x(h^{-1})$
311_EN	0,4673 a
311_UV	0,3704 b
311_P	0,1852 c

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

Os resultados obtidos até aqui comprovam uma característica importante das linhagens *M. guilliermondii* obtidas a partir do crescimento adaptativo, pois uma cinética de crescimento favorável, com alta afinidade pelo substrato, baixos efeitos de inibição e consumo eficiente de pentoses, são essenciais para o uso de hidrolisados lignocelulósicos nos processos de biorrefinaria. Além disso a capacidade de produção de biomassa celular a partir de açúcares como a xilose tem grande valor para a sustentabilidade destes processos, pois tais resíduos podem substituir o requerimento de carbono e outros nutrientes para a produção de proteína microbológica.²¹²

As linhagens adaptadas apresentaram maiores valores de produção de biomassa celular, menor fase de adaptação (lag) e menor ciclo de crescimento. Ambas as linhagens provenientes do crescimento adaptativo em xilose (311_EN e 311_UV) apresentaram ausência de necessidade de adaptação ao substrato, ou seja,

fase exponencial de crescimento a partir do instante inicial, já a levedura não adaptada apresentou início da etapa exponencial após 12 h de cultivo. Resultados que corroboram com aqueles observados na literatura, pois Zhao et al⁴¹ aplicaram técnicas de evolução adaptativa e reportaram resultados na redução da fase lag com aprimoramento de outras características como a eficiência da conversão de açúcares presentes nos hidrolisados lignocelulósicos em etanol.

5.3.1.1 Efeito do crescimento adaptativo na conversão em xilitol

Leveduras das espécies *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* têm sido reportadas na literatura como microrganismos promissores para a produção biotecnológica de xilitol. Que é de grande interesse para os processos de biorrefinarias, pois trata-se de produto de alto valor agregado com alto custo de produção por rota química. Desta forma nesta etapa do presente trabalho o objetivo foi avaliar *M. guilliermondii* como microrganismo capaz de produzir xilitol a partir de pentoses, bem como avaliar o efeito do crescimento adaptativo na produção de xilitol.

Os parâmetros de conversão em xilitol pela levedura *M. guilliermondii* original (311_P) e adaptadas (311_EN e 311_UV) podem ser observados na Tabela 5.6. Observa-se que *M. guilliermondii* foi capaz de produzir xilitol a partir do consumo de xilose em todas as condições testadas, sendo este um resultado interessante por se tratar de uma nova linhagem, não convencional, para a qual a produção de xilitol, a partir de pentoses, é reportada pela primeira vez e sabe-se ainda que um pequeno número de microrganismos é capaz de converter xilose em xilitol naturalmente.^{215,222}

Tabela 5.6 - Parâmetros de conversão de xilose em xilitol dos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 e 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.

Linhagem	[xilose (g/l)]	Yp/s^a	η^b
311_EN	40	0,31 +/- 0,009	34% +/-1,04
311_EN	20	0,34 +/- 0,014	37% +/-1,53
311_UV	40	0,29 +/- 0,007	32% +/-0,84
311_UV	20	0,12 +/- 0,007	13% +/-0,84
311_P	40	0,23 +/- 0,009	25% +/-1,07
311_P	20	0,13 +/- 0,017	13% +/-0,51

^aYP/S (g.g-1) g xilitol / g xilose consumida

^beficiência de conversão considerando o máximo teórico de 0,917g.g-1 (Barbosa- et al., 1988)

Além disso, é importante destacar ainda os aumentos obtidos na conversão em xilitol para as linhagens de *M. guilliermondii* adaptadas a xilose como substrato. Ambos os experimentos de crescimento adaptativo, com ou sem indução por luz UV, 311_UV e 311_EN geraram linhagens mais eficientes para a produção de xilitol a partir de xilose.

Bianchini et al.²³⁰ reportaram um aumento de 13% no rendimento em xilitol ao submeter linhagens de *Candida guilliermondii* a evolução adaptativa. Nas condições estudadas neste trabalho os melhores resultados em conversão a xilitol foram obtidos para as linhagens adaptadas em xilose, sem exposição a luz UV (311_EN) e em meio de cultivo YEPX com concentração de 20 g/L de pentoses, nestas condições o rendimento em xilitol foi de 37% e a conversão foi de 0,34 g/g e, nas mesmas condições, a linhagem original (311_P) apresentou uma conversão de 0,13 g/g e rendimento de 13% (Tabela 5.7), correspondendo a um aumento de rendimento de cerca de 261%.

Queiroz et al.²³¹ comentam que a aplicação de evolução adaptativa é uma ferramenta importante para se atingir níveis economicamente viáveis de conversão de xilitol em processos de biorrefinaria.

A análise de variância comprovou haver diferença estatística ao nível de 5% na concentração de xilitol produzido pelas linhagens de *M. guilliermondii* e o teste de Tukey foi realizado para se determinar a diferença significativa entre as médias. Os resultados da análise estatística estão apresentados na Tabela 5.7, onde observa-se que em altas concentrações de pentoses no meio de cultivo (40 g/L) todas as linhagens demonstraram diferença significativa, mas para os experimentos em 20 g/L apenas as linhagens evoluídas sem exposição a luz UV (311_EN) aumentaram significativamente a produção de xilitol.

Tabela 5.7 - Resultados do teste de Tukey das médias dos valores de xilitol produzidos nos experimentos realizados com a levedura *M. guilliermondii* original (311_P) e submetidas ao crescimento adaptativo natural (311_EN) e com exposição a luz UV (311_UV), em meio sintético contendo 40 e 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura a 30°C, 160 rpm, pH 5,5 incubadas por 96 h.

Pentoses 40 g/l	Xilitol (g/L)
311_EN	12,2 a
311_UV	10,3 b
311_P	6,4 c
Pentoses 20 g/l	Xilitol (g/L)
311_EN	6,6 a
311_P	2,5 bc
311_UV	2,3 c

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

Estudos que comparam a eficácia da aplicação de luz UV em relação a evolução adaptativa natural não foram encontrados na literatura, porém o aumento da produção significativa de xilitol tanto em 20 g/L quanto em 40 g/L pelas linhagens adaptadas sem aplicação de luz UV tem uma importância notória para a produção biológica de xilitol em processos de biorrefinaria, pois a conversão viável de xilose em xilitol depende da busca por linhagens capazes de manter rendimentos altos em concentrações elevadas de xilose em hidrolisados concentrados e na presença de inibidores, cuja resistência pelas linhagens de *M. guilliermondii* aplicadas neste estudo também já foram comprovadas em estudos anteriores.^{34, 216,220}

Os resultados obtidos nesta etapa do experimento demonstraram que o crescimento adaptativo de leveduras não convencionais em fontes de carbono não preferenciais, como pentoses, tem alto impacto para produzir leveduras melhoradas capazes de viabilizar a produção de processos de biorrefinaria. Nesta fase do estudo *M. guilliermondii* foi capaz de metabolizar as pentoses em todas as condições testadas e as linhagens evoluídas naturalmente demonstraram maior desempenho para biossíntese de xilitol e biomassa celular, sendo estes dois produtos de alto valor agregado que podem aumentar a sustentabilidade econômica do processo.

Além disso, o conhecimento produzido nesta etapa do trabalho também permitiu entender que a concentração do substrato afeta o metabolismo de *M. guilliermondii* levando a variações na performance da biossíntese. Desta forma, estudos mais pormenorizados para se entender quais são as melhores condições que direcionam o metabolismo para os produtos de interesse se fazem necessários. Sobretudo antes de se submeter as linhagens a fermentação de hidrolisados lignocelulósicos, visto que os meios sintéticos fornecem um maior controle sobre o impacto dos nutrientes e possíveis inibidores.

5.4 Avaliação do efeito das condições fermentativas sobre a biossíntese de etanol, xilitol e biomassa celular por *M. guilliermondii* adaptada (311_EN)

A dinâmica de crescimento e produção de bioprodutos por microrganismos depende de inúmeros fatores associados as condições do meio de cultivo como a concentração de substrato, a concentração de inóculo e fatores associados a transferência de oxigênio como condições de hipoxia e rotação. A levedura não convencional *Meyerozyma guilliermondii* CCT7783, isolada e previamente reportada como capaz de fermentar naturalmente pentoses, foi evoluída por crescimento adaptativo em xilose como única fonte de carbono na primeira etapa experimental do presente trabalho que gerou uma linhagem melhorada capaz de metabolizar xilose com maior eficiência que a linhagem original. Entretanto, por se tratar de uma linhagem recém isolada, pouco se sabe sobre como os fatores associados ao desempenho fermentativo afetam seu metabolismo.³⁴

Desta forma, na segunda etapa do presente trabalho avaliou-se a influência dos parâmetros concentração de xilose, concentração de biomassa celular, fluxo de N₂ no meio de cultivo e rotação, no consumo de xilose, produção de biomassa celular, produção de xilitol e produção de etanol pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN).

Os experimentos realizados nesta fase foram delineados a partir de um planejamento experimental fatorial completo 2⁴ no qual as quatro variáveis em estudo foram testadas em níveis alto e baixo, conforme descrito no item 4.2, e a partir dos resultados obtidos calculou-se o efeito das variáveis e suas interações, conforme equação descrita no item 4.2.5. Tal delineamento foi escolhido por possibilitar incluir um número alto de variáveis e entender seus efeitos nas respostas desejadas.

Sendo que os resultados do escaneamento dos efeitos destas variáveis serão apresentados e discutidos a seguir.

5.4.1 Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N₂ no meio de cultivo e rotação no consumo de xilose pela levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN

A concentração inicial e final de xilose foi analisada por HPLC, conforme descrito no item 4.1.4 e o consumo, pela levedura *M guilliermondii* 311_EN, foi calculado a partir da diferença entre os valores finais e iniciais. Os resultados de consumo obtidos nos experimentos propostos no planejamento experimental podem ser observados na Tabela 5.8, na qual é possível se verificar que houve uma variação ampla no consumo de xilose em resposta aos diferentes níveis das variáveis.

Os efeitos individuais e combinados das variáveis foram calculados, gerando um total de 15 efeitos, conforme metodologia descrita no item 4.2.5. Os resultados normalizados, dos efeitos foram submetidos a análise estatística e teste t, com intervalo de confiança de 95% utilizando o software Minitab, e os resultados podem ser observados no gráfico de pareto na Figura 5.8. Observa-se que três das quatro variáveis estudadas tem efeito individual mais significativo e que quatro efeitos combinados também estão acima limite de significância ao nível de 95% de confiança.

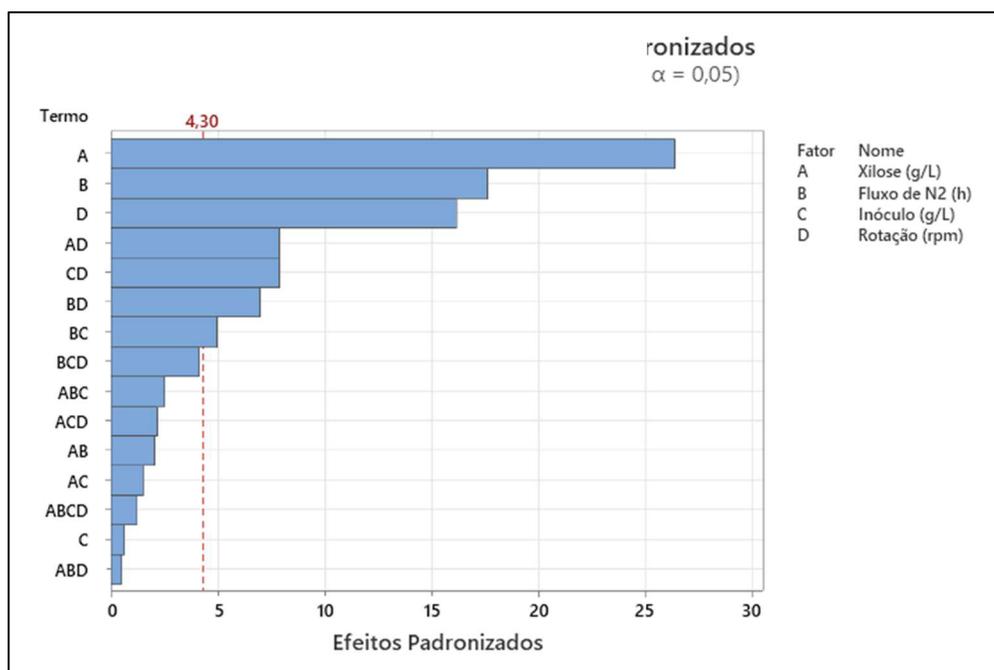
Tabela 5.8 - Xilose consumida pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h em 30°C em rotações de 60 ou 160 rpm.

Variáveis	A	B	C	D	Resposta
Exp	Xilose (g/L)	Hipoxia	Inóculo (g/L)	Rotação rpm	Consumo de Xilose (g/L)
1	-1	-1	-1	-1	20,11
2	1	-1	-1	-1	35,74
3	-1	1	-1	-1	12,10
4	1	1	-1	-1	20,50
5	-1	-1	1	-1	20,79
6	1	-1	1	-1	28,04
7	-1	1	1	-1	8,89
8	1	1	1	-1	17,33
9	-1	-1	-1	1	20,34
10	1	-1	-1	1	40,91
11	-1	1	-1	1	14,43
12	1	1	-1	1	29,22
13	-1	-1	1	1	20,35
14	1	-1	1	1	40,32
15	-1	1	1	1	20,21
16	1	1	1	1	38,93

Além disso, ao se escanear efeitos das variáveis e seus limites em planejamento fatorial simples objetiva-se entender as variáveis com maior influência na resposta e seus limites na busca de condições ótimas de bioconversão. Desta forma as variáveis A (concentração inicial de xilose), B (Fluxo de N₂ no meio de cultivo) e D (Rotação), são as variáveis de maior impacto e seus níveis ótimos devem ser objeto de estudo para condições ideais de conversão aplicando a linhagem de

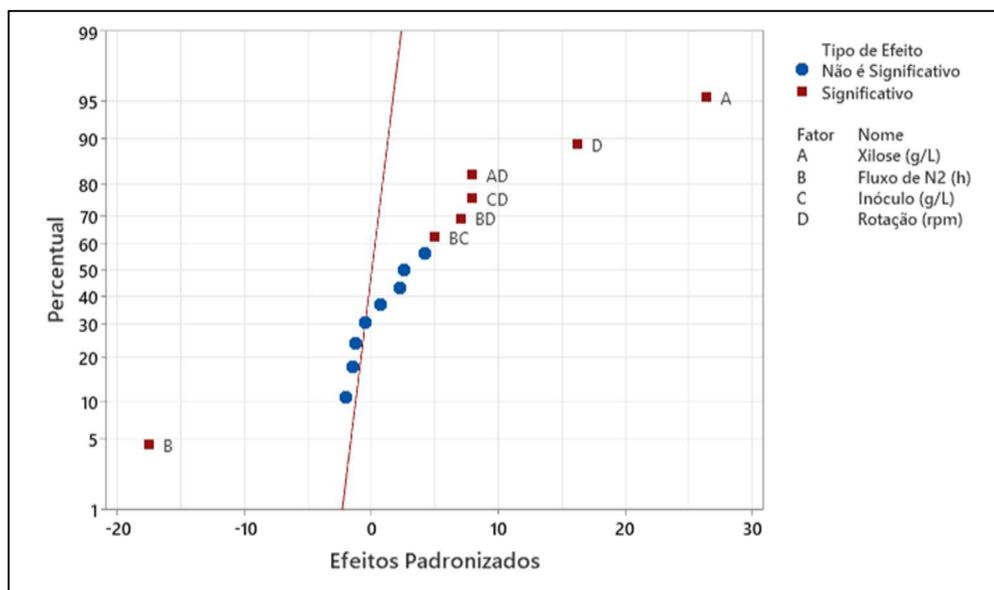
levedura *M. guilliermondii*, aqui estudada, em meios contendo xilose como substrato.

Figura 5.8 - Gráfico de pareto dos efeito padronizados no consumo de xilose nos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



Verifica-se que concentração de xilose, o fluxo de N₂ no meio de cultivo e a rotação exercem maior efeito no consumo de xilose. A análise estatística permitiu ainda organizar os valores dos efeitos normalizados das variáveis em um gráfico de probabilidades sendo os valores distribuídos ao longo de um eixo Z, considerando a distribuição dentro dos limites de uma curva gaussiana de área definida. Os intervalos de confiança foram calculados pela aplicação do teste t, com 95% de confiança, considerando o desvio da amostragem, em triplicata, no ponto central do planejamento (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Gráfico de distribuição normal dos efeitos, padronizados, no consumo de xilose por *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



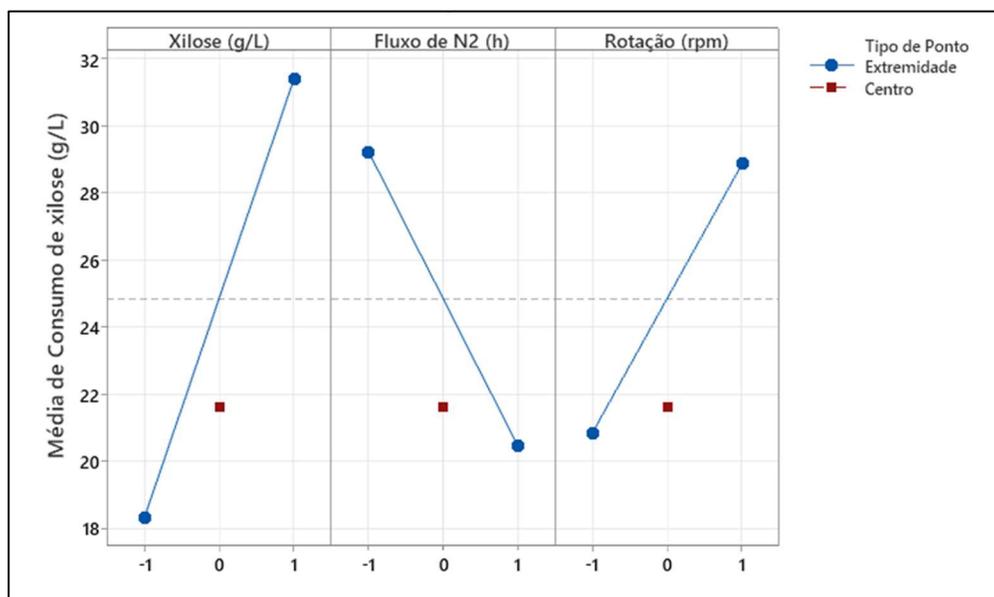
Os resultados estatísticos verificados no gráfico distribuição normal (Figura 5.9) corroboram com aqueles demonstrados no gráfico de pareto (Figura 5.8). Observa-se no gráfico de distribuição que muitos efeitos estão dentro da região do limite de confiança, ou seja, região de hipótese nula, portanto são efeitos estatisticamente nulos. Outra grande parcela dos efeitos encontra-se muito próxima do intervalo de confiança sendo, este conjunto de efeitos de baixo impacto no consumo de xilose pela levedura *M. guilliermondii*.

Além disso a distribuição dos valores reais na Figura 5.9 permitiu entender que a variável B, fluxo de N₂ no meio de cultivo tem efeito negativo sobre o consumo de xilose, sendo esta uma informação muito importante sobre o metabolismo desta levedura. O consumo de xilose tem sido reportado na literatura

como uma dependência das enzimas das de metabolização de xilose, sendo estas limitadas pela aeração e pela concentração de xilose. Sendo que em altas concentrações as leveduras sofrem inibição pelo aumento da pressão osmótica no meio extracelular, e este efeito pode ser intensificado, em condições de baixa capacidade de transporte de xilose. Rosa et al.¹⁴⁹ reportou um aumento nas atividades das enzimas envolvidas nas vias de conversão de xilose (xilose-redutase e xilitol-desidrogenase) em até 30g/L, de concentração inicial de xilose.¹⁴⁹

Devido ao destaque das variáveis concentração de xilose (A), fluxo de N₂ no meio de cultivo (B) e rotação (D), por seus valores estarem mais distantes do limite mínimo do intervalo de confiança, um gráfico de efeitos principais foi plotado e os resultados podem ser observados na Figura 5.10.

Figura 5.10 - Gráfico de efeitos principais das médias ajustadas do consumo de xilose pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



Observa-se, na Figura 5.10, que o consumo de xilose é favorecido quando se aumenta a concentração inicial do substrato no meio de cultivo e com a aeração, sendo este último associado a taxa de transferência de massa e de oxigênio e tal comportamento corrobora com a necessidade de manter a variável fluxo de N₂ em nível baixo, visto que tal variável também influencia na aeração do meio de cultivo.

Veras et al.¹⁵¹ reportaram uma redução no consumo de xilose em baixas condições de aeração para quatro diferentes espécies de leveduras não convencionais, os autores associaram a redução a fatores como equilíbrio redox entre NAD/NADH, atividade das enzimas das vias iniciais de conversão e transporte de xilose. Além disso verifica-se ainda na literatura que o comparativo entre as espécies se torna difícil devido a fatores intrínsecos e pela necessidade de adaptação de novas linhagens.

As médias dos efeitos principais, demonstrados na Figura 5.10, comprovam que para se aumentar consumo de xilose necessita de altas concentrações iniciais do substrato (30 a 40 g/L) e alta aeração, ou seja baixos valores de fluxo de nitrogênio. De acordo com Du Preez¹⁴⁶ a aeração do meio de cultivo é o parâmetro mais importante na conversão de xilose por leveduras, visto que a taxa de aeração está associada ao direcionamento do fluxo de carbono para o crescimento celular ou conversão em bioprodutos e tais vias apresentam diferentes cinéticas de conversão. A determinação do efeito das variáveis que devem ser controladas durante a bioconversão de xilose em processos de biorrefinaria é a primeira etapa na produção de conhecimento que permiti otimizar as condições de biossíntese afim de se tornar o processo economicamente viável.^{103,146}

Os processos metabólicos associados ao crescimento celular, transporte de xilose e funções mitocondriais são dependentes e limitados pela concentração de oxigênio. Em leveduras fermentadoras de pentoses a redução da disponibilidade de

oxigênio no meio, gera um efeito em cadeia resultando na incapacidade da cadeia transportadora de elétrons em reoxidar todo NADH_2 produzido, com o acúmulo no meio intracelular as taxas de conversão de NAD-xilitol desidrogenase são reduzidas acumulando xilitol e reduzindo as vias de produção de etanol e biomassa celular.¹⁴⁷⁻

148

Leveduras não convencionais, como *M. guilliermondii*, têm sido amplamente estudadas devido a sua capacidade natural de transporte de xilose, sendo esta característica também afetada por parâmetros como a aeração do meio de cultivo e concentração de xilose, pois a afinidade dos transportadores e energia celular requerida para o transporte tem sido reportadas como processos dependentes de oxigênio.¹⁴⁸⁻¹⁴⁹

A linhagem de levedura aplicada como inóculo nesta etapa de trabalho, *M. guilliermondii* 311_EN, foi adaptada em xilose como única fonte de carbono, avaliada e selecionada pela sua capacidade superior em metabolização de xiloses comparada a linhagem originalmente selecionada do processo industrial, conforme descrito no item 4.2. no qual se comprovou que a esta linhagem não sofre efeito de inibição pela xilose como substrato em até 35g/L e tais resultados corroboraram para o desempenho crescente com o aumento da concentração de xilose observados aqui, em condições de aeração.¹⁵⁰

Desta forma os resultados do escaneamento por análise fatorial dos efeitos das variáveis aqui estudadas no consumo de xilose pela levedura adaptada *M. guilliermondii* (311_EN) permitiu identificar que para se aumentar o consumo de xilose nas biossínteses aplicando esta linhagem necessita-se aumentar as concentrações iniciais de xilose e a rotação do meio de cultivo mantendo parâmetros associados a aeração do meio, como o fluxo de N_2 , em valores baixos.

5.4.2 Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N₂ no meio de cultivo e rotação na produção de biomassa celular pela levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN

Após se identificar as condições que favorecem um maior fluxo de xilose para as vias metabólicas da levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN, seguiu-se com a análise do efeito dos mesmos parâmetros na produção de biomassa celular e os resultados podem ser observados na Tabela 5.9, onde nota-se que algumas condições inibiram completamente a produção de biomassa celular com valores de rendimento ($Y_{x/s}$) próximos de zero e em outras condições os valores foram muito próximos de 0,85 g biomassa/g de xilose, ou seja quase 85% de aumento na produção de biomassa.

A influência de cada variável individual e de seus efeitos combinados foram calculados e podem ser observados na Figura 5.11, onde é possível verificar que as variáveis B (fluxo de N₂ no meio de cultivo), D (rotação) e A (Concentração inicial de xilose) são as variáveis com efeitos mais significativos. A concentração inicial de inóculo e a combinação das demais variáveis apresentaram efeitos de baixo impacto na resposta rendimento em biomassa celular, dentro dos limites aqui estudados

Tabela 5.9 - Biomassa celular produzida pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.

Variáveis	A	B	C	D	Respostas	
Exp	Xilose (g/L)	Hipoxia	Inóculo (g/L)	Rotação rpm	Biomassa celular (g/l)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)
1	-1	-1	-1	-1	14,69	0,664
2	1	-1	-1	-1	4,94	0,138
3	-1	1	-1	-1	0,28	0,023
4	1	1	-1	-1	1,01	0,049
5	-1	-1	1	-1	14,71	0,675
6	1	-1	1	-1	4,98	0,178
7	-1	1	1	-1	0,01	0,001
8	1	1	1	-1	0,21	0,012
9	-1	-1	-1	1	17,89	0,801
10	1	-1	-1	1	19,96	0,488
11	-1	1	-1	1	0,82	0,057
12	1	1	-1	1	5,61	0,192
13	-1	-1	1	1	18,71	0,838
14	1	-1	1	1	22,60	0,561
15	-1	1	1	1	11,98	0,539
16	1	1	1	1	5,16	0,133

^aY_{X/S} (g.g⁻¹) g biomassa celular / g xilose consumida

Sabe-se que a concentração de substrato pode inibir o crescimento celular a partir de limites, que variam de acordo com cada tipo de microrganismo e condições fermentativas. Por se tratar de uma levedura recentemente isolada e estudada procurou-se limitar os valores nesta fase do trabalho àqueles previamente

avaliados no estudo cinético, para se obter uma resposta direta do efeito da concentração em condições não inibitórias.

A varável C (concentração inicial de inóculo) foi eliminada e análise fatorial foi aplicada somente as três variáveis de maior impacto gerando o modelo de resposta ajustado abaixo:

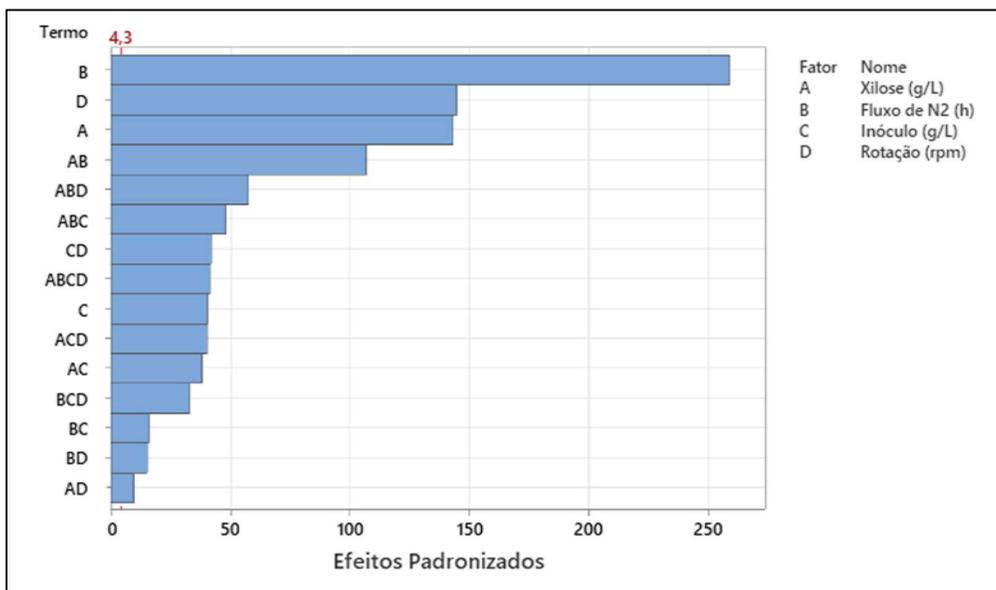
$$\eta\% \text{ Biomassa} = 36,426 - 14,571 A - 17,852 B + 14,695D + 5,595 AB - 2,223AD + 1,802 BD - 7,644 ABD - 14,71 Pt Ct \quad \text{Equação 10}$$

Sendo:

- A: Xilose (g/L)
- B: Fluxo de N2 (h)
- C: Rotação (rpm)
- PtCt: Ponto central

O modelo calculado pelo software Minitab foi submetido a análise de variância e os resultados podem ser observados na Tabela 5.10, onde verifica-se que tal modelo apresenta R² significativo, com valores de teste F altos e valor de p menores que os limites do intervalo de confiança de 95%. Sendo o R² calculado de 99,12% com R² do modelo previsto de 98,04%, demonstrando que este modelo pode ser aplicado para predizer as condições mais favoráveis de produção de biomassa celular pela levedura *M. guilliermondii* (311_EN) tendo xilose como substrato.

Figura 5.11 - Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis, na produção de biomassa celular pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.

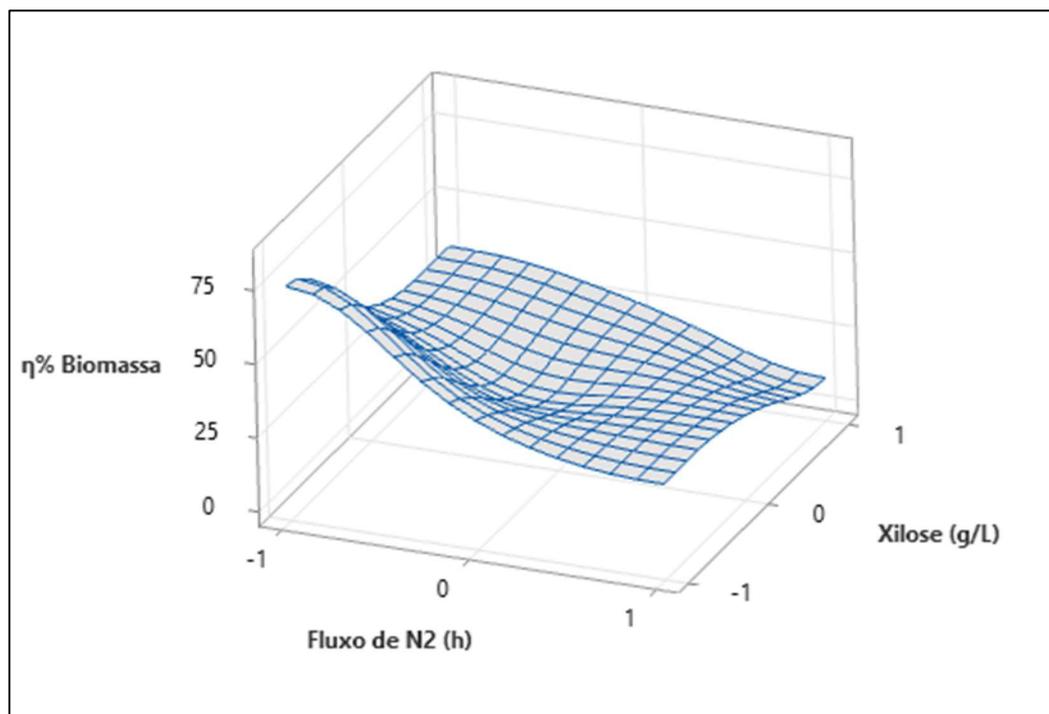


O efeito combinado das variáveis fluxo de N₂ no meio de cultivo e concentração inicial de xilose no rendimento em biomassa celular podem ser observados na **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, onde é possível verificar que o fluxo de nitrogênio no meio de cultivo teve efeito negativo na produção de biomassa, e que valores altos rendimentos podem ser atingidos pelo aumento da aeração da concentração inicial de substrato simultaneamente. Tais resultados corroboram com aqueles observados na Tabela 5.9, onde conversões próximas de zero foram observadas para todas as condições nas quais a rotação estava em nível baixo e o fluxo de nitrogênio era alto, experimentos 3 e 4 e 7 e 8.

Tabela 5.10 - Análise de variância do modelo de regressão do rendimento em biomassa celular produzida pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.

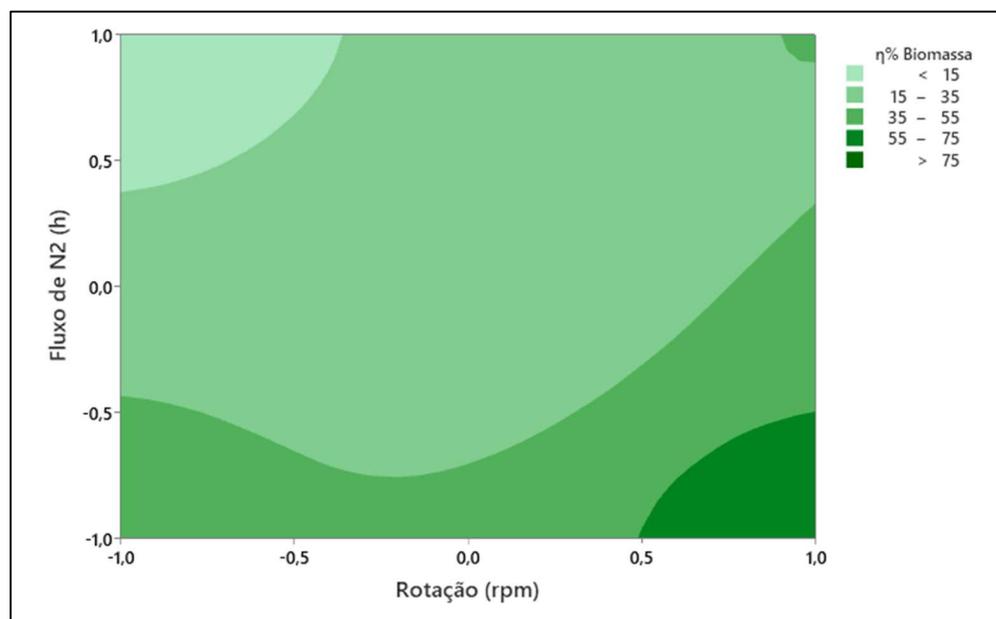
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	8	14064,5	1758,06	253,93	0,000
Linear	3	11950,9	3983,64	575,39	0,000
Xilose (g/L)	1	3396,8	3396,84	490,64	0,000
Fluxo de N ₂ (h)	1	5099,1	5099,10	736,51	0,000
Rotação (rpm)	1	3455,0	3454,99	499,04	0,000
Interações de 2 fatores	3	631,9	210,65	30,43	0,000
Xilose (g/L)*Fluxo de N ₂ (h)	1	500,9	500,88	72,35	0,000
Xilose (g/L)*Rotação (rpm)	1	79,1	79,10	11,43	0,007
Fluxo de N ₂ (h)*Rotação (rpm)	1	52,0	51,96	7,51	0,021
Interações de 3 fatores	1	934,8	934,78	135,02	0,000
Xilose (g/L)*Fluxo de N ₂ (h)*Rotação (rpm)	1	934,8	934,78	135,02	0,000
Curvatura	1	546,8	546,80	78,98	0,000
Erro	10	69,2	6,92		
Total	18	14133,7			

Figura 5.12 - Gráfico de superfície de resposta do rendimento em biomassa celular versus concentração inicial de xilose (g/L) e Fluxo de N₂ pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



Silva et al.^{100,151}, avaliaram os efeitos da oxigenação na conversão em biomassa por levedura não convencional *Pichia stipitis*, em delineamento fatorial 2³. Os autores reportaram que existe um valor limitante no qual a oxigenação do meio de cultivo desvia a conversão do processo para biossíntese de biomassa, sendo que a partir desta concentração, a produção de biomassa cresce linearmente com a taxa de transferência de oxigênio. Observando-se o gráfico de superfície de contorno (Figura 5.13) percebe-se que existe uma região de máxima produção de biomassa em rotações elevadas (140 a 160 rpm) e zero fluxo de N₂ no meio de cultivo, corroborando com os resultados discutidos pelos autores, pois máximas rotações levam a maior transferência de oxigênio.

Figura 5.13 - Gráfico de superfície de contorno considerando os efeitos das variáveis rotação e fluxo de N₂, no rendimento em biomassa celular pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) durante os experimentos fermentativos, em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, em pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



Em leveduras não convencionais como *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii*, a combinação da aeração com outros fatores como a concentração de células e substrato pode levar a diferentes taxas de produção de bioprodutos. Todavia, o crescimento celular e consequentemente a produção de biomassa celular tem uma dependência direta e forte da disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo, sendo os limites de oxigênio determinantes para a produção de biomassa celular. ¹⁵¹⁻¹⁵³

A dependência da aeração do meio observada neste experimento traz um importante aspecto sobre o metabolismo de leveduras não convencionais como *M. guilliermondii*, pois mesmo em valores altos de concentrações de substrato, o

crescimento celular foi limitado pelo fluxo de nitrogênio no meio de cultivo, sendo este um comportamento não observado em leveduras convencionais como *Saccharomyces cerevisiae*, cuja concentração de substrato desvia o fluxo de carbono para as vias de fermentação, sendo este o parâmetro determinante quando se atinge altas concentrações de substrato.¹⁵¹⁻¹⁵³

Outro resultado de destaque, nesta parte do estudo, foi o rendimento em biomassa ($Y_{X/S}$) obtido para algumas condições do planejamento. Os valores máximos de eficiência de conversão observados na Tabela 5.9 foram de 0,83 g de biomassa/g de xilose consumida, sendo estes superiores a muitos valores reportados na literatura, denotando que a levedura *M. guilliermondii* tem potencial para a produção de proteína microbiana, como uma opção de coproduto em processos de biorrefinaria.²³²⁻²³⁵

Leveduras não convencionais, como *Candida utilis*, *Candida lutzeri*, *Candida intermedia* e *Spathaspora passalidarum*, têm sido reportadas como candidatas para a produção de proteínas microbianas (unicelulares) a partir dos açúcares liberados na hidrólise da biomassa lignocelulósica, com rendimentos variando entre 0,12 a 0,45 g.g⁻¹. Os experimentos realizados nesta etapa do presente trabalho permitiram observar variações de rendimentos entre 0,001 a 0,83 g.g⁻¹ denotando a importância de se escanear variáveis e seus efeitos, salientando ainda o potencial de aplicação da levedura *M. guilliermondii* (311_EN) para a produção de proteína biológica, pois das 16 condições observadas no planejamento da (Tabela 5.10), 11 apresentam valores iguais ou superiores aos reportados na literatura.²³²⁻²³⁵

5.4.3 Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N₂ no meio de cultivo e rotação na produção de xilitol pela levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN

Na etapa anterior observou-se quais as condições que influenciam e que podem ser aplicadas para se otimizar a produção de biomassa celular (g/L), sendo este um produto de alto interesse pela produção de proteína biológica. Outro produto de alto interesse e valor agregado é o xilitol e a produção viável de xilitol tem sido reportada na literatura como uma relação da aeração do meio de cultivo associada a parâmetros como concentração de substrato.

Desta forma, a relação entre a concentração de xilose, fluxo de nitrogênio no meio de cultivo, concentração de inóculo e rotação na produção de xilitol pela levedura *M. guilliermondii* selecionada por crescimento adaptativo, 311_EN serão apresentados nesta fase do presente estudo

Os resultados da concentração, conversão e rendimentos em xilitol podem ser observados na Tabela 5.11, na qual observa-se que, assim como a produção de biomassa celular e o consumo de xilose, a bioconversão em xilitol apresenta uma grande variação em decorrência da combinação dos níveis das quatro variáveis.

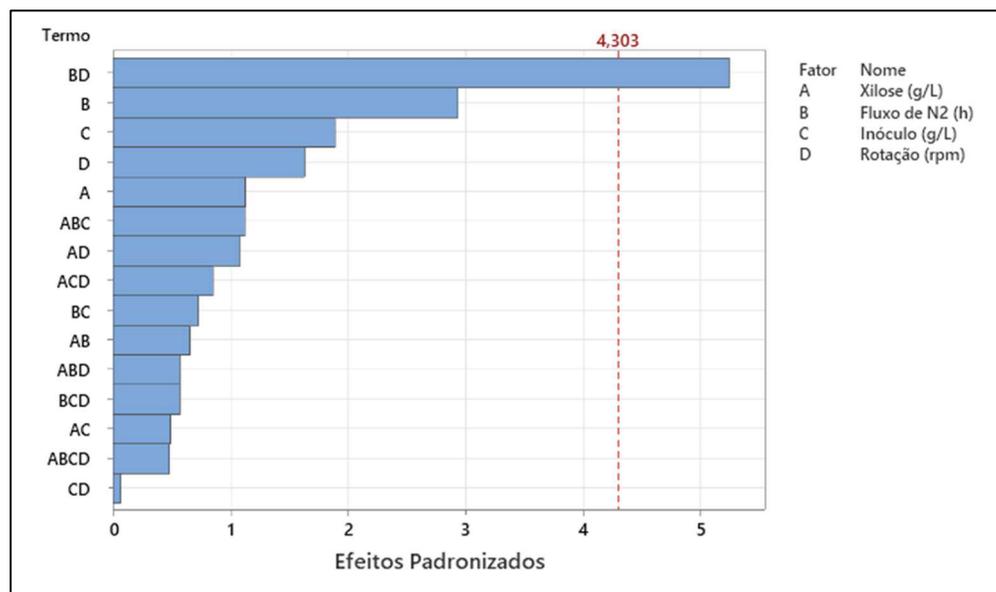
Tabela 5.11 - Valores de xilitol produzidos (g/L), conversão e rendimento em xilitol dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.

Variáveis	A	B	C	D		
Exp	Xilose (g/L)	Hipoxia	Inóculo (g/L)	Rotação rpm	Xilitol (g/l)	η^b (%)
1	-1	-1	-1	-1	1,59	7,82
2	1	-1	-1	-1	4,48	13,68
3	-1	1	-1	-1	0,73	6,57
4	1	1	-1	-1	1,68	8,96
5	-1	-1	1	-1	3,83	19,15
6	1	-1	1	-1	5,37	20,86
7	-1	1	1	-1	1,14	14,00
8	1	1	1	-1	0,74	4,63
9	-1	-1	-1	1	0,21	1,03
10	1	-1	-1	1	0,75	2,00
11	-1	1	-1	1	2,82	21,28
12	1	1	-1	1	8,37	31,25
13	-1	-1	1	1	0,31	1,49
14	1	-1	1	1	5,22	14,11
15	-1	1	1	1	6,17	30,30
16	1	1	1	1	11,75	32,90

^aYP/S rendimento em g xilitol / g xilose consumida

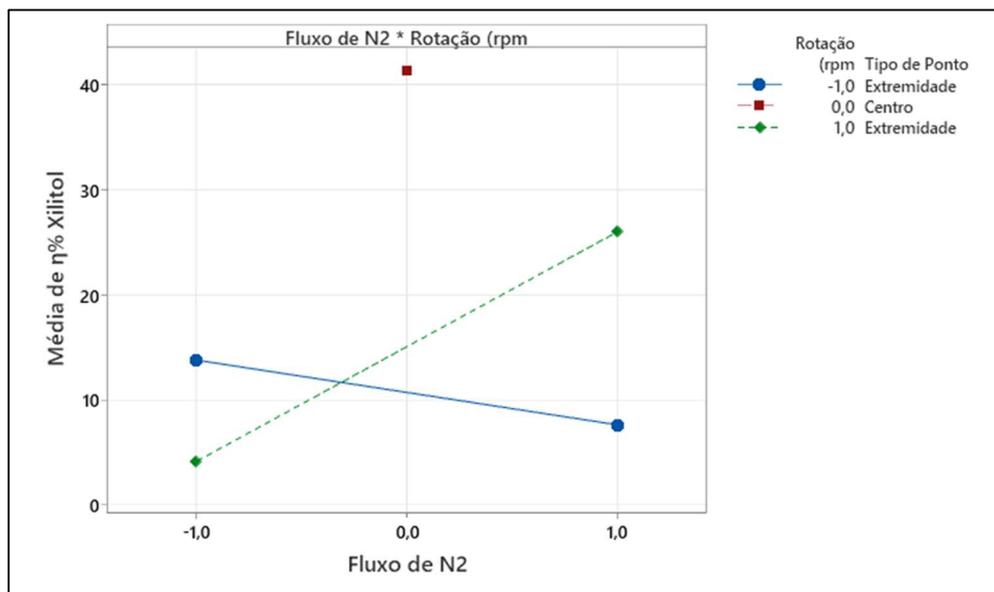
A grande variabilidade na produção de xilitol em função dos parâmetros de eficiência e conversão demonstrados na Tabela 5.11, denotam haver influência de algumas variáveis e suas combinações de forma mais significativa do que outras. Tal comportamento foi comprovado ao se analisar o efeito individual de cada variável e suas respectivas interações no gráfico de pareto (Figura 5.14). Verifica-se que a interação das variáveis relacionadas a aeração do meio, fluxo de N₂ (B) e rotação (D), foram os únicos parâmetros significativos ao nível de 5% de significância.

Figura 5.14 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados das variáveis no rendimento em xilitol (g/L) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



O gráfico de interação demonstra que o rendimento médio da produção de xilitol pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) depende do controle das duas variáveis de forma simultânea sendo que quando o fluxo de N₂ e a rotação são mantidos em nível alto atinge-se o maior rendimento em produção de xilitol (Figura 5.15).

Figura 5.15 - Gráfico de interação das variáveis fluxo de N₂ e rotação no rendimento em xilitol (g/g) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



A relação entre a produção de xilitol e os parâmetros relacionados à aeração do meio de cultivo têm sido amplamente estudados na literatura, sendo a produção de xilitol, por leveduras não convencionais, reportada como uma relação microaerófila, ou seja, ocorre em maior rendimento em baixas concentrações de oxigênio dissolvido no meio fermentativo, pois em altas taxas de aeração a redução de D-xilose a D-xilulose é favorecida, sem acúmulo de xilitol, porém em baixas condições de aeração o equilíbrio redox NADH/NAD⁺ limita esta etapa da conversão acumulando xilitol.^{146,147,153-156,159}

A concentração inicial de substrato é um parâmetro de alto impacto na produção de xilitol para leveduras não convencionais, conforme reportado na literatura. Dominguez et al.¹⁵⁹ reportaram um aumento linear na produção de xilitol com a concentração inicial de xilose no meio de cultivo. Todavia, dentro dos limites

avaliados neste planejamento, a concentração inicial de xilose não afetou o rendimento em xilitol. Sendo o rendimento em xilitol dependente apenas da aeração e rotação do meio de cultivo.

Além disso, as condições avaliadas no presente estudo variaram até 40g/L de xilose. Oh e Kim¹⁵⁷ reportaram que valores máximos de produção de xilitol em 150 g/L de concentração inicial de xilose nos cultivos de *Candida tropicalis*, sendo a biossíntese de xilitol inibida para valores superiores a este, denotando desta forma que os limites e valores ótimos dos parâmetros de conversão associados ao metabolismo de xilose é intrínseco de cada espécie.^{152,155}

Silveira et al.¹⁴³ estudaram os parâmetros que afetam a biossíntese de xilitol a partir de xilose em meio sintético em diversas linhagens de *M. guilliermondii* isoladas da região intestinal de besouros *Passalidae*, em seus resultados os autores reportaram uma forte influência da aeração com valores ótimos de rendimento previstos ao se ajustar a rotação para 113 rpm em 90 g/L de xilose no meio de cultivo, indicando que os rendimentos aqui obtidos podem ser melhorados e devem ser estudados em concentrações mais elevadas de xilose, combinados a níveis ideais de agitação do meio de cultivo.¹⁶²

5.4.4 Efeito da concentração inicial de xilose, concentração inicial de inóculo, fluxo de N₂ no meio de cultivo e rotação na produção de etanol pela levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN

Os resultados da produção, conversão e eficiência da biossíntese de etanol a partir de xilose pela levedura *M. guilliermondii* adaptada podem ser observados na Tabela 5.12, onde se observa que tal qual a produção de biomassa celular e xilitol, a biossíntese de etanol sofreu uma forte influência das variáveis

relacionadas no planejamento experimental, com valores de rendimentos variando entre 0 a 24,94%. Em estudos prévios, com a mesma linhagem, condições de baixa concentração de substrato e alta rotação, resultaram em valores de etanol muito baixos. Rendimentos próximos de 25% foram reportados pela primeira vez para esta linhagem, sendo este um resultado importante na busca da superação de desafios que podem levar a uma produção viável de etanol 2G, aplicando linhagens naturalmente fermentadoras de pentoses.³³⁻³⁴

Tabela 5.12 - valores de etanol produzidos (g/L), conversão e rendimento em etanol dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20g/l de xilose, 20 g/l de peptona e 10 g/l de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.

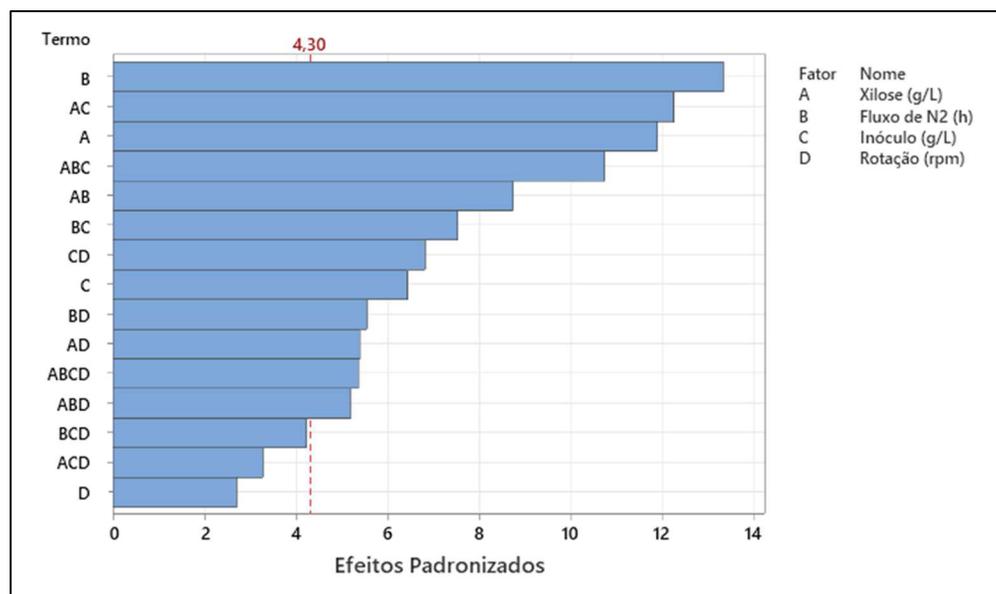
Variáveis	A	B	C	D	Resposta		
Exp.	[Xilose	Fluxo de N ₂	[Inóculo	Rotação	Etanol (g/l)	Yp/s ^a (g.g ⁻¹)	η ^b (%)
1	-1	-1	-1	-1	0,07	0,003	0,63
2	1	-1	-1	-1	0,38	0,011	2,09
3	-1	1	-1	-1	0,25	0,021	4,08
4	1	1	-1	-1	0,41	0,020	3,92
5	-1	-1	1	-1	0,16	0,007	1,40
6	1	-1	1	-1	0,35	0,012	2,43
7	-1	1	1	-1	0,07	0,008	1,62
8	1	1	1	-1	2,21	0,127	24,94
9	-1	-1	-1	1	0,40	0,018	3,50
10	1	-1	-1	1	0,68	0,017	3,26
11	-1	1	-1	1	0,43	0,030	5,83
12	1	1	-1	1	0,63	0,022	4,24
13	-1	-1	1	1	0,09	0,004	0,80
14	1	-1	1	1	0,66	0,016	3,22
15	-1	1	1	1	0,18	0,008	1,59
16	1	1	1	1	2,12	0,054	10,65

^aYP/S (g.g-1) g etanol / g xilose consumida

^beficiência de conversão considerando o máximo teórico de 0.511 g.g-1

A influência dos parâmetros concentração de xilose (A), fluxo de nitrogênio no meio de cultivo (B), concentração de inóculo (C) e rotação (D) na bioconversão de xilose em etanol foi avaliada e os resultados foram estatisticamente padronizados no gráfico de pareto na Figura 5.16. Observa que a produção de etanol pela levedura *M. guilliermondii* foi fortemente influenciada pelo fluxo de N₂ no meio de cultivo (B), pela interação entre a concentração de substrato e concentração inicial de inóculo (AC) e pela concentração de substrato (A), sendo o efeito da rotação (D), estatisticamente nulo.

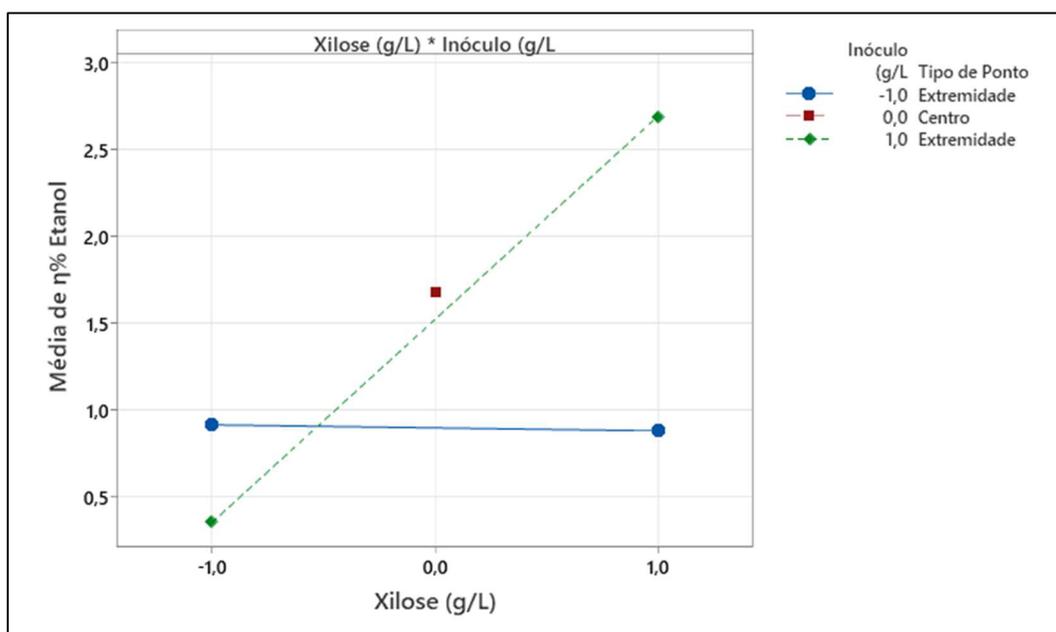
Figura 5.16 - Gráfico de pareto dos efeitos padronizados das variáveis na produção de etanol (g/L) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



A relação entre a concentração inicial de substrato e inóculo pode ser observada no gráfico de interações da Figura 5.17 no qual se observa que a única interação que aumenta o rendimento em etanol ocorre quando a concentração do substrato e de

inóculo estão em nível alto. Tal resultado é de extrema relevância e corrobora com todos os demais resultados observados neste e em trabalhos anteriores nos quais os valores destas variáveis apresentaram abaixo das condições observadas neste experimento.^{31,33}

Figura 5.17 - Gráfico de interação das variáveis concentração inicial de xilose inóculo no rendimento em etanol (g/g) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



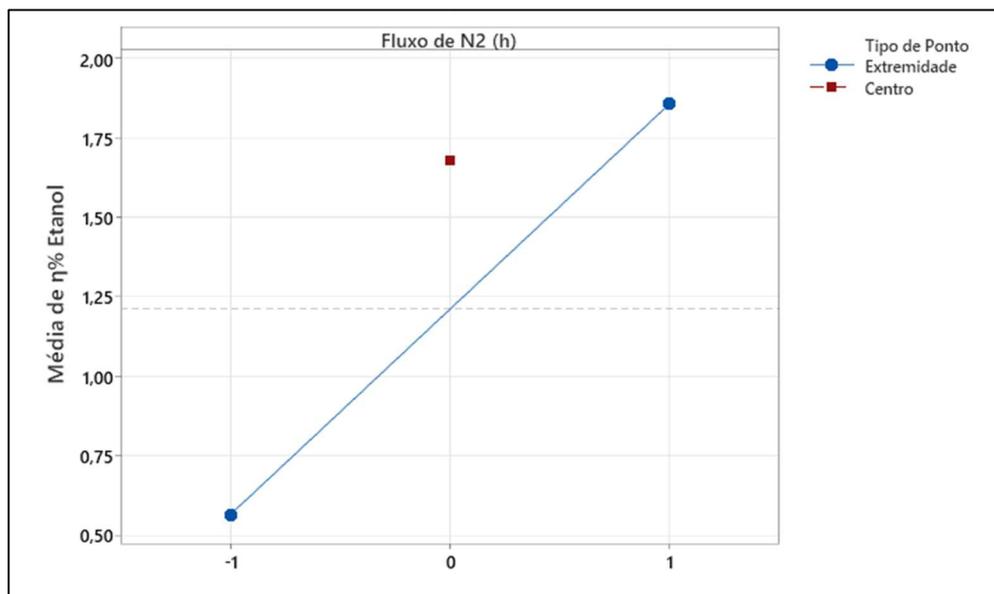
Além disso, o rendimento em etanol foi a única variável no qual a concentração inicial de inóculo teve um efeito significativo. Todavia valores altos de rendimento dependem da combinação em nível alto tanto da concentração inóculo quanto da concentração inicial de xilose.

Bonan et al.¹⁰¹ estudaram os efeitos da concentração de xilose e densidade de inóculo na eficiência de conversão de xilose em etanol, os autores reportaram que, sob condições otimizadas de baixa aeração, 90 g/L de xilose e altas

densidades celulares promoveram taxas ótimas de conversão de xilose em etanol nos cultivos de levedura não convencional *Spathaspora passalidarum*. Agbogbo et al.¹¹⁹ reportaram máxima produção de etanol de 41 g/L em cultivos com altas densidades celulares, 6,5 g/L de inóculo, utilizando levedura não convencional fermentadora de pentoses *Pichia stipitis*, os autores reportaram ainda que embora os cultivos de alta densidade levam a conversões mais rápidas e economicamente mais viáveis, os rendimentos globais em etanol não foram afetados pela densidade celular^{101,119,164,165}

O efeito da disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo, é um dos parâmetros mais estudados na literatura, devido a sua importância para os processos metabólicos das leveduras, que por serem organismos aeróbios facultativos, podem sobreviver e produzir diferentes produtos em função da concentração de oxigênio disponível. No presente experimento, condições de hipoxia foram geradas pelo fluxo de nitrogênio no meio de cultivo e seu efeito principal sobre a produção de etanol pela levedura *M. guilliemrondii* adaptada podem ser observados na Figura 5.18, onde percebe-se que para se aumentar o rendimento em etanol esta variável também precisa ser mantida em nível baixo.

Figura 5.18 - Gráfico de efeitos principais da variável fluxo de N₂ no rendimento em etanol (g/g) dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em meio sintético contendo 40 ou 20 g/L de xilose, 20 g/L de peptona e 10 g/L de extrato de levedura, pH 5,5, com ou sem fluxo de N₂ no meio de cultivo, incubados por 96 h a 30°C em 60 ou 160 rpm.



A fermentação é um processo anaeróbio, que para leveduras convencionais como *Saccharomyces cerevisiae*, em condições de altas concentrações de substratos as altas taxas de conversão permitem que o processo aconteça, mesmo em condições aeróbias, efeito este conhecido como Crabtree positivo. Todavia leveduras não convencionais, que fermentam xilose em taxas lentas de conversão, são referidas na literatura como Crabtree negativas, dependentes de uma condição reduzida de aeração, mesmo em altas taxas de substrato, efeito este que foi observado nos resultados obtidos neste experimento, pois mesmo a concentração de substrato sendo o parâmetro chave para se atingir melhores rendimentos na conversão em etanol.

A análise das condições do processo fermentativo nas conversões em biomassa celular, xilitol e etanol demonstraram que o fluxo de nitrogênio no meio de cultivo afetou negativamente o crescimento celular e, sendo a biomassa o produto com conversões mais elevadas, também afetou a metabolização de xilose

negativamente. Todavia a produção de etanol e xilitol responderam positivamente ao aumento do fluxo de N₂ associado as demais variáveis de maior impacto, como a concentração inicial de inóculo e a concentração de xilose.¹¹⁵

A complexidade do efeito de variáveis como a aeração nas diferentes rotas metabólicas também foi confirmada nos resultados obtidos neste estudo, condições de hipoxia são desejáveis para se acumular xilitol, e reduzir o fluxo para a conversão de biomassa, todavia o consumo de xilose é altamente reprimido em condições de altos fluxos de nitrogênio, corroborando desta forma com as observações gerais sobre o metabolismo de pentoses em leveduras reportados na literatura, nos quais mínimas condições de aeração são essenciais para produzir energia para o transporte de xilose e equilíbrio entre NAD⁺ e NADH.¹⁵²⁻¹⁵⁵

Os resultados obtidos nesta etapa do trabalho direcionam o entendimento e conhecimento sobre o metabolismo de xilose pela levedura *M guilliermondii* adaptada (311_EN). Visto que, a biossíntese de etanol com rendimentos próximos de 25%, bem como altas taxas de produção de biomassa celular, a partir de xilose com concomitante produção de xilitol, estão sendo reportados pela primeira vez, denotando o potencial deste microrganismo para aplicação em processos de coprodução em biorrefinarias.

5.5 Avaliação da fermentação de hidrolisados de biomassas lignocelulósicas por *M. guilliermondii* adaptada 311_EN

A levedura não convencional *M. guilliermondii* selecionada e caracterizada pela sua capacidade de fermentar pentoses. Foi adaptada em sucessivos ciclos de crescimento em meio contendo xilose como única fonte de

carbono e a avaliação do crescimento celular comprovou que, após crescimento adaptativo espontâneo, as linhagens se tornaram mais eficientes.^{33,34}

Além disso o estudo dos parâmetros que afetam o metabolismo e o desempenho da fermentação comprovou que a linhagem adaptada é capaz de consumir xilose para produzir biomassa celular, xilitol e etanol. Porém até o presente momento não se tem dados do estudo do comportamento desta levedura em hidrolisados lignocelulósicos de resíduos de palha de cana-de-açúcar e madeira, sendo estes fundamentais para aplicação em processos de biorrefinarias. Desta forma a terceira etapa experimental do presente trabalho apresenta e discute os resultados da fermentação de hidrolisados lignocelulósicos pela levedura *M. guilliermondii* adaptada 311_EN.

A levedura *M. guilliermondii* (311_EN) utilizada como inóculo nos experimentos desta etapa foi selecionada após crescimento adaptativo, e propagada até obtenção de biomassa celular suficiente para a fermentação dos hidrolisados, conforme descrito no item 4.3.1. Os hidrolisados, preparados conforme descrito no item 4.3.2, foram obtidos a partir da pré-hidrólise alcalina, seguido da hidrólise enzimática de biomassas de palha de cana-de-açúcar e resíduos do acabamento da fabricação de lápis coloridos, composto por cavacos finos de madeira, pigmentos e grafite.

A concentração dos açúcares contidos nos hidrolisados (xilose, glicose e arabinose), bem como dos inibidores, Hidroximetilfurfural (HMF), furfural e ácido acético estão descritos na Tabela 5.13. Onde se observa que as concentrações de açúcares obtidos foram próximas nos dois hidrolisados e em proporções que corroboram com aquelas observadas na literatura, com destaque para palha de cana-de-açúcar que apresentou concentrações, mais elevadas para os três açúcares.^{168,170}

Um outro resultado importante foi que o único inibidor presente em concentrações expressivas foi o ácido acético, que pode ser metabolizado como fonte

de carbono pela levedura aplicada neste estudo até 10 g/L, portanto mesmo para os hidrolisados de resíduos de lápis coloridos, cujos valores foram mais elevados, espera-se que a levedura *M. guilliermondii* possa fermentar sem sofrer efeito de inibição, desta forma os hidrolisados foram aplicados diretamente, sem passar por processo de detoxificação.³⁴

Tabela 5.13 - Caracterização dos açúcares e dos inibidores presentes nos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar e resíduos da fabricação de lápis coloridos, obtidos a partir de hidrólise enzimática e concentrados.

Hidrolisados	Açúcares			Inibidores		
	Xilose (g/l)	Glicose (g/l)	Arabinose (g/l)	Furfural (mg/l)	HMF (mg/l)	Ácido acético (g/l)
Palha de cana-de-açúcar	44,0	50,8	20,0	<0,100	<0,100	3,65
Resíduo de fabricação de lápis	32,7	38,9	16,8	<0,100	<0,100	6,52

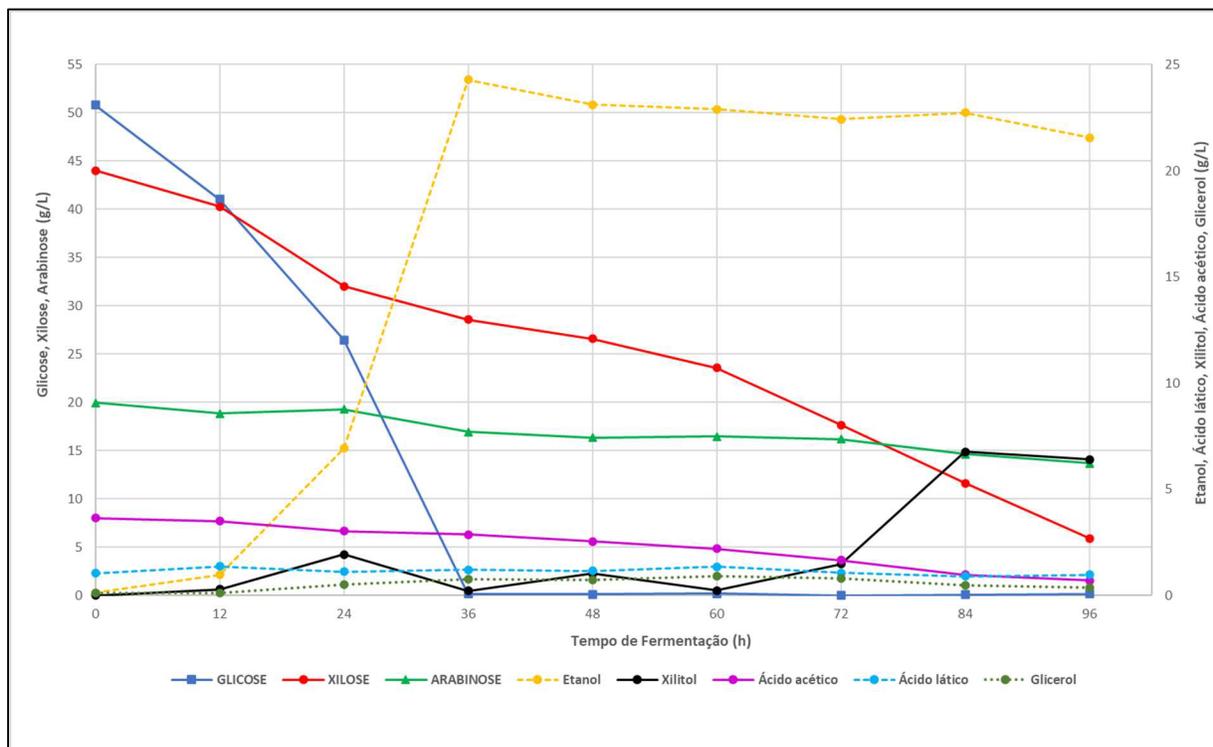
Salienta-se ainda, que o pré-tratamento alcalino seguido de uma hidrólise com coquetel enzimático, composto por celulasas e xilanasas, foi uma etapa importante para se obter concentrações viáveis para processos fermentativos e baixas taxas de produção de inibidores. A hidrólise pré-alcalina foi aplicada por ser um pré-tratamento capaz de ampliar a área de contato para a etapa enzimática com baixa remoção de xilose e alta remoção de lignina.^{2, 130-131,172-173}

5.5.1 Fermentação de hidrolisado obtido a partir da palha da cana-de-açúcar

Os hidrolisados de palha de cana-de-açúcar foram fermentados a 30°C e amostras foram retiradas a cada 12 h e analisadas por HPLC para determinação do consumo de substratos e produção de etanol, xilitol, glicerol, ácidos acéticos, lático e succínico, HMF e Furfural. Ácido succínico, HMF e furfural foram detectados abaixo dos limites de quantificação e os resultados da variação das concentrações dos substratos e formação de bioprodutos podem ser observados na Figura 5.19 na qual verifica-se que a levedura *M. guilliermondii* foi capaz de consumir todos os açúcares presentes no hidrolisado de palha de cana-de-açúcar, sendo esta uma característica importante a se destacar visto que a co-fermentação é um dos requisitos para se atingir eficiência nos processos de biorrefinarias.²²⁵

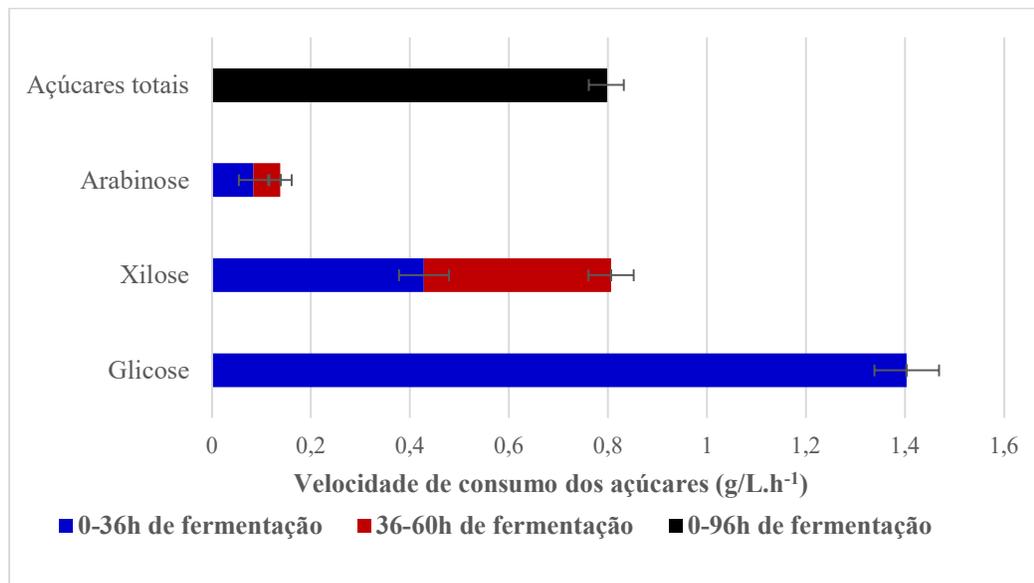
Destaca-se na Figura 5.19 que no período de 12 h a glicose foi o açúcar mais consumido de forma significativa (44,56 g/L) seguido pelo consumo de xilose que foi de apenas 4 g/L. O consumo concomitante de hexoses e pentoses é um de importância imperial para a viabilização de processos de biorrefinaria e a preferência pela metabolização de hexoses é um desafio a ser superado.

Figura 5.19 - Curvas de consumo de substratos e produção de bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.



Além disso, podemos observar na Figura 5.20, que o consumo concomitante de pentoses e hexoses por *M. guilliermondii* não sofreu influência pela de concentração de glicose presente no hidrolisado, pois a velocidade de consumo de xilose e arabinose foi maior nas primeiras 36 h, período no qual toda a glicose no meio também foi metabolizada, sendo está uma característica que diferencia o microrganismo em questão das demais leveduras não convencionais reportadas na literatura. Visto que o consumo concomitante possibilita menores tempos de retenção, reduzindo custos e riscos.

Figura 5.20 - Velocidade de consumo de substratos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.



Outro aspecto de destaque no gráfico demonstrado na Figura 5.20 foi a diferença na velocidade de consumo dos açúcares, pois mesmo o consumo sendo concomitante, a glicose foi consumida numa taxa de 3,78 vezes maior que a xilose e 25,9 vezes maior que a arabinose. A preferência metabólica pela glicose por leveduras fermentadoras de pentoses tem sido explicada na literatura como uma consequência da evolução genética que permitiu que leveduras se tornassem altamente eficazes em metabolizar hexoses como fonte de carbono, nestas condições os transportadores de hexoses são altamente ativados e sua ativação inibe os transportadores de pentoses, que são ativados de forma expressiva somente em baixas concentrações de glicose.^{169,171,176,179}

Observa-se ainda nas curvas de consumo de substratos (Figura 5.19) e no gráfico de velocidades (Figura 5.20) que a xilose foi o segundo açúcar mais consumido, porém seu consumo foi lento e em menor fração que a glicose, com um

residual de cerca de 6 g/L ao final das 96 h de processo, resultando num consumo de 86%. Entretanto, apenas 31% da arabinose foi consumida. Por se tratar de um açúcar presente em baixas concentrações, na maioria dos hidrolisados lignocelulósicos, o metabolismo e a fermentação de arabinose não são processos bastante reportados na literatura.¹⁷⁸

Fonseca et al.¹⁷⁷ estudaram a fermentação concomitante de glicose, xilose e arabinose e os autores reportaram o consumo de xilose e arabinose após a depleção de glicose no meio de cultivo por linhagens de *Pichia guilliermondii* e *Candida arabinofermentans*. Os autores reportaram ainda que em condições de aeração os três açúcares foram consumidos, porém não se observou a formação de bioprodutos. Nas condições experimentais observadas aqui a glicose foi o açúcar preferencialmente consumido, porém todos os substratos foram consumidos de forma concomitante (Figura 5.20) e, além disso, etanol e xilitol foram produzidos, mesmo em condições não otimizadas de aeração, sendo estes resultados que denotam o potencial de aplicação deste microrganismo para a produção de biocompostos a partir de biomassas lignocelulósicas.¹⁷⁸

Ao se avaliar as curvas de produção de metabólitos na Figura 5.19 observa-se que o etanol foi produzido a partir de 12 h e atingiu um valor máximo em 36 h de fermentação. A concentração de xilitol foi observada a partir de 72 h de fermentação. Atrasos na biossíntese de etanol e xilitol têm sido reportados na literatura em cultivos de batelada, sob condições de aeração, nos quais o etanol começa a ser produzido após a redução da concentração de oxigênio no meio de cultivo devido ao acúmulo de biomassa celular.

O comportamento das curvas de produção de etanol e xilitol corroboram ainda com os resultados obtidos nas fermentações em meio sintéticos nas etapas anteriores deste estudo, cujos resultados demonstraram que sob as mesmas condições de incubação aplicadas aqui, a produção de biomassa celular é

favorecida, item 5.3 e 5.4, e que a produção de etanol começa a ser observada em condições de baixa aeração, sendo este efeito mais fortemente expressivo para a produção de xilitol, que pode ser observada aqui somente a partir de 72 h de cultivo.¹⁷⁷

Além disso, nos períodos em que houve o máximo consumo de glicose não se observou a produção dos metabolitos aqui estudados, sendo o etanol detectado a partir de 12 h, corroborando com a hipótese de que os açúcares consumidos nas primeiras 12 h foram utilizados para respiração celular, ocorrendo então uma redução da disponibilidade de oxigênio do meio de cultivo após o aumento densidade celular, levando então a biossíntese parcial de etanol que apresentou concentração crescente até 36 h de fermentação, com a redução da concentração dos substratos, após 36 h a produção de etanol estagnou-se.

Os resultados obtidos até aqui corroboram com aqueles observados na literatura e nos experimentos do item 5.4, nos quais em condições de baixa aeração e alta concentração de inóculo a levedura *M. guilliermondii* necessitou ainda de uma concentração mínima de xilose de 35 g/L para se observar uma produção de etanol a partir de 1,5 g/L. Desta forma baixas condições de aeração, altas concentrações de xilose têm sido reportadas como condições essenciais para a produção de etanol por leveduras não convencionais de diferentes espécies.^{9,181}

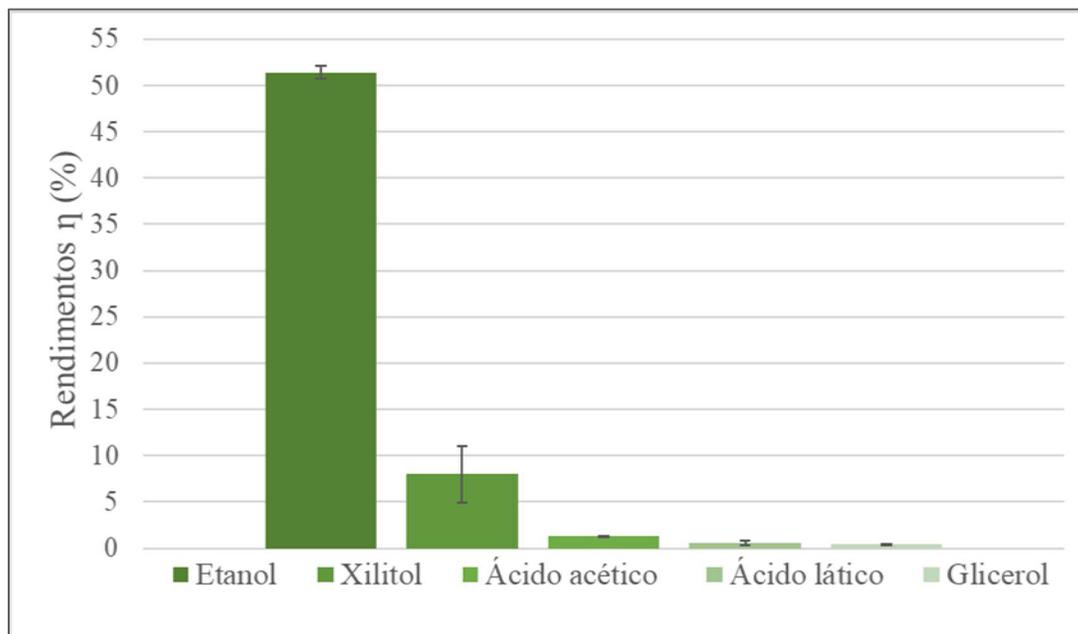
Os rendimentos globais da fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos de *M. guilliermondii* adaptada estão demonstrados na Figura 5.21 e, como podemos observar, o etanol e o xilitol foram os bioprodutos de maior produção. Destacando-se os rendimentos em etanol de 50,92%, valores estes bastante interessantes para processos de biorrefinaria e, embora os parâmetros aplicados, bem como a adaptação da linhagem, foram essenciais para direcionar a biossíntese para a produção de etanol, as condições fermentativas aplicadas neste

estudo foram exploratórias e podem ser otimizadas para se atingir rendimentos ainda maiores próximos aqueles desejados no processo industrial.

Betancur e Pereira²²⁹ avaliaram a produção de etanol 2G a partir de hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar e em condições próximas as aplicadas neste experimento eles obtiveram uma produção de etanol 2G de 20g/L em 40 h de fermentação em cultivos de *Pichia stiptis*, citada como um dos melhores microrganismos capazes de naturalmente produzir etanol em hidrolisados. No presente trabalho foram produzidos 24,28 g/L em 36 h de fermentação (Figura 5.19) o que demonstra o potencial desta linhagem para a produção de etanol 2G. Os autores reportaram ainda, rendimentos em g de etanol por g de xilose consumida variando entre 0,18 e 0,41 g.g⁻¹, no presente trabalho o rendimento foi de 0,3 g etanol/ g de açúcares totais consumidos, corroborando e salientando o potencial de aplicação desta linhagem como uma solução para a busca de microrganismos que possam ser aplicados em processos de biorrefinaria.

Os rendimentos em xilitol foram pouco expressivos denotando a necessidade de otimização das condições de biossíntese, pois conforme observado e discutido nos itens 4.3 e 4.4 e corroborado pela literatura, a conversão em xilitol e etanol são vias dependentes de controle de aeração e concentração de substrato para se atingir valores economicamente viáveis, além disso nesta fase do trabalho procurou-se manter condições que direcionassem a bio-conversão para valores mais altos de etanol.¹⁸⁵

Figura 5.21– Rendimentos em bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de palha de cana-de-açúcar suplementado com nutrientes, inoculados com 1g/L *M. guilliermondii* (311_EN), em pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm



Cunha-Pereira et al.¹⁹⁸, alcançaram altos rendimentos aplicando uma linhagem de *C guillhiemondii* em condições otimizadas de processo de fermentação de hidrolisados de resíduos de soja. Sidana et al.⁷⁶, conseguiu rendimentos próximos de 90% na conversão dos açúcares presentes em hidrolisados concentrados em condições previamente otimizadas aplicando linhagem de *M. guilliermondii* também recém isolada e selecionada.¹⁸³

Além disso, observa-se que nos períodos de 12 a 36 h quase 70% dos açúcares consumidos foram convertidos em etanol (Figura 5.19), sendo está uma informação relevante, pois nesta etapa do processo as condições no meio de cultivo direcionaram o metabolismo da levedura para a produção de etanol que, conforme reportado no item 5.4 do presente estudo, está associada as concentrações de substrato, biomassa celular e aeração, sendo este um conhecimento que permitirá

avançar na superação de desafios aplicando regimes de operação em reatores que permitam manter constantes as condições de alta produtividade em escala industrial.^{3-5, 12-14, 219,225}

Embora as condições nesta etapa do estudo tenham sido ajustadas para favorecer a produção de etanol, o xilitol também foi coproduzido pela levedura *M. guilliermondii*, sendo o segundo produto com maior rendimento. Estudos comparativos aplicando linhagens de *M. guilliermondii* utilizando palha de cana-de-açúcar para a produção de xilitol são escassos na literatura, sendo este um conhecimento bastante importante sobre a capacidade da presente linhagem em crescer e produzir etanol e xilitol em diferentes matrizes. Hernández-Pérez et al.²²⁵ reportaram que em condições otimizadas de nutrição e aeração, linhagens de *Candida guilliermondii* podem chegar a um rendimento de 60% em xilitol fermentando hidrolisados de palha-de-cana de açúcar.

Conforme já discorrido no início do presente capítulo, as condições que permitiram a produção de xilitol foram atingidas nos períodos finais do experimento. O rendimento global em xilitol foi de cerca de 7%, porém no intervalo o qual o bioproduto foi produzido cerca de 30% dos açúcares remanescentes foram utilizados para biossíntese de xilitol (Figura 5.19). Carneiro et al.⁹² destacou a produção de xilitol a partir de hidrolisados lignocelulósicos por *M. guilliermondii*, sob altas densidades celulares e condições limitadas de oxigênio, chegando a valores de conversão próximos de 25 a 60%.^{9,217}

Leveduras das espécies *Candida guilliermondii* e *Meyerozyma guilliermondii* têm sido reportadas pela sua capacidade de conversão de xilose em xilitol. Entretanto a viabilidade do processo, assim como para o etanol, demanda de otimização das condições, visto que tais microrganismos tem etapas metabólicas e requerimentos de energias mais complexos que as leveduras convencionais, porém o conhecimento das condições que podem levar a processos otimizados é de alta

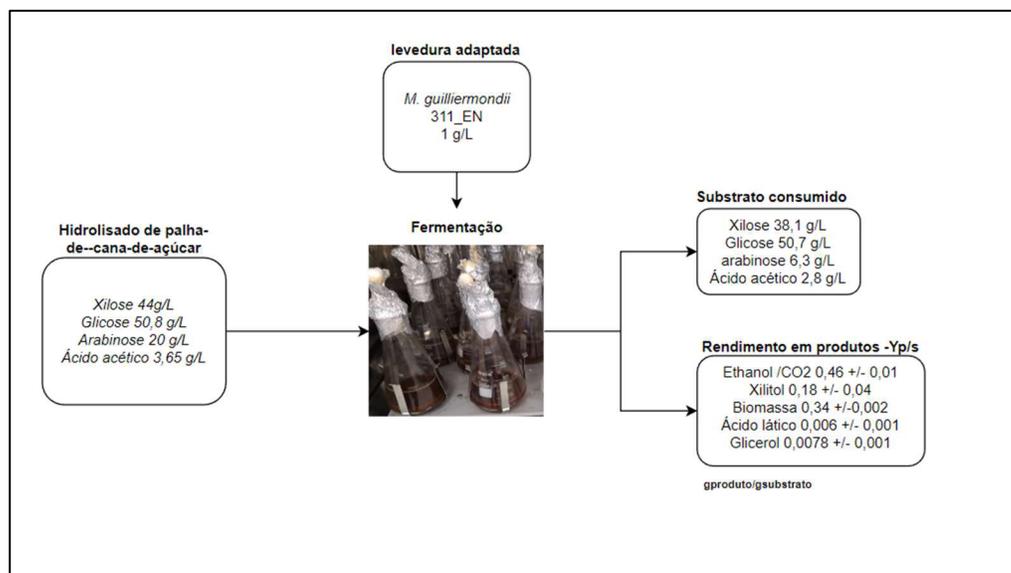
relevância, visto que tais microrganismos são capazes de produzir inúmeros compostos de alto valor agregado sendo então de grande interesse para aplicação em biorrefinarias.^{183,218,224}

A otimização das condições de fermentação não foram objetos de estudo no presente trabalho. Todavia o mapeamento das variáveis de maior impacto no metabolismo (5.4) permitiu direcionar as condições nesta fase do experimento levando aos maiores valores de produção de etanol observados até aqui para a levedura *M. guilliermondii* CCT7783, considerando os resultados obtidos neste estudo e os reportados na literatura.^{33,34}

A capacidade de metabolizar todos os açúcares presentes nos hidrolisados de palha e o aumento no rendimento em etanol, devido ao ajuste das condições experimentais, são uma evidência importante de que a levedura *M. guilliermondii* pode ser aplicada para uma rota de conversão em biorrefinarias que, quando otimizada, poderá levar a viabilidade de produção de etanol 2G e coprodutos como o xilitol e biomassa celular (proteína microbológica) que, embora não tenha sido um parâmetro analisado nesta etapa experimental, sua produção em grandes quantidades já foi demonstrada e discutida no presente estudo (5.3 e 5.4).

Nos resultados apresentados nos itens 6.3 e 6.4 do presente estudo a biomassa celular foi um dos bioprodutos mais produzidos pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) e, embora a biomassa celular não pode ser avaliada nesta fase do trabalho, estimou-se sua produção com base no balanço de massa entre produtos e substratos consumidos, e os resultados da estimativa do rendimento em biomassa celular podem ser observados na Figura 5.22.

Figura 5.22 – Exemplo do balanço de massa da fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos de palha de cana-de-açúcar pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.



Como se pode observar na Figura 5.22, a biomassa celular foi o produto com segundo maior rendimento, depois do etanol, sendo este um resultado que demonstra a importância de se direcionar as condições da fermentação, pois a biomassa têm sido o produto majoritário em todos os experimentos realizados com as linhagens desta levedura até o momento.

Além disso, a produção de biomassa celular microbiológica a partir de resíduos lignocelulósicos é uma etapa importante para aumentar a sustentabilidade econômica e ambiental de uma biorrefinaria. Matheus et al²³⁶. comentam que a coprodução de biomassa celular de levedura nos processos de biorrefinarias tem alto impacto na sustentabilidade ambiental, pois tal biomassa pode ser aplicada para alimentação de animais substituindo a necessidade de pastagens liberando terras para aumento da produção de cana-de-açúcar.

Jiaqiang e colaboradores²³⁷ avaliaram a capacidade de produção de biomassa seca a partir de xilose e hidrolisados lignocelulósicos com linhagens de leveduras não convencionais *Candida intermedia*, citada na literatura como promissora para a

produção de proteína microbiológica, os autores reportaram rendimentos da ordem de 0,40 g de biomassa seca por g de açúcar consumido. Tais resultados corroboram com aqueles obtidos no presente estudo, sendo que a linhagem estudada aqui foi capaz de co-fermentar etanol, xilitol e consumir ácido acético como fonte de carbono.

Meyer et al.²³⁹ otimizou a composição de hidrolisados lignocelulósicos para a produção de proteína microbiológica utilizando linhagens recém isoladas de levedura não convencional *Candida blankii*. Os autores reportaram que nas melhores condições de o rendimento em biomassa celular seca foi de 0,53 g/g. As condições aplicadas nesta etapa do trabalho foram direcionadas para a biossíntese de etanol 2G, todavia valores de rendimentos em biomassa celular de 0,34g/g foram estimados. Entretanto resultados com rendimentos de 0,83 g/g foram reportados na etapa no item 6.4.2 do presente estudo, em condições que direcionaram o metabolismo para a produção de biomassa, demonstrando o potencial desta linhagem para bioprocessos que visam a produção de proteína microbiológica.

5.5.2 Fermentação do hidrolisado obtido a partir dos resíduos da fabricação de lápis colorido (RFL)

A fim de se analisar a capacidade da levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN) em metabolizar e fermentar outras fontes de biomassa lignocelulósica, resíduos da fabricação de lápis coloridos foram submetidos aos mesmos pré-tratamento e tratamento que a palha-de cana-de-açúcar e utilizados como fontes de açúcares nos cultivos de *M. guilliermondii* adptada 311_EN. Os

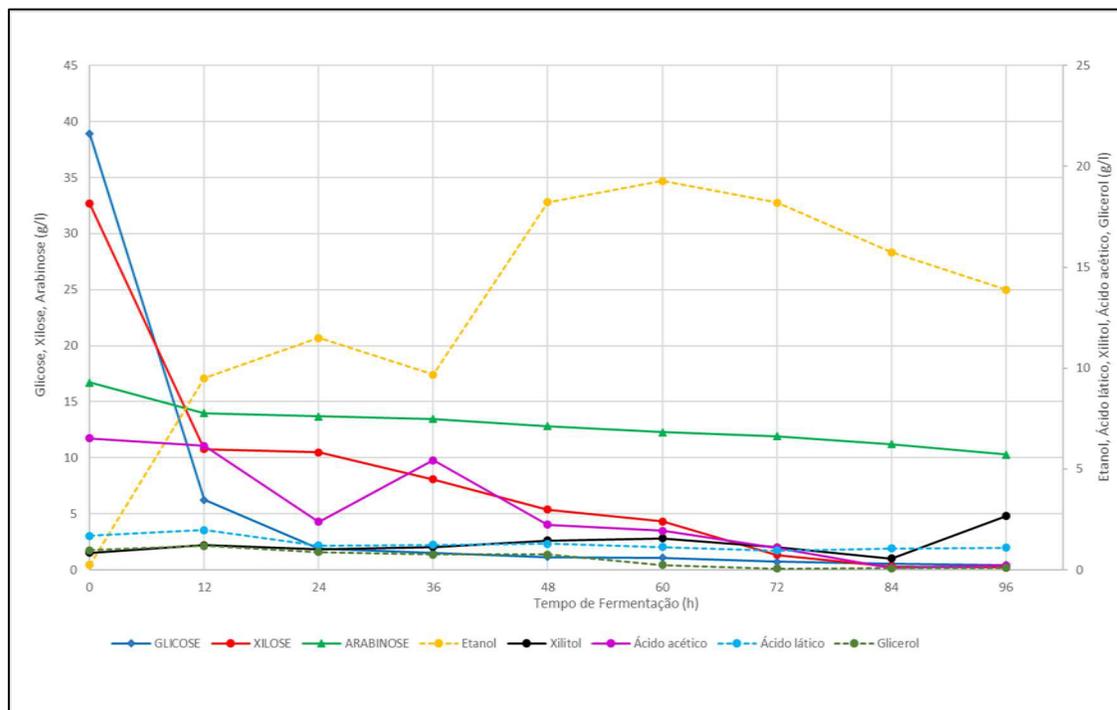
resultados da variação das concentrações dos substratos e formação de bioprodutos pode ser observado na

. Verifica-se que a levedura *M. guilliermondii* foi capaz de metabolizar quase que totalmente os açúcares presentes nestes hidrolisados, com exceção da arabinose que também foi consumida, porém de forma lenta e com residual ao final dos períodos de 96 h.

A metabolização preferencial de hexoses por leveduras fermentadoras de pentoses, sendo estas não convencionais ou geneticamente modificadas, tem sido objeto de estudo e, conforme também discutido e observado nos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar, se deve ao fato da eficiência no mecanismo de transporte de hexoses, que ocorre de forma preferencial inibindo o transporte de xilose.^{171,175,176,179}

Nos hidrolisados de palha 79% dos açúcares foram metabolizados (Figura 5.19) já nos hidrolisados de resíduos de lápis o consumo total foi de cerca de 89% (Figura 5.23). com destaque para o consumo de xilose nos hidrolisados de resíduos de fabricação de lápis (RFL), nos quais a xilose foi completamente consumida ao final das 96 h. Em ambos os experimentos a arabinose foi consumida lentamente corroborando com os resultados verificados na literatura os quais explicam que as vias de metabolização de arabinose requerem mais etapas dependentes de controle de aeração e equilíbrio redox, por isso são mais lentas que as vias de metabolização de xilose.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

Figura 5.23 - Curvas de consumo de substratos e produção de bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis (RFL) suplementado com nutrientes, inoculados 1 g/L *M. guilliermondii* (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.

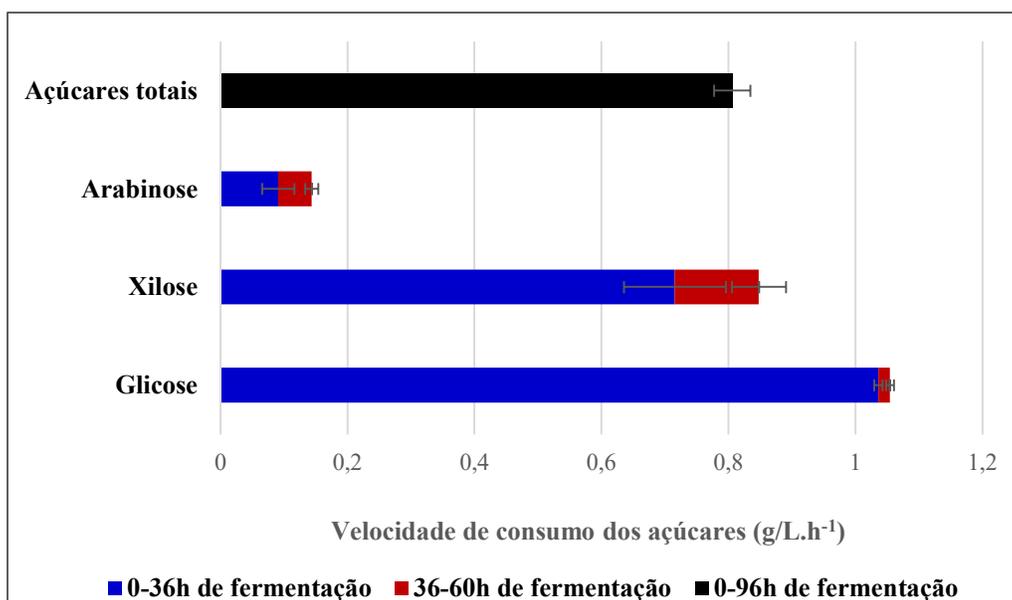


A velocidades de consumo dos três substratos (glicose, xilose e arabinose) em $\text{g/L}\cdot\text{h}^{-1}$ foram calculadas e os resultados podem ser observados na Figura 5.24, onde verifica-se que as velocidades de consumos também foram maiores nas primeiras 36 h de fermentação, assim como nas fermentações dos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar. Todavia, uma diferença notória pode ser observada na taxa de consumo de xilose, que foi maior do que aquela observada nas fermentações de palha de cana-de-açúcar.

Além disso, a velocidade de consumo dos açúcares totais foi de $0,79 \pm 0,035$ para os experimentos com hidrolisados de palha de cana-de-açúcar (Figura 5.20) e $0,80 \pm 0,030$ para o consumo total de açúcares nos experimentos de fermentação dos hidrolisados de resíduos de lápis. Desta forma, embora a glicose

também tenha sido o açúcar consumido mais rapidamente em ambos hidrolisados, a levedura manteve o fluxo de metabolização de carbono constante aumentando a taxa de consumo de xilose nas primeiras 36 h de fermentação (Figura 5.24), devido a menor concentração de açúcares totais comparando aos hidrolisados de palha de cana de açúcar (Tabela 5.13).

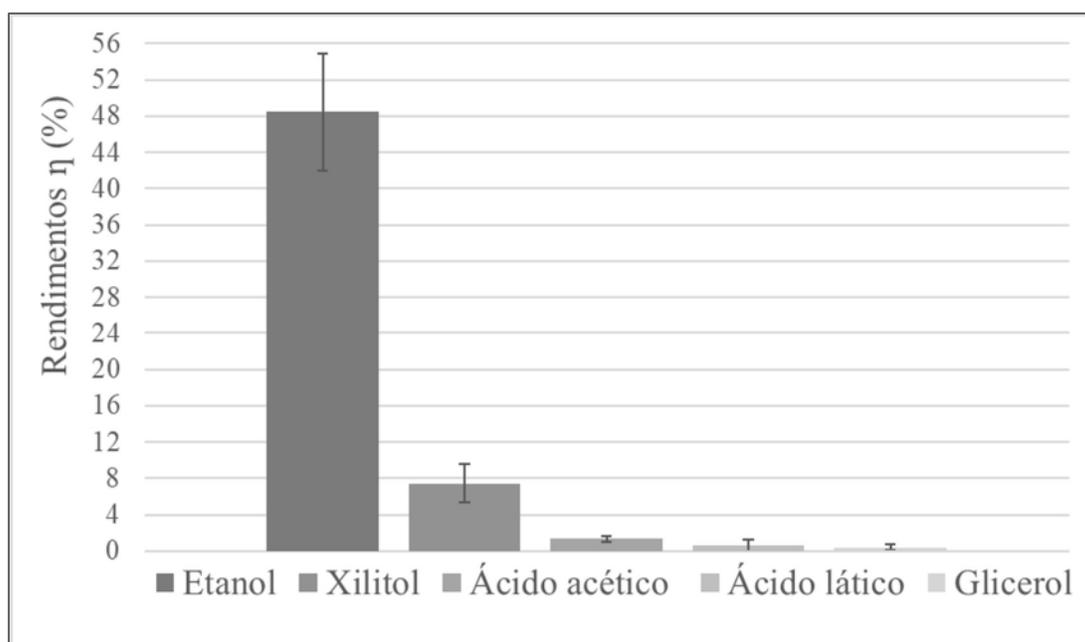
Figura 5.24 - Velocidade de consumo de substratos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.



Os resultados desta etapa corroboram com os demais resultados já discutidos no presente trabalho e demonstram uma característica peculiar da levedura em questão visto que a literatura reporta um mecanismo de inibição do consumo de xilose que somente se torna expressivo após a redução da concentração de glicose no meio de cultivo, abaixo de 4 g/L para algumas linhagens, e no presente trabalho observamos que a levedura aumentou o consumo de xilose para manter uma taxa constante de consumo de açúcares.^{169,171,176,179}

Além da análise de consumo dos substratos a eficiência de conversão em bioprodutos também foi avaliada e os resultados podem ser observados na Figura 5.25, na qual se observa que, assim como nos hidrolisados de palha, o etanol foi o bioproduto de maior rendimento de conversão $48 \pm 7\%$, seguido pelo xilitol $7,5 \pm 2,11\%$.

Figura 5.25 - Rendimentos em bioprodutos dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.



A produção de etanol e xilitol a partir de resíduos de fabricação de lápis coloridos em rotas fermentativas não foi reportada na literatura até o presente momento. Todavia rendimentos de conversão variando entre 10 a 80% são reportadas na literatura para diferentes espécies de leveduras não convencionais cultivadas em hidrolisados de madeira e papel, estando os valores aqui obtidos

dentro do intervalo dos resultados observados em fermentações de hidrolisados de madeira.^{188,192-195,198}

Shupe e Liu¹⁸⁶ reportaram uma rota de produção de etanol a partir de hidrolisados de madeira aplicando 4 cepas das espécies *Candida shehatae* e *Pichia stipitis* produzindo em frascos uma concentração máxima de etanol de 13,51 g/L, os autores reportaram ainda que a principal fonte de carbono na etapa de produção de etanol foi a xilose (36,7 g/L), sendo estas observações próximas ao comportamento da levedura *M. guilliermondii* obtidos aqui, porém foram produzidos valores de etanol superiores, 19,27 g/L de etanol em 60 h de fermentação. Outro aspecto importante destacado pelos autores foi que ao se concentrar a xilose e controlar as condições da síntese em fermentador de bancada foi possível aumentar a produção de etanol para 35,4 g/L em 76 h de fermentação.^{186,193}

A capacidade de conversão de xilose em hidrolisados de resíduos oriundos de madeira e seus subprocessos é uma característica peculiar e interessante visto que a produção de conhecimento reportada por estes experimentos pode suportar rotas de produção mais eficientes do que aquelas que fermentam apenas as frações celulósicas destas biomassas.¹⁸⁷⁻¹⁹³

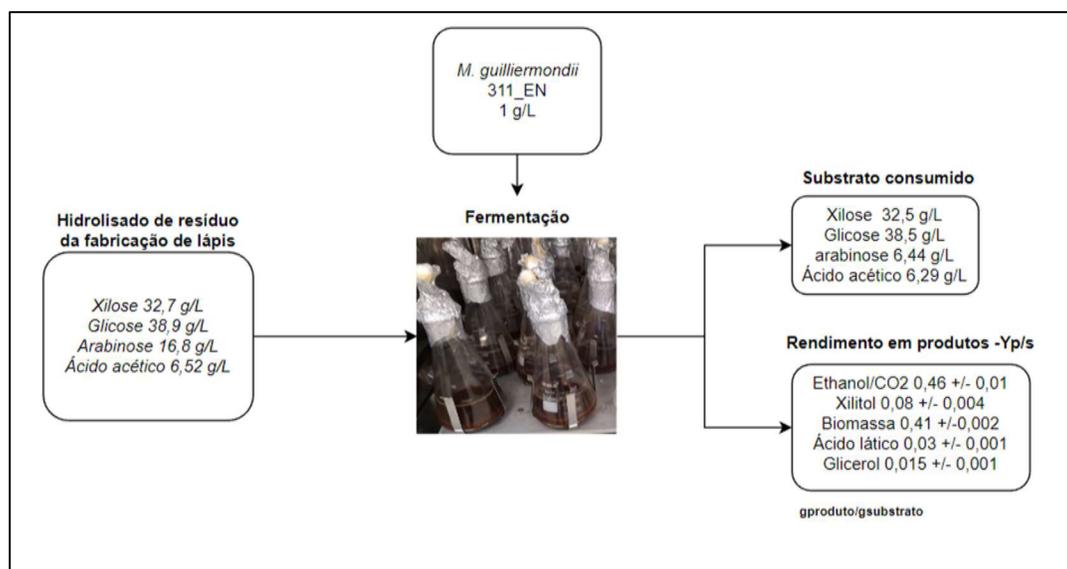
As condições de fermentação aplicadas nesta etapa do trabalho visaram explorar a capacidade de conversão da levedura adaptada *M. guilliermondii* para produção de etanol 2G, todavia o xilitol também foi coproduzido, porém em menor escala e ao final do processo de fermentação, conforme observado para as fermentações com hidrolisados de palha de cana-de-açúcar, e da mesma forma aqui os valores de xilitol foram pouco expressivos, sobretudo devido as condições de alta rotação e não hipoxia que conforme abordado no item 5.4 são essenciais para a produção de xilitol para a levedura *M. guilliermondii* aqui estudada.

Valores altos de produção de xilitol aplicando linhagens não convencionais como *M. guilliermondii*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*

em hidrolisados de madeira e resíduos de papel têm sido reportados na literatura, para processos com condições de concentração e aeração otimizadas. Valores de xilitol entre 9,59 e 25,51 g/L são comumente reportados. No presente projeto obteve-se uma produção de 2,6 g/L (Figura 5.23) que resultou uma eficiência de conversão em torno de 7% (Figura 5.25) sendo estes valores baixos para aplicação em processos de biorrefinaria, todavia deve-se se considerar aqui que tais resultados não foram produzidos em condições otimizadas.^{85,194-198}

A biomassa celular produzida também foi estimada com base no balanço de massa da fermentação e os resultados podem ser observados na Figura 5.26. Onde verifica-se que a biomassa celular também foi o segundo produto de maior rendimento sendo a sua conversão superior a produção de xilitol, glicerol e ácido láctico.

Figura 5.26 - Exemplo do balanço de massa da fermentação dos hidrolisados lignocelulósicos de resíduos da fabricação de lápis pela levedura *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), pH 5,5, incubados por 96 h a 30°C em 110 rpm.



Destaca-se também para o uso de hidrolisados de resíduos de processamento de derivados de madeira, como os resíduos de fabricação de lápis aqui aplicados, a importância da produção de biomassa celular como fonte de proteína microbológica e outros derivados de células de leveduras de alto valor agregado, e neste contexto com uma atribuição de valor ainda maior, visto que se trata de um resíduo de subprocessamento de difícil aplicação e processos convencionais.

Zhang e Zhao²⁴⁰ estudaram a produção de proteína e seus aspectos nutricionais aplicando linhagens de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos de eucalipto. Os autores reportaram um rendimento em biomassa máximo de 0.42g/g após 21 horas de cultivo. Resultados estes que corroboram com aqueles obtidos no presente estudo. A biomassa não foi medida diretamente neste estudo, entretanto o perfil de consumo de substratos e produção de bioprodutos observados (Figuras 5.19 e 5.23) permitem inferir que, biomassa em ambos os hidrolisados, foi produzida nas primeiras horas de fermentação.

A análise estatística comprovou haver diferença, ao nível de 5% de significância, entre os resultados de consumo de substratos e produção de produtos nos dois diferentes hidrolisados estudados aqui e os resultados foram submetidos ao teste de médias e estão demonstrados na

, na qual verifica-se que a palha demonstrou ser um meio de cultivo mais promissor que os resíduos da fabricação de lápis tanto para o a metabolização dos açúcares totais contidos no hidrolisados quanto para a produção de etanol e xilitol.

Salienta-se que tanto a palha como os resíduos de fabricação de lápis foram utilizados na sua forma bruta, conforme gerados pelos processos industriais e que os resíduos de fabricação de lápis além de cavacos de madeira continham pigmentos de diferentes naturezas em sua composição denotando uma característica de resistência importante da levedura *M. guilliermondii* para aplicação em processos

de biorrefinaria utilizando diversos tipos de resíduos lignocelulósicos de diversas fontes industriais.

Além disso, a aplicação de resíduos de fabricação de lápis tem uma notória importância, visto que se trata de um material com bastante impureza, de baixo valor agregado, sendo aplicado apenas como matéria prima para queima e produção energia térmica em processos que contribuem para o aumento da emissão de CO₂ e não agregam valor ao material.

Tabela 5.14 - Resultados do teste de Tukey dos parâmetros de fermentação dos cultivos de *M. guilliermondii* adaptada (311_EN), em hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis e palha de cana-de-açúcar, suplementado com nutrientes, pH 5,5, a 30°C em 110 rpm, durante 96 h de fermentação.

Hidrolisados	Consumo de açúcares (g/l)	Etanol (g/l)	Xilitol (g/l)	Y _{etanol/S}	Y _{xilitol/S}
Palha de cana-de-açúcar	^a 95,03 +/- 7,74	^a 24,28 +/- 1,12	^a 5,96 +/- 0,84	^a 0,26 +/- 0,02	^a 0,16 +/- 0,01
Resíduo de fabricação de lápis	^b 77,43 +/- 1,26	^b 19,27 +/- 0,30	^b 2,66 +/- 0,12	^a 0,25 +/- 0,01	^b 0,081 +/- 0,005

*Letras diferentes indicam diferença significativa a 5%.

Os resultados discutidos nesta etapa do estudo destacam uma importante característica da linhagem de levedura aqui estudada, que foi a consistência no padrão de consumo de substratos e produção de bioprodutos nos hidrolisados lignocelulósicos aplicados neste estudo. Diferentes hidrolisados, sobretudo de resíduos de subprocessamento como os resíduos de lápis podem apresentar características desafiadoras para a bioconversão pelo metabolismo das leveduras como diferentes níveis de pressão osmótica e compostos inibidores.

Os valores máximos de etanol e xilitol produzidos por *M. guilliermondii*, que foram apresentados na Figura 5.20 e 5.23, foram utilizados para se determinar o rendimento fermentativo ($Y_{P/S}$) e a taxa de produtividade volumétrica (Q_P), considerando o intervalo nos quais os bioprodutos atingiram seus valores máximos ao longo do período experimental. Tais resultados foram comparados a estudos semelhantes reportados na literatura, conforme demonstrado na Tabela 5.15.

Os valores dos parâmetros fermentativos obtidos durante as fermentações dos hidrolisados lignocelulósicos por *M. guilliermondii* foram semelhantes àqueles reportados na literatura, com destaque para o rendimento em etanol, nas fermentações com hidrolisados de palha de cana-de-açúcar cujos resultados estão entre os mais altos da tabela, sendo que dentre os 17 demais estudos comparativos destacados da literatura apenas 2 apresentam rendimento em etanol superior.

Os valores de rendimento em etanol obtidos a partir dos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar ($0,352 \text{ g.g}^{-1}$) se assemelham àqueles obtidos no trabalho de Sreenath e Jeffries¹⁹⁵ cujo rendimento em etanol foi de $0,350 \text{ g.g}^{-1}$, todavia tal rendimento foi calculado para um experimento que produziu $3,47 \text{ g/L}$ de etanol após 48 h de fermentação resultando em uma taxa de produtividade volumétrica de $0,072 \text{ g/L.h}^{-1}$. Desta forma, destaca a performance da linhagem de *M. guilliermondii* CCT7783, melhorada no presente estudo, que foi capaz de produzir $24,28 \text{ g/L}$ de etanol em 36 h de fermentação (Figura 5.19) resultando em uma produtividade volumétrica de $0,674 \text{ g/L.h}^{-1}$ de etanol.

Além disso, dentre os 17 trabalhos comparativos organizados na Tabela 5.15, apenas aquele reportado por Bonan et al.²²⁷ apresentou resultados de rendimento e produtividade superiores aos obtidos no presente estudo. Todavia os autores realizaram os estudos em condições de altas concentrações de xilose em e e

baixa concentração de glicose. Tal condições não foi aplicada no presente estudo, pois visou-se o aproveitamento de toda a fração de açúcares liberados na etapa da hidrólise, sendo está uma condição economicamente mais viável para o desenvolvimento de novas rotas fermentativas que podem ser otimizadas e escalonadas para processos de biorrefinaria.

Os valores de rendimento ($0,135 \text{ g.g}^{-1}$) e produtividade ($0,379 \text{ g/L.h}^{-1}$) obtidos para as fermentações de hidrolisados de resíduos da fabricação de lápis também foram comparados na Tabela 5.15 na qual observa-se que a levedura *M. guilliermondii* CCT7783 apresentou rendimentos em etanol intermediários àqueles destacados na tabela, sendo estes superiores a outros trabalhos que aplicaram também aplicaram linhagens de *M. guilliermondii*²²⁶, porém inferiores aos resultados obtidos no presente trabalho para as fermentações com hidrolisados de palha de cana-de-açúcar ($0,352 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,674 \text{ g/L.h}^{-1}$), por exemplo, denotando o efeito de inibição gerado por este hidrolisado em relação a palha e salientando a importância da adaptação as condições de estresse nos diferentes hidrolisados lignocelulósicos.

Os parâmetros fermentativos para a coprodução de xilitol também foram calculados e comparados a literatura na Tabela 5.15 e os valores obtidos no presente trabalho assemelham-se a maioria dos resultados dos demais trabalhos com exceção daqueles observados em Medeiros et al.¹²⁹, Shupe e Liu¹⁸⁶ e Bonan et al.²²⁷ que apresentaram os maiores rendimentos em xilitol, porém tais trabalhos foram otimizados e direcionados para a produção de xilitol e o presente trabalho visou condições que direcionassem o metabolismo da levedura para a produção de etanol 2G, sendo o xilitol um produto secundário. Além disso tais trabalhos obtiveram rendimentos extremamente baixos em etanol, sendo o xilitol o produto primário da biossíntese.^{129,186}

Outro aspecto que ser agregado a discussão é que a produção de etanol e xilitol é fortemente influenciada pela quantidade de oxigênio disponível no meio

de cultivo, e por se tratar de experimentos em condições de frascos, a aeração não foi objeto de otimização nesta etapa do estudo, todavia conforme citado na literatura valores ótimos podem ser atingidos com concentrações mínimas de oxigênio necessárias para os processos de transporte viável de xilose e manutenção do equilíbrio redox (microaeração). Sendo o acúmulo de xilitol e a bioprodução de etanol dependente do controle da aeração. Ou seja, resultados ainda mais promissores podem ser obtidos ao se aplicar a linhagem de *M. guilliermondii*, melhorada no presente trabalho em biorreatores com sistemas de controle de oxigênio dissolvido, e condições otimizadas para os demais parâmetros reportados no presente trabalho.

Tabela 5.15 - Parâmetros fermentativos de *M. guilliermondii* CCT7783(311_EN), presente estudo, e leveduras convencionais reportadas na literatura.

Leveduras não convencionais	Substratos e meios de cultivo	Rendimentos $Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)			Produtividade Q_P (g/L.h ⁻¹)		Referência
		Etanol	Xilitol	Etanol	Xilitol		
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> CBMAI 0536	Pentoses e glicose em Hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	n.d.	0,060	n.d.	0,004	[226]	
<i>Pichia butonii</i> 68-1111	Xilose em meio mínimo	n.d.	0,083	n.d.	0,052	[129]	
<i>M. guilliermondii</i> ATM (microaerofilia)	Pentoses e glicose em Hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	n.d.	0.150	n.d.	0.049	[226]	
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	Pentoses em Hidrolisados de Eucalipto	n.d.	0.158	n.d.	0.106	[201]	
<i>M. guilliermondii</i> ITF (microaerofilia)	Pentoses e glicose em Hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	n.d.	0.200	n.d.	0.038	[226]	
<i>Candida intermedia</i> RJ-245	Xilose em meio mínimo	0.013	0.110	0.004	0.138	[129]	
<i>M. guilliermondii</i> BEX INT-P1 20D	Xilose em meio mínimo	0.017	0.025	0.001	0.011	[228]	

<i>M. guilliermondii</i> BEX INT-P1 15D	Xilose em meio mínimo	0.031	0.036	0.002	0.014	[228]
<i>Candida guilliermondii</i> FT-20037	Xilose em meio mínimo	0.039	0.618	0.031	0.138	[129]
<i>Pichia stiptis</i> NRRL Y- 11543	Pentoses e glicose em Hidrolisados de madeira	0.058	0.789	0.050	0.625	[186]
<i>M. guilliermondii</i> BEX INT-P1 21D	Xilose em meio mínimo	0.059	0.468	0.002	0.013	[228]
* <i>M. guilliermondii</i> _CCT77 83 (311_EN)	Pentoses e glicose em Hidrolisados de palha de resíduos de fabricação de lápiz	0.135	0.041	0.379	0.028	Presente estudo
<i>Klaviuromyces fragilis</i> FTI-20066	Xilose em meio mínimo	0.180	0.223	0.073	0.096	[129]
<i>Klaviuromyces marxianus</i> IZ-1821	Xilose em meio mínimo	0.197	0.266	0.077	0.104	[129]
<i>Candida utilis</i> FT- 20039	Xilose em meio mínimo	0.216	0.000	0.079	n.d	[129]

<i>Candida Shehatae</i> FPL-Y-049	Pentoses e glicose em Hidrolisados de madeira	0.350	0.000	0.072	n.e	[195]
^{*M.} <i>guilliermondii</i> CCT77 83 (311_EN)	Pentoses e glicose em Hidrolisados de palha de cana-de-açúcar	0.352	0.168	0.674	0.076	Presente estudo
<i>Spathaspora</i> <i>passalidarum</i>	Pentoses e glicose em Hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar	0.400	0.250	0.730	0.280	[227]
<i>Pichia stiptis</i> 79-26	Xilose em meio mínimo	0.550	0.000	0.458	0.000	[129]

n.d. denominação para valores não detectados

* valores calculados nos intervalos de produção de etanol, 36h para hidrolisados de palha e 48 horas para hidrolisados de resíduos de fabricação de lápis.

6 Conclusões

O crescimento adaptativo natural promoveu melhorias evolutivas nas linhagens da levedura *M. guilliermondii* aumentando a velocidade máxima de crescimento em 78% e a produção de xilitol em 90% gerando linhagens mais eficientes na metabolização de xilose e bioconversão em biomassa e bioprodutos. O estudo dos parâmetros que afetam o crescimento e a biossíntese produziu conhecimentos essenciais para se aplicar *M. guilliermondii* em processos de biorrefinarias de forma economicamente viável. A biossíntese de xilitol é dependente da redução da aeração. Altas concentrações de substrato e biomassa celular são necessárias para a produção de etanol. O metabolismo aeróbio que converte xilose em biomassa celular é mais rápido e pode ser reduzido em condições de hipoxia. A levedura *M. guilliermondii* adaptada foi capaz de metabolizar de 82% a 88% dos açúcares totais nos hidrolisados de palha de cana-de-açúcar e resíduos da fabricação de lápis. Em ambos os hidrolisados os bioprodutos foram etanol 2G e xilitol, sendo o etanol 2G o produto majoritário com rendimento de 48% e 50,92% no hidrolisados de palha de cana-de-açúcar e resíduos da fabricação de lápis, respectivamente. Altas concentrações de substrato são necessárias para a biossíntese eficiente de etanol. A levedura *M. guilliermondii* demonstrou comportamento fermentativo reprodutível em meio sintético e nos dois diferentes hidrolisados testados, sendo as variabilidades estudadas consistentes com as condições e parâmetros experimentais.

7 Referências

- (1) Soares, J. F.; Confortin, T. C.; Todero, I.; Luft, L.; Ugalde, G. A.; Tovar, L. P.; Mayer, F. D.; Mazutti, M. A. Estimation of Bioethanol, Biohydrogen, and Chemicals Production from Biomass Wastes in Brazil. *Clean - Soil, Air, Water*, v. 50, n. 8, 1 ago. **2022**.
- (2) Gursel, I. V.; Quist-Wessel, F.; Langeveld, H.; Kline, L. K.; Slinderland, M.; Grassini, P.; Kwant, k.; Elbersen, W. Variable demand as a means to more sustainable biofuels and biobased materials. *Biofuels, Bioproducts Biorefinery*. 15:15-31, **2021**.- DOI: 10.1002/bbb.2164.
- (3) Ercolano, M. R.; Gomez L. D.; Andolfi A.; Simister, R.; Troise, C.; Angelino G.; Borreli, C.; Mcqueen-Mason, S. J.; Evidente, A.; Frusciante, L.; Caruso, G. Residual biomass saccharification in processing tomato is affected by cultivar and nitrogen fertilization. *Biomass and Bioenergy*. **2015**, 72, 242-250. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.10.030>.
- (4) Vassilev, S. V.; Baxter, D.; Andersen, L. K.; Vassileva, C. G. An overview of the chemical composition of biomass. *Fuel*. **2010**, (89), 913-933.
- (5) Blanch, H. W.; Blake, A. S.; Klein-Marcuschamer, D. Biomass deconstruction to sugars. *Biotechnology J.* **2011**, (6), 1086-1102. DOI 10.1002/biot.201000180
- (6) Antar, M.; Lyu, D.; Nazari, M.; Shah, A.; Zhou, X.; Smith, D. L. Biomass for a sustainable bioeconomy: An overview of world biomass production and utilization *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, 1 abr. **2021**.
- (7) Cho, E. J.; Trinh, L. T. P.; Song, Y.; Lee, Y. G.; Bae, H. J. Bioconversion of biomass waste into high value chemicals *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, 1 fev. **2020**.

- (8) Senad, N.; Zweckmair, T. Renewable resources – green biorefinery: separation of valuable substances from fluid-fractions by means of membrane technology. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*. **2009**, 3: 20-27. DOI:10.1002/bbb.118;
- (9) Jeffries, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*. **2006**, 17: 320-326. [https://doi.org/10.1016.j.copbio.2006.05.008](https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.008).
- (10) Dygas, D.; Janicka, P.; Berlowska, J.; Kregiel, D. Conventional and Unconventional Yeasts Able to Grow on Rapeseed Meal Hydrolysates. *BioResources*, **2022**, 17(2), 3082-3094. DOI: 10.15376/biores.17.2.3082-3094.
- (11) Magoye, E.; Hilber-Bodmer, M.; Pfister, M.; FREIMOSER, F. M. Unconventional yeasts are tolerant to common antifungals, and *aureobasidium pullulans* has low baseline sensitivity to captan, cyprodinil, and difenoconazole. *Antibiotics*, v. 9, n. 9, p. 1–19, 1 set. **2020**.
- (12) Özdenkçi, K.; De Blasio, C.; Muddassar, H. R.; Melin, K.; Oinas, P.; Koskinen, J.; Sarwar, G.; Jarvinen, M. A novel biorefinery integration concept for lignocellulosic biomass. *Energy Conversion and Management*, v. 149, p. 974–987, **2017**.
- (13) Baral, N. R.; Sundstrom, E. R.; Das, L.; Gladden, J.; Eudest, A.; Mortimer, J. C.; Singer, S. W.; Mukhopadhyay A.; Scown, C. D. Approaches for More Efficient Biological Conversion of Lignocellulosic Feedstocks to Biofuels and Bioproducts. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, 7, 9062–9079. DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b01229

- (14) De bhowmick, G.; Sarmah, A. K.; Sen, R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, 1 jan. **2018**.
- (15) Michels, J.; Wagemann, K. The German Lignocellulose Feedstock Biorefinery project. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v. 4, n. 3, p. 263–267, maio **2010**.
- (16) Cherubini, F.; Anders, H. S. Chemicals from lignocellulosic biomass: opportunities, perspectives, and potential of biorefinery systems. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, v 5:548–561 (201 **2011**, 5: 548-561. DOI: 10.1002/bbb.297.
- (17) Ochoa-chacón, A.; Martinez, A.; Poggi-varaldo, H. M.; VILLA-TANACA, L.; RAMOS-VALDIVIA, A. C.; PONCE-NOYOLA, T. Xylose Metabolism in Bioethanol Production: *Saccharomyces cerevisiae* vs Non-*Saccharomyces* Yeasts *Bioenergy Research* Springer, 1 jun. **2022**.
- (18) DOLORES PENDÓN, M.; MADEIRA JR, J. V; ROMANIN, D. E.; RUMBO, M.; GOMBERT, A. K.; GARROTE, G. L. A biorefinery concept for the production of fuel ethanol, probiotic yeast, and whey protein from a by-product of the cheese industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **2021**, 105: 3859-3871. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-021-11278-y>>.
- (19) CHRYSIKOU, L. P.; BEZERGIANNI, S.; KIPARISSIDES, C. Environmental analysis of a lignocellulosic-based biorefinery producing bioethanol and high-added value chemicals. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, v. 28, p. 103–109, 1 ago. **2018**.

- (20) Nachiluk, K. Alta na Produção e Exportações de Açúcar Marcam a Safra 2020/21 de Cana. *Análises e Indicadores do Agronegócio*, São Paulo, v. 16, n. 6, jun. **2021**, p. 1-5. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br/ftpica/AIA/AIA-21-2021.pdf>. Acesso em: 30.03.2023.
- (21) Junior, M. A. U. A.; Valin, H.; Soterroni A. C.; Ramos F. M.; Halog, A. Exploring future scenarios of ethanol demand in Brazil and their land-use implications. *Energy Policy*. 2019, 134, 110958. <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2019.110958>.
- (22) Robak, K.; Balcerek, M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass Food Technology and Biotechnology University of Zagreb, 1 abr. **2018**.
- (23) A expansão da Cana-de-açúcar e a Produção dos demais gêneros na última década: uma análise dos principais estados produtores. *Rev. Econ. NE*, Fortaleza, v. 45, n. 2, p. 88-100, abril/jun., **2014**.
- (24) Silva, Maria Aparecida Moraes Silva. Produção de Alimentos e agrocombustíveis no Contexto da Nova Divisão Mundial do Trabalho. *Revista Pegada*. Vol. 9. N. 1. Junho, **2008**.
- (25) Kumar, B.; Bhardwaj, N.; Agrawl, K.; Chaturvedi, V.; Verma, P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: An emerging biorefinery concept *Fuel Processing Technology* Elsevier B.V., 1 mar. **2020**.
- (26) Roukas, T.; Kotzekidou, P. From food industry wastes to second generation bioethanol: a review *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* Springer Science and Business Media B.V., 1 mar. **2022**.
- (27) Estrada-ávila, A. K.; González-hernández, J. C.; Calahorra, M.; Sánchez, N. S.; Peña, A. Xylose and yeasts: A story beyond xylitol production. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1866, n. 8, 1 ago. **2022**

- (28) Atzmüller, D.; Ullmann, N.; Zwirzitz, A. Identification of genes involved in xylose metabolism of *Meyerozyma guilliermondii* and their genetic engineering for increased xylitol production. *AMB Express*, v. 10, n. 1, 1 dez. **2020**.
- (29) Handumrongkul C, Ma DP, Silva JL (1998) Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (*xy11*) in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 49:399–404. <https://doi.org/10.1007/s002530051189>.
- (30) Sato, T. K.; Hittinger, C. T.; Rosa, C. A. The Brazilian Amazonian rainforest harbors a high diversity of yeasts associated with rotting wood, including many candidates for new yeast species. *Yeast*, 22 fev. **2023**.
- (31) Jain, V.; Ghosh, S. Biotransformation of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview *Biomass Conversion and Biorefinery* Springer Science and Business Media Deutschland GmbH, **2021**.
- (32) Mohamad, N. L.; Mustapa Kamal, S. M.; Mokhtar, M. N. Xylitol Biological Production: A Review of Recent Studies. *Food Reviews International*, v. 31, n. 1, p. 74–89, 2 jan. **2015**.
- (33) Martini, C.; Tauk-Tornisielo, S. M.; Codato, C. B.; Bastos, R. G.; Ceccato-antonini, S. R. A strain of *Meyerozyma guilliermondii* isolated from sugarcane juice is able to grow and ferment pentoses in synthetic and bagasse hydrolysate media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 32, n. 5, 1 maio **2016**.
- (34) Perna, M. S. C.; C. B.; Bastos, R. G.; Ceccato-antonini, S. R. Single and combined effects of acetic acid, furfural, and sugars on the growth of the pentose-fermenting yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *3 Biotech*, v. 8, n. 2, 1 fev. **2018**.

- (35) Patel, S. M.; Chudasama, U. V; Ganeshpure, P. A. Metal(IV) Phosphates as Solid Acid Catalysts for Selective Cyclodehydration of 1,n-Diols. *Green Chem.* **2001**, 3 (3), 143–145. <https://doi.org/10.1039/b100503k>.
- (36) Jain, V., Ghosh, S. Biotransformation of lignocellulosic biomass to xylitol: an overview. *Biomass Conversion and Biorefnery*, **2021**. <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01904-0>.
- (37) CHANDEL, A. K. et al. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions – Review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 6(1), pp. 008-020, **2011**.
- (38) Rech, F. R. Fermentação de xaropes artificiais constituídos de glicose e xilose e de hidrolisados enzimáticos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando leveduras não convencionais e cocultivos. Tese defendida no programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade de Caxias do Sul, Brasil, **2016**.
- (39) Parapouli, M.; Vasileiadis, A.; Afendra, A. S.; Hatziloukas, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications AIMS Microbiology AIMS Press, **2020**.
- (40) Hahn-Hagerdal, B. H.; Jeppsson, K.; Skoog, B. A. Prior, Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts, *Enzym. Microb. Technol.* **1994**, 16: 933–943, [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)90002-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)90002-7).
- (41) Zhao, Z.; Xian, M.; Liu, M.; Zhao, G. Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms *Biotechnology for Biofuels* BioMed Central Ltd., 1 fev. **2020**.
- (42) Guriérrez-rivera, B.; Waliszewski-kubiak, K.; Carvajal-zarrabal, O.; Aguilar-uscanga, M. G. Conversion efficiency of glucose/xylose mixtures for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* ITV01 and *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 87, n. 2, p. 263–270, fev. **2012**.

- (43) Gárdonyi, M.; Jeppsson, M.; Lidén, G.; Gorwa-grauslund, M. F.; Hahn-hagerdal, B. Control of xylose consumption by xylose transport in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 82, n. 7, p. 818–824, 30 jun. **2003**.
- (44) Hu, Y.; Piao, C.; Chen, Y.; Zhou, Y.; Wang, D.; Yu, H.; Xu, B. Soybean residue (okara) fermentation with the yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Food Bioscience*, v. 31, 1 out. **2019**.
- (45) Silva, D. M. et al. Isolation of yeasts that hydrolyze pentoses in the eucalyptus bark as a subsidy to bioethanol production. *Brazilian Journal of Development*, 50226-50238, **2021**.
- (46) Kręgiel D.; Pawlikowska E.; Antolak, H. Non-conventional yeasts in fermentation processes: potentialities and limitations. In: *Old Yeasts - New Questions*. Intech Open. **2017**, 87–116.
- (47) Jefries, T. W, et al. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipiti*. *Nat Biotechnol* 25:319–326, **2007**. <https://doi.org/10.1038/nbt1290>.
- (48) Bader, N. B., Germec, M., Turhan, I. Ethanol production from different medium compositions of rice husk hydrolysate by using *Scheffersomyces stipitis* in a repeated-batch biofilm reactor and its modeling. *Process Biochemistry*. 100:26–38, **2021**. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.018>.
- (49) Gorgens, J. F.; Passoth V.; VanZyl, W. H.; Knoetze, J. H.; Hahn-Hagerdal, B. Amino acid supplementation, controlled oxygen limitation and sequential double induction improves heterologous xylanase production by *Pichia stipitis*. *FEMS Yeast Res*, **2005**, 5:677-683.
- (50) Tanimura, A. et al. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature. *Springerplus*, 1:27, 2012. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-1-27>.

- (51) Knob, A.; Izidoro, S. C.; Lacerda, L. T.; Rodrigues, A.; de Lima, V. A. A novel lipolytic yeast *Meyerozyma guilliermondii*: Efficient and low-cost production of acid and promising feed lipase using cheese whey. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 24, 1 mar. **2020**.
- (52) Cletus P. Kurtzman, Motofumi Suzuki, Phylogenetic analysis of ascomycete yeasts that form coenzyme Q-9 and the proposal of the new genera *Babjeviella*, *Meyerozyma*, *Millerozyma*, *Priceomyces*, and *Scheffersomyces*, *Mycoscience*, Volume 51, Issue 1, 2010, Pages 2-14, ISSN 1340-3540, <https://doi.org/10.1007/S10267-009-0011-5>.
- (53) Kurtzman, C. P. DNA Relatedness Among Phenotypically Similar Species of *Pichia*, *Mycologia*. 1992 84:1, 72-76, DOI:0.1080/00275514.1992.12026105.
- (54) Coudavault, V.; Milllerieux, Y.; Clastre, M.; Simkin, A. J.; Marais, E.; Crechè, J.; Giglioli-guivarc'h, N.; Papon, N. Fluorescent protein fusions in *Candida guilliermondii*. *Fungal Genetics and Biology*, v. 48, n. 11, p. 1004–1011, nov. **2011**.
- (55) Fu, Y.; Yang, Q.; Solairaj, D.; Godana, E. A.; Routledge, M. N.; Zhang, H. Biodegradation of mycotoxin patulin by the yeast *Meyerozyma guilliermondii*. *Biological Control*, v. 160, 1 set. **2021**.
- (56) Yan, W.; Gao, H.; Qian, X.; Jiang, Y.; Zhou, J.; Dong, W.; Xin, F.; Zhang, W.; Jiang, M. Biotechnological applications of the non-conventional yeast *Meyerozyma guilliermondii* *Biotechnology Advances Elsevier Inc.*, 1 jan. **2021**.
- (57) Roseiro, J. C.; Peito, M. A.; Girio, F. M.; Amaral-colla, M. T. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaryomyces hansenii* *Arch Microbiol*. **1991**, 156: 484-490.

- (58) Petek, Z. C. et al. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties. Minireview. FEMS Yeast Research, 171–182, 2012. Doi: 10.1111/j.1567-1364.2011.00775.x.
- (59) Keller, B.; Zölzer, F.; Kiefer, J. Mutation Induction in Haploid Yeast after Split-Dose Radiation Exposure. II. Combination of UV-Irradiation and X-Rays. Environmental and Molecular Mutagenesis, v. 43, n. 1, p. 28–35, **2004**.
- (60) Siddique, S.; Syed, Q.; Adnan, A.; Qureshi, F. A. Production and screening of high yield avermectin B1b mutant of *Streptomyces avermitilis* 41445 through mutagenesis. Jundishapur Journal of Microbiology, v. 7, n. 2, **2014**.
- (61) White, C.I.; Sedgwick, S. G. Induced cellular resistance to ultraviolet light in *Saccharomyces cerevisiae* is not accomplished by increased repair of plasmid DNA. Curr Genet, **1987**, 11:321–326.
- (62) Zhao, Y.; Goriparthi, L.; Lieberman, H. B. A new shuttle vector system for the identification of spontaneous and radiation-induced mutations in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* Mutation Research. **1994**, 311: 111-123.
- (63) Slininger, P. J., Shea-Andersh, M. A., Thompson, S. R., Dien, B. S., Kurtzman, C. P., Sousa, L. D. C., Balan, V. Techniques for the Evolution of Robust Pentose-fermenting Yeast for Bioconversion of Lignocellulose to Ethanol. J. Vis. Exp. (116), e54227, doi:10.3791/54227 (**2016**).
- (64) Tekarslan-Sahin, S. H. Adaptive Laboratory Evolution of Yeasts for Aroma Compound Production Fermentation MDPI, 1 ago. **2022**.
- (65) Hughes, S. R.; Gibbons, W. R.; Bang, S. S.; Pinkelman, R.; Bischof, K. M.; Slininger, P. J.; Qureshi, N.; Kurtzman, C. P.; Liu, S.; Saha, B. C.; Jackson, J. S.; Cotta, M. A.; Rich, J. O.; Javers, J. E. Random UV-C mutagenesis of *Scheversomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 39, n. 1, p. 163–173, jan. **2012**.

- (66) Zart, V.; Souza, C.; Peralta, R.; Castoldi, R. Etanol 1,5g: Uma Discussão Sobre A Integração Entre O Etanol De Primeira E Segunda Geração. *International Journal Education and Teaching*, **2020**.
- (67) Hou, J.; Zhang, X.; Liu, S.; Zhang, S.; Zhang, Q. A Critical Review on Bioethanol and Biochar Production from Lignocellulosic Biomass and Their Combined Application in Generation of High-Value Byproducts. *Energy Technol.* **2020**, 8. <https://doi.org/10.1002/ente.202000025>.
- (68) Clark, J. H.; Luque, R.; Matharu, A. S. Green chemistry, biofuels, and biorefinery *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* jul. **2012**.
- (69) P Chirat, C. Use of vegetal biomass for biofuels and bioenergy. Competition with the production of bioproducts and materials? *Comptes Rendus Physique Elsevier Masson s.r.l.*, 1 set. **2017**.
- (70) Augusto, J.; Rodrigues, R. Do Engenho À Biorrefinaria. A Usina De Açúcar Como Empreendimento Industrial Para A Geração De Produtos Bioquímicos E Biocombustíveis *Quim. Nova.* **2011**, 34 (7), 1242-1254.
- (71) Sun, Y. et al. Metabolic and evolutionary engineering of Diploid Yeast for the production of first- and second-generation ethanol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. doi: 10.3389/fbioe.2021.835928.
- (72) Raghavendran, V.; Basso, T. P.; Da Silva, J. B.; Basso, L. C.; Gombert, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 110, n. 7, p. 971–983, 1 jul. **2017**.
- (73) Dilascio, MD. et al. Technological Monitoring of Second Generation Ethanol Patents. *Revista Geintec-Gestão Inovação e Tecnologias*, 10: 55353-5566, 2020. doi: 10.7198/geintec.v10i3.1441

- (74) Gallo, J. M. R.; Trapp, M. The Chemical Conversion of Biomass-Derived Saccharides: an Overview. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 28, No. 9, 1586-1607, **2017**. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170009>.
- (75) Favaro, L.; Basaglia, M.; Trento, A.; Van Rensburg, E.; García-Aparicio, M.; Van Zyl, W. H.; Casella, S. Exploring grape marc as trove for new thermotolerant and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation bioethanol production. **2013**, 6:168. Disponível em: <<http://www.biotechnologyforbiofuels.com/content/6/1/168>>.
- (76) SIDANA, A.; KAUR, S.; YADAV, S. K. Assessment of the ability of *Meyerozyma guilliermondii* P14 to produce second-generation bioethanol from giant reed (*Arundo donax*) biomass. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **2022**.
- (77) Delgado Arcaño, Y.; Valmaña García, O. D.; Mandelli, D.; Carvalho, W. A.; Magalhães Pontes, L. A. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route *Catalysis Today Elsevier B.V.*, 15 mar. **2020**.
- (78) PARACHIN, N. S., ALMEIDA, J. R. M. In *Microrganismos na Produção de biocombustíveis Líquidos*; Machado, C. M. M. (Edt.); Embrapa: Brasília, **2013**, p. 189.
- (79) Kim, Jh. et al. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass. *Applied Microbiologic Biotechnology*, 88:1077–1085, **2010**. DOI 10.1007/s00253-010-2839-1.
- (80) Acosta, J. Universidad de Sonora Biotechnological production of xylitol from agricultural waste *Producción biotecnológica de xilitol a partir de residuos agrícolas*. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. VXXII (1): 126-134. **2020**. Disponível em: <<http://biotecnia.unison.mx>>.

- (81) Tochampa, W.; Sirisansaneeyakul, S.; Vanichsriratana, W.; Srinophakun, P.; Baker, H.H.C.; Chisti, Y. A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2005**, 28, 175–183.
- (82) Hernández-Pérez, Vaz de Arruda, P.; Sene, L.; Silvério da Silva, S.; Chandel, A. K.; de Almeida Felipe, M.Z. Xylitol bioproduction: state-of-the-art, industrial paradigm shift, and opportunities for integrated biorefineries. *Critical Reviews in Biotechnology*, **2019** 39:7, 924-943, DOI: 10.1080/07388551.2019.164065. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1640658>.
- (83) Rafiqul, I. S. M.; Sakinah, A. M. M. Processes for the Production of Xylitol- A Review *Food Reviews International*. **2013**, 29:2, 127-156, DOI:10.1080/87559129.2012.714434.
- (84) Martínez, E. A.; Canettieri, E. V.; Bispo, J. A. C.; Giulietti, M.; De Almeida E Silva, J. B.; Converti, A. Strategies for xylitol purification and Crystallization: A review *Separation Science and Technology (Philadelphia)* Taylor and Francis Inc., **2015**. 50:14, 2087-2098, DOI:10.1080/01496395.2015.1009115.
- (85) Ko, C. H.; Chiang, P. N.; Chiu, P. C.; Liu, C. C.; Yang, C. L.; Shiau, I. L. Integrated xylitol production by fermentation of hardwood wastes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 83, n. 4, p. 534–540, abr. **2008**.
- (86) Venkateswar Rao, L.; Goli, J. K.; Gentela, J.; Koti, S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, 1 ago. **2016**.
- (87) Zahoor, F.; Sooklim, C.; Songdech, P.; Duangpakdee, O.; Soontorngun, N. Selection of potential yeast probiotics and a cell factory for xylitol or acid production from honeybee samples. *Metabolites*, v. 11, n. 5, 1 maio **2021**.

- (88) Basanta R.; García Delgado, M. A.; Cervantes Martínez, J. E.; Mata Vázquez, H.; Bustos Vázquez, G. Sostenibilidad Del Reciclaje De Residuos De La Agroindustria Azucarera: Una Revisión Sustainable Recycling Of Waste From Sugarcane Agroindustry: A Review, *Cyta . Journal of Food*, **2007**, 5:4, 293-305, DOI:10.1080/11358120709487704. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/11358120709487704>.
- (89) Gupta, V. K.; Kumar, V. Valorisation of xylose to renewable fuels and chemicals, an essential step in augmenting the commercial viability of lignocellulosic biorefineries *Sustainable Energy and Fuels* Royal Society of Chemistry, 7 jan. **2022**.
- (90) Pal, S.; Mondal, A. K.; Sahoo, D. K. Molecular strategies for enhancing microbial production of xylitol. *Process Biochemistry*. **2016**, 51:809–819. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2016.03.017>.
- (91) Guo, C.; Zhao, C.; He, P.; Lu, D.; Shen, A.; Jiang, N. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. *Journal of Applied Microbiology*, v. 101, n. 5, p. 1096–1104, nov. **2006**.
- (92) Carneiro, C. V. G. C.; E Silva, F. C. De P.; Almeida, J. R. M. Xylitol production: Identification and comparison of new producing yeasts. *Microorganisms*, v. 7, n. 11, 1 nov. **2019**.
- (93) Parajo, J.C.; Dominguez, H.; Dominguez, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresour. Technol.* **1998**, 66, 25–40.
- (94) Granström, T.B.; Izumori, K.; Leisola, M. A rare sugar xylitol. Part II: Biotechnological production and future applications of xylitol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 74, 273–276.
- (95) Wang, D. et al. Fermentation Kinetics of Different Sugars by Apple Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing*, **2004**.

- (96) Snoep, J. et al. Control of specific growth rate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 155, 1699–1707, **2009**. DOI 10.1099/mic.0.023119-0.
- (97) Paixão, J. N. V. Estudo de metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* para produção de glutatona utilizando melaço de beterraba. Dissertação defendida na Universidade Federal de Goiás, Brasil, **2018**.
- (98) Yablochkova, E. N.; Bolotnikova, O. I.; Mikhailova, N. P.; Nemova, N. N.; Ginak, A. I. The Activity of Key Enzymes in Xylose-Assimilating Yeasts at Different Rates of Oxygen Transfer to the Fermentation Medium. *Microbiology*, Vol. 73, No. 2, **2004**, 129-133.
- (99) Branco, R. F.; dos Santo, J. C.; Sarrouh, B. F.; Rivaldi, J. D.; Pessoa Jr, A.; da Silva, S. S. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. *J Chem Technol Biotechnology*, **2009**; 84: 326–330.
- (100) Silva, J. P. A.; Mussatto, S. I.; Roberto, I. C.; Teixeira, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 259–265, jan. **2012**.
- (101) Bonan, C. I. D. G.; Biazi, L. E.; Dionísio, S. R.; Soares, L. B.; Tramontina, R.; Sousa, A. S.; De Oliveira Filho, C. A.; Costa, A. C.; Ienczak, J. L. Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited-oxygen conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 43, n. 8, p. 1509–1519, 1 ago. **2020**.

- (102) Cheng, K. K.; Ling, H. -Z.; Zhang, -A.; Ping, -X.; Huang, W.; Ge & J, J. -P.; Xu, -M. Strain Isolation and Study on Process Parameters for Xylose-to-Xylitol Bioconversion, *Bioconversion, Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **2010**, 24:1, 1606-1611, DOI: 10.2478/V10133-010-0013-7.
- (103) Du Preez, J.C.; van Driessel, B.; Prior, B. A. Effect of Aerobiosis on Fermentation and Key Enzyme Levels during Growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Candida tenuis* on D-Xylose. *Arch. Microbiol.*, **1989**, vol. 152, pp. 143–147.
- (104) Michel, A. C. S. Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casaca de soja. Dissertação apresentada na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, **2018**.
- (105) Galafassi, S. Dekkera/Brettanomyces yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 38:1079–1088, **2011**. Doi; 10.1007/s10295-010-0885-4.
- (106) Milessi, T. S. S. et al. Effect of dissolved oxygen and inoculum concentration on xylose reductase production from *Candida guilliermondii* using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. *Food and Nutrition Sciences*, 2, 235-240, **2011**. Doi:10.4236/fns.2011.23033.
- (107) Signori, L. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. *Microbial Cell Factories*, 13:51, **2014**.
- (108) Hor, S. et al. Sugarcane Bagasse-Based Ethanol Production and Utilization of Its Vinasse for Xylitol Production as an Approach in Integrated Biorefinery. *Fermentation*, 8, 340, **2022**. <https://doi.org/10.3390/fermentation8070340>.

- (109) Mardawati, E. et al. Effects of substrate concentration on bioethanol production from oil palm empty fruit bunches with simultaneous saccharification and fermentation (SSF). *Earth and Environmental Science*, 230:012079, **2019**. doi:10.1088/1755-1315/230/1/012079.
- (110) Barathikannan, Kaliyan, AGASTIAN, P. Xylitol: Production, Optimization and Industrial Application. *International Journal of Currenty Microbiological Applied Science*, 5(9): 324-339, **2016**.
- (111) Krahulec, S. et al. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. *Microbial Cell Factories*, 9:16, **2010**.
- (112) Mardawati, E. Microbial Production of Xylitol from Oil Palm Empty Fruit Bunches Hydrolysate: The Effect of Glucose Concentration. *Journal of the Japan Institute of Energy*, 94, 769-774, **2015**.
- (113) Bravo, V.; Camacho, F.; Sanchez, S.; Castro, E. Influence of the Concentrations of D-Xylose and Yeast Extract on Ethanol Production by *Pachyolen tannophilus*. *Journal Of Fermentation And Bioengineering*. vol. 79, No. 6, 566-571. **1995**.
- (114) Zhang, W.; Geng, A. Improved ethanol production by a xylosefermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method. *Biotechnology for Biofuels* **2012**, 5:46.
- (115) Lee, S. B.; Tremaine, M.; Place, M.; Liu, L.; Pier, A.; Krause, D. J.; Xie, D.; Zhang, Y.; Landick, R.; Gasch, A. P.; Hittinger, C. T.; Sato, T. K. Crabtree/Warburg-like aerobic xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, v. 68, p. 119–130, 1 nov. **2021**.

- (116) Silva, R. O, Serpa, M. N. Broda, F. C. A. Influence Of Agitation And Aeration On Xylitol Production By The Yeast *Starmerella meliponinoru*. *Química Nova*, 705-710, 2020. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170541>
- (117) Rodmui, A. Optimization of Agitation Conditions for Maximum Ethanol Production by Coculture. *Kasetsart J. Natural Science*, 42:285 – 293, 2008.
- (118) Prabhu, A. et al. Enhanced xylitol production using non-detoxified xylose rich pre-hydrolysate from sugarcane bagasse by newly isolated *Pichia* ferments. *Biotechnology Biofuels*, 13:209, 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01845-2>.
- (119) Agbogbo, F. K.; Coward-Kelly, G.; Torry-Smith, M.; Wenger, K.; Jeffries, T. W. The Effect of Initial Cell Concentration on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 136-140, **2007**.
- (120) Saputra, H. Et Al. Efficiency of xylitol production from *Meyerozyma caribbica* Y67 with cell initiation and volume fermentation. *Earth and Environmental Science*, 439:012032, 2020. doi:10.1088/1755-1315/439/1/012032.
- (121) Mussatto, S. I., Roberto, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rate. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 331–337, **2003**.
- (122) Souza, R. B. A. Estudo do pré-tratamento hidrotérmico e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. Tese defendida na Universidade Federal de São Carlos, Brasil, 2016.
- (123) Capolupo, L., Faraco, V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiological Biotechnology*, 100:9451–9467, 2016. Doi 10.1007/s00253-016-7884-y.

- (124) Silva Junior, I. J. Pré-tratamento alcalino e hidrólise enzimática da palha de cana-de-açúcar. Trabalho de conclusão de curso apresentado na Universidade Federal de Paraíba, Brasil, 2018.
- (125) Ogeda, T. L.; Petri, D. F. S. Hidrólise Enzimática De Biomassa Quim. Nova. Vol. 33, No. 7, 1549-1558, **2010**.
- (126) Moreno, A. D.; Carbone, A.; Pavone, R.; Olsson, L.; Geijer, C. Evolutionary engineered *Candida intermedia* exhibits improved xylose utilization and robustness to lignocellulose-derived inhibitors and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 103, n. 3, p. 1405–1416, 1 fev. **2019**.
- (127) Bastos, R. G. Coleção UAB – UFSCar Tecnologia das fermentações fundamentos de bioprocessos. Udufscar. 2015. Disponível em: <www.editora.ufscar.br>.
- (128) Mendes, F. M.; Laurito, D. F.; Bazzeggio, M.; Ferraz, A.; Milagres, A. M. F. Enzymatic digestion of alkaline-sulfite pretreated sugar cane bagasse and its correlation with the chemical and structural changes occurring during the pretreatment step. *Biotechnology Progress*, v. 29, n. 4, p. 890–895, jul. **2013**.
- (129) Tm, M. F. S. B.; De Medeiros, M. B.; De Mancilha, I. M.; Schneider, H.; Lee B, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, 3 (1988) 241-251. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jimb/article/3/4/241/5987315>>.
- (130) Lukajtis, R.; Rybarczyk, P.; Kucharska, K.; Konopacka-Lyskawa, D.; Słupek, E.; Wychodnik, K.; Kamiński, M. Optimization of saccharification conditions of lignocellulosic biomass under alkaline pre-treatment and enzymatic hydrolysis. *Energies*, v. 11, n. 4, 1 abr. **2018**.

- (131) Moubarik, A.; Grimi, N.; Boussetta, N.; Pizzi, A. Isolation and characterization of lignin from Moroccan sugar cane bagasse: Production of lignin-phenol-formaldehyde wood adhesive. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 296–302, fev. **2013**.
- (132) Pereira, F. M. V.; Pereira-Filho, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. *Quim. Nova*, Vol. 41, No. 9, 1061-1071, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170254>.
- (133) Barbosa, M. F. S.; Medeiros, M. B.; De Mancilha, I. M.; Schneider, H.; Lee, H. Screening of Yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology*, **1988**, 3, 241-251.
- (134) Tomé, D. Yeast Extracts: Nutritional and Flavoring Food Ingredients. *Food Science and Technology American Chemical Society*, **2021**, 1, 487-494. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.0c00131>.
- (135) Ramírez-Castrillón M.; Jaramillo-García V.P.; Rosa P.D.; Landell, M. F.; Vu, D.; Fabricio, M. F.; MAZ, A.; Robert, V.; Henriques, J.; Valente, P. The Oleaginous Yeast *Meyerozyma guilliermondii* BI281A as a New Potential Biodiesel Feedstock: Selection and Lipid Production Optimization. *Front. Microbiol.* **2017**, 8:1776. doi: 10.3389/fmicb.2017.01776
- (136) Ginovart, M.; Prats, C.; Portell, X.; Silbert, M. Exploring the lag phase and growth initiation of a yeast culture by means of an individual-based model. *Food Microbiology*, v. 28, n. 4, p. 810–817, jun. **2011**.
- (137) Jomdecha, C.; Prateepasen, A. Effects of pulse ultrasonic irradiation on the lag phase of *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Letters in Applied Microbiology*, v. 52, n. 1, p. 62–69, jan. **2011**.

- (138) Sharma, K. N.; Shuvashish, B.; Arora, R.; Kumar, S. Enhancement in xylose utilization using *Kluyveromyces marxianus* NIRE-K1 through evolutionary adaptation approach. *Bioprocess Biosyst Eng.* **2016**, 39:835–843.
- (139) Matsushika, A.; Oguri, E.; Sawayama, S. Evolutionary adaptation of recombinant shochu yeast for improved xylose utilization. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 110, n. 1, p. 102–105, jul. **2010**
- (140) Promdonkoy, P.; Sornlek, W.; Preechakul, T.; Tanapongpipat, S.; Runguphan, W. Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Production of Fragrant Terpenoids from Agarwood and Sandalwood. *Fermentation*, v. 8, n. 9, 1 set. **2022**.
- (141) Kuyper, M.; Hartog, M. M. P.; Toirkens, M. J.; Almering, M. J. H.; Winkler, A. A.; Van Dijken, J. P.; Pronk, J. T. Metabolic engineering of a xylose-isomerase-expressing *Saccharomyces cerevisiae* strain for rapid anaerobic xylose fermentation. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 4–5, p. 399–409, fev. **2005**.
- (142) A.; Castro Martínez, C.; Ivonne Beltrán-Arredondo, L.; Rocío Hernández-Leyva, S.; Eduardo Maldonado-Mendoza, I.; Reyes-Moreno, C.; Contreras-Andrade, I.; Castro-Martínez, C. Valorisation of agroindustrial residues acid hydrolyzates as carbon sources for ethanol production by native yeast strains with different fermentative capabilities. *revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*. XXII (2): 78-87, **2020**. Disponível em: <<http://biotecnia.unison.mx>>.
- (143) Da Silveira, F. A.; Fernandes, T. A. R.; Bragança, C. R. S.; Balbino, T. R.; Diniz, R. H. S.; Passos, F. M. L.; Da Silveira, W. B. Isolation of xylose-assimilating yeasts and optimization of xylitol production by a new *Meyerozyma guilliermondii* strain. *International Microbiology*, v. 23, n. 2, p. 325–334, 1 maio **2020**.

- (144) Bhavana, B. K.; Sandeep, N.; Mudliar, V.; Bokade, V.; Debnath, S. Effect of furfural, acetic acid and 5-hydroxymethylfurfural on yeast growth and xylitol fermentation using *Pichia stipitis* NCIM 3497. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **2022**. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-02758-w>.
- (145) Manaf, S. F. A.; Luthfi, A. A. I.; Tan, J. P.; Abdul, P. M.; Jamali, N. S. Kinetic study and model of fermentation parameters affected growth and xylitol production in bioreactor by *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36,907. *Biomass Conversion and Biorefinery*, **2022**.
- (146) Du Preez, J. C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts. *Enzyme Microbiology Technology*, Vol. 16, **1994**.
- (147) Cao, N. J.; Tang, R.; Gong, C. S.; Chen, L. F. The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 45, 515–519, **1994**. <https://doi.org/10.1007/BF02941826>
- (148) Srivani, K.; Pydi Setty, Y. Parametric optimization of xylitol production from xylose by fermentation. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, v. 7, n. SUPPL. 3, ago. **2012**.
- (149) Rosa, S. M. A.; Feupe, M. G. A.; Silva, S. S.; Vitolo, M. X ylose Reductase Production *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 70-72, **1998**.
- (150) Su, Y. K.; Willis, L. B.; Jeffries, T. W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnol Bioeng*. **2015**, 112, 3:457–469. <https://doi.org/10.1002/bit.25445>.

- (151) Veras, H. C. T.; Parachin, N. S.; Almeida, J. R. M. Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. *Microbial Cell Factories*, v. 16, n. 1, 13 set. **2017**.
- (152) Aguiar, W. B.; Faria, F. F.; Couto, M. A. P. G.; Araujo, O. Q. F.; Pereira, N. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from d-xylose by *C. guilliermondii* *Biochemical Engineering Journal*. 12, 49-59, **2002**.
- (153) Silva, J. P. A.; Mussatto, S. I.; Roberto, I. C.; Teixeira, J. A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. *Renewable Energy*, v. 37, n. 1, p. 259–265, jan. **2012**.
- (154) Badal, C. S.; Kennedy, G. J. Optimization of xylitol production from xylose by a novel arabitol limited co-producing *Barnettozyma populi* NRRL Y-12728. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **2021**, 51:8, 761-768, DOI: 10.1080/10826068.2020.1855443
- (155) Antonieta, M.; Gimenes, P.; Cláudio, L.; Carlos, S.; Faria, L. F. F.; Pereira, N. Oxygen Uptake Rate in Production of Xylitol by *Candida guilliermondii* with Different Aeration Rates and Initial Xylose Concentrations *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Vols. 98-100, **2002**.
- (156) Winkelhausen, E.; Amartey, A.; Kuzmanova, S. Xylitol Production from D-Xylose at Different Oxygen Transfer Coefficients in a Batch Bioreactor. *Eng. Life Sci.* **2004**, 4, No.2. DOI:10.1002/elsc.200420023.
- (157) Oh, D.-K.; Kim, S.-Y. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 50:419-425, **1998**.

- (158) 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*, 25 fev. **2016**.
- (159) Dominguez, J.M.; Cao, N.; Gong, C.S.; Tsao, G.T. Dilute acid hemicellulosic hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Bioresource Technol.* **1997**, 6, 85–90.
- (160) Faria, L. F. F.; Gimenes, M. A. P.; Nobrega, R.; Pereira Jr, N. Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2002**, 98, 449–458. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1385/ABAB:98-100:1-9:449>.
- (161) Mussatto, S. I.; Roberto, I. C. Establishment of the optimum initial xylose concentration and nutritional supplementation of brewer's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Process Biochemistry*, v. 43, n. 5, p. 540–546, maio **2008**.
- (162) Lorliam, W.; Akaracharanya, A.; Krajangsang, S.; Tolieng, V.; Tanasupawat, S. Optimization of xylitol production by *Candida tropicalis* A26. *Chiang Mai Journal of Science*. **2017**, 44, 1:50-8.
- (163) Bravo, V.; Camacho, F.; Sgnchez, S.; Castro, M. The influence of the initial concentrations of glucose and yeast extract on the ethanolic fermentation by *P. fannophilus*. *Collect.Cz ech. Chem. Commun.*, 55, 854-866, **1990**.
- (164) Parajó, J. C.; Domínguez, H.; Domínguez, J. M. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. *Biotechnol Lett.* **1996**, 18, 593–598. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/BF00140209>

- (165) Matsushika, A.; Sawayama, S. Effect of Initial Cell Concentration on Ethanol Production by Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* with Xylose-Fermenting Ability. *Appl Biochem Biotechnol* 162, 1952–1960, **2010**. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-010-8972-6>
- (166) Schirmer-Michel, Â. C.; Flôres, S. H.; Hertz, P. F.; Ayub, M. A. Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 84, n. 2, p. 223–228, **2009**.
- (167) Vandeska, E.; Amartey, S.; Kuzmanova, S.; JEFFRIES, T. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 11. 213-218. **1995**.
- (168) Olsson, L.; Hahn-Higerdal, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 18:312-331, **1996**.
- (169) Nijland, J. G.; Shin, H. Y.; Boender, L. G. M.; De Waal, P. P.; Klaassen, P.; Driessen, A. J. M. Improved Xylose Metabolism by a CYC8 Mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 83, **2017**. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00095-17>.
- (170) Zhang, Y.; Li, M.; Wang, Y.; Ji, X.; Zhang, L.; Hou, L. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation coupled with adsorption. *Bioresource Technology*, v. 197, p. 276–283, 1 dez. **2015**.
- (171) Sarkar, P.; Mukherjee, M.; Goswami, G.; Das, D. Adaptive laboratory evolution induced novel mutations in *Zymomonas mobilis* ATCC ZW658: a potential platform for co-utilization of glucose and xylose. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 47, n. 3, p. 329–341, 1 mar. **2020**.

- (172) Steinbach, D.; Kruse, A.; Sauer, J. Pretreatment technologies of lignocellulosic biomass in water in view of furfural and 5-hydroxymethylfurfural production- A review. *Biomass Conversion and Biorefinery*, v. 7, n. 2, p. 247–274, 1 jun. **2017**.
- (173) Chu, Q.; Song, K.; Bu, Q.; Hu, J.; Li, F.; Wang, J.; Chen, A.; Shi, A. Two-stage pretreatment with alkaline sulphonation and steam treatment of Eucalyptus woody biomass to enhance its enzymatic digestibility for bioethanol production, *Energy Conversion and Management*, **2018**, 175, 236-245. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2018.08.100>.
- (174) J Grootjen, D. R.; J M Van Der Lans, R. G.; Ch M Luyben, K. A. Conversion of glucose/xylose mixtures by *Pichia stipitis* under oxygen-limited conditions. *Enzyme Microbial Technology*, **1991**, vol. 13.
- (175) Sedlak, M.; Ho, N. W. Y. Characterization of the effectiveness of hexose transporters for transporting xylose during glucose and xylose co-fermentation by a recombinant *Saccharomyces* yeast. *Yeast*, v. 21, n. 8, p. 671–684, jun. **2004**.
- (176) Nijland, J. G.; Shin, H. Y.; De Jong, R. M.; De Waal, P. P.; Klaassen, P.; Driessen, A. J. M. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific D-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, v. 7, n. 1, **2014**.
- (177) Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Hahn-Hägerdal, B. L-Arabinose metabolism in *Candida arabino fermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: Influence of sugar and oxygen on product formation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 75, n. 2, p. 303–310, maio **2007**.

- (178) Verho, R.; Putkonen, M.; Londesborough, J.; Penttilä, M.; Richard, P. A Novel NADH-Linked L-Xylulose Reductase in the L-Arabinose Catabolic Pathway of Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, v. 279, n. 15, p. 14746–14751, 9 abr. **2004**.
- (179) Sharma, S.; Arora, A. Tracking strategic developments for conferring xylose utilization/fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* *Annals of Microbiology BioMed Central Ltd*, 7 ago. **2020**.
- (180) De Menezes, F. F.; Rencoret, J.; Nakanishi, S. C.; Nascimento, V. M.; Silva, V. F. N.; Gutiérrez, A.; Del Río, J. C.; De Moraes Rocha, G. J. Alkaline Pretreatment Severity Leads to Different Lignin Applications in Sugar Cane Biorefineries. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 5, n. 7, p. 5702–5712, 3 jul. **2017**.
- (181) Xiong M.; Chen, G.; Barford, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations, *Bioresource Technology*, **2011**, 102, 9206-9215. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.058>.
- (182) Zhang, W.; Mao, Y.; Liu, Z.; Wang, M. Ethanol Production from *Colpomenia sinuosa* by an Alginate Fermentation Strain *Meyerozyma guilliermondii*. *Indian Journal of Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 112–122, 1 mar. **2022**.
- (183) Sene, L.; Arruda, P. V.; Oliveira, S. M.; Felipe, M. G. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. *Brazilian Journal of Microbiology*. **2011**, 42:1141-6.
- (184) Liu, G. L.; Fu, G. Y.; Chi, Z.; Chi, Z. M. Enhanced expression of the codon-optimized exo-inulinase gene from the yeast *Meyerozyma guilliermondii* in *Saccharomyces sp.* W0 and bioethanol production from inulin. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 21, p. 9129–9138, 16 out. **2014**.

- (185) Unrean, P.; Ketsub, N. Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse, *Industrial Crops and Products*, **2018**, 123, 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.06.071>.
- (186) Shupe, A. M.; Liu, S. Ethanol fermentation from hydrolysed hot-water wood extracts by pentose fermenting yeasts. *Biomass and Bioenergy*, v. 39, p. 31–38, abr. **2012**.
- (187) Tang, Y.; An, M.; Liu, K.; Nagai, S.; Shigematsu, T.; Morimura, S.; Kida, K. Ethanol production from acid hydrolysate of wood biomass using the flocculating yeast *Saccharomyces cerevisiae* strain KF-7. *Process Biochemistry*, v. 41, n. 4, p. 909–914, abr. **2006**.
- (188) Zhu, M.; Xu, W.; Li, X. Bioconversion of different paper sludge to ethanol by yeast using separate hydrolysis and fermentation. Em: Proceedings of 2012 International Conference on Biobase Material Science and Engineering, **2012**. p. 141–145.
- (189) Lara, C. A.; Santos, R. O.; Cadete, R. M.; Ferreira, C.; Marques, S.; Gírio, F.; Oliveira, E. S.; Rosa, C. A.; Fonseca, C. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, v. 105, n. 6, p. 1107–1119, **2014**.
- (190) Dalli, S. S.; Da Silva, S. S.; Uprety, B. K.; Rakshit, S. K. Enhanced Production of Xylitol from Poplar Wood Hydrolysates Through a Sustainable Process Using Immobilized New Strain *Candida tropicalis* UFMG BX 12-a. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 182, n. 3, p. 1053–1064, 1 jul. **2017**.
- (191) Delgenes, J. P.; Escare, M. C.; Laplace, J. M.; Moletta, R.; Navarro, J. M. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems *Industrial Crops and Products*. *Industrial Corps and Products*, 1, **1998**, 101-111.

- (192) Domínguez, J. M.; Cruz, J. M.; Roca, E.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. Xylitol Production from Wood Hydrolyzates by Entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* Cells. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **81**, **1999**.
- (193) Miura, M.; Shimotori, Y.; Nakatani, H.; Harada A.; Masakazu, A. Bioconversion of Birch Wood Hemicellulose Hydrolyzate to Xylitol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2015**, *176*, 947–955. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-015-1604-4>
- (194) Kwon, S. G.; Park, S. W.; Oh, D. K. Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2006**, *101*:13–18.
- (195) Sreenath, H. K.; Jeffries, T. W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts, *Bioresources Technology* *72*, 253-260, **2000**.
- (196) Diz, J.; Cruz, J. M.; Domínguez, H.; Parajó, J. C. Xylitol production from eucalyptus wood hydrolysates in low-cost fermentation media. *Food Technology and Biotechnology*. **2002**, *25*; *40*(3):191-7.
- (197) Gurpilhares, D. B.; Hasmann, F. A.; Pessoa, A.; Roberto, I. C. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. *36*, n. *1*, p. 87–93, jan. **2009**.
- (198) Da Cunha-Pereira, F.; Hickert, L. R.; Rech, R.; Dillon, A. P.; Záchia Ayub, M. A. Fermentation of hexoses and pentoses from hydrolyzed soybean hull into ethanol and xylitol by *Candida guilliermondii* BL 13. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. *34*, n. *4*, p. 927–936, 1 out. **2017**.

- (199) Johnson, E.; Sarchami, T.; Kiesslich, S.; Munch, G.; Rehmann, L. Consolidating biofuel platforms through the fermentative bioconversion of crude glycerol to butanol *World Journal of Microbiology and Biotechnology* Springer Netherlands, 1 jun. **2016**.
- (200) Xiros, C.; Olsson, L. Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Biomass and Bioenergy*, v. 65, p. 79–90, **2014**.
- (201) Vieira Canettieri, E.; Batista De Almeida E Silva, J.; Das Graças, M.; Felipe, A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 38, n.3, jul./set., **2001**.
- (202) Aranda-Barradas, J. S.; Garibay-Orijel, C.; Badillo-Corona, J. A.; Salgado-Manjarrez, E. A stoichiometric analysis of biological xylitol production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 50, n. 1–2, p. 1–9, 15 jun. **2010**.
- (203) Sun, F. F.; Hong, J.; Hu, J.; Saddler, J. N.; Fang, X.; Zhang, Z.; Shen, S. Accessory enzymes influence cellulase hydrolysis of the model substrate and the realistic lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 79–80, p. 42–48, 1 nov. **2015**.
- (204) Pfeifer, G. P.; You, Y. H.; Besaratinia, A. Mutations induced by ultraviolet light *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* Elsevier, 1 abr. **2005**.
- (205) Dziezak J. D. Yeast and yeast derivatives: definitions, characteristics and processing. *Food Technol* **1987**; 42(2):104-21
- (206) Lee, S. M.; Jellison, T.; Alper, H. S. Systematic and evolutionary engineering of a xylose isomerase-based pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for efficient conversion yields. *Biotechnol Biofuels*, **2014**, 7, 122. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1186/s13068-014-0122-x>

- (207) Rollero, S.; Bloem, A.; Ortiz-Julien, A.; Camarasa, C.; Divol, B. Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. FEB, 13 fev. **2018**.
- (208) Laplace, J. M.; Delgenes, J. P.; Moletta, R.; Navarrot, J. M. Fermentation of lignocellulosic sugars to ethanol: Selection of mutants of *Pichia stipitis* affected for D-glucose utilization. *Enzyme Microb. Technol.*, V.14, **1992**.
- (209) Cadière, A.; Ortiz-Julien, A.; Camarasa, C.; Dequin, S. Evolutionary engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains with increased in vivo flux through the pentose phosphate pathway. *Metabolic Engineering*, v. 13, n. 3, p. 263–271, maio **2011**.
- (210) Ding, W.; Xiao, Z.; Tang, X.; Deng, K.; Fu, S.; Jiang, Y.; Yuan, L. Evolutionary engineering of yeast for closed-circulating ethanol fermentation in PDMS membrane bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 56–61, 15 jan. **2012**.
- (211) Smith, J.; van Rensburg, E.; Görgens, J. F. Simultaneously improving xylose fermentation and tolerance to lignocellulosic inhibitors through evolutionary engineering of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* harbouring xylose isomerase. *BMC Biotechnology*. **2014**, 14, 41. [https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1186/1472-6750-14-41](https://doi.org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1186/1472-6750-14-41).
- (212) Mora, M.; Fàbregas, E.; Céspedes, F.; Bartrolí, J.; Puy, N. Production and separation of value-added compounds from pine wood using pyrolysis and biorefinery techniques. *Fuel Processing Technology*, v. 238, 15 dez. **2022**.
- (213) Zhang, Q.; Jin, Y. L.; Fang, Y.; Zhao, H. Adaptive evolution and selection of stress-resistant *Saccharomyces cerevisiae* for very high-gravity bioethanol fermentation. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 41, p. 88–94, 1 set. **2019**.

- (214) Nguyen, P.V.; Nguyen, K.H.V.; Nguyen, N.L.; Ho, X.T.T.; Truong, P.H.; Thi Nguyen, K.C. Lychee-Derived, Thermotolerant Yeasts for Second-Generation Bioethanol Production. *Fermentation* **2022**, *8*, 515. <https://doi.org/10.3390/fermentation8100515>.
- (215) Ikeuchi, T.; Azuma, M.; Kato, J.; Ooshima, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose, *Biomass and Bioenergy*, **1999**, *16*. [https://doi.org/10.1016/S0961-9534\(99\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0961-9534(99)00005-7).
- (216) Romanelli, G.; Pasquale, G.; Sathicq, Á.; Thomas, H.; Autino, J.; Vázquez, P. Synthesis of Chalcones Catalyzed by Aminopropylated Silica Sol-Gel under Solvent-Free Conditions. *J. Mol. Catal. A Chem.* **2011**, *340* (1–2), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2011.03.004>.
- (217) Sonderegger M.; Sauer, U. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for anaerobic growth on xylose. 2003, *Appl Environ Microbiol* *69*:1990–1998.
- (218) Carvalho, W.; Silva, S. S.; Converti, A.; Vitolo, M. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. *Biotechnology and bioengineering*. **2002** Jul 20;79 (2):165-9.
- (219) Carla J.S.M Silva, C. J. S. M.; Roberto, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology, *Process Biochemistry*, Volume 36, Issue 11, **2001**, Pages 1119-1124. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00153-4).
- (220) Jiang, X.; He, P.; Qi, X.; Lin, Y.; Zhang, Y.; Wang, Q. High-efficient xylitol production by evolved *Candida maltosa* adapted to corncob hemicellulosic hydrolysate. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 91, n. 12, p. 2994–2999, 1 dez. **2016**.

- (221) Shavlovskii GM, Fedorovich DV, Babyak LY. Nutritive carbon source effect on regulatory mutations *rib80* and *rib81* in *Pichia guilliermondii*. *Microbiology (USA)*. **1990**.
- (222) Winkelhausen, E.; Kuzmanova, S. Microbial conversion of d-xylose to xylitol, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, 86, 1-14. [https://doi.org/10.1016/S0922-338X\(98\)80026-3](https://doi.org/10.1016/S0922-338X(98)80026-3).
- (223) Fonseca, C.; Spencer-Martins, I.; Hahn-Hgerdal, B. L-Arabinose metabolism in *Candida arabinofermentans* PYCC 5603T and *Pichia guilliermondii* PYCC 3012: influence of sugar and oxygen on product formation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 75 (2), 303–310.
- (224) Cortez, D. V.; Roberto, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*, *Bioresource Technology*, Volume 101, Issue 6, **2010**, 1858-1865, 0960-8524, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.09.072>.
- (225) Hernández-Pérez, A. F.; Vaz de Arruda, P.; de Almeida Felipe, M. G. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037, *Brazilian Journal of Microbiology*, Volume 47, Issue 2, **2016**, Pages 489-496. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.01.019>.
- (226) Rech, F.R., Fontana, R.C., Rosa, C.A. et al. Fermentation of hexoses and pentoses from sugarcane bagasse hydrolysates into ethanol by *Spathaspora hagerdaliae*. *Bioprocess Biosyst Eng* 42, 83–92, **2019**. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s00449-018-2016-y>
- (227) Bonan, C.I.D.G., Tramontina, R., dos Santos, M.W. Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. *Bioenerg. Res.* 15, 1169–1181, **2022**. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12155-021-10255-7>

- (228) Da Silveira, F.A., Fernandes, T.A.R., Bragança, C.R.S. et al. Isolation of xylose-assimilating yeasts and optimization of xylitol production by a new *Meyerozyma guilliermondii* strain. *Int Microbiol* 23, 325–334, **2020**. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s10123-019-00105-0>
- (230) Bianchini, I.d., Sene, L., da Cunha, M.A.A. et al. Short-term Adaptation Strategy Improved Xylitol Production by *Candida guilliermondii* on Sugarcane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate. *Bioenerg. Res.* 15, 1182–1194, **2022**. <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12155-021-10324-x>
- (231) Sarah S. Queiroz, Fanny M. Jofre, Solange I. Mussatto, Maria das Graças A. Felipe, Scaling up xylitol bioproduction: Challenges to achieve a profitable bioprocess, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 154, **2022**, 111789, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111789>.
- (232) Wu, J., Hu, J., Zhao, S. *et al.* Single-cell Protein and Xylitol Production by a Novel Yeast Strain *Candida intermedia* FL023 from Lignocellulosic Hydrolysates and Xylose. *Appl Biochem Biotechnol* 185, 163–178 (**2018**). <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12010-017-2644-8>
- (233) Zhang, X. & Zhao, G.: Yeast cultivation for single-cell protein production using the carbohydrate hydrolysate of steam-exploded eucalyptus wood. In: *Wood Research* 67 (4), 568-58, **2022**, disponível em: doi.org/10.37763/wr.1336-4561/67.4.568581
- (234) Nigam, J. Cultivation of *Candida langeronii* in sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for the production of single cell protein. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16, 367–372 (**2000**). <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1023/A:1008922806215>

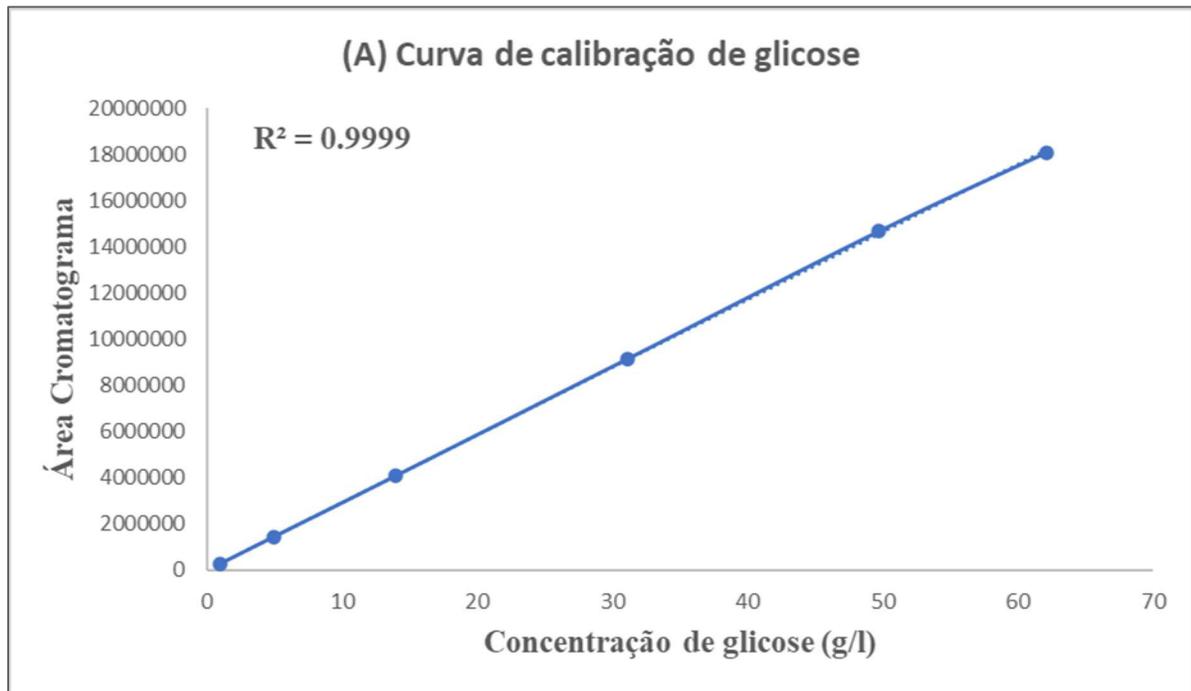
- (235) Bonan, C.I.D.G., Tramontina, R., dos Santos, M.W. et al. Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. *Bioenerg. Res.* 15, 1169–1181 (2022). <https://doi-org.ez87.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s12155-021-10255-7>
- (236) Wang, W., Yu C., Zhao H., Directed Evolution of Xylose Specific Transportes to Facilitate Glucose-Xylose Co-Utilization. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol. 113, No 3, (2016).
- (237) Mathews, J. A., Hao T., Moore M.J.B., Bell G., A conceptual lignocellulosic ‘feed+fuel’ biorefinery and its application to the linked biofuel and cattle raising industries in Brazil, *Energy Policy*, Volume 39, Issue 9, (2011). <https://doi.org/10.1016/j.enpol.2011.06.022>.
- (238) Wu, J., Hu J., Zhao S., He, M., HU, G., Ge, X., Peng, N., Single-cell Protein and Xylitol Production by a Novel Yeast Strain *Candida intermedia* FL023 from Lignocellulosic Hydrolysates and Xylose, *Appl Biochem Biotechnol* (2018). <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2644-8>
- (239) Meyer, P. S., Du Preez, J. C., Kilian S. G., Hu J., 9 Chemostat cultivation of *Candida blankii* on sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate, *Biotechnology and Bioengineering* (1992). <https://doi-org.ez338.periodicos.capes.gov.br/10.1002/bit.260400304>

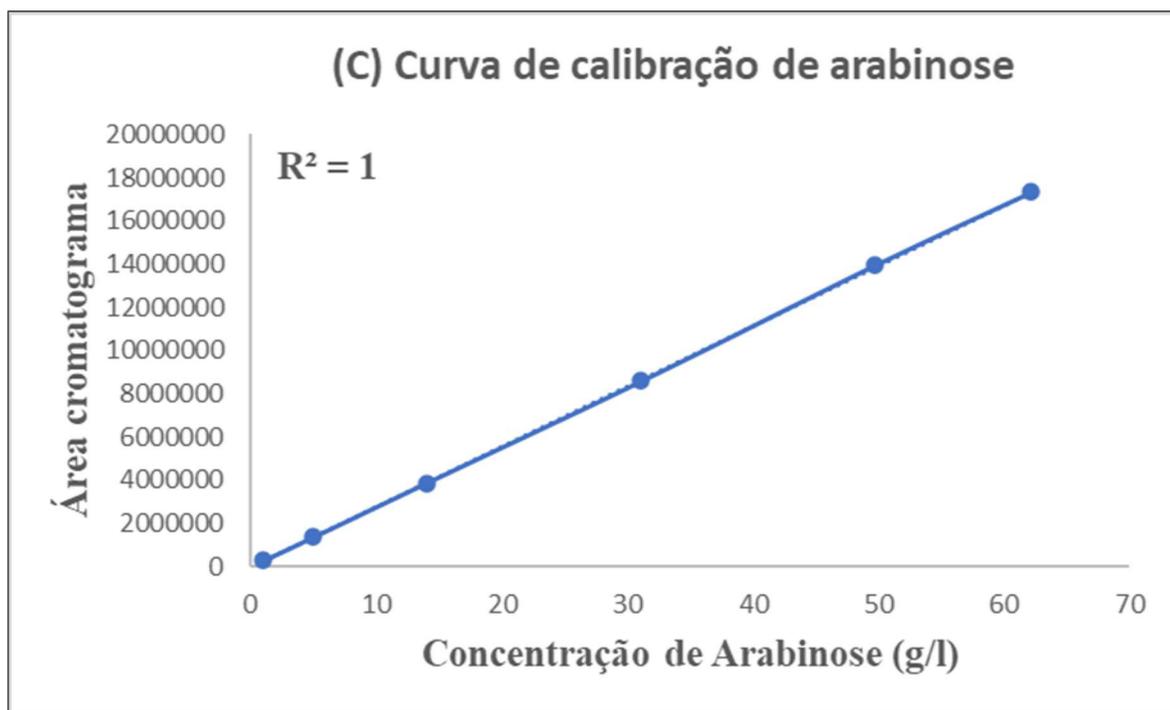
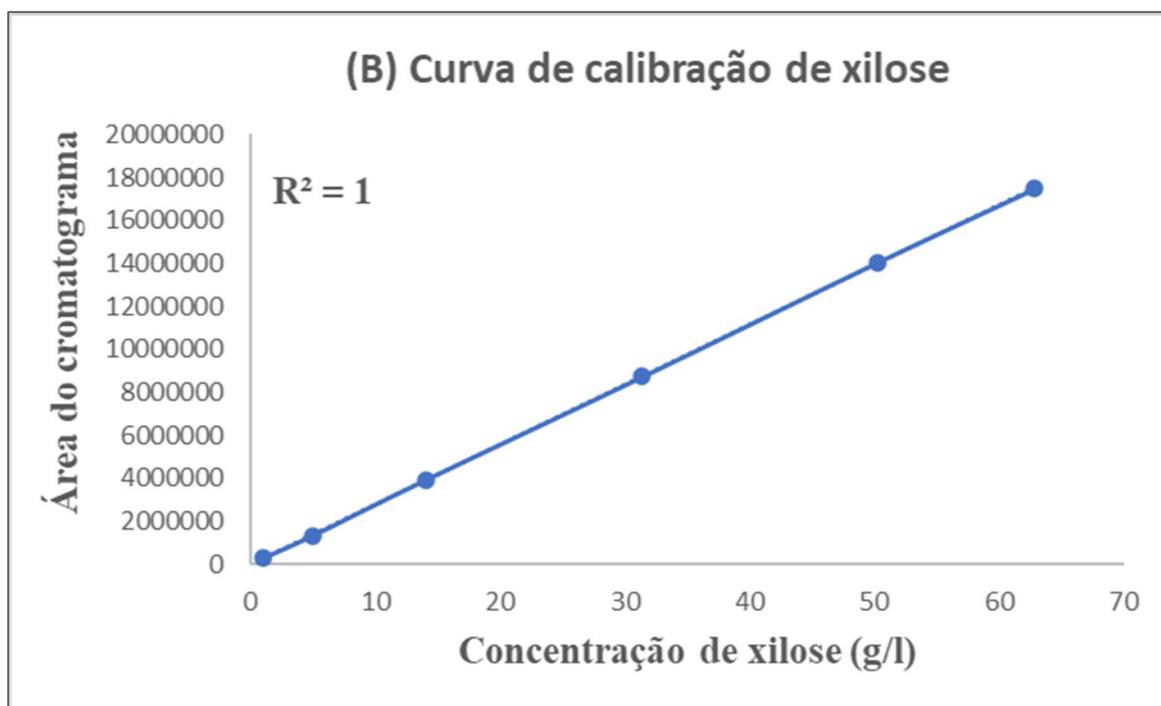
- (240) Gonçalves, F., Perna, R., Lopes, E., Maciel, R., Tovar, L., Lopes, M., Strategies to improve the environmental efficiency and the profitability of sugarcane mills, *Biomass and Bioenergy*, Volume 148, (2021), <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106052>.
- (241) Dias de Souza, N. R., Klein, C. K., Chagas, M. F., Cavalett, O., Bonomi, A., Towards Comparable Carbon Credits: Harmonization of LCA Models of Cellulosic Biofuels, *Sustainability* (2021), 13, 10371. <https://doi.org/10.3390/su131810371>
- (242) Carpio, R. R., de Carvalho Miyoshi, S., Elias, M. E., Furlan F. F., de Campos Giordano R., Secchi, A. R., Multi-objective optimization of a 1G-2G biorefinery: A tool towards economic and environmental viability. *Journal of Cleaner Production* 284 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125431>
- (243) Chen, X., Madhu, K., Sonia, Y., Stimulating learning-by-doing in advanced biofuels: effectiveness of alternative policies. *Environ. Res. Lett.* 7 (2012). doi:10.1088/1748-9326/7/4/045907
- (244) Memari, Y., Memari, A., Ebrahimnejad, S., Ahmad R., A mathematical model for optimizing a biofuel supply chain with outsourcing decisions under the carbon trading mechanism. *Environ. Biomass Conversion and Biorefinery* (2023) 13:1047–1070. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01264-1>

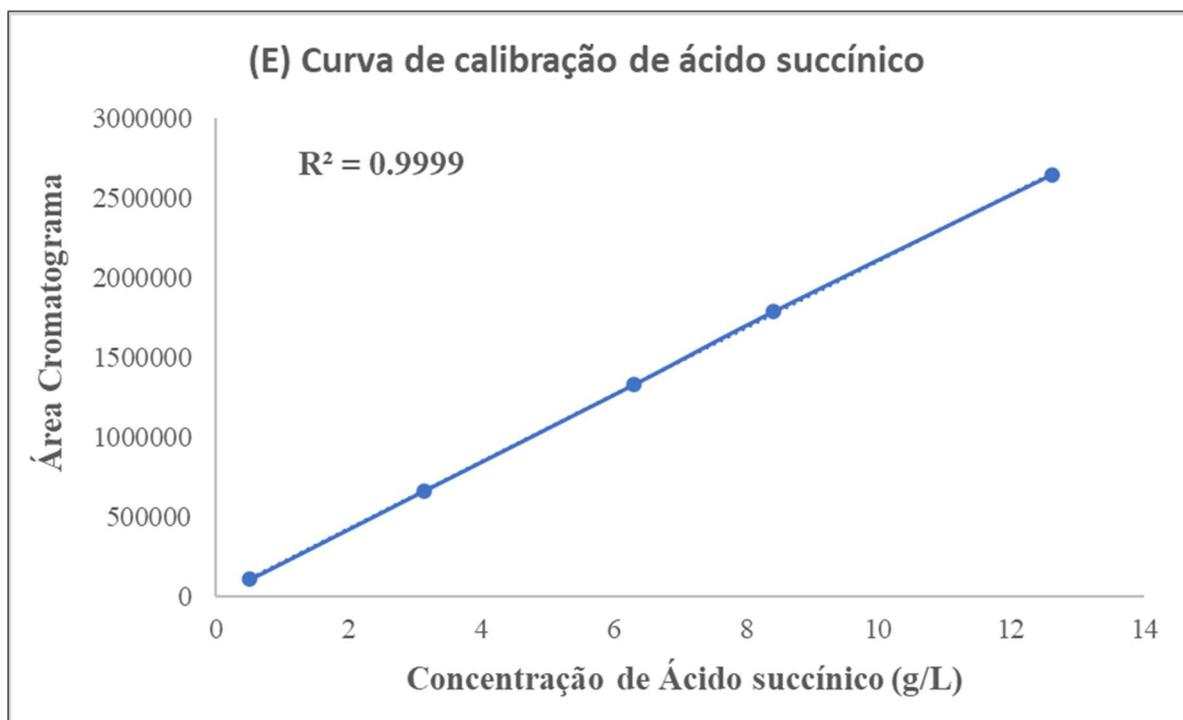
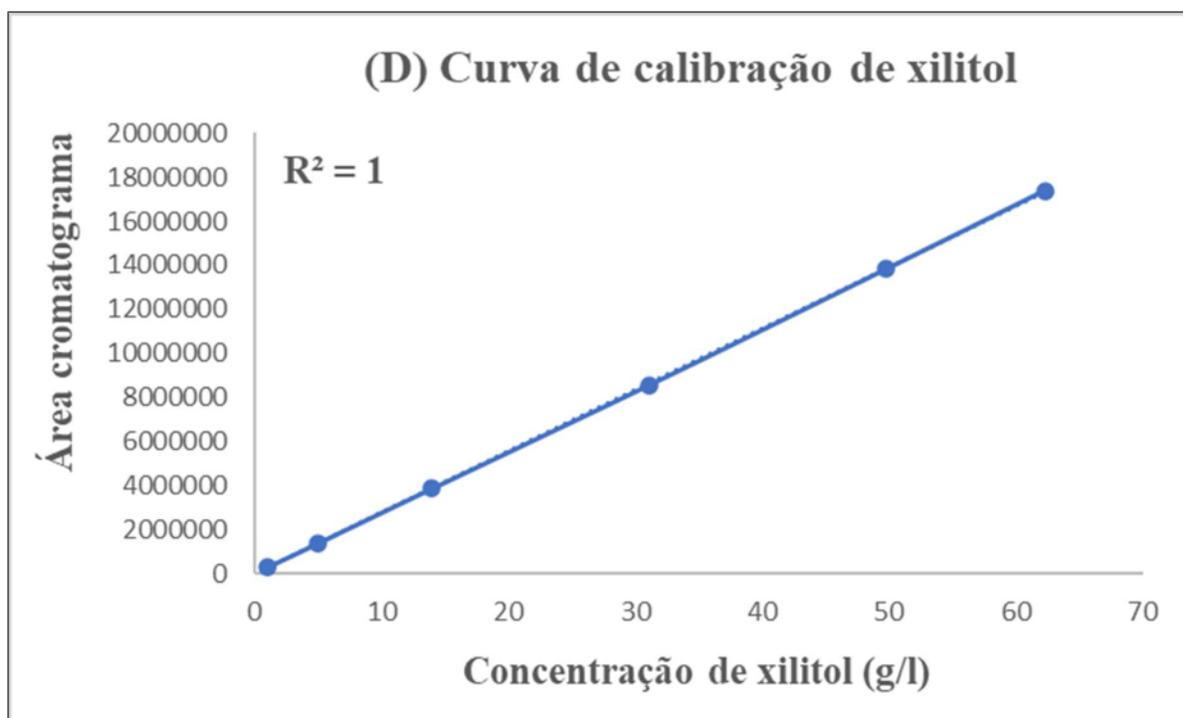
- (245) Christensen, A., Hobbs, B., A model of state and federal biofuel policy: Feasibility assessment of the California Low Carbon Fuel Standard, *Applied Energy*, Volume 169, (2016), 799-812.
<https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.01.121>
- (246) Skolrud, T. D., Galinato, G. I., Galinato, P. G., C., Shumway C. R., Yoder, K. J., The role of federal Renewable Fuel Standards and market structure on the growth of the cellulosic biofuel sector. *Energy Economics* 58 (2016) 141–151.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.eneco.2016.06.024>
- (247) Kim, S., Zhang, X., Reddy, A.D., Dale, B. E., Thelen, K. D. Jones, C. D., Izaurrealde, R. C., Runge, T., Maravelias, C., Carbon-Negative Biofuel Production. *Environ. Sci. Technol.* (2020), 54, 10797–10807.
<https://dx.doi.org/10.1021/acs.est.0c01097>
- (248) Klein, B.C., Chagas, M.F., Watanabe, M.D.B., Bonomi A., Maciel Filho, R., Low carbon biofuels and the New Brazilian National Biofuel Policy (RenovaBio): A case study for sugarcane mills and integrated sugarcane-microalgae biorefineries, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 115, (2019), 109365.
<https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109365>

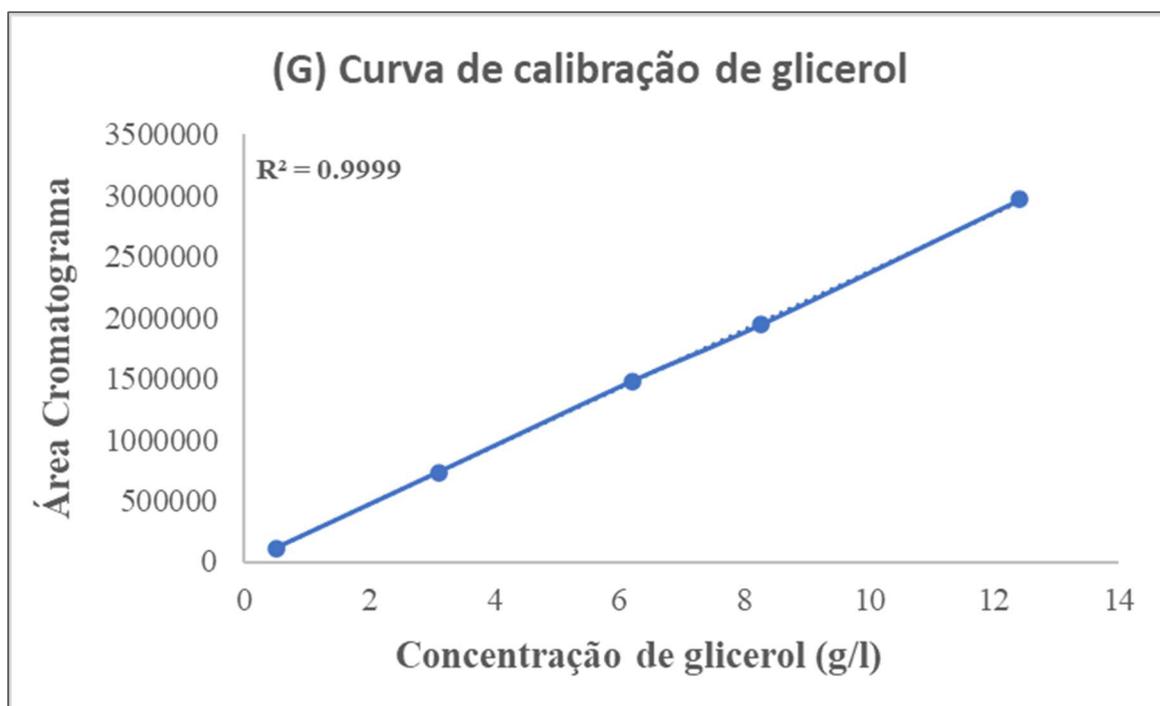
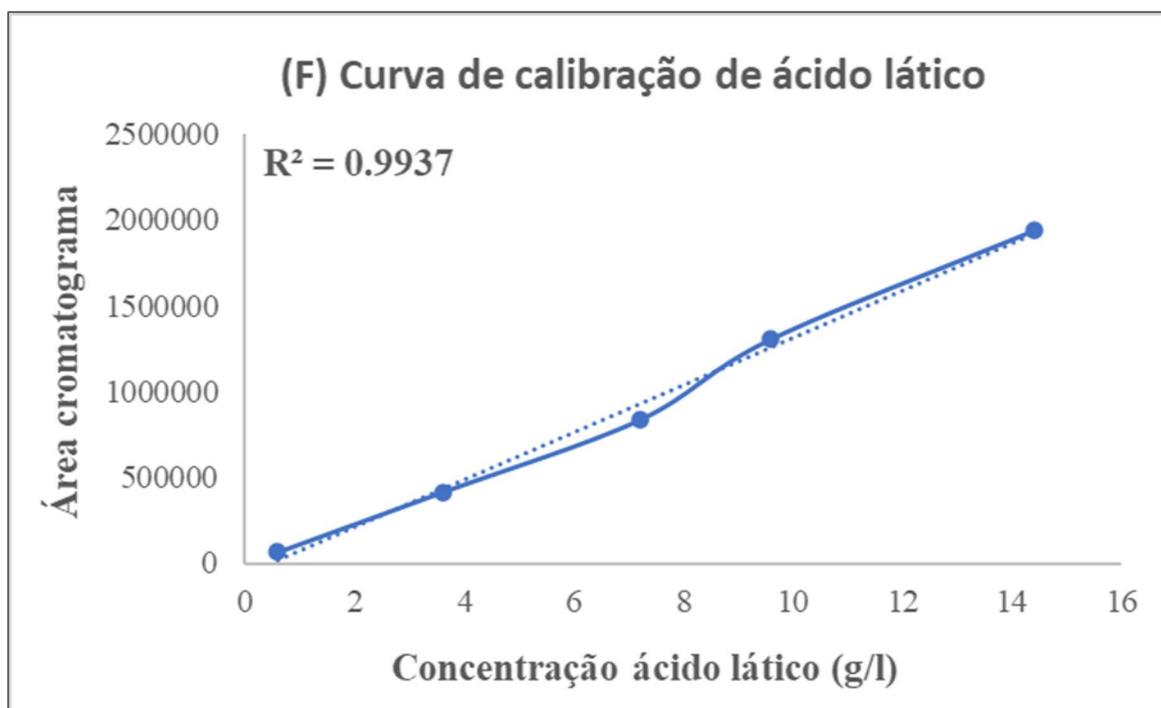
8 ANEXOS

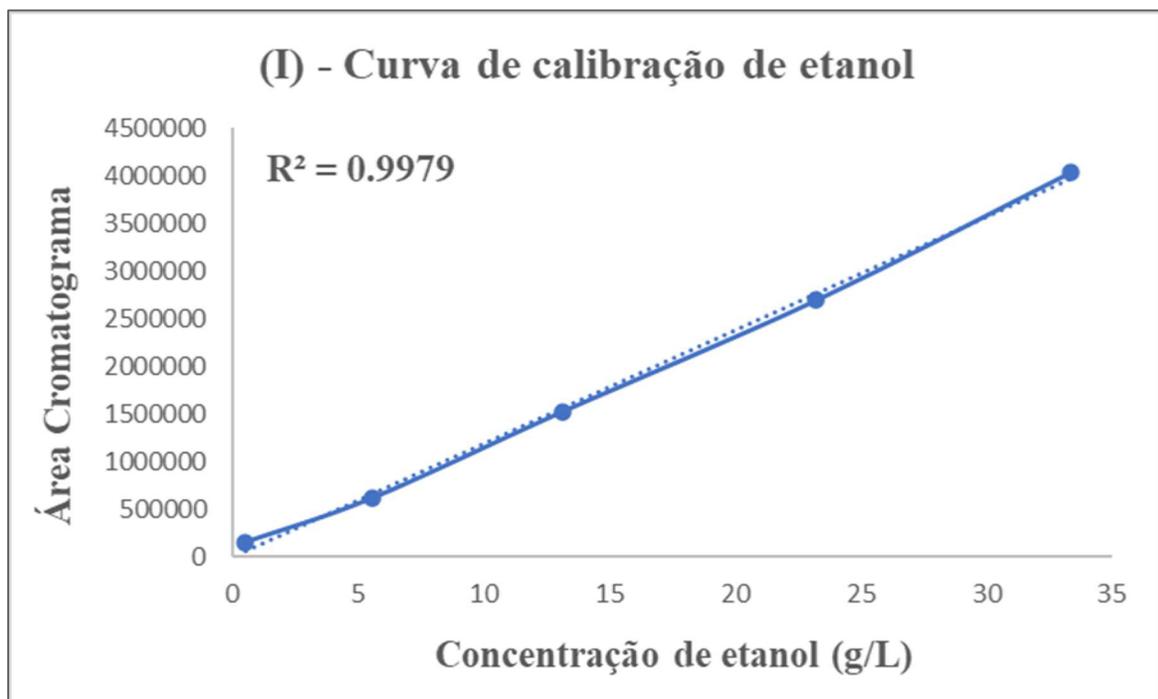
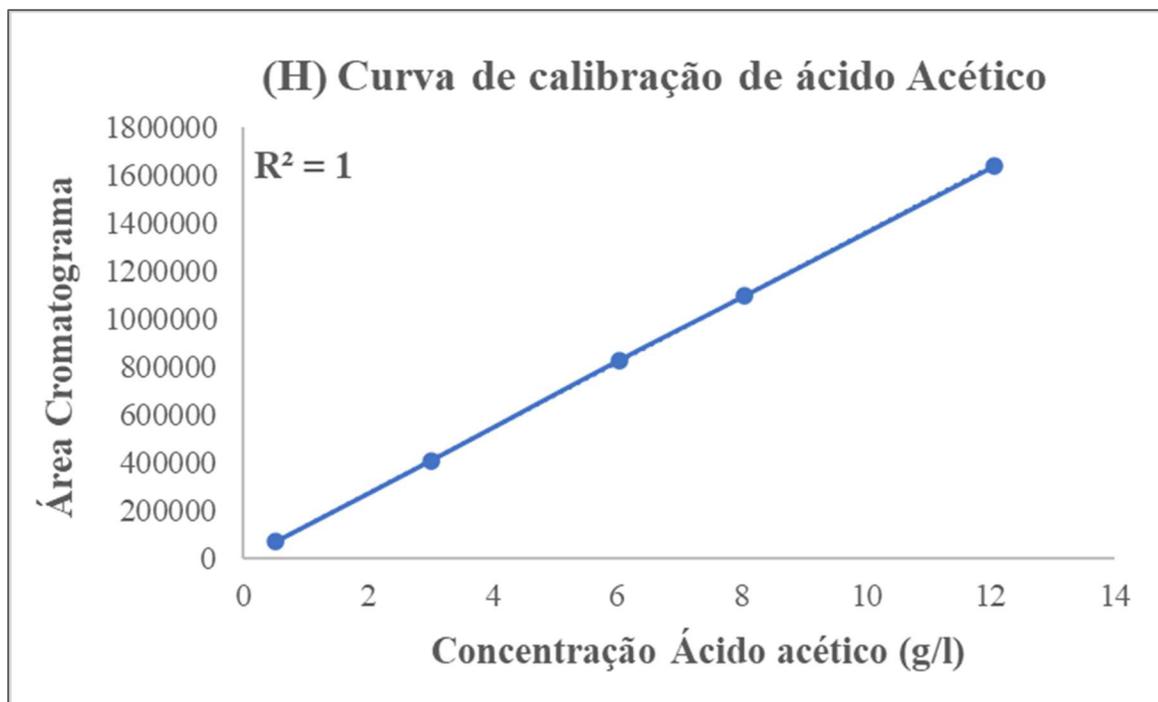
8.1 Curvas de calibrações utilizadas para determinar a concentração dos substratos e produtos dos experimentos em meios sintéticos e hidrolisados.

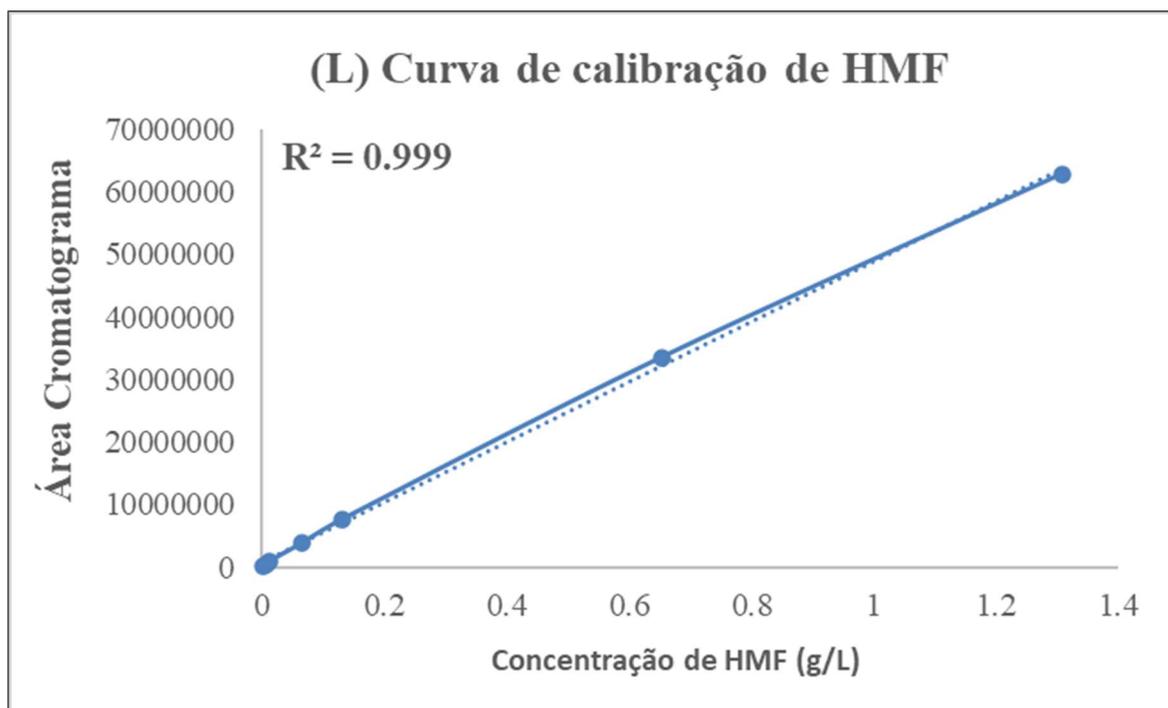
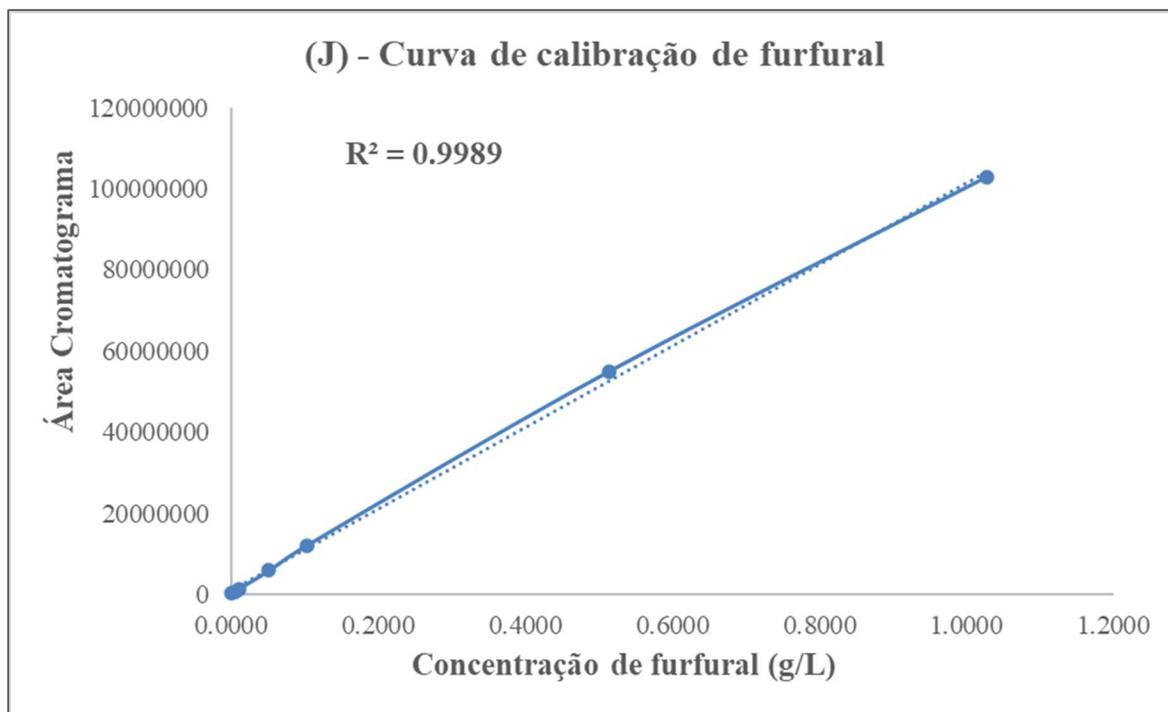




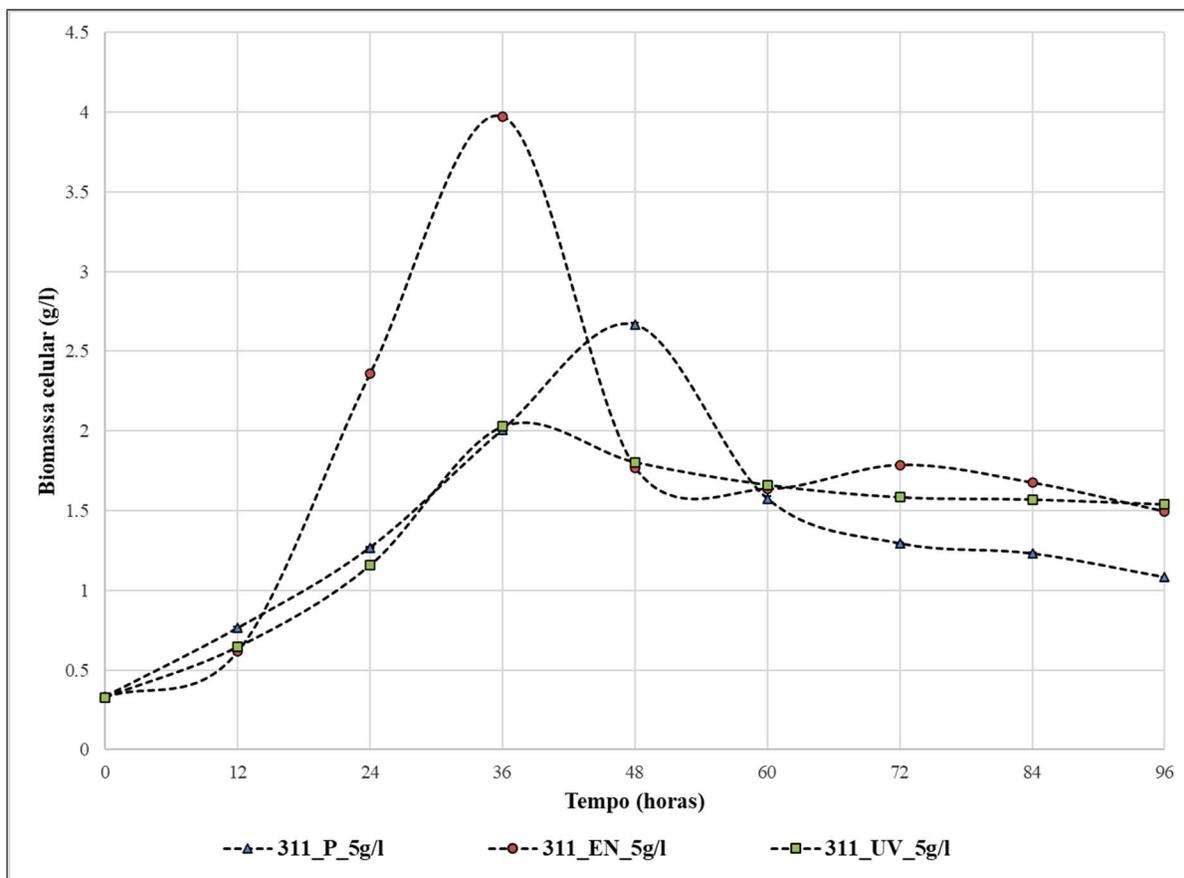




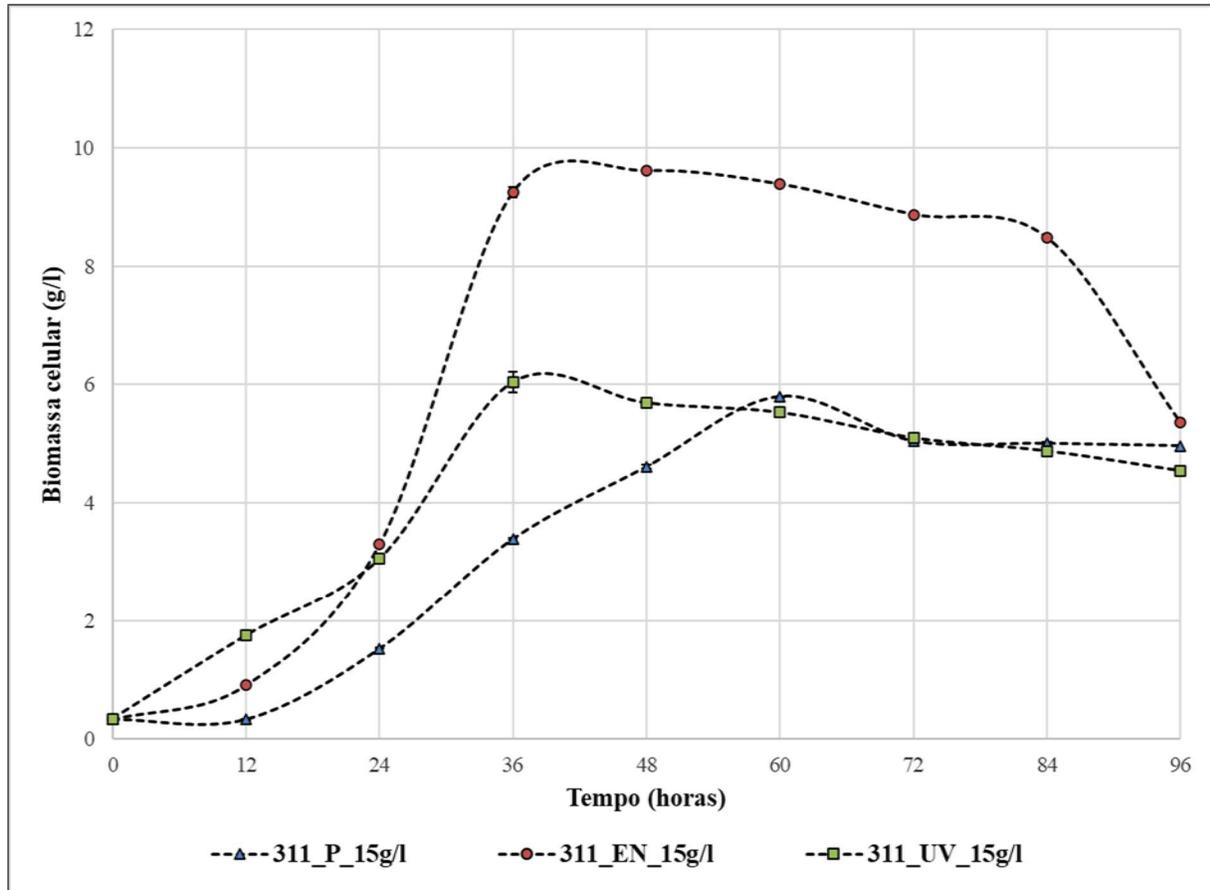




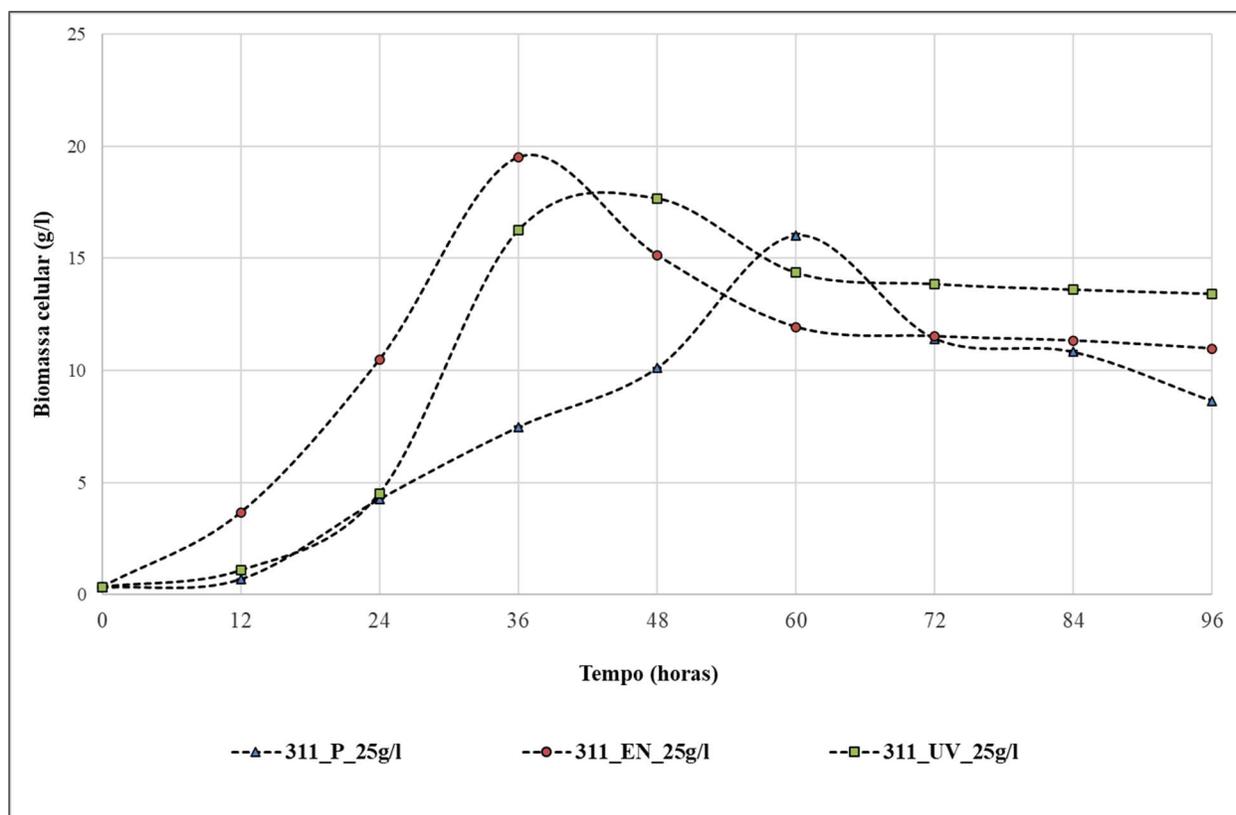
8.2 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 5g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



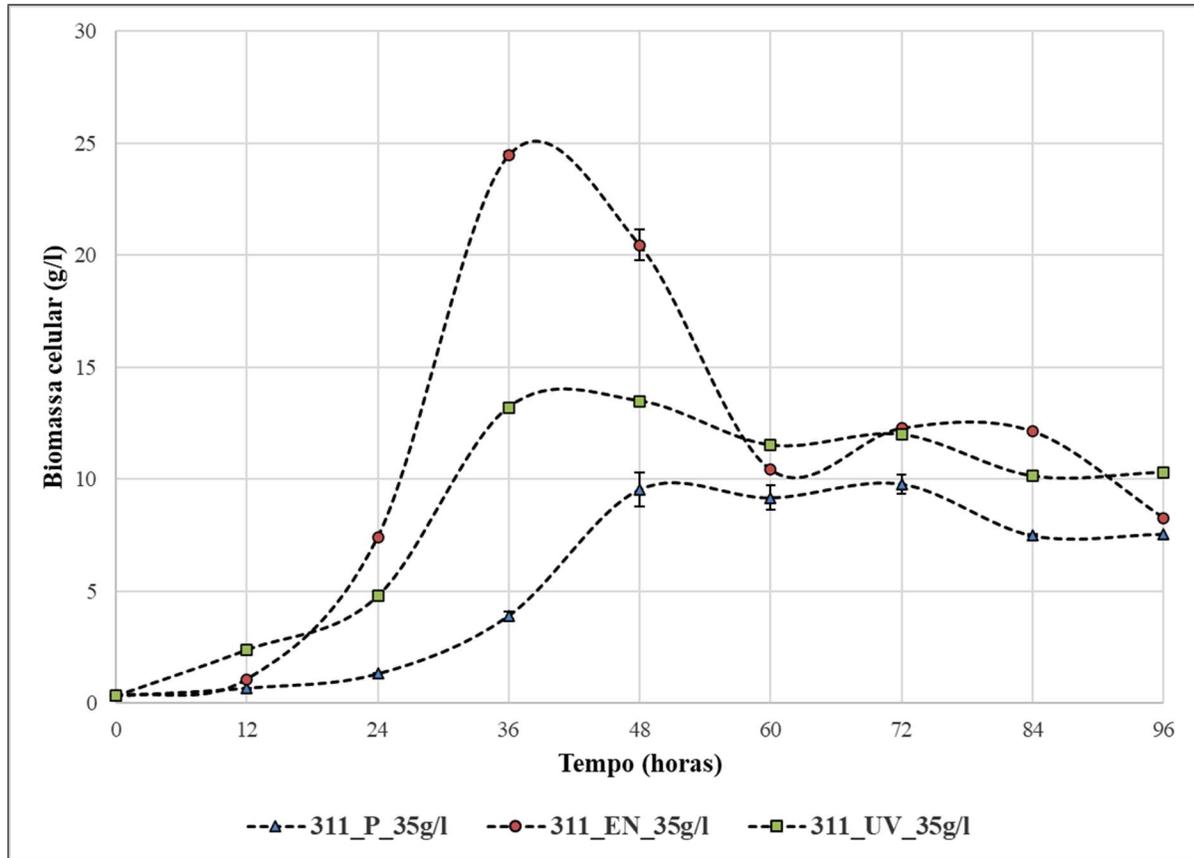
8.3 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 15g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



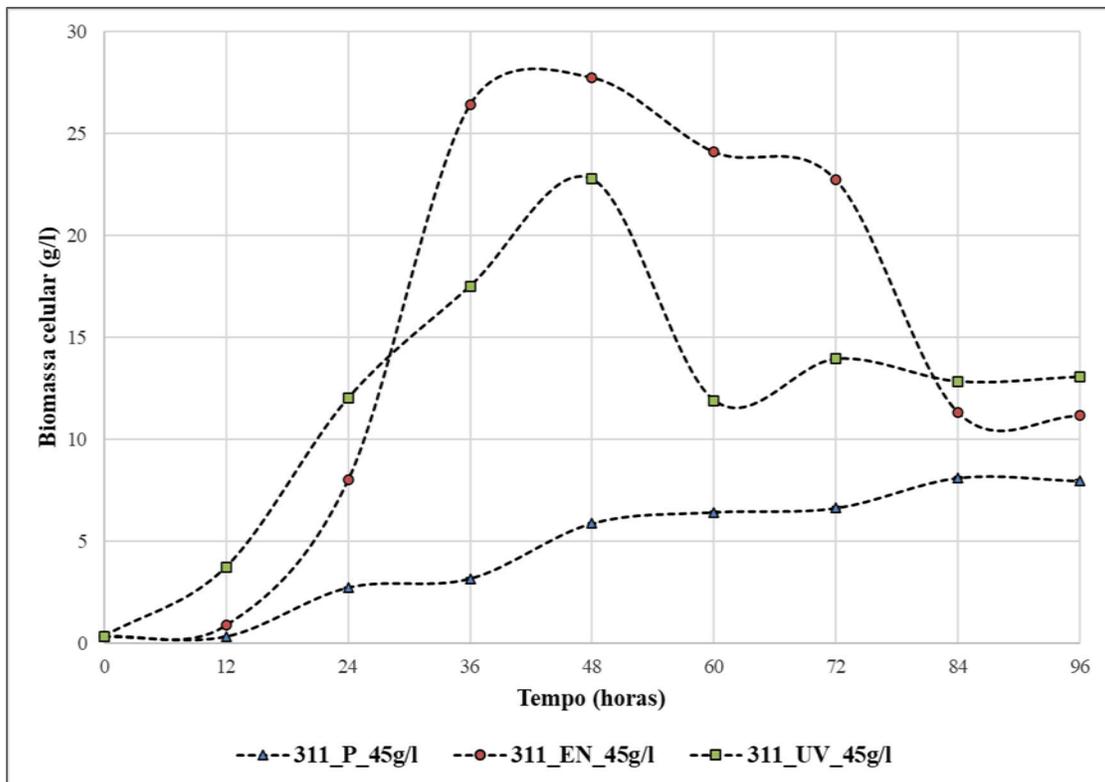
8.4 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 25g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



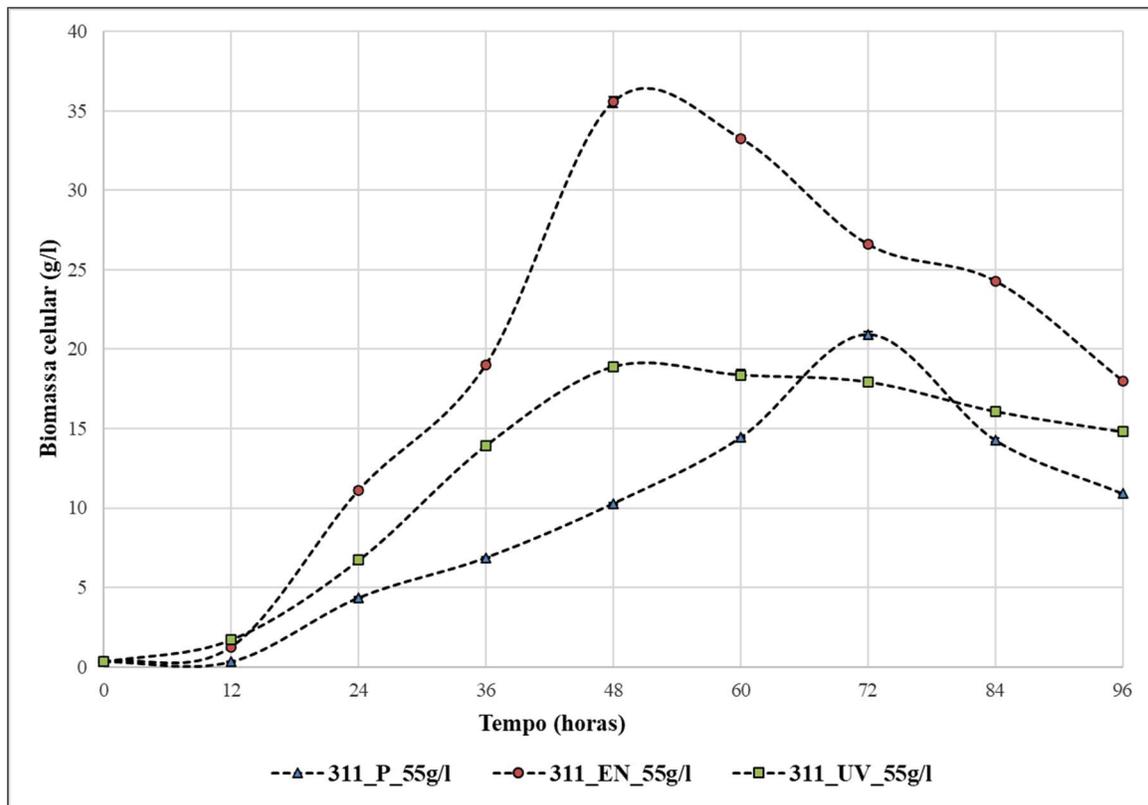
8.5 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 35g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



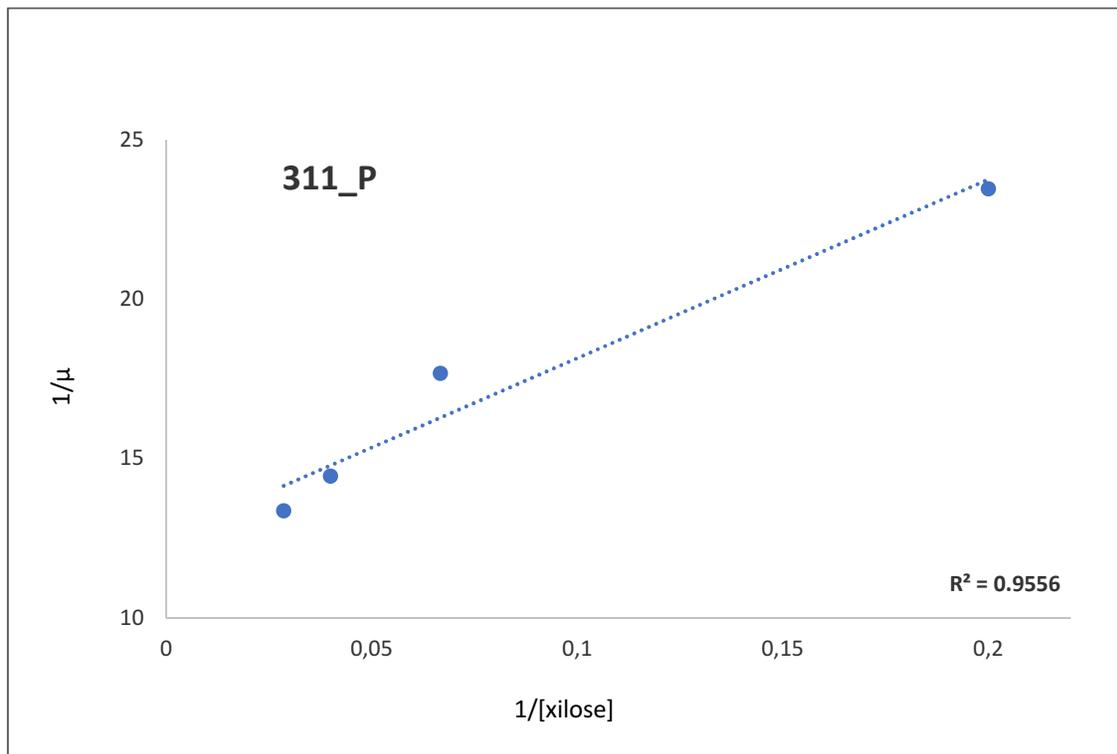
8.6 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 45g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



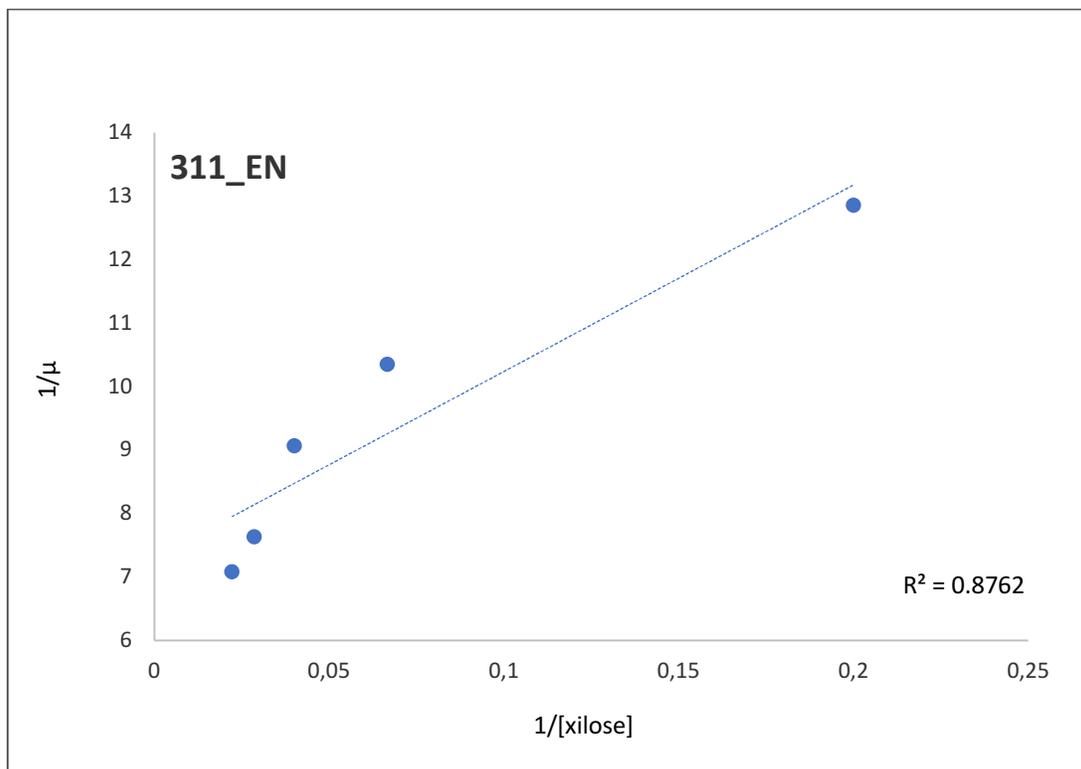
8.7 Curva de crescimento utilizada para determinar a velocidade específica de crescimento das linhagens original e adaptadas de *M. guilliermondii* nos cultivos em 55g/L de xilose, em meio mínimo YNB.



8.8 Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (K_s) dos cultivos da linhagem original *M. guilliermondii* 311_P, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 35 g/L.



8.9 Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (k_s) dos cultivos da linhagem adaptada sem exposição a luz UV *M. guilliermondii* 311_EN, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 45 g/L.



8.10 Aplicação do modelo de Monod linearizado para obtenção dos parâmetros de cinéticos de Monod, velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$) e constante de Monod (K_s) dos cultivos da linhagem adaptada com exposição a luz UV *M. guilliermondii* 311_UV, em meio mínimo YNB, com concentrações de xilose de 5 a 35 g/L.

