

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

Márcio Daniel Nicodemos Ramos

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO
UTILIZANDO LEVEDURA COM SECREÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

SÃO CARLOS - SP

2023

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

Márcio Daniel Nicodemos Ramos

DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSAMENTO CONSOLIDADO
UTILIZANDO LEVEDURA COM SECREÇÃO DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Suzane Milessi Esteves

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina Zangirolami

SÃO CARLOS - SP
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Márcio Daniel Nicodemos Ramos, realizada em 28/02/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves (UFSCar)

Profa. Dra. Bruna Trindade de Carvalho (NovelYeast)

Profa. Dra. Cristiane Sanchez Farinas (EMBRAPA)

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

“Quem disse que seria fácil? Se fácil foi, simplesmente não foi.”
Márcio Daniel Nicodemos Ramos – Livro “Versos em Escala de Bancada”

Sumário

Resumo	9
Lista de figuras	11
Lista de tabelas	15
Capítulo 1: Introdução.....	19
1.1. Contextualização.....	19
1.2. Objetivos.....	21
1.2.1. Objetivo Geral	21
1.2.2. Objetivos Específicos	21
1.3. Estrutura do texto.....	22
1.4. Revisão Bibliográfica.....	22
1.2.1. Biocombustíveis	22
1.2.2. Materiais lignocelulósicos	24
1.2.3. Pré-tratamentos	25
Pré-tratamento ácido	27
Pré-tratamento hidrotérmico	27
Pré-tratamentos complementares	28
1.2.4. Hidrólise enzimática	29
1.2.5. Avanços na biotecnologia para produção de etanol 2G	30
1.2.6. <i>S. cerevisiae</i> AC14	37
1.2.7. Imobilização celular	38
Capítulo 2 - Influência das condições operacionais na produção de enzimas hidrolíticas por levedura recombinante de alto desempenho para Bioprocessamento Consolidado.....	41
2.1. Introdução	41
2.2. Metodologia	44
2.2.1. Microrganismo.....	44
2.2.2. Materiais	45
2.2.3. Preparo do inóculo	45

2.2.4. Procedimento experimental	45
2.2.5. Métodos analíticos	47
3.3. Resultados e discussão	51
3.3.1. Influência da composição do meio	51
3.3.2. Influência do pH inicial	57
3.3.3. Influência do fornecimento de oxigênio	60
3.3.4. Bateladas repetidas	62
2.4. Conclusão.....	66
Anexo A – Géis de eletroforese com extratos enzimáticos obtidos nos ensaios fermentativos com AC14 em diferentes substratos conforme Tabela 6. ...	68
Capítulo 3 – Avaliação da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AC14 no bioprocessamento consolidado de bagaço de cana advindo da indústria sucroalcooleira para produção de etanol 2G	69
3.1. Introdução	69
3.2. Materiais e métodos.....	72
3.2.1. Materiais	72
3.2.2. Microrganismo e inóculo.....	72
3.2.3. Preparo do bagaço de cana	73
3.2.4. Pré-tratamentos do bagaço de cana	73
3.2.5. Ensaio fermentativos.....	73
3.2.6. Métodos analíticos.....	77
3.3. Resultados e discussão.....	78
3.3.1. Estudo dos pré-tratamentos do bagaço	78
3.3.2. Ensaio fermentativos do BPC	79
3.3.2.1. Estudo dos licores	79
3.3.2.2. Estudo das frações sólidas	81
3.3.2.2. Estudo das frações líquidas e sólidas	89
3.4. Conclusões	92
Capítulo 4 – Bioprocessamento consolidado utilizando células imobilizadas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AC14: Influência da carga de células e do diâmetro dos beads	93

4.1. Introdução	93
4.2. Metodologia	95
4.2.1. Microrganismo e inóculo	95
4.2.2. Materiais	96
4.2.3. Imobilização da levedura e planejamento experimental.....	96
4.2.4. Métodos analíticos	98
4.2.5. Procedimentos de cálculo	99
4.3. Resultados e discussão	100
4.3.1. Influência da carga celular e diâmetro dos beads em BPC estático	100
4.3.2. Influência da carga celular e diâmetro dos beads BPCs agitados...	106
4.4. Conclusões	113
Capítulo 5 - Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....	116
Referências	118

Agradecimentos

Primeiramente, à Deus e à Nossa Senhora das Graças por iluminarem meus passos desde o ventre materno até a conclusão deste Mestrado.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a. Thais Suzane Milessi Esteves, e à minha co-orientadora, Prof.^a Dr.^a. Teresa Cristina Zangirolami, pela oportunidade, confiança, paciência e ensinamentos.

Aos meus pais, Máris Cilene Miranda Nicodemos Ramos e Márcio Dimas Ramos (*in memorian*) por sempre me incentivarem, acreditarem em mim, por nunca me deixarem desistir e pela educação e amor incondicional sem os quais eu não teria chegado até aqui.

À minha família, principalmente minha tia Marcela e meus avós Marcelo e Celina (*in memorian*) pelo apoio em todas as dificuldades.

À minha namorada, Bruna da Graça Macêdo Pereira, pelo amor, pelo carinho, pela preocupação e por todas as demonstrações de afeto que demonstra por mim a cada dia.

Aos amigos Tomás e Ananda pelo companheirismo desde a faculdade até os tempos atuais.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Cnpq (130409/2021-9) pela infraestrutura e suportes financeiros durante todo este Mestrado.

Ao professor, Adilson José da Silva, que me ensinou a técnica de eletroforese e a todos os professores do Departamento de Engenharia Química da UFSCar que permitiram a utilização de seus laboratórios ou pela doação de reagentes que viabilizaram este trabalho.

Aos técnicos do laboratório da Universidade Federal de São Carlos pela disponibilidade e ajuda e a todas as funcionárias da limpeza que sempre zelaram pela organização dos laboratórios e auxiliaram em momentos turbulentos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho e apesar de não citados jamais serão esquecidos.

Resumo

O Bioprocessamento Consolidado (BPC) para a produção de etanol de segunda geração (2G) é uma tecnologia emergente na qual a produção de enzimas hidrolíticas, a hidrólise enzimática e a fermentação das pentoses e hexoses ocorrem em um mesmo reator. A levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* AC14, se destaca por produzir sete enzimas hidrolíticas (β -glicosidase, β -xilosidase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase I e II, e acetil xilana esterase), possuindo grande potencial de aplicação no BPC em condições industriais. Neste sentido, o objetivo desta dissertação foi contribuir para o desenvolvimento do BPC de bagaço de cana-de-açúcar utilizando esta levedura recombinante de alta performance (cepa AC14), visando a aplicação em biorrefinarias. Os experimentos foram realizados em mini-reatores dotados de saída de CO₂, a 35 °C e com densidade ótica inicial 100. Os sobrenadantes gerados foram analisados em relação às atividades enzimáticas (celulases totais, xilanase, β -glicosidase e β -xilosidase) e à composição de substratos e produtos. Em uma primeira etapa, avaliou-se o BPC em meio sintético (influência das condições de cultivo: substratos, pH e fornecimento de oxigênio) com células livres, em bateladas simples e repetidas e identificou-se as condições que favoreceram a produção de enzimas: meio contendo xilana de sabugo de milho, carboximetilcelulose, celobiose, glicose e xilose e pH 5,5, alcançando-se 2,1 UI.g⁻¹_{célula} de celulases totais, 102,0 UI.g⁻¹_{célula} de xilanases, 7,4 UI.g⁻¹_{célula} de β -glicosidase e 25,5 UI.g⁻¹_{célula} de β -xilosidase. A condição aeróbia favoreceu o crescimento em detrimento da produção de etanol, mas não alterou a produção de enzimas em relação às condições fermentativas. Bateladas repetidas foram realizadas no meio selecionado, alcançando-se conversão total nos dez ciclos e produtividade e rendimento médio em etanol de 0,86 g.L⁻¹.h⁻¹ e 0,4 g.g⁻¹. Em uma segunda etapa, conduziu-se cultivos BPC com meio industrial real contendo bagaço de cana pré-tratado por via hidrotérmica e ácida, avaliando-se também a dopagem com proteína de soja e o congelamento da fração pré-tratada como tratamentos auxiliares para melhorar o acesso das enzimas e intensificar o BPC. O processo com bagaço de cana pré-tratado por via hidrotérmica foi superior ao obtido pela via ácida devido à menor concentração de inibidores. O congelamento da celulignina favoreceu o BPC, enquanto a adição de proteína de soja não teve influência nas condições estudadas, obtendo-se 14,1 g.L⁻¹ e 1,3 g.L⁻¹.h⁻¹ de etanol utilizando-se licor e celulignina (10 g.L⁻¹) hidrotérmicos. Por fim, na etapa 3 deste trabalho, avaliou-se a aplicabilidade e as condições de imobilização da levedura AC14 em alginato de cálcio, variando-se o diâmetro das microesferas, carga celular e agitação. Notou-se limitações difusionais nos experimentos com células imobilizadas, porém sem comprometer o consumo total do substrato. Constatou-se que a presença de agitação favoreceu a difusão das enzimas para o meio reacional. Menores diâmetros e maiores cargas de células dentro das microesferas melhoraram o desempenho da fermentação, provavelmente pela formação de um microambiente favorável e diminuição das limitações difusionais, obtendo-se 11,9 g.L⁻¹ (1,1 g.L⁻¹.h⁻¹) de etanol. Deste modo, o presente estudo gerou um amplo panorama sobre o BPC, que abrangeu condições fermentativas, matéria-prima real e imobilização celular, contribuindo para expandir os conhecimentos referentes a essa tecnologia promissora para aplicação no contexto da obtenção do etanol 2G.

Palavras chave: Produção enzimática; Hidrólise; Fermentação; Bagaço de cana-de-açúcar; Imobilização celular.

Abstract

Consolidated Bioprocessing (BPC) for the production of second-generation (2G) ethanol is an emerging technology in which the production of hydrolytic enzymes, enzymatic hydrolysis and fermentation of pentoses and hexoses occur in the same reactor. The recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* AC14 stands out for producing seven hydrolytic enzymes (β -glucosidase, β -xylosidase, xylanase, endoglucanase, cellobiohydrolase I and II, and acetyl xylan esterase), with great potential for application in CBP under industrial conditions. In this sense, the objective of this dissertation was to contribute to the development of CBP from sugarcane bagasse using this high-performance recombinant yeast (strain AC14), aiming at application in biorefineries. The experiments were carried out in mini-reactors equipped with a CO₂ outlet, at 35 °C and with an initial optical density of 100. The supernatants generated were analyzed in relation to enzymatic activities (total cellulases, xylanase, β -glucosidase and β -xylosidase) and to the composition of substrates and products. In a first step, CBP was evaluated in synthetic medium (influence of culture conditions: substrates, pH and oxygen supply) with free cells, in simple and repeated batches, and the conditions that favored the production of enzymes were identified: medium containing corn cob xylan, carboxymethylcellulose, cellobiose, glucose and xylose and pH 5.5, reaching 2.1 IU.g⁻¹_{cell} of total cellulases, 102.0 IU.g⁻¹_{cell} of xylanases, 7.4 IU.g⁻¹_{cell} of β -glucosidase and 25.5 IU.g⁻¹_{cell} of β -xylosidase. The aerobic condition favored growth to the detriment of ethanol production, but did not alter enzyme production in relation to fermentative conditions. Repeated batches were carried out in the selected medium, reaching total conversion in the ten cycles and productivity and average yield in ethanol of 0.86 g.L⁻¹.h⁻¹ and 0.4 g.g⁻¹. In a second stage, BPC cultivations were carried out with real industrial medium containing sugarcane bagasse pre-treated by hydrothermal and acid, also evaluating the doping with soy protein and the freezing of the pre-treated fraction as auxiliary treatments to improve enzyme access and intensify CPB. The process with sugarcane bagasse pre-treated by hydrothermal route was superior to that obtained by the acid route due to the lower concentration of inhibitors. The freezing of cellulignin favored the CBP, while the addition of soy protein had no influence on the studied conditions, obtaining 14.1 g.L⁻¹ and 1.3 g.L⁻¹.h⁻¹ of ethanol using liquor and cellulignin (10 g.L⁻¹) hydrothermal. Finally, in step 3 of this work, the applicability and immobilization conditions of the yeast AC14 in calcium alginate were evaluated, varying the diameter of the microspheres, cell load and agitation. Diffusional limitations were noted in the experiments with immobilized cells, but without compromising the total consumption of the substrate. It was found that the presence of agitation favored the diffusion of enzymes into the reaction medium. Smaller diameters and higher cell loads within the microspheres improved fermentation performance, probably by creating a favorable microenvironment and decreasing diffusional limitations, yielding 11.9 g.L⁻¹ (1.1 g.L⁻¹.h⁻¹) of ethanol. Thus, the present study generated a broad overview of CBP, which covered fermentation conditions, real raw material and cell immobilization, contributing to expand knowledge regarding this promising technology for application in the context of obtaining 2G ethanol.

Keywords: Enzyme production; Hydrolysis; Fermentation; Sugar cane bagasse; Cell immobilization.

Lista de figuras

Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis de acordo com as matérias-primas de origem (Adaptado de AHORSU <i>et al.</i> , 2018).	23
Figura 2 - Processos produtivos do etanol 1G e 2G (Adaptado de MILESSI, 2017).....	23
Figura 3 - Estrutura das cadeias que compõem celulose e hemicelulose da biomassa. .	24
Figura 4 - Rompimento da estrutura de materiais lignocelulósicos obtida pela etapa de pré-tratamento (Adaptado de MOOD <i>et al.</i> , 2013).....	26
Figura 5 - Diferentes tipos de pré-tratamentos existentes para materiais lignocelulósicos (Adaptado de RAMOS <i>et al.</i> , 2022).	26
Figura 6 - Enzimas hidrolíticas e seus respectivos substratos (Adaptado de RAMOS <i>et al.</i> , 2022).....	30
Figura 7 - Bioprocessamento consolidado para produção de etanol 2G (Adaptado de RAMOS <i>et al.</i> , 2022).....	32
Figura 8 - Integração gênica realizada no desenvolvimento da cepa AC14 contemplando os diferentes genes heterólogos que codificam enzimas lignocelulolíticas (Adaptado de CLAES <i>et al.</i> , 2020).	37
Figura 9 - Acompanhamento dos ensaios de BPC em meios contendo diferentes substratos. Leveduras AC14 (●) e MD4 (▲). DO ₀ = 100, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio YP (composição na Tabela 6).....	52
Figura 10 - Atividades nos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC com diferentes substratos: (a) Xilanases, (b) Celulases totais, (c) β-glicosidase e (d) β-xilosidase. Leveduras AC14 (barras preenchidas) e MD4 (barras hachuradas). DO ₀ = 100, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio YP (composição na Tabela 6). Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.....	56
Figura 11 - Acompanhamento dos ensaios de BPC conduzidos em diferentes valores de pH inicial: (a) 4,5; (b) 5,5 e (c) 6,5. Meio YP (5 g.L ⁻¹ de glicose, 5 g.L ⁻¹ de xilose, 5 g.L ⁻¹ de xilana de sabudo de milho, 5 g.L ⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L ⁻¹ de CMC; meio 6, Tabela 6), DO ₀ = 100 e 35 °C. Leveduras AC14 (●) e MD4 (▲).....	58
Figura 12 - Atividades dos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC realizados em diferentes valores de pH inicial. (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β-glicosidase e (d) β-xilosidase. Meio 6 (Tabela 6), contendo 5 g.L ⁻¹ de glicose, 5 g.L ⁻¹ de xilose, 5 g.L ⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 5 g.L ⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L ⁻¹ de CMC. DO ₀ = 100 e 35 °C. Leveduras AC14 (barras preenchidas) e MD4 (barras hachuradas). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.....	59
Figura 13 - Cinética da produção enzimática dos ensaios de BPC com levedura AC14 em condições aeróbias (◆) e anaeróbias (■). (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β-	

glicosidase e (d) β -xilosidase. Meio 6, contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de xilose, 5 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 5 g.L⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L⁻¹ de CMC (Tabela 6). DO₀ = 100, pH inicial 5,5 e 35 °C. Letras iguais acima dos pontos indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. 61

Figura 14 - Acompanhamento dos ensaios de BPC em bateladas repetidas (levedura AC14, meio YP contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de xilose, 5 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 5 g.L⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L⁻¹ de CMC, DO = 100 e 35 °C). 62

Figura 15 - Atividades nos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC em batelada repetida. (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β -glicosidase e (d) β -xilosidase. Levedura AC14, DO₀ = 100, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. 65

Figura 16 - Fluxograma das diferentes configurações estudadas nos ensaios fermentativos de BPC realizados com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido e hidrotérmicamente (a) BPC padrão; (b) BPC com proteína de soja; (c) BPC com celulignina condicionada; (d) BPC com celulignina condicionada e com proteína de soja; (e) BPC com celulignina congelada; (f) BPC com celulignina congelada e com proteína de soja. Condições: 35°C, pH 5,5, DO₀ 100. 76

Figura 17 - Perfis de conversão dos ensaios de BPCs (pH 5,5, DO₀ 100, agitação magnética) com licores advindo dos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolos vermelhos) e ácido (símbolos pretos). 80

Figura 18 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5). BPC agitado (●), BPC estático (■). Conversão estimada a partir dos dados de massa CO₂ produzido. 81

Figura 19 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO₀ = 100, 35 °C, pH 5,5, agitação magnética), analisando influência da ausência (●) e presença (■) de proteína de soja no BPC (símbolo cheio) ou no condicionamento (símbolo vazio), congelamento da celulignina (▲) e interação da proteína de soja e congelamento (◆). 84

Figura 20 - Cinética da produção enzimática dos ensaios de BPC com levedura AC14. Influência da proteína de soja e do congelamento. DO₀ = 100, pH inicial 5,5 e 35 °C, agitação magnética. 85

Figura 21 - Incrementos em porcentagem das atividades enzimáticas do extrato enzimático obtidos nos cultivos em relação ao BPC padrão. Letras iguais acima dos pontos indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. 87

Figura 22 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido

(símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar ($DO_0 = 100$, $35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,5$). BPC agitado (●), BPC estático (■). Conversão estimada a partir dos dados de produção de CO_2 90

Figura 23 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar ($DO_0 = 100$, $35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,5$, agitação magnética), analisando influência da ausência (●) e presença (■) de proteína de soja no BPC (símbolo cheio) ou no condicionamento (símbolo vazio), congelamento da celulignina (▲) e interção da proteína de soja e congelamento (◆.) Conversão estimada a partir dos dados de produção de CO_2 90

Figura 24 - Diâmetro dos *beads* testados para imobilização da levedura AC14 a ser utilizada em BPC. 97

Figura 25 - Acompanhamento dos ensaios 1-7 de BPC em mini-reatores do planejamento experimental 22 em condição estática. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5\text{ g.L}^{-1}$), 35°C , DO_0 100 e $\text{pH } 5,5$, 8% ($v_{\text{bead}}/v_{\text{meio}}$). 101

Figura 26 - Atividades enzimática dos sobrenadantes do BPC em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5\text{ g.L}^{-1}$). 35°C , DO_0 100 e $\text{pH } 5,5$ 102

Figura 27 - Gráficos de Pareto para cada variável resposta do BPC em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança). (a) Celulases totais; (b) Xilanases; (c) β -glicosidase; (d) β -xilosidase; (e) Concentração de etanol; (f) $Y_{P/S}$; (g) Q_P ; (h) Viabilidade. Diâmetro do *bead* – x_1 ; carga celular – x_2 e suas interações ($x_1.x_2$) 105

Figura 28 - Variação das variáveis resposta do BPC em condição estática com as condições de imobilização da levedura AC14 em alginato de cálcio: (a) Xilanases, (b) Produção de etanol, (c) Q_P e (d) $Y_{P/S}$ 106

Figura 29 - Acompanhamento dos experimentos do planejamento fatorial 22 realizado para os ensaios BPC em condição agitada em mini-reatores. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5\text{ g.L}^{-1}$), 35°C , DO_0 100, 250 rpm e $\text{pH } 5,5$, 8% ($v_{\text{bead}}/v_{\text{meio}}$). 107

Figura 30 - Atividades enzimática dos sobrenadantes do BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5\text{ g.L}^{-1}$). 35°C , 250 rpm, DO_0 100 e $\text{pH } 5,5$ 108

Figura 31 - Gráficos de Pareto para cada variável resposta do planejamento fatorial 22 do BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança). Diâmetro do *bead* – x_1 , carga celular – x_2 e interações ($x_1.x_2$). 111

Figura 32 - Superfícies de resposta das variáveis estudadas no planejamento fatorial 22 de BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança): (a) Xilanases, (b) Produção de etanol, (c) Q_P e (d) $Y_{P/S}$ 112

Lista de tabelas

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do BPC (adaptado de OLGUIN-MACIEL et al., 2020).	32
Tabela 2 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que produzem enzimas celulolíticas.	35
Tabela 3 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que secretam enzimas hemicelulolíticas.	36
Tabela 4 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que secretam enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.....	36
Tabela 5 - Informações sobre as enzimas hidrolíticas produzidas por <i>S. cerevisiae</i> AC14 (CLAES et al., 2020; RAMOS et al., 2022).....	43
Tabela 6 - Composição inicial dos meios estudados para o BPC (considerando diluição após adição da suspensão celular).	46
Tabela 7 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC com AC14 em meio YP (composição de acorco com Tabela 6). $DO_0 = 100$, 35 °C, pH inicial 5,5. Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.....	54
Tabela 8 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em diferentes valores de pH inicial. Levedura AC14, $DO_0 = 100$, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.	58
Tabela 9 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em condições aeróbias e anaeróbias. Leveduras AC14, $DO_0 = 100$, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.	62
Tabela 10 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em bateladas repetidas. Levedura AC14, $DO_0 = 100$, 35 °C, pH 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.	63
Tabela 11 - Protocolos resumidos das atividades enzimáticas utilizadas para caracterizar os extratos enzimáticos gerados nos ensaios de BPC.....	77
Tabela 12 - Características dos licores advindos dos pré-tratamentos ácido (H_2SO_4 1% v/v, 1:10 p/v, 121 °C, 20 min) e hidrotérmico (1:10 p/v, 195 °C, 10 min, 250 rpm) do bagaço.	79
Tabela 13 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios fermentativos com AC14 em licores hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar ($DO_0 = 100$, 35 °C, pH 5,5, agitação magnética). Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não	

diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%..... 80

Tabela 14 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC padrão agitados e estáticos com levedura AC14 com licores reais e sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar ($DO_0 = 100$, $35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,5$). Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.. 82

Tabela 15 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores reais e sintéticos e celuligninas gerados nos pré-tratamentos hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar ($DO_0 = 100$, $35\text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH } 5,5$, magnéticamente), avaliando a presença de proteína de soja e congelamento da celulignina. Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.. 86

Tabela 16 - Matriz experimental de planejamento fatorial 22 com 3 repetições no ponto central para avaliar a influência do diâmetro médio do *bead* (X1) e a concentração de células imobilizadas (X2) em diferentes variáveis de resposta..... 97

Tabela 17 - Parâmetros fermentativos utilizados para avaliar o BPC com levedura AC14 imobilizada em alginato de cálcio (SHULER e KARGI, 2002). 99

Tabela 18 - Parâmetros fermentativos do BPC em mini-reatores em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5\text{ g.L}^{-1}$). 35°C , 250 rpm , $DO_0\ 100$ e $\text{pH } 5,5$ 103

Lista de abreviaturas e símbolos

2B: Segunda geração;

AFEX: Ammonia fiber expansion;

ARA: Arabinofuranosidase;

AXE: acetil-xilana esterase;

BC: bagaço de cana-de-açúcar;

BG: β -glicosidase

BPC: Biorprocessamento Consolidado;

BX: β -xilosidase;

C: celulase;

C6: Hexose;

C5: Pentose;

CEL: Celobiohidrolase;

CIAF: Celulose inchada com ácido fosfórico;

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

CMC: Carboximetilcelulose;

DO₀: Densidade ótica inicial;

EM: espiga de milho;

ENDG: Endoglucanase;

ENDX: endoxilanase;

EXOG: Exoglucanase;

FT: farelo de trigo;

HMF: Hidroximetilfurfural;

LMM: licor de maceração de milho;

P: Peptona;

PA: palha de arroz;

PKBL: polpa Kraft não branqueada Laubholz;

PM: palha de milho;

PT: palha de trigo;

PW: papel Whatman;

Q_P: Produtividade;

SHF: Hidrólise seguida de Fermentação;

SHIF: Sacarificação, hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas;

SSCF: Sacarificação e co-fermentação simultâneas;

SSF: Sacarificação e fermentação simultâneas;

X: xilanase;

XB: xilano de bétula;

XR: xilose redutase;

XSM: xilana de sabugo de milho.

XD: xilitol desidrogenase;

XQ: xiluloquinase;

Y: Extrato de levedura;

Y_{P/S}: Rendimento em etanol.

Capítulo 1: Introdução

1.1. Contextualização

Diante dos problemas socioambientais e econômicos da atualidade, muitos estudos têm focado no desenvolvimento de processos sustentáveis e na utilização de fontes renováveis para produção de energia, visando a diminuição dos impactos ambientais e das emissões de gases de efeito estufa (FURLAN *et al.*, 2013; RODIONOVA *et al.*, 2017). Neste contexto, surge o conceito de Biorrefinaria que consiste em uma planta industrial que contempla a utilização total da biomassa vegetal substituindo os recursos fósseis, em especial aquelas que não são fontes de alimentos, reduzindo também a geração de resíduos (OCTAVE e THOMAS, 2009). A produção de biocombustíveis em Biorrefinarias, integrada à obtenção de outros produtos, destaca-se por propor a utilização das frações celulósica e hemicelulósica da biomassa vegetal, aplicando rotas bioquímicas alternativas aos processos químicos e contribuindo para uma economia circular (LIU *et al.*, 2021). Dentre os biocombustíveis, etanol destaca-se no cenário brasileiro devido ao histórico e tradição do mesmo no país. Embora a produção do etanol de primeira geração (1G) já esteja muito bem consolidada, o etanol de segunda geração (2G) apesar de bastante incentivado por ser produzido a partir de materiais lignocelulósicos (como os co-produtos agroindustriais) (RAMOS *et al.*, 2022) possui ainda gargalos, como a subutilização da fração hemicelulósica devido à dificuldade da conversão da xilose por leveduras selvagens de maneira eficiente, necessitando de mais aprofundamento sobre o assunto (FERREIRA, 2015).

Neste sentido, os grupos de pesquisa LaFaC (Laboratório de Fábricas Celulares), LaDABio (Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos) e LabEnz (Laboratório de Tecnologia Enzimática) e mais recentemente LaBioS (Laboratório de Bioprocessos e Sustentabilidade) do DEQ/UFSCAR têm larga experiência no estudo da produção de etanol 2G a partir de materiais lignocelulósicos por diferentes modos de operação, em condições industriais. Em mais de uma década de estudos, microrganismos selvagens e geneticamente modificados foram utilizados na forma livre e imobilizada para produzir etanol 2G a partir de xilose (MILESSI *et al.*, 2020a; 2020b; 2020c; MILESSI *et al.*, 2018; PEREZ *et al.*, 2022, 2021; RAMOS *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2022). O grupo também é pioneiro no desenvolvimento de processos de aproveitamento da fração hemicelulósica via Hidrólise, Isomerização e Fermentação

Simultâneas (SHIF) (MILESSI *et al.*, 2019) e Isomerização e Fermentação Simultâneas (SIF) (MILESSI *et al.*, 2020; MILESSI *et al.*, 2018; RAMOS *et al.*, 2021), possuindo duas patentes no assunto, uma concedida e outra depositada (GIORDANO *et al.*, 2014; MILESSI-ESTEVEES; ZANGIROLAMI; *et al.*, 2019).

Uma tecnologia emergente que ainda merece ser mais explorada é o Bioprocessamento Consolidado (BPC) da biomassa, no qual a produção das enzimas hidrolíticas, hidrólise enzimática e fermentação de pentose e hexoses ocorrem simultaneamente em um mesmo reator (OH; JIN, 2020; OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020). Esse processo é bastante atrativo por conta da produção das enzimas *in situ*, visto que em outras configurações existentes, como a sacarificação e fermentação simultâneas (SSF) e hidrólise e fermentação separadas (SHF), a adição de enzima exógena é uma barreira tecnológica por conta dos elevados custos das enzimas (RAMOS *et al.*, 2022).

O desenvolvimento da tecnologia BPC é fundamental, particularmente no contexto da Biorrefinaria da cana-de-açúcar, de forma que o bagaço e a palha gerados no processamento da cana sejam efetivamente aproveitados para a obtenção não apenas de etanol, mas de outros compostos de maior valor agregado. Embora existam pesquisas que abordem o BPC, ainda não foi encontrado microrganismos selvagens ou desenvolvida uma linhagem recombinante que assimilem xilose e produzam enzimas de maneira eficiente. Nenhum estudo visando o desenvolvimento de uma tecnologia de BPC escalonável, robusta e que viabilize a operação com alta produtividade, por longos períodos, foi realizado até o momento.

Por isso, esses desafios precisam ser enfrentados para a inserção do BPC no cenário da indústria sucroenergética brasileira, destacando-se ainda que não foram encontrados trabalhos de grupos de pesquisa do Brasil abordando a aplicação de BPC com linhagens de *S. cerevisiae* recombinantes, além do estudo preliminar desenvolvido por Perez (2021). Tais testes iniciais foram realizados com a *S. cerevisiae* AC14 construída por Claes *et al.*, (2020) que produz sete enzimas hidrolíticas, conferindo-lhe um grande potencial para ser utilizada em BPC. Resumidamente, essa cepa apresenta a capacidade de produção das enzimas β -glicosidase, β -xilosidase, xilanase, endoglucanase, celobiohidrolase I, celobiohidrolase II, acetil xilana esterase, além de elevados rendimentos em etanol (0,46 g.g⁻¹), sendo necessário ainda estudar seu comportamento em condições de processo (CLAES *et al.*, 2020; PEREZ, C.L., 2021).

Diante do exposto, o presente estudo pretende contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia escalonável para o BPC de bagaço de cana, utilizando levedura com

elevada capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas e assimilação eficiente de xilose (cepa AC14). Vale destacar que o presente mestrado se inseriu no subprojeto “Subprojeto 5.2: Etanol 2G a partir de biomassa de cana de açúcar: processamento da fração C5 em reator de hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF)” do projeto temático FAPESP “Da fábrica celular à biorrefinaria integrada biodiesel-bioetanol: uma abordagem sistêmica aplicada a problemas complexos em micro e macroescalas” (Processo 2016/10.636-8). Este mestrado também integrou as atividades no Projeto Universal do CNPq #407716/2021-1.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo Geral

O objetivo geral deste projeto foi contribuir para o desenvolvimento do Bioprocessamento Consolidado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando a levedura recombinante de alta performance *Saccharomyces cerevisiae* AC14, visando a aplicação em biorrefinarias.

1.2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a influência de diferentes substratos sintéticos, pHs e da aeração na atividade das enzimas hidrolíticas produzidas pela linhagem AC14;
- b) Avaliar o BCP em meio sintético em bateladas repetidas utilizando a melhor condição operacional selecionada no objetivo “a”;
- c) Avaliar o BPC com bagaço pré-tratado por via hidrotérmica e ácida (fração sólida + hidrolisado);
- d) Estudar a influência de diferentes tratamentos da fração sólida do bagaço (adição de proteína de soja e congelamento) na eficiência da hidrólise enzimática no BPC;
- e) Avaliar a aplicabilidade da levedura AC14 em sua forma imobilizada em BPC e estudar a influência das variáveis do processo de imobilização (diâmetro dos *beads* e carga de células) no BPC.

1.3. Estrutura do texto

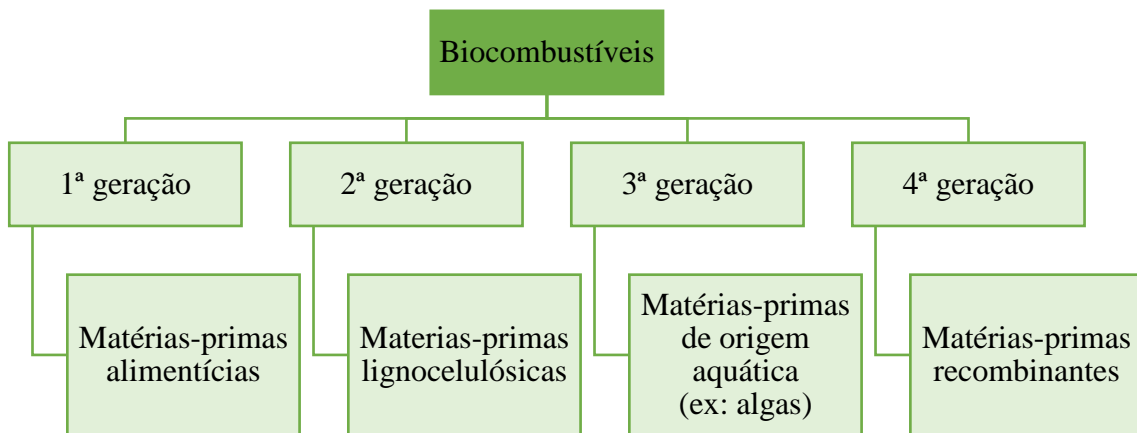
Os resultados obtidos nesta dissertação encontram-se apresentados nos capítulos seguintes no formato de artigos científicos. O Capítulo 2, intitulado “Influência das condições operacionais na produção de enzimas hidrolíticas por levedura recombinante de alto desempenho para Bioprocessamento Consolidado”, aborda a seleção das condições de processo (composição do meio, pH e influência do O₂) que levaram à maior produção de enzimas. Já o Capítulo 3, “Avaliação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AC14 no bioprocessamento consolidado de bagaço de cana advindo da indústria sucroalcooleira para produção de etanol 2G”, apresenta os resultados obtidos com a levedura recombinante no BPC de meio industrial real, utilizando as condições selecionadas anteriormente. Por fim, considerando o desafio de se recuperar e reutilizar a biomassa celular em processos que envolvem a hidrólise e fermentação simultâneas do substrato, o Capítulo 4, “Bioprocessamento consolidado utilizando células imobilizadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AC14: Influência da carga de células e do diâmetro dos *beads*”, avaliou a aplicabilidade da levedura imobilizada em BPC e a influência das condições de imobilização na produção de etanol. O Capítulo 5 encerra a presente dissertação com as principais conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

1.4. Revisão Bibliográfica

1.2.1. Biocombustíveis

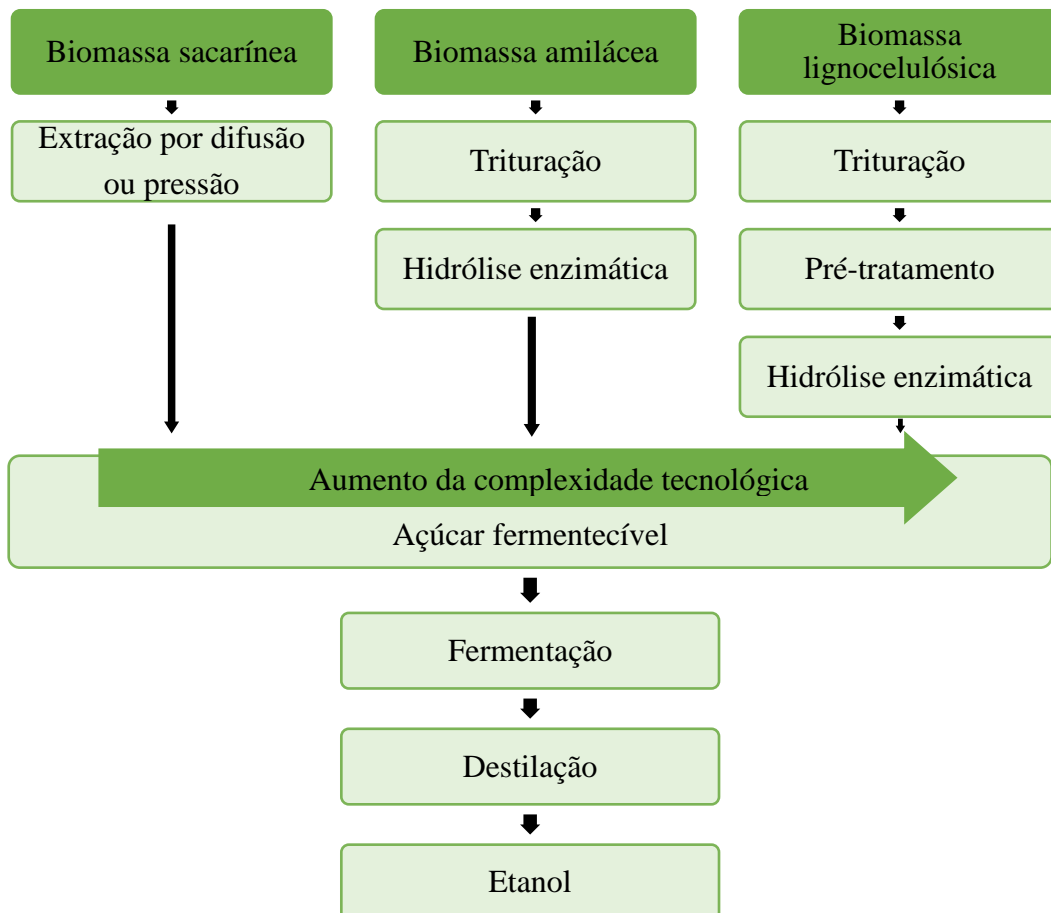
Os biocombustíveis são substâncias geradoras de energia que podem ser produzidos a partir de diferentes matérias-primas (AHORSU *et al.*, 2018), podendo ser classificados em virtude dos diferentes tipos de substrato em primeira, segunda, terceira ou ainda quarta geração, sendo os detalhes expressos na Figura 1. Dentre os biocombustíveis existentes, atualmente o etanol é majoritariamente produzido a partir dos grãos de milho, assim como do caldo e do melaço gerados no processamento da cana-de-açúcar, dando origem ao etanol de primeira geração (1G). No entanto, os materiais lignocelulósicos constituem uma abundante fonte de matéria-prima no contexto da Biorrefinaria para obtenção de etanol de segunda geração (2G) e outros compostos (AGUIAR *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020).

Figura 1 – Classificação dos biocombustíveis de acordo com as matérias-primas de origem (Adaptado de AHORSU *et al.*, 2018).



As etapas envolvidas na produção de etanol variam de acordo com a matéria prima. Na Figura 2 estão representadas as rotas de produção do etano 1G a partir de biomassas sacarínea e amilácea assim como as etapas para a produção de etanol 2G a partir da biomassa lignocelulósica.

Figura 2 - Processos produtivos do etanol 1G e 2G (Adaptado de MILESSI, 2017).



A biomassa lignocelulósica, como por exemplo co-produtos agroindustriais e florestais, é um substrato interessante por permitir o aumento da produção do etanol sem demandar maior área de plantio. Esta biomassa é composta principalmente por polímeros ricos em açúcares fermentescíveis, além de uma pequena parcela de proteínas, minerais e outros (AGUIAR *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020).

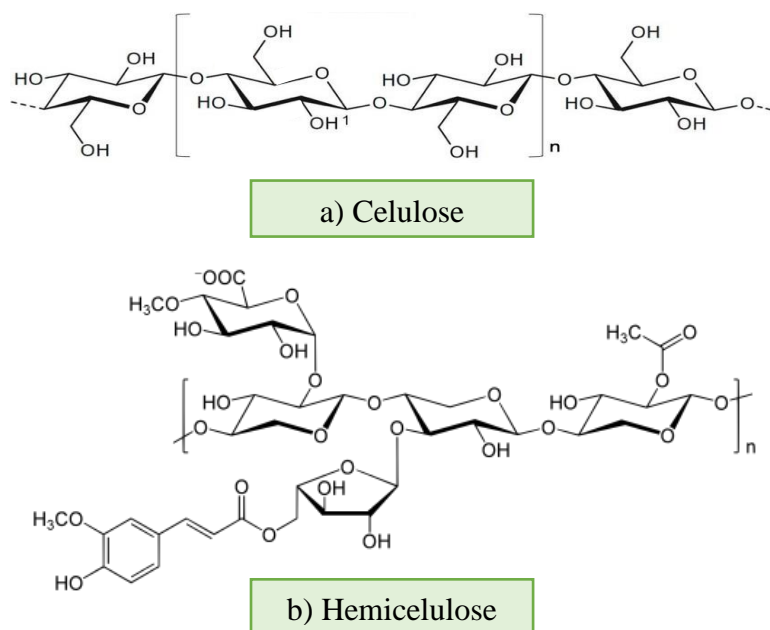
No Brasil, os co-produtos agroindustriais gerados em maior abundância são provenientes do processamento da cana-de-açúcar. Na safra 2022/2023, está prevista a produção de 572,9 milhões de toneladas de cana no país (CONAB, 2022), sendo que, para cada tonelada de cana processada nas usinas, são gerados 140 kg de bagaço e 120 kg de palha de cana (CANILHA *et al.*, 2012).

O bagaço, atualmente, vem sendo parcialmente aproveitado como combustível nas caldeiras para geração de energia elétrica e vapor. Por outro lado a palha costuma ser deixada no campo, porém os excedentes representam valiosa fonte de açúcares (AGUIAR *et al.*, 2021; FERREIRA, 2015).

1.2.2. Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são estruturas vegetais complexas. São principalmente compostos por celulose (Figura 3a), hemicelulose (Figura 3b) e lignina (CORRÊA e GALLO, 2020).

Figura 3 - Estrutura das cadeias que compõem celulose e hemicelulose da biomassa.



A celulose é o polímero composto por unidades de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas. A hemicelulose (Figura 3b), por sua vez, é um heteropolímero ramificado composto principalmente por pentoses (como xilose e arabinose) mas contendo também hexoses (como glicose, galactose e manose) e ácidos de açúcar (como ácido glucurônico). A lignina é um biopolímero aromático rígido com alto peso molecular que liga os outros dois componentes por ligações covalentes e hidrogenadas (CORRÊA e GALLO, 2020). Essa estrutura é bastante recalcitrante, sendo necessária uma etapa de pré-tratamento seguida de uma hidrólise enzimática para liberar os açúcares fermentescíveis que podem ser convertidos a biocombustível (SHARMA *et al.*, 2020).

1.2.3. Pré-tratamentos

Para produção de etanol 2G, a estrutura complexa da biomassa deve ser rompida a fim de tornar as frações celulósica e hemicelulósica mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas, viabilizando a liberação dos açúcares e sua fermentação a etanol ou sua conversão a outros bioprodutos. Diante disso, uma etapa de pré-tratamento deve ser aplicada, conforme ilustrado na Figura 4 (AGUIAR *et al.*, 2021; CHEAH *et al.*, 2020; SHARMA *et al.*, 2020).

Existem diversos métodos de pré-tratamentos disponíveis na literatura, porém não existe uma técnica universal, pois sua eficiência depende do produto de interesse e da biomassa utilizada (BARUAH *et al.*, 2018). Tais metodologias podem consistir em processos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos ou uma combinação deles, dependendo dos catalisadores utilizados (BARUAH *et al.*, 2018; KUMAR e SHARMA, 2017). Alguns pré-tratamentos estão listados e classificados na Figura 5.

De acordo com Zhao *et al.* (2022) as principais desvantagens dos pré-tratamentos existentes são a geração de inibidores e a baixa eficiência. Os inibidores são produtos associados à degradação da hemicelulose e lignina, podendo citar o 5-hidroximetilfurfural, o furfural, os fenóis e outros compostos aromáticos. Essas substâncias podem inibir a assimilação de monômeros e a ação das enzimas, prejudicando o crescimento microbiano e causando lise celular, sendo primordial minimizar sua produção.

Figura 4 - Rompimento da estrutura de materiais lignocelulósicos obtida pela etapa de pré-tratamento (Adaptado de MOOD et al., 2013).

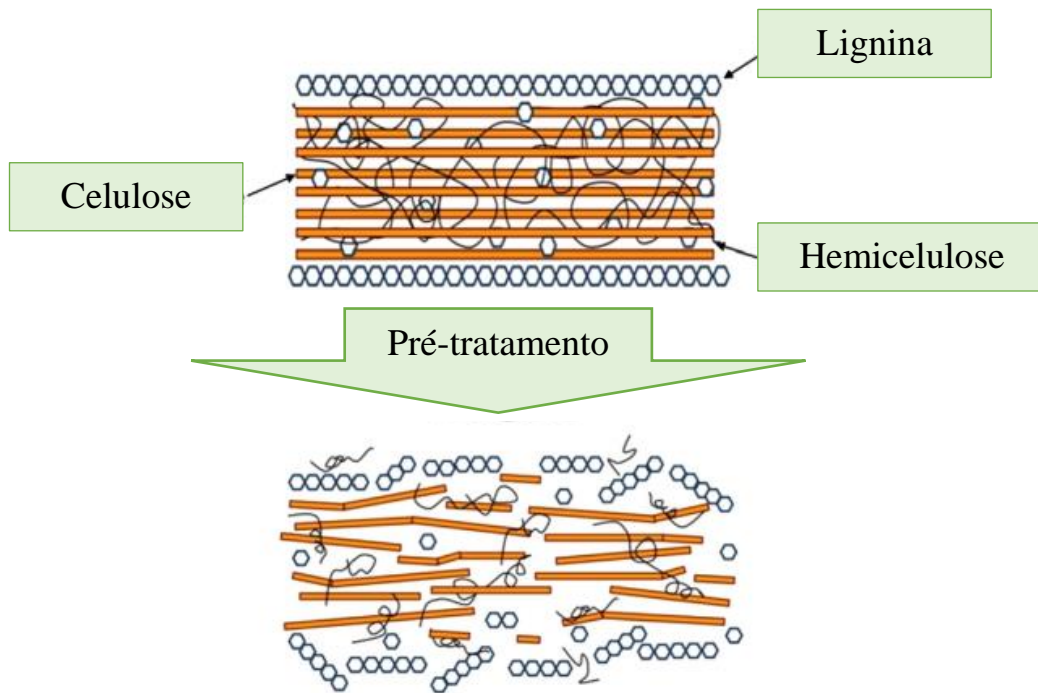
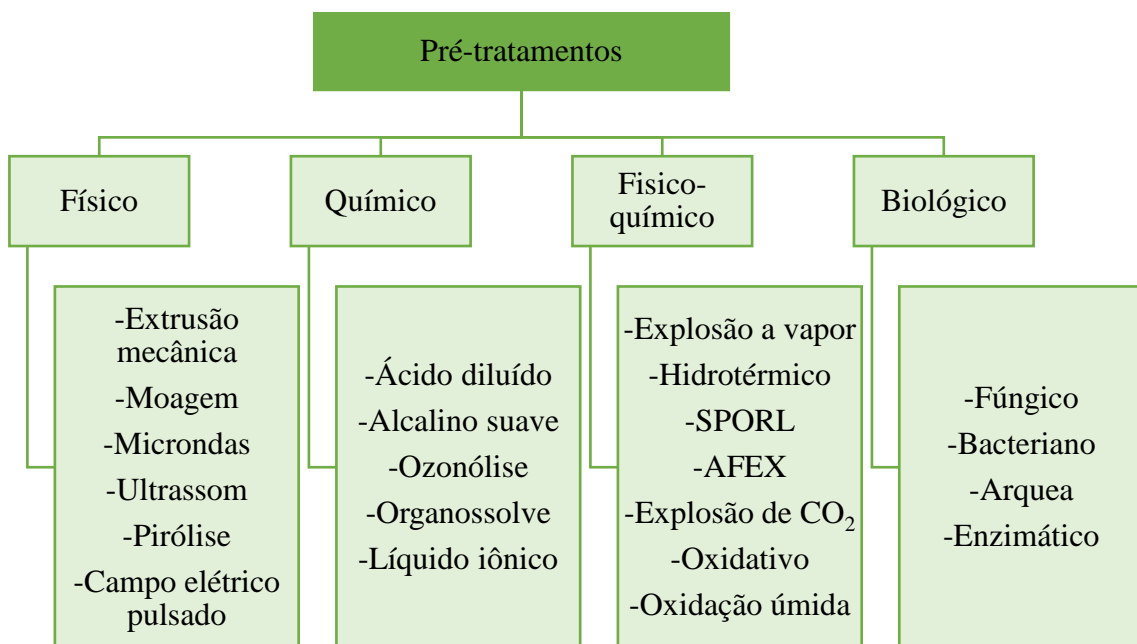


Figura 5 - Diferentes tipos de pré-tratamentos existentes para materiais lignocelulósicos (Adaptado de RAMOS et al., 2022).



Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido é um processo de baixo custo e aplicável em diferentes matérias-primas (CHEAH *et al.*, 2020). Essa metodologia, por meio da hidrólise química, transforma a biomassa em uma fração líquida, a qual possui a porção hemicelulósica solubilizada, e outra fração sólida, contendo a celulignina. Ou seja, esse processo solubiliza a hemicelulose, podendo ser seguido de uma etapa de deslignificação alcalina para retirada da lignina (CHEAH *et al.*, 2020).

Nesse pré-tratamento, pode-se usar ácido diluído ou concentrado. Ao se utilizar ácido concentrado, baixas temperaturas (<100°C) são aplicadas, enquanto temperaturas mais altas (100-250°C) são usadas para ácidos diluídos (<10%) (BARUAH *et al.*, 2018). Os insumos mais utilizados são: ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico e ácido clorídrico (AGUIAR *et al.*, 2021; CHEAH *et al.*, 2020; KUMAR e SHARMA, 2017).

Ao comparar as duas possibilidades, o ácido diluído é mais atraente, pois acarreta menores problemas de corrosão em equipamentos, demandando menos manutenção e custos de neutralização do que o ácido concentrado (AGUIAR *et al.*, 2021; CHEAH *et al.*, 2020; KUMAR e SHARMA, 2017). Adicionalmente, uma desvantagem geral desse tipo de pré-tratamento é a formação de inibidores, como por exemplo furfural e hidroximetilfurfural (HMF). Para minimizar este problema, uma opção é a adição de uma etapa de destoxificação antes da fermentação. Todavia, a adição de uma nova etapa no processo acarreta aumento do tempo de produção e no custo final (MILESSI *et al.*, 2020b).

Pré-tratamento hidrotérmico

O pré-tratamento hidrotérmico é promissor por ser simples, econômico e ter um ciclo curto que gera menos produtos de degradação quando comparado aos demais métodos disponíveis (CHEAH *et al.*, 2020). Essa tecnologia baseia-se na utilização de água em altas pressões. Isso faz com que seja um processo bastante atraente do ponto de vista de sustentabilidade, pois não necessita de adição de solventes, nem de etapas de neutralização e recuperação. Além disso, não é preciso reatores resistentes a corrosão, pode-se usar a biomassa úmida e tem custos operacionais menores quando comparado a outros pré-tratamentos que necessitam de diversos insumos e equipamentos específicos (CHEAH *et al.*, 2020; MOOD *et al.*, 2013; YUE *et al.*, 2022). Um aspecto desfavorável

ao pré-tratamento hidrotérmico é o grande volume de água necessário (CHEAH *et al.*, 2020).

Esse método é conduzido em altas temperaturas (150–260 °C) e pressões (>5 MPa), solubilizando a fração hemicelulósica (> 80%), mantendo a celulose na fração sólida e alterando a estrutura da lignina (CHEAH *et al.*, 2020; MOOD *et al.*, 2013; YUE *et al.*, 2022). Isso é interessante, pois pode facilitar a hidrólise enzimática da celulose que fica mais exposta. Neste processo, os açúcares da fração hemicelulósica são solubilizados em grande parte como oligômeros, enquanto a formação de xilose é minimizada (CHEAH *et al.*, 2020; MOOD *et al.*, 2013; YUE *et al.*, 2022).

Resumidamente, as reações que acontecem nesse pré-tratamento estão ligadas à auto-ionização da água e à produção de ácido acético *in situ*. Em condições normais, a água é composta por uma rede de ligações de hidrogênio. À medida que a temperatura é elevada, estas ligações enfraquecem, gerando íons hidrônio ácidos (H_3O^+) e íons hidróxido alcalinos (OH^-), tendo a função de autocatálise ácido-álcali, que diminui a rigidez da estrutura lignocelulósica e despolimeriza a biomassa. Os grupos acetil clivados da hemicelulose são convertidos em ácido acético, os quais catalisam a degradação da hemicelulose em oligossacarídeos, monossacarídeos e produtos de degradação. Adicionalmente, a viscosidade diminui em altas temperaturas, resultando em maior fluidez da suspensão, maior transferência de massa e, conseqüentemente, maior eficiência do pré-tratamento (YUE *et al.*, 2022).

Pré-tratamentos complementares

A combinação de pré-tratamentos pode aumentar a exposição da fibra da biomassa. Assim, a celulignina gerada no primeiro método utilizado é encaminhada para um segundo processo que visa melhorar a acessibilidade das enzimas hidrolíticas à matéria-prima. Sendo assim, com a estrutura recalcitrante do material lignocelulósico mais susceptível à ação das enzimas, é realizada a hidrólise enzimática para a liberação dos monossacarídeos fermentescíveis. Dentre os diferentes pré-tratamentos complementares existentes, pode-se citar a aplicação de micro-ondas que é de fácil operação, baixo consumo de energia e geração mínima de inibidores (KUMAR e SHARMA, 2017). O congelamento é outro processo bastante atraente. Neste caso, o volume da água presente no material expande quando o líquido passa para o estado sólido em baixas temperaturas. Ao acontecer a variação de volume da água, as paredes celulares

se rompem, diminuindo a rigidez da matriz lignocelulósica. Interessantemente, este método é de baixo custo e resulta em pouca geração de inibidores (CHEAH *et al.*, 2020; SMICHI *et al.*, 2016).

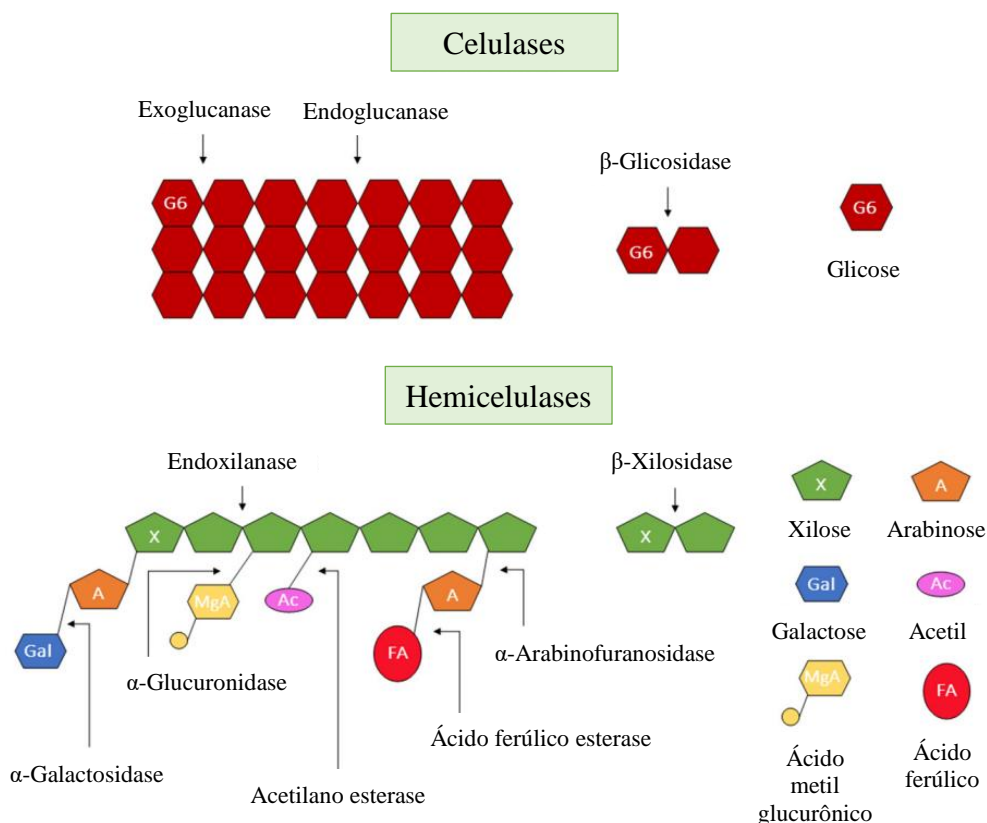
1.2.4. Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática é de suma importância para a liberação dos açúcares que serão fermentados a etanol. A utilização de biocatalisadores para esta finalidade é interessante por possuírem elevada especificidade e não gerarem componentes tóxicos (FERREIRA, 2015). Dentre as enzimas mais utilizadas para essa aplicação, destacam-se as celulases e xilanases, além das pectinases, lacases e enzimas acessórias (RAMOS *et al.*, 2022).

A ação de algumas dessas enzimas está ilustrada na Figura 6 juntamente com os substratos na qual atuam. Dentre elas, cita-se que as celulases atuam de forma sinérgica, sendo que as endoglucanases (E.C. 3.2.1.4) clivam as ligações internas de celulose, as exoglucanases (E.C. 3.2.1.91) clivam ligações próximas ao oligossacarídeo e extremidades da cadeia e a β -glicosidase (E.C. 3.2.1.21) converte a celobiose em glicose (BHARI e SINGH, 2017; OGEDA e PETRI, 2010). As xilanases, por sua vez, são responsáveis pela hidrólise da fração hemicelulósica da biomassa. A enzima endo-xilanase (EC 3.2.1.8) atua no meio da cadeia de xilana e a β -xilosidase (EC 3.2.1.37) hidrolisa xilobiose em xilose. Adicionalmente, existem enzimas auxiliares para hidrolisar as cadeias laterais da xilana, devendo-se citar a α -galactosidase (EC 3.2.1.22), a α -glucuronidase (EC 3.2.1.131), a acetil xilana esterase (EC 3.1.1.72), a ácido ferúlico esterase (EC 3.1.1.73) e a α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) (BHARDWAJ *et al.*, 2019).

O custo elevado das enzimas e a adsorção irreversível das mesmas na lignina residual presente na fração sólida, prejudicando a eficiência do processo de hidrólise, são desafios observados atualmente nesta etapa (FLORENCIO *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2022) Para minimizar esse problema, pode-se adicionar proteínas ao meio fermentativo que têm a função de serem moléculas de sacrifício, ocupando o sítio onde as enzimas adsorveriam e perderiam função. Dentre as proteínas que já foram estudadas para esta finalidade, a proteína de soja tem se mostrado bastante eficiente, além de possuir baixo custo (FLORENCIO *et al.*, 2019, 2016).

Figura 6 - Enzimas hidrolíticas e seus respectivos substratos (Adaptado de RAMOS et al., 2022).



1.2.5. Avanços na biotecnologia para produção de etanol 2G

As leveduras têm papel fundamental na obtenção de biocombustíveis. Dentre elas, a *Saccharomyces cerevisiae* se destaca, sendo o microrganismo mais utilizado industrialmente para a produção de etanol 1G por causa de sua robustez e por apresentar rápida conversão de hexoses em etanol (AZHAR *et al.*, 2017). Todavia, linhagens selvagens de *S. cerevisiae* não assimilam eficientemente as pentoses, pois não possuem transportadores específicos para xilose e apresentam baixíssima atividade de xilose redutase (XR) e xilose desidrogenase (XDH), principais enzimas do metabolismo das pentoses em leveduras (MONTAÑO, 2013; APEL *et al.*, 2016; TOIVARI *et al.*, 2004). Por isso, o aproveitamento da fração hemicelulósica, rica em xilose, crucial para a viabilidade econômica da produção de etanol 2G, permanece como um grande desafio do ponto de vista industrial a nível global (AZHAR *et al.*, 2017). Neste sentido, em muitos estudos, modificações genéticas têm sido introduzidas na *S. cerevisiae* para viabilizar a fermentação eficiente de xilose, incluindo a expressão da enzima xilose isomerase, a qual

isomeriza xilose em xilulose, a super-expressão de enzimas da via pentose fosfato e a sub-expressão da XDH, a fim de minimizar a produção de xilitol (CUNHA *et al.*, 2019; DIAO *et al.*, 2013; MERT *et al.*, 2017).

Diferentes configurações de processo também têm sido estudadas. Na Fermentação e Hidrólise Separadas (SHF, de *Separated Hydrolysis and Fermentation*) ambas as etapas são realizadas em condições ideais de pH e temperatura de maneira sequencial. Porém, as celulases são inibidas por glicose e alguns oligossacarídeos gerados durante a etapa de hidrólise (OGEDA e PETRI, 2010), levando à diminuição da velocidade da reação. Por outro lado, a Fermentação e Hidrólise Simultâneas (SSF, de *Simultaneous Saccharification and Fermentation*) se baseia na adição de enzimas e leveduras em um único reator (DIAZ *et al.*, 2014). No entanto, as enzimas hidrolíticas costumam ter faixas de temperatura ótima entre 45–50 °C, enquanto a fermentação é conduzida a 30-35°C para preservar a viabilidade celular, resultando em menor atividade catalítica das enzimas (AGUIAR *et al.*, 2021). Tanto as hexoses quanto as pentoses podem ser convertidas no mesmo reator através da Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF, de *Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) quando se utiliza um microrganismo recombinante ou natural capaz de fermentar pentoses, o que pode levar a maior produção de etanol (MORALES-RODRIGUEZ *et al.*, 2011).

Recentemente, a tecnologia conhecida como Bioprocessamento Consolidado (Figura 7), no qual ocorre produção de enzimas hidrolíticas, hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares liberados simultaneamente em um único reator, tem recebido atenção especial. O BPC se caracteriza pelo uso de microrganismos ou consórcio de microrganismos (fungos ou bactérias) selvagens ou recombinantes que apresentem tanto a capacidade de secreção de enzimas hidrolíticas quanto de transformação dos açúcares liberados nos produtos de interesse. Assim, dispensa-se os preparados enzimáticos comerciais, geralmente considerados de alto custo, para a realização da etapa de hidrólise/sacarificação da biomassa lignocelulósica (OH e JIN, 2020; OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020).

O BPC se mostra bastante interessante quando comparado com outros processos que têm as etapas seccionadas em diferentes equipamentos. Todavia, como todo processo, o BPC possui pontos negativos. Sendo assim, vantagens e desvantagens estão relacionadas na Tabela 1.

Figura 7 - Bioprocessamento consolidado para produção de etanol 2G (Adaptado de RAMOS et al., 2022).

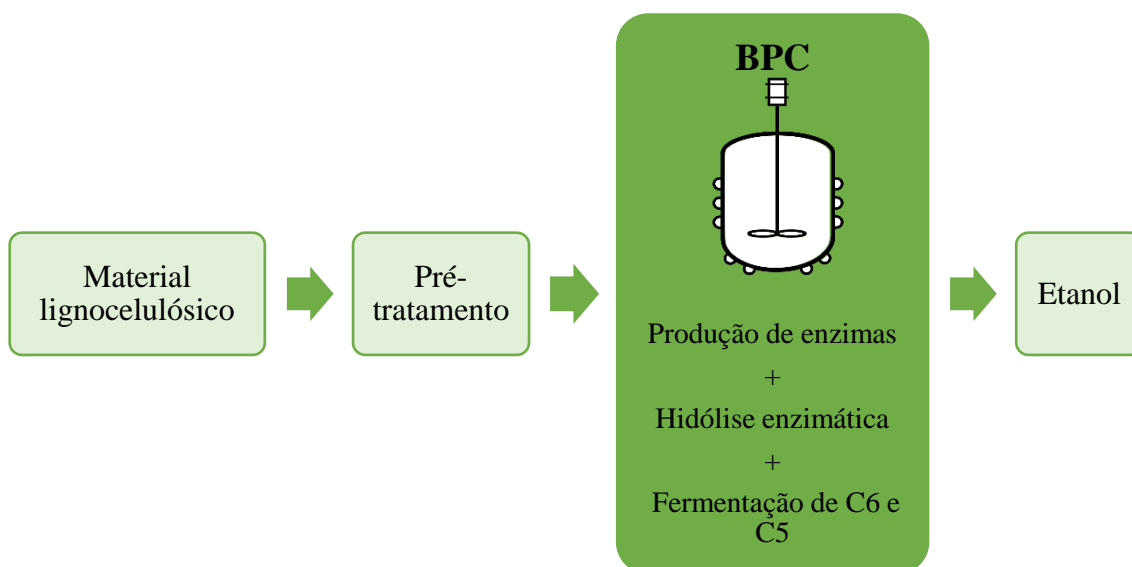


Tabela 1 - Vantagens e desvantagens do BPC (adaptado de OLGUIN-MACIEL et al., 2020).

Vantagens do BPC	Desvantagens do BPC
<ul style="list-style-type: none"> • Simplicidade operacional. • Reatores menores • Sem necessidade de adição de enzimas. • Risco mínimo de contaminação. • Co-fermentação de pentose e hexose. • Investimento reduzido. • Menor demanda de energia. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cepas selvagens produzem baixas concentrações de etanol. • Necessidade de cepas recombinantes com alto desempenho. • Restrições de leis de biossegurança. • Normalmente requer longos tempos de processo.

Infelizmente, ainda não foi encontrado um microrganismo selvagem capaz de produzir enzimas e etanol eficientemente (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020), incentivando o desenvolvimento de organismos geneticamente modificados providos dessa capacidade. Por isso, na literatura, existem muitos trabalhos que desenvolveram cepas recombinantes para o BPC. O levantamento do estado da arte está resumido nas Tabelas 2 a 4.

A maioria destes trabalhos concentra-se no desenvolvimento de microrganismos secretando principalmente β -glicosidase e endoglucanase, que degradam a fração celulósica da biomassa liberando glicose, que é consumida pelo microrganismo (Tabela 2). Já um número expressivamente menor de trabalhos aborda apenas a hidrólise da fração hemicelulósica (Tabela 3), uma vez que essa porção é mais facilmente solubilizada na forma de monômeros na etapa de pré-tratamento. Porém, a aplicação de pré-tratamentos menos severos pode levar à solubilização de parte da hemicelulose na forma de xilooligômeros assim como à formação de uma fração sólida residual da biomassa contendo o restante da hemicelulose não solubilizada (WANG e LU, 2013).

Uma vez que, no contexto de Biorrefinaria, a biomassa lignocelulósica deve ser aproveitada em sua totalidade, o microrganismo (ou consórcio) utilizado deve ser capaz de secretar enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas. No entanto, poucos trabalhos relatados na literatura abordam microrganismos capazes de degradar ambos os polímeros, sendo que Chen *et al.*, (2018) utilizaram um consórcio de leveduras, no qual uma levedura produzia celulasas e outra xilanases (Tabela 4).

Percebe-se ainda que a maioria dos trabalhos listados nas Tabelas 2 a 4 utilizam *S. cerevisiae* modificadas, com exceção de dois estudos, nos quais *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia pastoris* foram empregadas, confirmando a preferência por essa levedura em processos de produção de etanol, já mencionada anteriormente (AZHAR *et al.*, 2017). Somente quatro trabalhos (CLAES *et al.*, 2020; CUNHA *et al.*, 2020; KHRAMTSOV *et al.*, 2011; PEREZ, C.L., 2021) usaram uma levedura industrial como chassi para a transformação com os genes de expressão das enzimas, ou seja, quase todos os trabalhos utilizam cepas de laboratório que são menos robustas e podem ser mais sensíveis às condições reais de produção de etanol (CLAES *et al.*, 2020).

Outro ponto que chama a atenção são os elevados tempos de fermentação e as baixas concentrações de etanol, os quais inviabilizam o BPC em condições industriais. Diversos trabalhos conduziram fermentações com mais de 100 h. Comparando os dados encontrados na literatura, MATANO *et al.*, (2013) obtiveram a maior concentração de produto (42,2 g.L⁻¹) em 70 h de processo. Porém, além do tempo elevado, este trabalho utilizou enzima exógena. É importante destacar que outros trabalhos também utilizaram suplementação do meio com concentrados enzimáticos de celulasas ou β -glicosidades (HONG *et al.*, 2014; ILMÉN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017; MATANO *et al.*, 2013), não ficando clara a efetividade das enzimas produzidas pelo microrganismo em estudo.

Neste contexto, há uma carência de estudos de BPC utilizando meios industriais. A maioria dos trabalhos reportados utiliza principalmente de meios sintéticos, formulados com celuloses comerciais (Avicel, CMC, papel de filtro, celobiose, β -glucano). Poucas referências (DAVISON *et al.*, 2019; HONG *et al.*, 2014; KHRAMTSOV *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2020; MATANO *et al.*, 2013; PEREZ, 2021; YAMADA *et al.*, 2011) avaliaram o desempenho das linhagens recombinantes em materiais lignocelulósicos reais e somente dois deles usaram resíduos da indústria canavieira.

Da mesma forma, inibidores provenientes da etapa de pré-tratamento podem afetar o metabolismo do microrganismo, reduzindo a produtividade (MILESSI *et al.*, 2020a; MILESSI *et al.*, 2020b; PEREZ *et al.*, 2021; RAMOS *et al.*, 2021). Por essas razões, é importante avaliar o desempenho das leveduras recombinantes em meios contendo frações sólidas e hidrolisados obtidos a partir de materiais lignocelulósicos submetidos a diferentes condições de pré-tratamento.

A análise das Tabelas 2 a 4 mostra ainda que praticamente a totalidade de estudos em BPC realizados até o momento foram conduzidos em batelada simples e que muitos utilizam densidade celular baixa ($< 20 \text{ g.L}^{-1}$). O reciclo de células é uma importante estratégia amplamente aplicada nas usinas produtoras de etanol 1G, pois aumenta a produtividade, reduz o tempo e o custo de operação (AZHAR *et al.*, 2017). Todavia este modo de operação em BPC é abordado somente por Matano *et al.* (2013) e Liu *et al.* (2015), os quais estudaram o reciclo de células desenvolvidas para BPC em sua forma livre.

Sendo assim, nota-se a ênfase dada até o momento a nível mundial na construção de leveduras recombinantes capazes de secretar enzimas hidrolíticas e a carência de estudos de Engenharia do BPC. Assim, pouco se sabe sobre o desempenho das linhagens desenvolvidas para BPC em condições de operações industriais (operação em alta carga de células, exposição das células a altas concentrações de açúcares e de etanol), utilizando meios formulados a partir de hidrolisados e frações sólidas gerados após o pré-tratamento. De maneira geral, a “Engenharia do Bioprocessamento Consolidado” é pouco estudada na literatura, na qual são encontrados principalmente trabalhos cujo foco é a construção da cepa recombinante com capacidade de secreção de enzimas.

Tabela 2 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que produzem enzimas celulolíticas.

Referência	Microorganismo	Enzimas	Fonte de carbono (concentração em g.L ⁻¹)	Modo de operação	Condições de cultivo	T (°C)	t (h)	Carga celular	Concentração de etanol (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
FUJITA <i>et al.</i> , 2002	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG II	β-glucana (45)	-	Anaeróbio	30	50	DO ₀ : 17,8	16,5	93,3	0,33
FUJITA <i>et al.</i> , 2004	<i>S. cerevisiae</i>	BG I; ENDG II; CEL II	CIAF (10)	Batelada	Anaeróbio	30	40	DO ₀ : 50	2,9	88,5	0,07
HAAN <i>et al.</i> , 2007	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG	CIAF (10)	-	Anaeróbio	-	-	3,88.10 ⁷ célula.ml ⁻¹	1,0	-	-
JEON <i>et al.</i> , 2009	<i>S. cerevisiae</i>	BG I; ENDG	Celobiose (50); CMC (20); β-glucana (20)	Batelada	-	-	40 – 50	DO ₀ : 5 e 20	7,5 (celobiose); 11,03 (CMC); 9,15 (β-glucana)	80,3% (β-glucana)	0,17 – 0,24
YANASE <i>et al.</i> , 2010	<i>K. marxianus</i>	BG*; ENDG	Glicose (100); celobiose (50); β-glucana (10)	Batelada	Microaerado; Agitado suavemente	48	24	DO ₀ : 20	0,47	92,2	0,02
ILMÉN <i>et al.</i> , 2011	<i>S. cerevisiae</i>	CEL I; CEL II	Avicel (20)	Batelada	Anaeróbio; Agitado magneticamente	-	168	25 mL de cultura	3,0	30	0,02
KHRAMTSOV <i>et al.</i> , 2011	<i>S. cerevisiae</i> industrial	BG; ENDG; EXOG	PM e PW pré-tratado; PA (50)	Batelada	Anaeróbio; Agitado (150 rpm)	30	96	-	20,5	63 (PM); 94 (PW)	0,21
YAMADA <i>et al.</i> , 2011	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL	CIAF (20); PA pré-tratada (100)	Batelada	Microaerado; Agitado suavemente	37	72	140 g.L ⁻¹	7,6 (CIAF); 7,5 (PA)	75 (CIAF); 33 (PA)	0,11 (CIAF); 0,10 (PA)
MEKO'O <i>et al.</i> , 2012	<i>P. pastoris</i>	BG	Celobiose ou glicose (10)	Batelada	Anaeróbio; Agitado (150 rpm)	30	48	0,27 g.L ⁻¹	1,35-2,56 (celobiose); 3,0-3,05 (glicose)	-	0,03 – 0,06
RENSBURG <i>et al.</i> , 2012	<i>S. cerevisiae</i> Y294	BG; ENDG; CEL	Glicose (20)	-	Aeróbio; Agitado (250-700 rpm); pH 5,5	30	~140	DO ₀ : 0,05	7,35 – 8,31	-	~0,05 – 0,06
MATANO <i>et al.</i> , 2013	<i>S. cerevisiae</i>	BG I; ENDG II; CEL II	PA pré-tratado hidrotérmicamente (250)	Batelada repetida	-	-	72 cada ciclo	350 g.L ⁻¹	1º ciclo: 42,2	1º ciclo: 86,3	1º ciclo: 0,59
YAMADA <i>et al.</i> , 2013	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL	CIAF (5)	Batelada	Microaerado; Agitado suavemente; pH 5,0	37	72	140 g.L ⁻¹	4,3	37	0,06
HONG <i>et al.</i> , 2014	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL I*; CEL II*	EM pré-tratado com ácidos e álcalis (100)	Batelada	-	-	-	1 g.kg ⁻¹ (PS)	4,74	-	-
LIU <i>et al.</i> , 2015	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL I	CIAF; β-glucana (10)	Batelada repetida	Microaerado; Agitado (200 rpm)	37	96 cada ciclo	35 e 105 g.L ⁻¹	1º ciclo: 2,9 (CIAF); 2,6 (β-glucana)	-	1º ciclo: 0,03 (Ambos)
INOKUMA <i>et al.</i> , 2016	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG II	Celobiose (20)	Batelada	Agitado (150 rpm)	30	8	7 g.L ⁻¹	8,4 - 8,9	-	1,05 – 1,11
LEE <i>et al.</i> , 2017	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL I*; CEL II*	Avicel (20); PA (30)	-	Anaeróbio; Agitado (100 rpm)	30	96	DO ₀ : 5,4	14	-	0,14
LIU <i>et al.</i> , 2017	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL I; CEL II	Avicel (10); PA (25)	Batelada	Anaeróbio	37	96	84 g.L ⁻¹	2,9 (Avicel); 0,8 (PA)	57 (Avicel)	0,03 (Avicel); 0,01 (PA)
SONG <i>et al.</i> , 2018	<i>S. cerevisiae</i>	BG I; ENDG II; CEL I	CIAF (20), Avicel (10), CMC (20)	Batelada	Microaerado; Agitado	37	96	84 g.L ⁻¹	4,7 (CIAF); 3,8 (Avicel); 5,4 (CMC)	75 (Avicel)	0,04 – 0,06
DAVISON <i>et al.</i> , 2019	<i>S. cerevisiae</i>	BG I; ENDG II; CEL I	Resíduos de milho pré-tratado com álcalis (20)	Batelada	Microaerado; Agitado (200 rpm)	30	168	DO ₀ : 0,5	4,05	-	0,02
LIU <i>et al.</i> , 2020	<i>S. cerevisiae</i>	BG; CEL	CMC, □-glucano, PA pré-tratado com AFEX; PT; FT (20)	Batelada	Sem agitação	30	48	-	0,20 (CMC); 0,61 (β-glucana); 0,15 (palha); 0,61 (farelo)	-	0,003 – 0,013

BG: β-glicosidase; ENDG: endoglucanase; EXOG: exoglucanase CEL: celobiohidrolase; C: celulase; CIAF: celulose inchada com ácido fosfórico; CMC: carboximetilcelulo-se; PA: palha de arroz; PT: palha de trigo; PM: palha de milho; FT: farelo de trigo; LMM: licor de maceração de milho; EM: espiga de milho; PW: papel Whatman; AFEX: Ammonia fiber expansion; DO₀: Densidade ótica inicial; Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol; * Suplementação com concentrado enzimático.

Tabela 3 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que secretam enzimas hemicelulolíticas.

Referência	Microrganismo	Enzimas	Fonte de carbono (concentração em g.L ⁻¹)	Modo de operação	Condições de cultivo	T (°C)	t (h)	Carga celular	Concentração de etanol (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
KATAHIRA <i>et al.</i> , 2004	<i>S. cerevisiae</i>	X II; BX; XR; XD; XQ	XB (100)	Batelada	Agitado (100 rpm)	30	62	DO ₀ : 50	7,1	-	0,11
SUN <i>et al.</i> , 2012	<i>S. cerevisiae</i>	ENDX; ARA; BX	XB (10)	Batelada	Anaeróbio; Agitado (250 rpm)	30	80	DO ₀ : 50	0,95	-	0,01

X: xilanase; ENDX: endoxilanase; BX: β-xilosidase; XR: xilose redutase; XD: xilitol desidrogenase; XQ: xiluloquinase; ARA: Arabinofuranosidase; XB: xilana de bétula; DO₀: Densidade ótica inicial; Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Tabela 4 - Produção de etanol por BPC com leveduras recombinantes que secretam enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas.

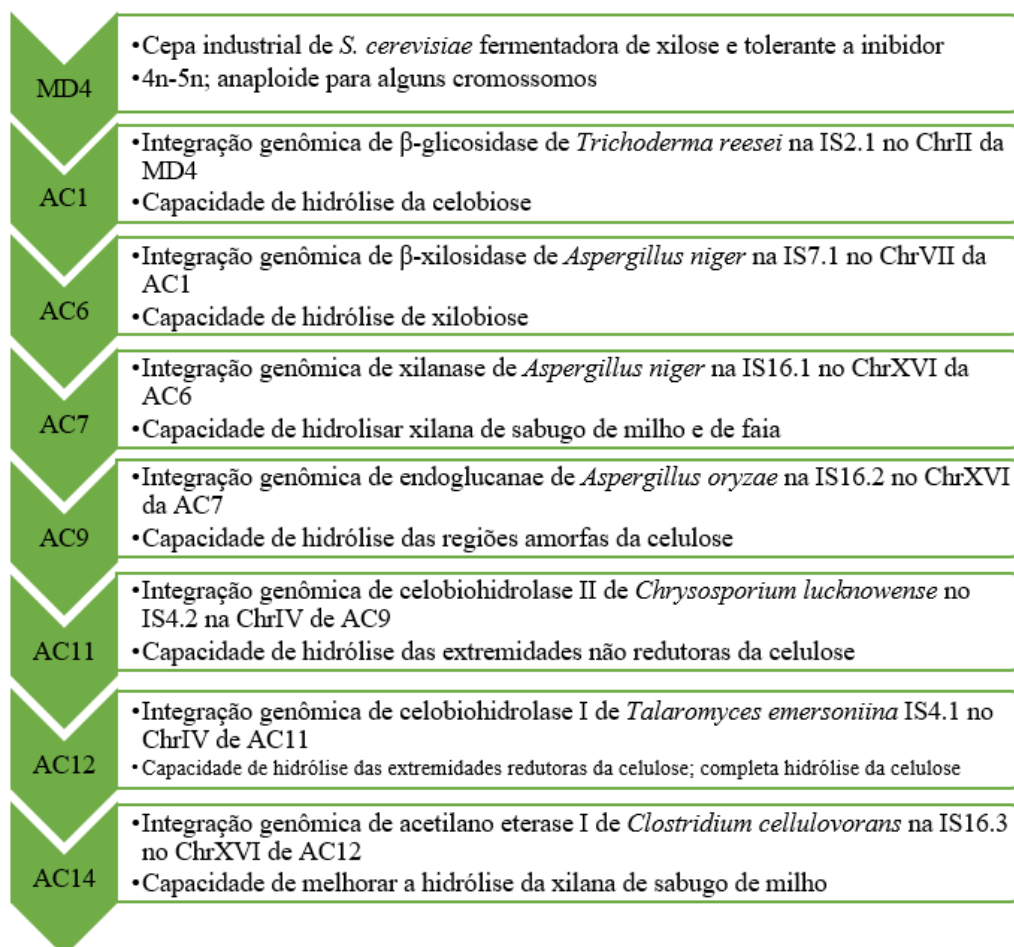
Referência	Microrganismo	Enzimas	Fonte de carbono (concentração em g.L ⁻¹)	Modo de operação	Condições de cultivo	T (°C)	t (h)	Carga celular	Concentração de etanol (g.L ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
SAKAMOTO <i>et al.</i> , 2012	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDX; BX; XR; XD; XQ	Hidrolisado de PA (80%)	Batelada	Microaerada; Agitada moderadamente	30	72	70 g.L ⁻¹	8,2	82	0,11
YANG <i>et al.</i> , 2016	<i>S. cerevisiae</i>	ENDG; EXOG; X	PA (80 g.L ⁻¹); FT (20)	Batelada	Agitado (150 rpm); pH 6,0	30 – 50	31	10 g.L ⁻¹	8,1	-	0,26
AMOAH <i>et al.</i> , 2017	<i>S. cerevisiae</i>	BG; ENDG; CEL I; CEL II; X	BC pré-tratado com líquido iônico ou PKBL (5)	-	Agitado (120 rpm); pH 5,0	35	72	5 g.L ⁻¹	0,93 (BC); 0,71 (PKBL)	91,2 (BC); 41,2 (PKBL)	0,01 (BC); 0,57 (PKBL)
CHEN <i>et al.</i> , 2018	<i>S. cerevisiae</i>	X	CIAF (10); XB (10);	Batelada	Agitado (90 rpm)	30	144	3 g.L ⁻¹	2,11 (CIAF)	80,2 (CIAF)	0,015 (CIAF)
	<i>S. cerevisiae</i>	C	PM pré-tratada (20)						1,15 (XB)	79,3 (XB)	0,007 (XB)
									1,61 (PM)	64,75 (PM)	0,011 (PM)
(CLAES <i>et al.</i> , 2020	<i>S. cerevisiae</i> industrial	ENDG; BG; CEL I e II; X; BX; AXE	Glicose (20) + xilose (20) + celobiose (10) + xilana (20)	-	Agitado (120 rpm)	35	50	1 g.L ⁻¹	25	-	0,50
CUNHA <i>et al.</i> , 2020	<i>S. cerevisiae</i> industrial	BG; ENDX II	Licor de EM pré-tratado hidrotérmicamente (10)	Batelada	Anaeróbio; Agitado (150 rpm); pH 5,0	40	~170	35 e 70 g.L ⁻¹	11,1	-	~0,06
PEREZ, 2021	<i>S. cerevisiae</i> industrial	ENDG; BG; CEL I e II; X; BX; AXE	Glicose (20) + xilose (20) + celobiose (20) + XSB (20); BC pré-tratado hidrotérmicamente (fração líquida + sólida)	Batelada repetida	Anaeróbio; Estático; pH 5,6	35	7 - 9	DO ₀ : 100	25 (meio sintético) 13 (BC)	-	3,57 – 1,44

BG: β-glicosidase; ENDG: endoglucanase; EXOG: exoglucanase; CEL: celobiohidrolase; ENDX: endoxilanase; X: xilanase; C: celulase; BX: β-xilosidase; AXE: acetil-xilana esterase; XR: xilose redutase; XD: xilitol desidrogenase; XQ: xiluloquinase; CIAF: celulose inchada com ácido fosfórico; CMC: carboximetilcelulose; PA: palha de arroz; FT: farelo de trigo; PT: palha de trigo; PM: palha de milho; BC: bagaço de cana-de-açúcar; EM: espiga de milho; PKBL: polpa Kraft não branqueada Laubholz; XB: xilano de bétula; XSM: xilana de sabugo de milho. Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol; DO₀: Densidade ótica inicial.

1.2.6. *S. cerevisiae* AC14

Dentre as leveduras recombinantes descritas na literatura e relacionadas na Tabela 4, a cepa *S. cerevisiae* AC14, construída por Claes *et al.* (2020), se destaca como a única capaz de secretar 7 enzimas envolvidas na degradação da biomassa: endoglucanase (EC 3.2.1.4), β -glicosidase (EC 3.2.1.21), celobiohidrolase I e II (EC 3.2.1.91), xilanase (EC Se 3.2.1.8), β -xilosidase (EC 3.2.1.37) e acetil-xilana esterase (EC 3.1.1.72). Esse microrganismo foi desenvolvido pelo grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeast – Bélgica) e gentilmente cedido para ser avaliado neste projeto. Claes *et al.* (2020) reportou a segunda maior concentração de etanol (25 g.L^{-1}) após 50 h, porém sem qualquer suplementação enzimática. Detalhes das modificações genéticas efetuadas por Claes *et al.* (2020) estão na Figura 8.

Figura 8 - Integração gênica realizada no desenvolvimento da cepa AC14 contemplando os diferentes genes heterólogos que codificam enzimas lignocelulolíticas (Adaptado de CLAES et al., 2020).



Experimentos preliminares utilizando a cepa de *S. cerevisiae* AC14 foram conduzidos nos grupos de pesquisa LaFaC e LaDABio durante o doutorado de Perez (2021). Ao utilizar a referida cepa, Perez (2021) observou bons rendimentos e produtividades, com destaque para o tempo de processo, obtendo 25 g.L⁻¹ de etanol em menos de 7 h para meio sintético, resultando em uma produtividade significativamente superior às demais relatadas (3.57 g.L⁻¹.h⁻¹) graças à operação em alta carga de células (50 g.L⁻¹). Já para a suspensão de celulignina em hidrolisado hidrotérmico de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar, foram produzidos 13 g.L⁻¹ de etanol em aproximadamente 9 h de processo. Esse resultado inferior foi atribuído por Perez (2021) à hidrólise incompleta tanto dos xilooligômeros presentes no hidrolisado de hemicelulose quanto da celulose presente na fração sólida residual obtida após o pré-tratamento hidrotérmico, o que demonstra a necessidade de aprofundamento dos estudos para melhorar o desempenho do BPC em meios industriais.

1.2.7. Imobilização celular

Um dos grandes desafios ao se realizar processos envolvendo hidrólise/sacarificação e fermentações simultâneas, como BPC e SSF, é a recuperação das células ao final do processo para sua reutilização (JIN, Mingjie *et al.*, 2012). Geralmente, a fração sólida remanescente e as células livres se misturam, tornando sua separação difícil, de forma a complicar a operação do processo em ciclos. Considerando que a viabilidade e robustez da produção de etanol 1G está intimamente ligada ao modo de operação com reciclo de células, uma vez que a produção/propagação de células agrega custos adicionais ao processo, viabilizar o aproveitamento dos biocatalisadores para a produção de etanol 2G se torna crucial.

Neste contexto, a imobilização celular é uma técnica que pode contornar essa limitação e melhorar a eficiência do processo. Esta técnica é baseada na fixação ou confinamento dos microrganismos em uma matriz sólida e porosa, impedindo que as células escapem, mas permitindo a difusão de substratos e produtos. As células imobilizadas possuem as vantagens de fácil separação do meio, favorecendo as etapas de purificação e a reutilização do biocatalisador. A imobilização possibilita ainda o aumento de concentração celular no reator, levando à redução do tempo de processo e a maiores produtividades, além de contribuir para o aumento de estabilidade do biocatalisador por

causa do efeito protetor da matriz do suporte de imobilização e, conseqüentemente, melhora da eficiência do processo (LAPPONI *et al.*, 2022).

Existem diferentes metodologias de imobilização celular: imobilização por aprisionamento, encapsulamento, adesão e adsorção, ligação covalente e crosslinking (KARAGOZ *et al.*, 2019; LAPPONI *et al.*, 2022). A imobilização por alginato de cálcio é uma técnica de encapsulamento amplamente estudada que merece destaque, pois utiliza um material não tóxico, biocompatível e biodegradável (SOARES *et al.*, 2022). Interessantemente, esse procedimento é altamente versátil, porque pode ser estudado e possivelmente aplicado em uma grande diversidade de processos catalisados por microrganismos selvagens ou recombinante e até consórcios microbianos.

O desenvolvimento de biocatalisadores imobilizados em gel de alginato para a produção de etanol 2G é extensivamente relatado na literatura e explorado pelos grupos de pesquisa do DEQ/UFSCar (LaFaC, LabEnz e LaBioS), utilizando tanto leveduras selvagens quanto recombinantes (MILESSI, Thais S S *et al.*, 2015; MILESSI, Thais S. S. *et al.*, 2013; MILESSI, Thais S.; PEREZ; *et al.*, 2020; PEREZ, Caroline L. *et al.*, 2022). Ainda no grupo, biocatalisadores imobilizados em gel de alginato foram desenvolvidos para aplicação em processos multienzimáticos, contemplando reações em cascata para a produção de etanol 2G. Milessi *et al.* (2020) co-imobilizaram a enzima xilose isomerase e a levedura nativa *S. cerevisiae* em alginato de cálcio e realizaram a produção contínua de etanol a partir de xilose em reator de leito fixo por 7 dias. Porém, devido à baixa velocidade de assimilação de pentoses, o processo era altamente susceptível à contaminação. Milessi-Esteves *et al.*, (2019) co-imobilizaram xilanases, xilose isomerase e levedura nativa *S. cerevisiae* para a Hidrólise, isomerização e fermentação simultâneas (SHIF) de xilooligômeros provenientes do pré-tratamento hidrotérmico e, apesar de ação limitada de hidrólise devido à falta de enzimas acessórias, os autores observaram que é possível para as enzimas acessarem os substratos heterogêneos, ou seja, os mesmos eram capazes de difundir na matrix do gel. Porém, em ambos os trabalhos os autores utilizaram enzimas exógenas, o que pode limitar os custos do processo.

Neste sentido, considerando o elevado potencial da levedura AC14 por secretar 7 enzimas hidrolíticas, as quais podem hidrolisar de forma mais eficiente a biomassa, e os resultados anteriormente obtidos pelo grupo, a avaliação da aplicação em BPC da AC14 imobilizada se torna de grande importância, podendo viabilizar o reaproveitamento da levedura. Vale ressaltar que ainda não existem relatos na literatura de BPC utilizando células imobilizadas, de forma que a investigação da viabilidade de aplicação de

biocatalisadores heterogêneos para BPC, e a avaliação da eficiência do processo que também envolve polímeros heterogêneos, e o acesso das enzimas aos substratos nessas condições se torna uma grande contribuição do presente trabalho para a área.

Capítulo 2 - Influência das condições operacionais na produção de enzimas hidrolíticas por levedura recombinante de alto desempenho para Bioprocessamento Consolidado

2.1. Introdução

Nas últimas décadas, muitos esforços têm sido realizados para o desenvolvimento de processos sustentáveis e a inclusão de fontes renováveis na matriz energética global de forma a diminuir problemas ambientais e emissões de gases de efeito estufa (RODIONOVA *et al.*, 2017). Neste sentido, o conceito de Biorrefinaria surge como uma alternativa promissora, que se baseia na utilização da biomassa vegetal em sua totalidade, principalmente aquelas que não são fontes de alimentos, substituindo os recursos fósseis e reduzindo a geração de resíduos (PATEL e SHAH, 2021).

A produção de etanol em Biorrefinarias integrada à obtenção de outros produtos é bastante atraente do ponto de vista econômico e ambiental. Atualmente, esse biocombustível é majoritariamente produzido a partir dos grãos de milho e do caldo de cana-de-açúcar (ou de co-produtos da produção de açúcar como o melaço), dando origem ao etanol de primeira geração (1G). No entanto, os materiais lignocelulósicos constituem uma abundante fonte de matéria-prima para obtenção de etanol de segunda geração (2G). A biomassa lignocelulósica, como por exemplo co-produtos agroindustriais e florestais, é interessante por permitir o aumento da produção do etanol sem demandar maior área de plantio. Estes materiais são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, além de uma pequena parcela de proteínas, minerais e outros (AGUIAR *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2020).

Neste contexto, diferentes configurações de processos estão sendo estudadas para a produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos (AGUIAR *et al.*, 2021; RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos *et al.*, 2022). Um gargalo existente na maioria das tecnologias é o custo elevado das enzimas que são necessárias para hidrolisar os polissacarídeos presentes nas frações sólida e líquida obtidas após o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (RAMOS *et al.*, 2022). Por isso, uma tecnologia emergente, o Bioprocessamento Consolidado (BPC), vem ganhando espaço. O BPC é caracterizado pela produção de enzimas hidrolíticas, hidrólise do material lignocelulósico e fermentação dos açúcares C5 e C6, simultaneamente, em um mesmo reator (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020; SINGHANIA *et al.*, 2022). Essa cadeia de reações pode ser

executada por um único microrganismo ou um consórcio deles, tanto selvagens quanto recombinantes (CHEN *et al.*, 2018; CUNHA *et al.*, 2020).

De acordo com Raftery e Karim (2017), uma planta que utilize BPC do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima, pré-tratamento com hidróxido de sódio e cogeração de energia, a longo prazo, pode ter uma margem de lucro de 78%. Algumas outras vantagens do BPC são a simplicidade operacional, a ausência de enzima exógena no sistema, o risco de contaminação reduzido, o aproveitamento de pentose e hexoses, o investimento reduzido e o menor gasto de energia (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020). Todavia, na ausência de um microrganismo nativo de elevada performance, que seja capaz de expressar enzimas, possua elevada produtividade em etanol e seja tolerante a etanol e a inibidores, muitos estudos têm focado na construção de cepas capazes de desempenhar tal função (AMOAHA *et al.*, 2017; LIU, Jeng-Chen *et al.*, 2020; SONG *et al.*, 2018).

Uma levedura que tem se destacado na literatura é a cepa AC14 de *S. cerevisiae*, desenvolvida por Claes *et al.* (2020), sendo, até o momento, a única capaz de secretar sete enzimas envolvidas na degradação de biomassa (Tabela 5), não necessitando de suplementação enzimática como relatado em outros trabalhos (HONG *et al.*, 2014; ILMÉN *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2017; MATANO *et al.*, 2013). A integração dos genes heterólogos no genoma desta cepa foi feito pelo protocolo geral CRISPR/Cas9 (CLAES *et al.*, 2020), levando à construção de uma cepa com capacidade de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, o que possibilita uma eficiente degradação do material lignocelulósicos. Além disso, essa cepa foi construída a partir da levedura industrial *Ethanol Red*, conferindo-lhe maior robustez em comparação a outras leveduras recombinantes reportadas na literatura.

A fim de gerar um processo robusto e aplicável, deve-se estudar a influência das condições operacionais empregadas no processo, pois afetam diretamente o metabolismo celular e a ação catalítica das enzimas e, conseqüentemente, a produção de etanol 2G, independente da tecnologia aplicada. Por exemplo, nas configurações de processo Hidrólise e Fermentação Separadas (SHF), Sacarificação e Fermentação Simultâneas (SSF), Sacarificação e Co-Fermentação Simultâneas (SSCF) e Isomerização e Fermentação Simultâneas (SIF), o desempenho é afetado com mudanças de pH e temperatura (SILVA *et al.*, 2018; MILESSI *et al.*, 2018; PENG; CHEN, 2011; SURIYACHAI *et al.*, 2013). Adicionalmente, os microrganismos naturalmente fermentadores de xilose e recombinantes também têm sua produtividade alterada de

acordo com as condições fermentativas (ANTUNES *et al.*, 2014; HADIYANTO *et al.*, 2014; YANASE *et al.*, 2010).

Tabela 5 - Informações sobre as enzimas hidrolíticas produzidas por *S. cerevisiae* AC14 (CLAES *et al.*, 2020; RAMOS *et al.*, 2022).

Enzima	Função	pH ótimo	Temperatura ótima (°C)	Promotor/ Terminador
β -glicosidase (EC 3.2.1.21)	Clivagem das ligações β -glicosídicas das celulosas.	4,6	65	TEF1/ CYC1
β -xilosidase (EC 3.2.1.37)	Clivagem dos terminais não-redutores das xilanas.	3,2	60	TEF1/ CYC1
Xilanase (EC 3.2.1.8)	Clivagem das ligações β -1,4-glicosídicas das xilanas.	5,0	50	TEF1/ CYC1
Endoglucanase (EC 3.2.1.4)	Clivagem da região interna das celulosas.	4,0	45	PGK1/ PRM9
Celobiohidrolase I (EC 3.2.1.91)	Clivagem dos terminais redutores das celulosas.	5,0	55	PGK1/ PRM9
Celobiohidrolase II (EC 3.2.1.91)	Clivagem dos terminais não redutores das celulosas.	5,0	30-35	PGK1/ PRM9
Acetilana esterase (EC 3.1.1.72)	Desacetilação de xilanas e xilooligosacarídeos	5,0	60	TEF1/ CYC1

O BPC especificamente pode ser afetado pelas condições de processo, porque levedura e enzimas possuem condições ótimas diferentes, porém isso não tem sido muito abordado na literatura. Como pode ser visto na Tabela 5, o pH ótimo das enzimas produzidas pela AC14 varia entre 3,2 e 5,0, enquanto a levedura *S. cerevisiae* é favorecida pelo pH 5,0 (AZHAR *et al.*, 2017). A temperatura também pode interferir no processo. Enquanto a fermentação pela *S. cerevisiae* é favorecida por uma temperatura de 20 a 35 °C (AZHAR *et al.*, 2017), as enzimas hidrolíticas têm temperatura ótima geralmente acima de 50 °C (Tabela 5). Todavia, a temperatura do microrganismo é limitante, porque sua integridade deve ser preservada para a produção das enzimas e posterior fermentação dos açúcares liberados, sendo interessante operar o processo em alta carga de células para compensar a menor atividade enzimática (AZHAR *et al.*, 2017). Embora a AC14 tenha sido desenvolvida utilizando-se promotores constitutivos fortes (CLAES *et al.*, 2020), a

composição do meio fermentativo também pode ser um fator que influencia o BPC. Dependendo da concentração e do tipo de açúcares presentes no meio, pode ocorrer repressão catabólica. A glicose, um açúcar de fácil assimilação, pode causar a inibição da transcrição de alguns genes. Isso pode fazer com que a produção das enzimas seja afetada negativamente (GANCEDO, 1998; NAIR; SARMA, 2021). A repressão por *feedback* é outro caso que pode ocorrer. Neste caso, o acúmulo do produto final da hidrólise enzimática no meio bloqueia a transcrição do gene (SHULER e KARGI, 2002). Ao revisarem a literatura, Amit *et al.* (2018) citaram estudos onde as celulases foram inibidas pela celobiose e glicose, enquanto as β -glicosidase sofreu inibição por glicose. Também reportaram inibição de β -xilosidase por xilose e xilobiose e inibição ocasional da endo-xilanases pelos mesmos carboidratos. Até mesmo açúcares derivados na hemicelulose (xilose, arabinose, manose e galactose) podem afetar a hidrólise da celulase. Adicionalmente, a agitação e o fornecimento de oxigênio podem alterar o metabolismo do microrganismo e afetar a produção das enzimas e de produto (AZHAR *et al.*, 2017), devendo ser estudada.

Neste cenário, é crucial avaliar a influência das condições de processo sobre a produção de etanol 2G por BPC, a qual envolve uma cadeia de reações complexa, incluindo a produção *in situ* das enzimas, a hidrólise enzimática e a fermentação dos açúcares liberados. Sendo assim, no presente estudo, objetivou-se analisar a influência da composição do meio de cultivo, do pH e do fornecimento de oxigênio sobre a produção de enzimas, o rendimento e a produtividade em etanol durante BPC utilizando-se a levedura AC14.

2.2. Metodologia

2.2.1. Microrganismo

Neste estudo, foi utilizada a levedura *S. cerevisiae* AC14 (CLAES *et al.*, 2020), a qual foi desenvolvida no laboratório do Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeast, Bélgica). Essa levedura recombinante é capaz de produzir sete enzimas hidrolíticas (Tabela 5) e assimilar xilose, além de glicose e outras hexoses. Como controle negativo, foi utilizada a levedura parental *S. cerevisiae* MD4 que consome os monossacarídeos, mas não produz as enzimas (CLAES *et al.*, 2020).

2.2.2. Materiais

O extrato de levedura foi adquirido de Fisher Bioreagentes (México), a peptona foi doada pela Pharma & FIA Kerry (Campinas/Brasil). Celobiose e p-NPX eram da Sigma-Aldrich (Reino Unido e Israel, respectivamente). A xilana da espiga de milho e a xilana da madeira de faia foram produzidas por Carl Roth (Alemanha). O papel de filtro foi fornecido pela Cytiva (China). Foi utilizada carboximetilcelulose da marca Synth (Brasil). O reagente GOD-PAP foi fornecido pela Bioclim (Brasil). Outros reagentes eram de grau analítico.

2.2.3. Preparo do inóculo

Inicialmente, uma alçada de cultura estoque da cepa AC14 armazenada a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ foi estriada em meio sólido YPÁgar contendo glicose (20 g.L^{-1}), xilose (20 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (10 g.L^{-1}), celobiose (10 g.L^{-1}) e carboximetilcelulose (50 g.L^{-1}), além de extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}) e ágar (15 g.L^{-1}). A placa Petri foi incubada a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Em seguida, uma colônia foi ressuspensa em 75 μL de água destilada estéril. A suspensão foi espalhada com alça de Drigalski em meio YPÁgar contendo glicose (20 g.L^{-1}), xilose (20 g.L^{-1}) e ágar (15 g.L^{-1}) e incubada por mais 24 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, para a formação de um “tapete” celular cobrindo toda a superfície. Para preparar o inóculo, o “tapete” celular de uma placa de Petri foi totalmente ressuspensa em meio YPDX (20 g.L^{-1} de glicose e 20 g.L^{-1} de xilose) e inoculado em 300 mL do mesmo meio em um frasco de 1 L, sendo deixado em incubadora rotatória (150 rpm) por 12 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células foram recuperadas por centrifugação (2500 rpm) a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Adicionalmente, um protocolo semelhante foi adotado para a preparação do inóculo da cepa MD4. A única diferença foi a ausência de xilana de sabugo de milho, celobiose e carboximetilcelulose no primeiro meio sólido, uma vez que este microrganismo é incapaz de produzir as enzimas hidrolíticas.

2.2.4. Procedimento experimental

Ensaio fermentativo em batelada simples: Os experimentos foram realizados em mini-reatores de 5 mL equipados com saída de CO_2 , segundo Mesquita *et al.* (2021). O processo foi monitorado medindo-se a liberação de massa de CO_2 na fermentação

alcoólica por meio da pesagem dos mini-reatores. A partir desses dados foi possível estimar a conversão em etanol por meio da estequiometria (MESQUITA *et al.*, 2021). Os experimentos foram interrompidos após a estabilização da massa dos mini-reatores, ou seja, quando uma variação menor de 5% da massa foi observada, indicando o fim da fermentação.

Os estudos de BPC em condições fermentativas tiveram como objetivo avaliar a influência da composição do meio de cultivo sobre a produção de enzimas e o desempenho do processo em termos de rendimento e produtividade em etanol. A influência do pH inicial do meio (4,5, 5,5 e 6,5) também foi avaliada em condições fermentativas.

Dez diferentes meios foram testados, sendo compostos por extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹) e diferentes substratos, conforme mostra a Tabela 6, em pH inicial 5,5. As composições dos meios foram estabelecidas baseando-se nos meios reais (composição do licor bruto e fração sólida pré-tratados). Após testar diferentes composições e definir o meio mais adequado para o BPC, esse meio foi utilizado nos ensaios seguintes. Todos ensaios foram conduzidos em condições assépticas a 35°C, 4 mL de meio, densidade óptica inicial 100.

Tabela 6 - Composição inicial dos meios estudados para o BPC (considerando diluição após adição da suspensão celular).

Meio	Componente (g.L ⁻¹)				
	Glicose	Xilose	Xilana de sabugo de milho	Celobiose	CMC
1	10	-	-	-	-
2	-	10	-	-	-
3	10	-	5	5	2,5
4	-	10	5	5	2,5
5	-	-	5	5	2,5
6	5	5	5	5	2,5
7	-	-	-	-	2,5
8	-	-	-	5	-
9	-	-	5	-	-
10	-	-	-	5	2,5

Ao final dos cultivos, foi retirada uma alíquota para a determinação da viabilidade celular. Em seguida, o meio foi centrifugado e parte do sobrenadante obtido foi congelado

a - 20 °C para análise da composição final por cromatografia líquida de alta eficiência. Outra parte do sobrenadante foi utilizada como extrato enzimático destinada à caracterização das atividades enzimáticas quanto a celulases totais, xilanases, β -glicosidase e β -xilosidase. Os extratos enzimáticos obtidos ao final dos cultivos nos meios 1 a 10 foram ainda caracterizados por SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970).

Cultivos BPC em condições aeróbias (batelada simples): O efeito do fornecimento de O₂ sobre a produção de enzimas e o desempenho do processo também foi avaliado. Foram realizados experimentos aeróbios (incubação a 250 rpm em *Erlenmeyers* aletados de 100 mL) e anaeróbios (estáticos em mini-reatores), para comparação. Os ensaios anaeróbios foram conduzidos a 35°C, 4 mL do meio selecionado previamente e densidade óptica inicial 100, enquanto os testes aeróbios foram realizados em 20 mL de meio. Os cultivos aeróbios foram acompanhados por amostragem periódica, que foram processadas conforme descrito no item 2.2.5. Já os anaeróbios foram conduziram-se mini-reatores idênticos em paralelo, que foram periodicamente interrompidos ao longo da fermentação para obtenção do extrato enzimático.

Ensaio fermentativo em bateladas repetidas: BPC em bateladas repetidas foram realizados em mini-reatores, utilizando a melhor condição selecionada nos ensaios em bateladas simples. Ao final de cada ciclo, a biomassa celular de AC14 foi recuperada por centrifugação (2500 rpm) a 4 °C por 5 min e o sobrenadante foi reservado para as análises posteriores. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio fresco para iniciar uma nova batelada. Dez ciclos foram estudados no presente trabalho.

2.2.5. Métodos analíticos

Viabilidade celular: A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com metodologia de Sandri *et al.* (2023). A amostra foi incubada com o corante na proporção 1:1 por 5 min em temperatura ambiente. As células não viáveis foram aquelas que adquiriram coloração azul e as células viáveis aquelas que ficaram transparentes. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas em um espaço definido da câmara de contagem (SANDRI *et al.*, 2023).

Eletroforese: Os extratos enzimáticos foram avaliados por eletroforese SDS-PAGE (gel poliacrilamida 10%) seguindo as condições desnaturantes descritas por Laemmli (1970) em sistema Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, China). As amostras foram preparadas adicionando tampão de desnaturação (Tris base 0,015 g.L⁻¹, mercaptoetanol 0,1 v/v, SDS 0,04 g.L⁻¹, glicerol 0,2 v/v, azul de bromofenol 0,001 g.L⁻¹, pH 6,8) na proporção 2:1 de amostra:tampão. A corrida do gel foi realizada por aproximadamente 90 minutos a uma tensão de 150 V em cuba de eletroforese vertical, conectada a uma fonte de alimentação (Power PAC 300, Bio-Rad, USA) contendo tampão de corrida (Tris base 25 mmol.L⁻¹, glicina 190 mmol.L⁻¹, SDS 0,1% m/v, pH 8,3). As amostras foram comparadas com o kit de calibração de baixo peso molecular para eletroforese da Sigma-Aldrich. Após as corridas das amostras, o gel foi corado por 30 minutos em uma solução contendo 0,25% (m/v) de Coomassie PhastGel Blue R-350 (m/v) e 60% metanol (v/v); e descorado com uma solução de 30% etanol e 10% ácido acético (v/v) até descorar adequadamente.

Medidas de atividades enzimáticas: A atividade enzimática das celulases totais foi medida conforme metodologia adaptada de Ghose (1987), a qual baseia-se na liberação de glicose do papel de filtro Whatman n° 1 de 15 mm de diâmetro. Em um tubo de 5 mL, foi adicionado o disco de papel de filtro, 600 µL de tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,0) e 300 µL de extrato enzimático. O tubo foi incubado a 50 °C por 1 h. Em seguida, os açúcares redutores liberados do papel de filtro pela ação das enzimas foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de glicose em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado substituindo a enzima por água destilada.

A atividade enzimática de xilanase foi medida conforme metodologia adaptada de (MILESSI *et al.*, 2016), a qual baseia-se na liberação de xilose da xilana a 50°C. Em um reator enzimático homogêneo com agitação mecânica, foram adicionados 3 mL de xilana de faia (1% m/v) preparada em tampão citrato de sódio 50 mmol.L⁻¹ (pH 5,5) e 200 µL de extrato enzimático. Alíquotas foram retiradas em intervalos de 2 min para determinação da velocidade de formação de produtos (dP/dt) e os açúcares redutores foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959). Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 µmol de xilose em 1 min nas condições de ensaio. O controle foi a alíquota retirada no tempo zero.

A atividade enzimática de β-xilosidase foi medida conforme metodologia adaptada de Lachke (1988), a qual baseia-se no aumento da absorvância em 405 nm

causado pela liberação de 4-nitrofenol ($\epsilon = 1950 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) durante a hidrólise de 4-nitrofenil β -D-glicopiranosídeo (p-NPX) a 50°C. Em um eppendorf, foram adicionados 1 mL de p-NPX (5 mmol.L^{-1}) -preparado em tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} (pH 6,0) e 150 μL de extrato enzimático. Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de 4-nitrofenol em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado com uma amostra antes da incubação.

A atividade enzimática da β -glicosidase foi medida conforme metodologia adaptada de Voltatódio (2012), a qual quantifica a liberação de glicose da celobiose. Em um eppendorf, foi adicionado 50 μL de celobiose (2%) preparado em tampão citrato 50 mmol.L^{-1} (pH 5,5) e 50 μL de extrato enzimático, sendo incubado a 50 °C por 15 min e, posteriormente, aquecido para 100 °C por 10 min a fim de parar a reação.as unidades de glicose liberadas a partir da celobiose pela ação das enzimas foram quantificadas pelo kit enzimático GOD-PAP (RAMOS *et al.*, (2021). Uma unidade de atividade (UI) foi a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose em 1 min nas condições de ensaio. Um controle foi realizado substituindo a enzima por água destilada.

A Equação 1 foi utilizada nos cálculos de todas as atividades enzimáticas (RAMOS *et al.*, 2021), onde $(\Delta P/\Delta t)$ é a velocidade de formação de produto (mg/mL/min); V_R é o volume reacional (mL); D é a diluição do extrato enzimático; MM é a massa molar do produto ($\text{mg}/\mu\text{mol}$); e V_E é o volume de extrato enzimático.

$$\text{Atividade (UI/mL)} = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta t}\right) \times V_R \times D}{MM \times V_E} \quad (1)$$

Medida da concentração de células: A concentração de células livres (C_x) foi determinada por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Biochrom, USA), a 600 nm, e correlacionada com o peso seco de células (g.L^{-1}) por meio de curva de calibração correspondente determinada por Perez (2021), reproduzida na Equação 2. As medidas foram feitas em suspensões celulares devidamente diluídas.

$$C_x = (\text{g.L}^{-1}) = (0,821 \pm 0,043) \times DO \quad (2)$$

Quantificação de açúcares e produtos: Inicialmente, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes conforme Demeke *et al.* (2013). Em seguida, as amostras foram

filtradas em filtro 0,22 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Para quantificar etanol, glicerol, xilitol, ácido acético, celobiose, glicose e xilose foi utilizada a coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA- Organic acid H+, com H₂SO₄ 5mM como fase móvel no fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de operação 65 °C (PRATTO *et al.*, 2020).

Para quantificação total dos xilooligômeros presentes na fração líquida pré-tratada, um volume de 5 mL de amostra foi submetido à hidrólise ácida total para a conversão dos oligômeros a monômeros a partir da reação com 174 µL de H₂SO₄ 72% em tubos de ensaio com tampa, colocados em banho seco a 121°C por 1 h (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Após hidrólise ácida, as amostras foram resfriadas, o pH neutralizado com CaCO₃ e em seguida quantificadas por HPLC. A quantidade total de xilooligômeros presentes na fração líquida foi determinada pela diferença entre a massa de xilose total obtida após hidrólise dos oligômeros em monômeros na hidrólise ácida e a massa de xilose obtida antes a hidrólise ácida (PEREZ, C.L., 2021).

Procedimentos de cálculo: Para avaliação dos BPCs com a cepa AC14, a partir dos dados obtidos pelas análises em CLAE e por meio do acompanhamento da liberação da massa de CO₂, foram calculados a conversão de substrato (X, %), o fator de rendimento (Y_{P/S}, %) e a produtividade volumétrica (Q_P, g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹), sendo utilizadas as Equações 3-5 (BARROS-RIOS *et al.*, 2015; MESQUITA *et al.*, 2021; SHULER e KARGI, 2002), onde C_{Si} é a concentração de açúcares totais no tempo inicial (g.L⁻¹); C_{Sf} é a concentração de açúcares totais no caldo fermentado (g.L⁻¹); mCO_{2,t} é a massa de CO₂ liberada no tempo t; mCO_{2,f} é a massa de CO₂ liberada no tempo final; C_{Pf} é a concentração de produto formado no tempo t (g.L⁻¹); C_{Pi} é a concentração de produto no início do processo (g.L⁻¹); e Δt_f é o tempo de processo (h). Para o cálculo do Y_{P/S} (Equação 4), os valores de concentração de etanol máximo teórico foram estimados por fatores estequiométricos de etanol para mono, di e polissacarídeos (0,511; 0,538 e 0,57 g/g, respectivamente) (BARROS-RIOS *et al.*, 2015).

$$X = \frac{C_{Si} - C_{Sf}}{C_{Si}} \times \frac{mCO_{2,t}}{mCO_{2,f}} 100 \quad (3)$$

$$Y_{P/S} = \frac{\text{Concentração de etanol produzido}}{\text{Concentração de etanol máximo teórico}} \times 100 \quad (4)$$

$$Q_P = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{\Delta t_f} \quad (5)$$

3.3. Resultados e discussão

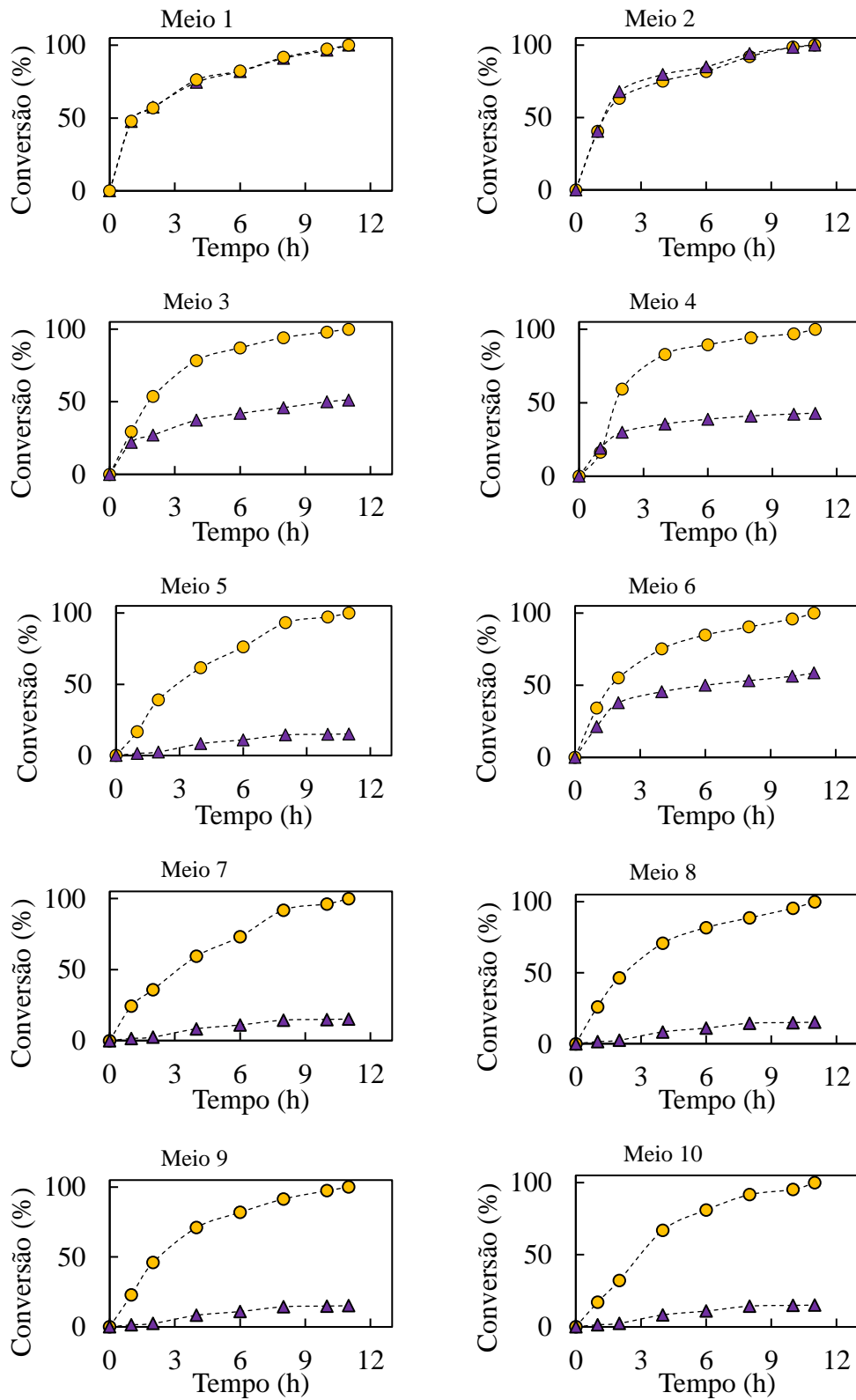
3.3.1. Influência da composição do meio

A levedura AC14 é um microrganismo construído para assimilar substratos complexos e convertê-los em etanol no contexto do Bioprocessamento Consolidado. Antes de avaliar o desempenho da AC14 em meios industriais, formulados a partir de biomassa lignocelulósica, é importante estudar a levedura em meios sintéticos, com composição definida, para investigar a resposta das células a diferentes substratos, incluindo desde simples monossacarídeos, como glicose e xilose (Meios 1 e 2, Tabela 6), até polissacarídeos complexos como a xilana de sabugo de milho e a CMC (Meios 3- 10, Tabela 6). Esse estudo também é importante para avaliar a eficiência da hidrólise da celobiose, xilana e celulose pelas enzimas produzidas pela AC14, em condições controladas.

Embora as inserções gênicas da AC14 tenham sido realizadas com promotores constitutivos, deve-se confirmar se o tipo de substrato presente no meio pode interferir na expressão e secreção das enzimas hidrolíticas, influenciando a etapa de hidrólise do BPC e, conseqüentemente, alterando a produção de etanol 2G. Sendo assim, testou-se dez diferentes meios para analisar os efeitos causados por fontes de açúcares variadas, monossacarídeos e polímeros. Os perfis de conversão das fermentações com AC14 nestes meios, além das curvas referentes a MD4, para comparação, encontram-se na Figura 9.

As cepas AC14 e MD4 apresentaram o mesmo comportamento nos meios 1 e 2 que continham somente glicose ou xilose, respectivamente, confirmando que os dois microrganismos consomem C5 e C6 eficientemente e que as modificações genéticas da AC14 não interferiram no metabolismo desses açúcares (CLAES *et al.*, 2020). Já com os meios 3, 4 e 6, notou-se que a AC14 foi capaz de hidrolisar e fermentar todos os substratos presentes, chegando à conversão total. Por outro lado, como esperado, a MD4 assimilou somente a porção monomérica, convertendo o correspondente a aproximadamente 50% dos substratos do meio. Os meios 5, 7, 8, 9 e 10, por sua vez, continham somente polissacarídeos ou dissacarídeos ou uma mistura deles, de forma que somente a AC14 assimilou esses açúcares, confirmando a produção de enzimas hidrolíticas (CLAES *et al.*, 2020).

Figura 9 - Acompanhamento dos ensaios de BPC em meios contendo diferentes substratos. Leveduras AC14 (●) e MD4 (▲). $DO_0 = 100$, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio YP (composição na Tabela 6).



A viabilidade da AC14 manteve-se acima de 90% (Tabela 7) em todos os ensaios. A parental MD4 também apresentou viabilidade nesta faixa (dados não mostrados), mesmo nos meios contendo somente polímeros (meio 5, 7, 8, 9 e 10), indicando que ambas as leveduras são robustas e suportam condições desfavoráveis. Além disso, destaca-se que o meio fermentativo era composto por extrato de levedura e peptona, componentes que fazem o meio ser complexo e bastante rico em nutrientes o que ajuda as células a não perderem viabilidade. Ressalta-se ainda que o pH final não variou significativamente.

Conforme esperado, nos sistemas que continham polissacarídeos e dissacarídeos, além dos monossacarídeos, gerou-se maior concentração de etanol (Tabela 7), uma vez que havia maior concentração de açúcar potencial para ser convertido e a AC14 foi capaz de fazer tal transformação por intermédio das enzimas hidrolíticas. Cita-se que, como o objetivo foi estudar a influência da fonte de carbono, utilizou-se baixas concentrações de açúcares, acarretando uma concentração de etanol proporcional. A produtividade (Q_P) seguiu este mesmo perfil observado para a concentração final de produto. Ao comparar os fatores de rendimento ($Y_{P/S}$), a partir do teste de Tukey, verificou-se que esse parâmetro não foi alterado pela variação de fonte de carbono (Tabela 7). Semelhantemente, Perez (2021), em seus testes preliminares com AC14, utilizando xilose como substrato, obteve $Y_{P/S}$ de $0,46 \text{ g.g}^{-1}$. Em todos os meios estudados observou-se rendimento elevado, superior à 80% do teórico. A viabilidade celular foi estatisticamente semelhante independente da fonte de carbono. Concentrações de xilitol, glicerol e ácido acético não foram superiores a $1,0$, $0,5$ e $1,1 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. Adicionalmente, o pH final e a DO final não variaram significativamente em relação aos valores iniciais.

Artigos recentes têm mostrado que a variação de substrato pode afetar a concentração de etanol produzido. Por exemplo, um BPC com bactéria produtora de enzimas celulolíticas foi avaliado com diferentes fontes de carbono: Avicel, papel de filtro, xilana, celobiose, xilose e glicose. Os autores notaram maior produção de etanol nos substratos contendo celobiose ($2,26 \text{ g.L}^{-1}$; $Y_{P/S} = 0,41 \text{ g.g}^{-1}$) e glicose ($1,96 \text{ g.L}^{-1}$; $Y_{P/S} = 0,35 \text{ g.g}^{-1}$) e atribuíram esse comportamento à fácil degradabilidade desses açúcares em comparação com as celuloses cristalinas (SINGH *et al.*, 2018).

Tabela 7 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC com AC14 em meio YP (composição de acorco com Tabela 6). $DO_0 = 100$, 35 °C, pH inicial 5,5. Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Meio fermentativo	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade celular (%)
1	4,50±0,215 ^a	0,40±0,01 ^{f,i}	88,1±4,2 ^l	97,8±2,2 ^m
2	4,74±0,25 ^a	0,43±0,02 ^{f,i}	92,8±4,9 ^l	99,8±0,2 ^m
3	10,34±0,14 ^b	0,94±0,01 ^g	85,6±1,2 ^l	96,0±1,8 ^m
4	10,71±0,47 ^b	0,97±0,04 ^g	88,7±3,9 ^l	98,1±0,5 ^m
5	6,69±0,21 ^c	0,61±0,02 ^f	96,1±3,0 ^l	97,9±0,0 ^m
6	10,89±0,40 ^b	1,00±0,04 ^g	90,3±3,3 ^l	96,6±1,9 ^m
7	1,34±0,03 ^d	0,12±0,00 ^h	94,0±2,1 ^l	94,5±1,0 ^m
8	2,34±0,03 ^{d,e}	0,21±0,00 ^{h,i,j}	82,1±1,1 ^l	97,8±0,4 ^m
9	2,52±0,36 ^e	0,23±0,03 ^e	88,4±6,1 ^l	93,8±2,4 ^m
10	4,04±0,01 ^a	0,37±0,00 ^{f,i,j}	98,2±0,2 ^l	93,4±3,2 ^m

Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Um ponto bastante interessante do presente estudo é que a conversão total dos açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos) ocorreu em um curto período de 11 h, pois indica a possibilidade do desenvolvimento de um BPC aplicável em larga escala. Claes *et al.* (2020) realizou um cultivo com 20 g.L⁻¹ de glicose e xilana de sabugo de milho que durou 50 h e obteve conversão de 85%. Embora a concentração de açúcar inicial seja aproximadamente o dobro, o tempo de processo foi quase cinco vezes maior. Essa rapidez do atual processo pode ser atribuída a alta carga celular (DO_0 de 100) em comparação com a baixa carga (1 g.L⁻¹ em base seca) adotada pelo outro estudo.

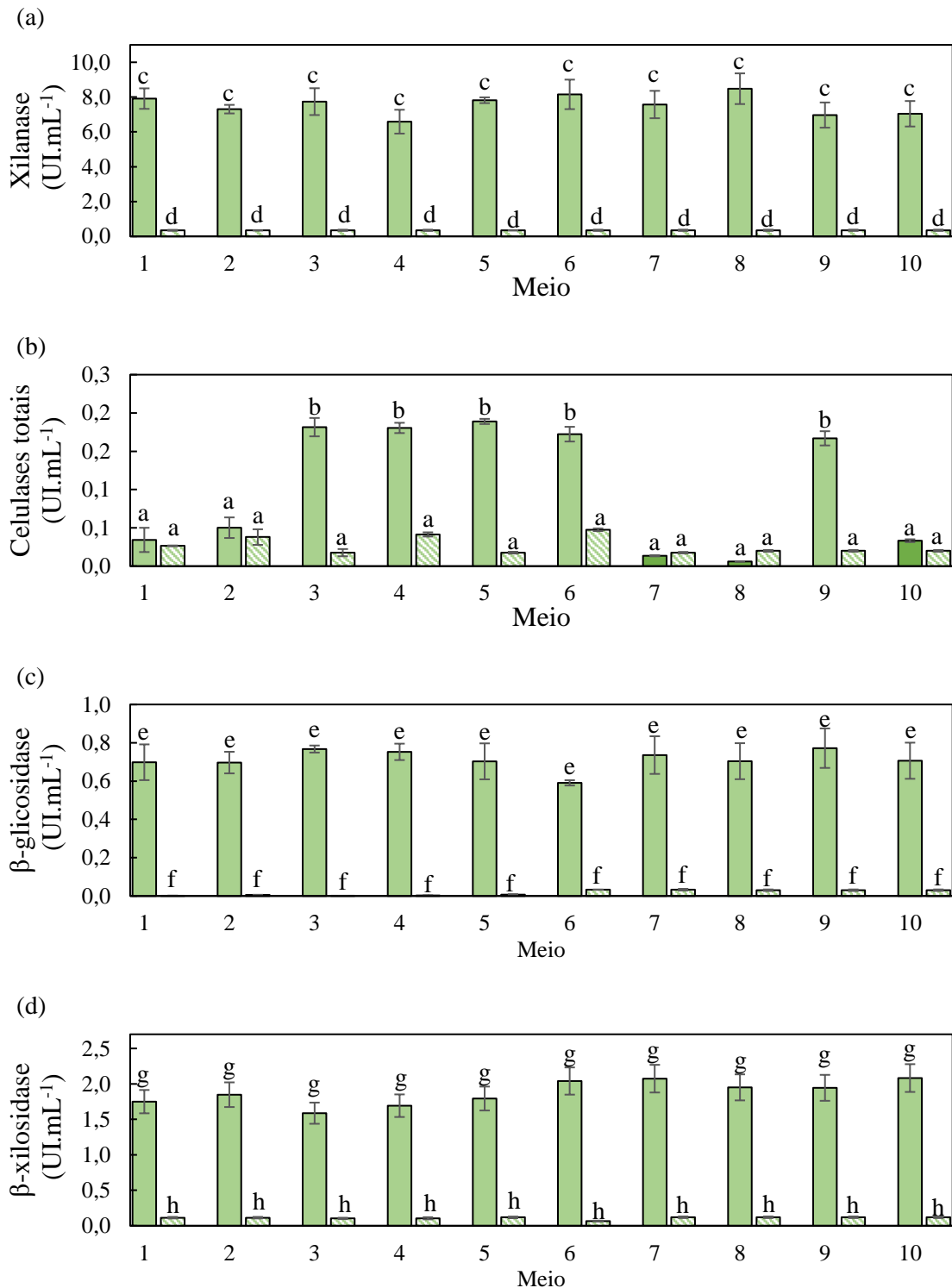
De maneira geral, na literatura foram encontrados trabalhos que realizaram experimentos muito longos, o que não é interessante. Por exemplo, Rensburg *et al.* (2012) realizaram um BPC com a *S. cerevisiae* Y294 que produz β-glicosidase, endoglucanase e celobiohidrolase. Nos ensaios fermentativos, foi utilizada somente glicose como matéria-prima (20 g.L⁻¹) e com DO_0 0,05, durando aproximadamente 140 h. Inokuma *et al.* (2016)

usaram 7 g.L^{-1} de uma levedura que secreta β -glicosidase e endoglucanase II, consumindo celobiose (20 g.L^{-1}) em uma batelada com duração de 30 h.

Para avaliar a produção enzimática da levedura AC14 no BPC em diferentes substratos, as atividades enzimáticas de celulases totais, xilanases, β -glicosidase e β -xilosidase dos extratos enzimáticos de cada condição de cultivo foram quantificadas ao final dos experimentos. Paralelamente, foram quantificadas as atividades nos extratos obtidos das fermentações com MD4 como controle. Adicionalmente, a eletroforese do extrato enzimático foi realizada para ilustrar o perfil de proteínas presentes no extrato enzimático (Anexo A). Como esperado, a Figura 10 mostra que a levedura parental não produziu enzimas hidrolíticas. Ao comparar os meios fermentativos, notou-se que as celulases totais são afetadas por sua composição, as quais foram produzidas em quantidades muito baixas na presença apenas de monômeros (meios 1 e 2). Vale ressaltar que mesmo assim ocorreu a hidrólise e consumo total dos polissacarídeos. Já na presença de dissacarídeo e polissacarídeos (meios 3, 4, 5 e 6), houve a produção das celulases. Desta forma, para averiguar qual dos compostos influenciava a produção das celulases, foram realizados experimentos adicionais com os meios 7, 8, 9 e 10. Assim, observou-se que a xilana de sabugo de milho aparentemente influenciou a produção das celulases. Isso pode ocorrer por conta da modificação genética realizada por Claes *et al.* (2020), que fizeram a integração genômica da xilanase e da endoglucanase no mesmo cromossomo (Cromossomo XVI).

Ao estudarem o coquetel enzimático Celluclast (15 FPU), García-Aparicio *et al.* (2006) notaram que açúcares derivados de hemicelulose demonstraram ter um efeito inibitório direto sobre celulases. Os autores reportaram que as taxas de hidrólise diminuem em 35%, 13%, 11,5% e 5% após a suplementação com 20 g.L^{-1} de xilose, arabinose, galactose e manose, respectivamente. De forma semelhante, Xiao *et al.*, (2004) observaram que a presença de 100 g.L^{-1} de manose (45%), xilose (38%) e galactose (32%) interferiram negativamente na hidrólise da celulose ao estudar o mesmo complexo enzimático (40 FPU). A inibição por monômeros não foi observada no BPC, provavelmente, porque a assimilação da glicose e xilose pela levedura AC14 ocorre rapidamente, não tendo uma alta concentração desses açúcares no meio por tempo suficiente para interferir na hidrólise.

Figura 10 - Atividades nos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC com diferentes substratos: (a) Xilanases, (b) Celulases totais, (c) β -glicosidase e (d) β -xilosidase. Leveduras AC14 (barras preenchidas) e MD4 (barras hachuradas). $DO_0 = 100$, 35°C , pH inicial 5,5 e meio YP (composição na Tabela 6). Letras iguais acima das barras indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.



A partir dos resultados discutidos acima, decidiu-se selecionar o meio 6 contendo monômeros, dissacarídeo e polissacarídeos, no qual foram observadas $0,17 \text{ UI.mL}^{-1}$ ($2,13 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$) de celulases totais, $8,16 \text{ UI.mL}^{-1}$ ($102,0 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$) de xilanases, $0,59 \text{ UI.mL}^{-1}$ ($7,38 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$) de β -glicosidase e $2,04 \text{ UI.mL}^{-1}$ ($25,5 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$) de β -xilosidase, para as etapas seguintes. Neste sentido, os desenvolvedores da cepa AC14 obtiveram aproximadamente as seguintes atividades quando o substrato foi glicose (20 g.L^{-1}): $18 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$ para endoglucanase, $29 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$ para xilanase, $14 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$ para β -glicosidase e $13 \text{ UI.g}^{-1}_{\text{célula}}$ para β -xilosidase (CLAES *et al.*, 2020). Somente a atividade de β -xilosidase foi realizada com a mesma metodologia em ambos os trabalhos, por isso a diferença para as demais enzimas pode ser atribuída à variação de métodos, de reagentes e equipamentos para quantificação das atividades enzimáticas. Todavia vale ressaltar que esta discrepância não prejudica a comparação entre substratos, pois sempre foi utilizada a mesma metodologia experimental para quantificação. Em outros estudos, já foram reportadas atividades enzimáticas em ordens de grandeza bem menores às obtidas aqui. Amoah *et al.* (2017), por exemplo, desenvolveram um levedura que secretava celulases e xilanases, obtendo $0,2$ e $0,4 \text{ UI.g}^{-1}$ em base úmida.

3.3.2. Influência do pH inicial

Após a seleção da composição do meio mais adequada para os estudos de BPC, avaliou-se a influência do pH no processo. O pH do meio fermentativo pode favorecer a contaminação bacteriana, além de influenciar a sobrevivência e o crescimento celular, a taxa de fermentação e a formação de produtos. Adicionalmente, a permeabilidade de alguns nutrientes nas células da levedura é influenciada pela concentração de H^+ no meio de cultivo (AZHAR *et al.*, 2017). Por outro lado, o pH tem grande influência nas enzimas, porque afeta o estado de protonação dos grupos funcionais de aminoácidos e cofatores e também a estrutura tridimensional da proteína (BISSWANGER, 2014), podendo, portanto, afetar as reações de hidrólise e a produção de etanol 2G, consequentemente.

Como pode ser visto na Figura 11, na faixa de pH inicial avaliada, ocorreu total conversão dos substratos quando se utilizou a AC14. Ao analisar os parâmetros fermentativos (Tabela 8), notou-se que os maiores valores de concentração de etanol, produtividade e rendimentos ocorreram no pH de 5,5, indicando que ele é o mais favorável para o BPC.

Figura 11 - Acompanhamento dos ensaios de BPC conduzidos em diferentes valores de pH inicial: (a) 4,5; (b) 5,5 e (c) 6,5. Meio YP (5 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de xilose, 5 g.L⁻¹ de xilana de sabudo de milho, 5 g.L⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L⁻¹ de CMC; meio 6, Tabela 6), DO₀ = 100 e 35 °C. Leveduras AC14 (●) e MD4 (▲).

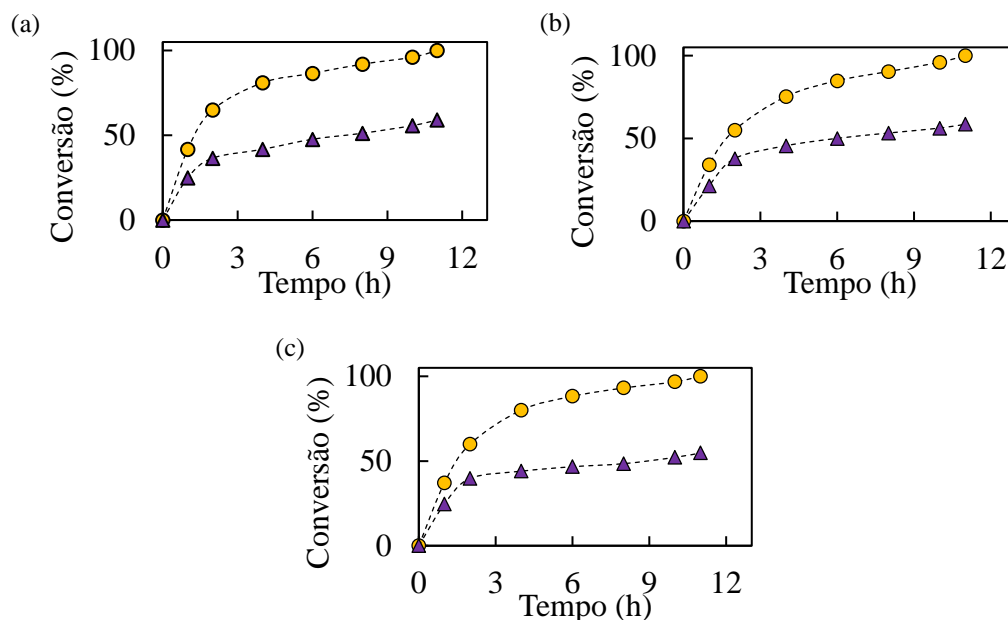


Tabela 8 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em diferentes valores de pH inicial. Levedura AC14, DO₀ = 100, 35 °C, pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

pH inicial	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade celular (%)
4,5	8,66±0,71 ^a	0,78±0,06 ^c	71,7±1,6 ^g	96,4±2,8 ⁱ
5,5	10,70±0,39 ^b	0,97±0,04 ^d	89,1±2,6 ^h	97,1±1,9 ⁱ
6,5	7,71±0,02 ^a	0,70±0,00 ^c	63,8±1,8 ^g	97,2±2,8 ⁱ

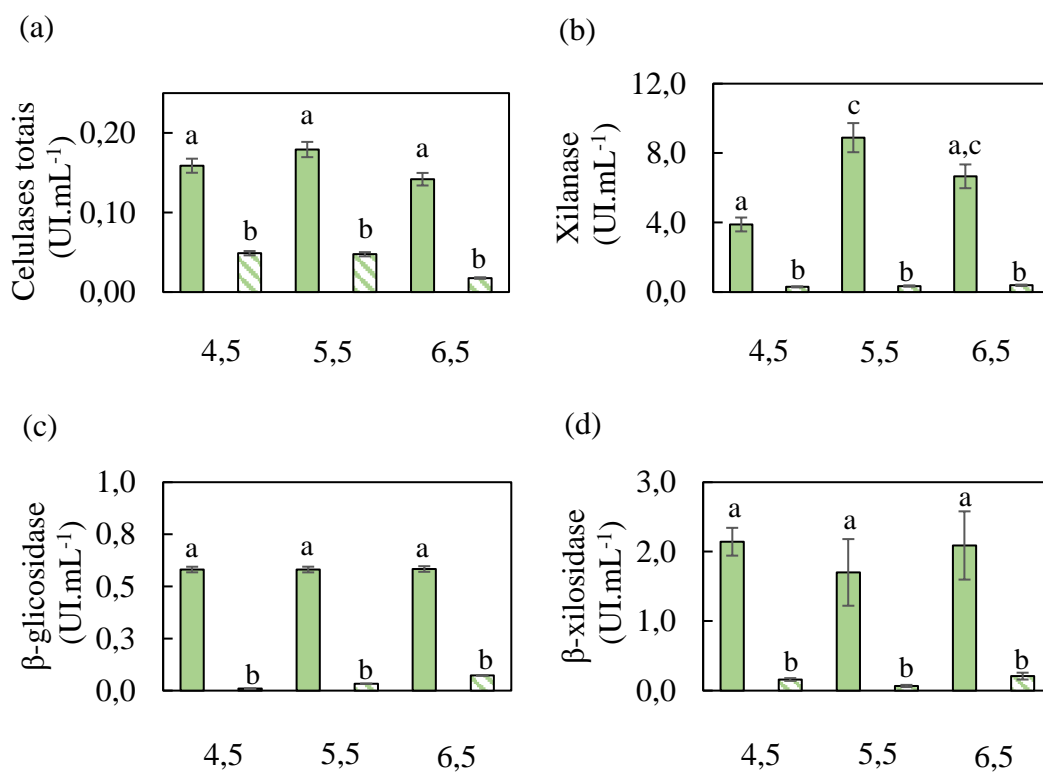
Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Independente do pH inicial, a concentração final de xilitol, glicerol e ácido acético foram em média 0,2, 0,3 e 0,6 g.L⁻¹, respectivamente. Semelhante aos experimentos fermentativos com diferentes composições de meio, a viabilidade final da AC14 e MD4

nos três pHs ficou acima de 90%. Além do pH final e DO final também terem ficado próximos dos valores medidos inicialmente.

Ao avaliar a produção enzimática nos diferentes valores de pH (Figura 12), notou-se que somente a xilanase foi afetada. O pH 5,5 foi responsável por favorecer a atividade desta enzima. Analisando os resultados do teste de Tukey, percebeu-se que as atividades em xilanase em pHs 5,5 e 6,5, assim como em pHs 4,5 e 6,5 foram estatisticamente semelhantes. Sendo assim, decidiu-se seguir os experimentos com pH inicial 5,5. Adicionalmente, a operação com pHs mais ácidos auxilia na prevenção da contaminação do meio (AZHAR *et al.*, 2017). Vale ainda ressaltar que mesmo com uma atividade enzimática reduzida nos pHs extremos (4,5 e 6,5) houve hidrólise e consumo total dos substratos.

Figura 12 - Atividades dos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC realizados em diferentes valores de pH inicial. (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β -glicosidase e (d) β -xilosidase. Meio 6 (Tabela 6), contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de xilose, 5 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de bilho, 5 g.L⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L⁻¹ de CMC. DO₀ = 100 e 35 °C. Leveduras AC14 (barras preenchidas) e MD4 (barras hachuradas). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.



Na literatura também existem relatos de que os BPCs são influenciados pelo pH. Singh *et al.* (2018), utilizando um *Clostridium thermocellum* ATCC 31924 que produz celulase e xilanase, estudaram o consumo de celulose cristalina em um intervalo de pH de 6,0 a 8,0 e observaram que a maior concentração de etanol foi obtida no pH mais alcalino. Favaro *et al.* (2015), por sua vez, estudaram as leveduras *S. cerevisiae* M2n[SFA1-TLG1] e *S. cerevisiae* MEL2[SFA1-TLG1] no BPC de etanol de amido, as quais produzem glicoamilase e α -amilase, respectivamente, e concluíram que o pH 4,5 era ótimo para o processo. Chi *et al.* (2018) estudaram o BPC para a produção de ácido butírico a partir de palha de arroz deslignificada com um consórcio de microrganismos e notaram que o pH 6,5 foi o mais adequado ao variar de 5,5 a 7,0. Vale destacar que o pH ideal de processo será particular de cada cepa e enzimas envolvidas, uma vez que cada biocatalisador terá suas características de pH e temperatura ótima específicas.

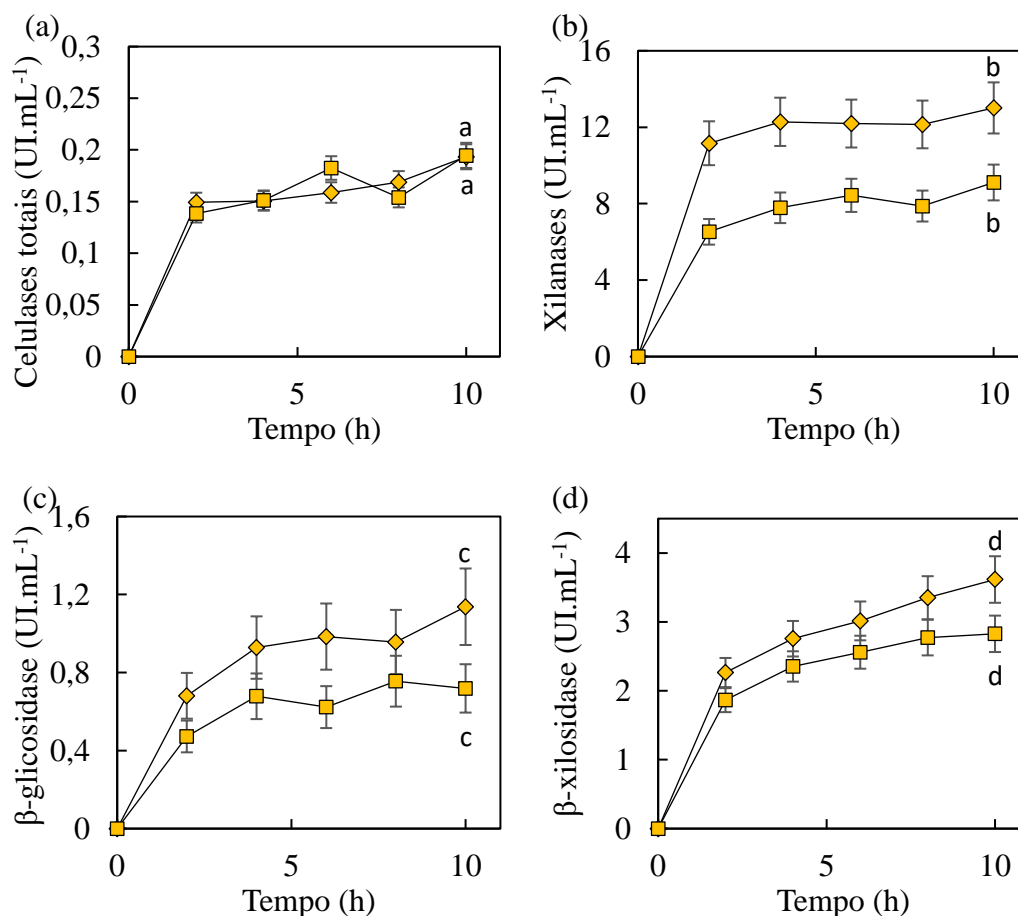
3.3.3. Influência do fornecimento de oxigênio

A presença ou ausência de oxigênio em um processo pode interferir no metabolismo celular, desviando a rota metabólica e influenciando a velocidade específica de crescimento e, conseqüentemente, pode também alterar a produção das enzimas. Como a produção eficiente das enzimas hidrolíticas é crucial em BPC, estudou-se a produção das enzimas em experimentos estáticos e agitados, em pH 5,5 e no meio 6, previamente selecionados. Todos os perfis de atividade enzimática ao longo dos BPCs conduzidos em condições fermentativas ou aeróbias seguiram a mesma tendência para cada enzima estudada (Figura 13) e as atividades enzimáticas finais foram estatisticamente semelhantes (teste de Tukey com 95% de confiança).

Como esperado, a concentração de etanol no experimento agitado foi quase um terço do valor obtido na condição estática (Tabela 9), levando a uma menor produtividade. Neste caso, o metabolismo deve ter sido desviado para o crescimento e manutenção celular, o que também explicaria o aumento de massa celular de aproximadamente 15% (dados não mostrados). Adicionalmente, a viabilidade celular foi próxima de 100% tanto na presença quanto na ausência de oxigênio. A produção final de xilitol, glicerol e ácido acético também foi baixa, atingindo-se em média 0,4, 0,4 e 0,5 g.L⁻¹ destes metabólitos, respectivamente. O pH final também foi semelhante ao inicial. Vale destacar que provavelmente a desaceleração na produção das enzimas após 5 h está relacionada à

diminuição na concentração dos substratos, principalmente glicose e xilose, que são monômeros de rápida assimilação.

Figura 13 - Cinética da produção enzimática dos ensaios de BPC com levedura AC14 em condições aeróbias (♦) e anaeróbias (■). (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β -glicosidase e (d) β -xilosidase. Meio 6, contendo 5 g.L⁻¹ de glicose, 5 g.L⁻¹ de xilose, 5 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 5 g.L⁻¹ de celobiose e 2,5 g.L⁻¹ de CMC (Tabela 6). DO₀ = 100, pH inicial 5,5 e 35 °C. Letras iguais acima dos pontos indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.



Com o estudo da influência do fornecimento de oxigênio, conclui-se a etapa inicial de caracterização do BPC utilizando a levedura AC14, tornando possível identificar as condições de cultivo mais favoráveis para a produção de enzimas e etanol em termos de composição de meio e pH, incluindo a ausência de agitação (anaerobiose).

Tabela 9 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em condições aeróbias e anaeróbias. Leveduras AC14, $DO_0 = 100$, $35\text{ }^\circ\text{C}$, pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

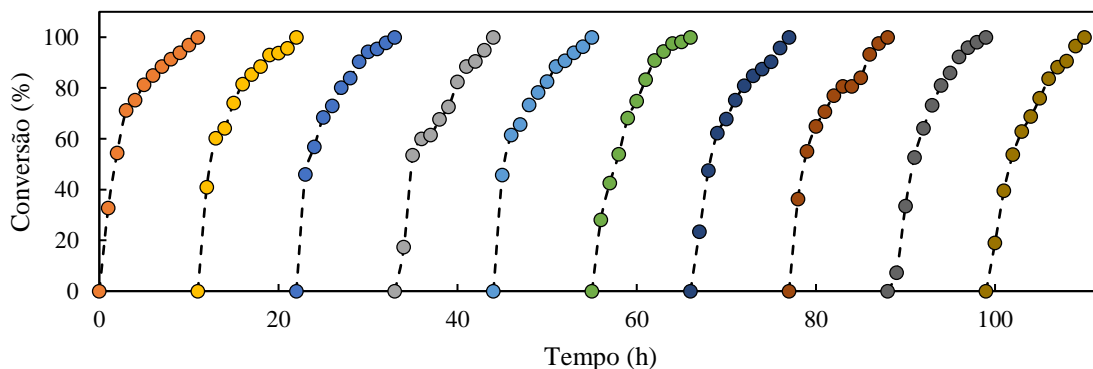
Condição	Etanol produzido ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Q_P ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ (%)	Viabilidade celular (%)
Agitada	$4,21\pm 0,20^a$	$0,38\pm 0,03^c$	$34,9\pm 1,2^g$	$96,8\pm 1,0^i$
Estática	$10,64\pm 0,40^b$	$0,97\pm 0,03^d$	$88,1\pm 2,4^h$	$95,1\pm 1,5^j$

$Y_{P/S}$: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P : produtividade de etanol.

3.3.4. Bateladas repetidas

Uma importante análise a ser feita no BPC é a possibilidade de reutilização do biocatalisador, uma vez que esta estratégia pode aumentar a viabilidade econômica e técnica do processo, além de ser uma prática amplamente utilizada nas usinas de etanol 1G, característica do processo Melle Boinot (SHULER e KARGI, 2002). Por isso, os ciclos da levedura AC14 foram estudados em dez bateladas repetidas com 11 h de duração cada (tempo no qual o escape de CO_2 cessou). As curvas de conversão são apresentadas na Figura 14, sendo observado que todo o substrato foi consumido em todos os ciclos, ao longo de 11 h de processo.

Figura 14 - Acompanhamento dos ensaios de BPC em bateladas repetidas (levedura AC14, meio YP contendo $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de glicose, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilana de sabugo de milho, $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de celobiose e $2,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de CMC, $DO = 100$ e $35\text{ }^\circ\text{C}$).



Ao analisar os parâmetros fermentativos de cada ciclo (Tabela 10) percebe-se que a concentração de etanol foi estaticamente semelhante em todas as bateladas (aproximadamente 9,5 g.L⁻¹), indicando a viabilidade de reuso da levedura por dez vezes consecutivas. Semelhantemente, produtividades e rendimentos mantiveram-se praticamente constantes, o que é bastante atraente no ponto de vista de processo. A produção de xilitol, glicerol e ácido acético não foi superior a 0,6, 0,4 e 2,0 g.L⁻¹, respectivamente.

Tabela 10 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC em bateladas repetidas. Levedura AC14, DO = 100, 35 °C, pH 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Batelada	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade celular (%)
1	10,89±0,40 ^a	1,00±0,04 ^b	91,3±3,4 ^c	96,6±1,9 ^{d,f}
2	9,04±0,42 ^a	0,82±0,21 ^b	80,9±3,8 ^c	94,1±0,8 ^{d,e,f}
3	8,34±0,92 ^a	0,76±0,08 ^b	72,1±6,8 ^c	95,0±0,3 ^{d,e,f}
4	10,82±0,31 ^a	0,98±0,28 ^b	88,3±2,5 ^c	96,3±0,8 ^{d,e,f}
5	7,98±0,71 ^a	0,72±0,15 ^b	72,3±6,4 ^c	96,6±1,3 ^{d,e,f}
6	10,36±0,51 ^a	0,94±0,10 ^b	85,6±4,2 ^c	91,2±0,9 ^{d,f}
7	8,10±0,86 ^a	0,74±0,05 ^b	71,3±5,7 ^c	79,4±1,7 ^{e,f,g,h}
8	9,09±0,59 ^a	0,83±0,23 ^b	79,6±4,2 ^c	85,6±1,9 ^{f,h}
9	10,24±0,99 ^a	0,93±0,10 ^b	86,1±3,3 ^c	67,8±2,5 ^{g,h}
10	10,02±0,57 ^a	0,91±0,15 ^b	83,2±4,7 ^c	73,4±0,7 ^h

Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Na literatura existem poucos relatos sobre bateladas repetidas em BPC para a produção de etanol. Um ponto que chama atenção nestes artigos é o tempo elevado de cada ciclo. Por exemplo, Matano *et al.*, (2013) fizeram cinco ciclos de 72 h com cepa de *S. cerevisiae* que produz somente enzimas celulolíticas (β-glicosidase, endoglucanase e celobibiohidrolase II). Neste caso, foi utilizado palha de arroz pré-tratada (250 g.L⁻¹) como substrato. Já Liu *et al.* (2015) estudaram uma levedura que secretava β-glicosidase,

endoglucanase e celobibiohidrolase I. Utilizando 10 g.L⁻¹ de celulose inchada com ácido fosfórico como matéria-prima, realizaram 3 ciclos de 96 h cada, enquanto no presente trabalho os ciclos tiveram duração de apenas 11 h, graças à utilização de alta carga de células. Perez (2021) realizou 10 bateladas repetidas com 7 h de duração utilizando a cepa AC14 com elevado rendimento ($Y_{P/S}$ médio de 0,49 g.g⁻¹), todavia só utilizou xilose como fonte de carbono.

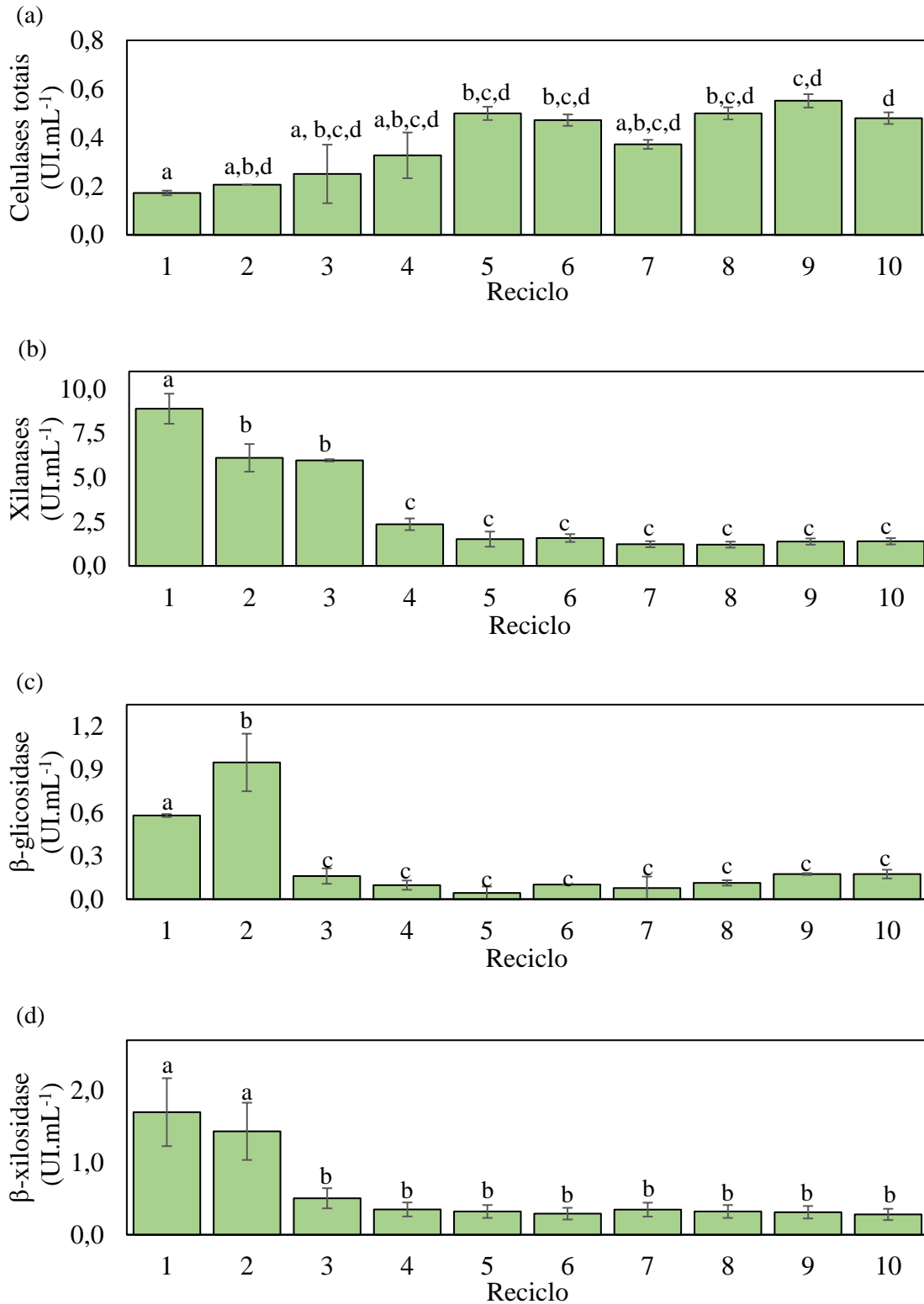
Além do desempenho fermentativo, a atividade enzimática presente nos extratos obtidos ao final de cada ciclo também foi quantificada. Como esperado, notou-se que a atividade em celulases totais foi aumentando a cada repetição (Figura 15a). Isso é explicado pela retenção da enzima produzida junto com a suspensão de biomassa concentrada recuperada por centrifugação ao final de cada batelada. À medida que essa suspensão é transferida de uma batelada para outra, a atividade inicial aumenta gradativamente devido à produção de enzima que ocorre em cada ciclo.

Por outro lado, para as demais enzimas (Figuras 15b, 15c e 15d), houve um decréscimo de atividade ao longo dos reciclos, observando-se uma estabilização a partir da terceira ou quarta batelada. Isso pode ser atribuído à perda da capacidade de produzir essas enzimas ao longo dos reciclos, devido a algum processo de perda de vitalidade celular, devendo ser estudado de maneira mais aprofundada.

Sabe-se que a vitalidade celular é a capacidade de produção de energia das células, podendo interferir no metabolismo do microrganismo. De acordo com Bouix *et al.* (2022), essa característica está ligada ao comportamento dinâmico das células ou ao nível de atividade metabólica (velocidades específicas de crescimento, de produção de metabólitos ou de assimilação de substratos).

Na literatura existem relatos de que o esgotamento de nutrientes e acúmulo de metabólitos, como o etanol, pode prejudicar a vitalidade celular de leveduras (BOUIX *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2022b). Adicionalmente, a pressão causada pelo CO₂ liberado na fermentação e a concentração de CO₂ dissolvido no meio também podem reduzir a vitalidade do microrganismo (ZHAO *et al.*, 2022b). Tian *et al.* (2022) reportaram, por exemplo, que a vitalidade de espécies de *S. cerevisiae* é afetada até mesmo pela diferença de concentração de glicose no meio fermentativo, que pode causar alterações mitocondriais.

Figura 15 - Atividades nos extratos enzimáticos dos ensaios de BPC em batelada repetida. (a) Celulases totais, (b) Xilanases, (c) β -glicosidase e (d) β -xilosidase. Levedura AC14, $DO_0 = 100$, 35°C , pH inicial 5,5 e meio 6 (Tabela 6). Letras iguais indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.



Aparentemente, esse problema se refletiu na viabilidade celular, que teve uma redução ao longo das repetições, chegando à cerca de 70 % nos dois últimos ciclos (Tabela 10). Mesmo com as baixas atividades em xilanases, β -xilosidase e β -glicosidase, a conversão total do substrato foi atingida e a produção de etanol se mostrou constante (Tabela 10). Isso provavelmente ocorreu porque foi utilizado meio com baixas concentrações de CMC, celobiose e xilana de sabugo de milho, de forma que a baixa atividade enzimática foi suficiente para degradar em 11h todos os polímeros presentes. Caso maiores concentrações de polímeros tivessem sido utilizadas, as baixas atividades enzimáticas provavelmente levariam a uma menor conversão no mesmo tempo de cultivo.

Adicionalmente, a diferença de perfil entre a atividade das celulases totais (endoglucanase, celobiase I e celobiase II) e as demais enzimas pode estar associada aos promotores utilizados por Claes *et al.* (2020) na construção da cepa AC14. Como mostra a Tabela 5, a introdução dos genes da endoglucanase, da celobiase I e da celobiase II foram flanqueados por um promotor diferente das demais, denominado PGK1. Os autores que desenvolveram a levedura AC14 justificaram essa alteração no promotor como uma forma de evitar o esgotamento do promotor TEF1, que poderia resultar em menor produção de proteínas (CLAES *et al.*, 2020). Todavia, os resultados aqui obtidos apontam que essa mudança pode ter prejudicado a produção das enzimas associadas ao PGK1 durante as bateladas repetidas.

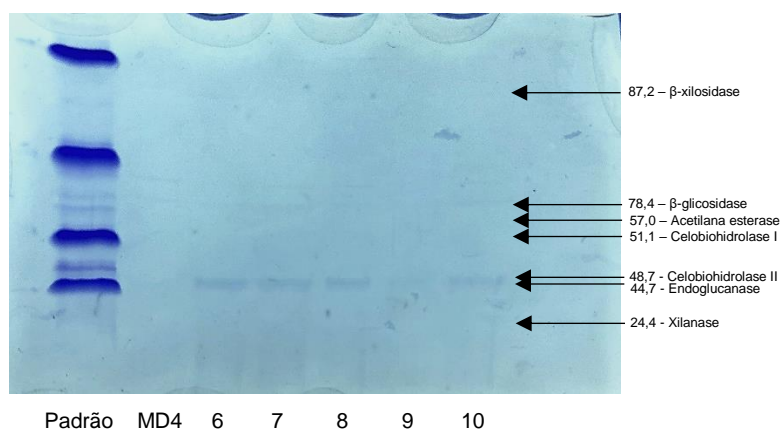
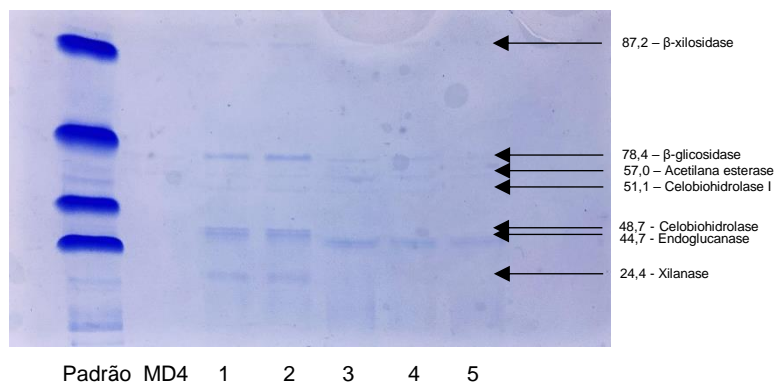
É importante destacar que, nos estudos conduzidos em bateladas repetidas com outras linhagens de leveduras recombinantes que antecederam a AC14 (*S. cerevisiae* T18, HAA1 e MDS130), nenhum indício de perda de vitalidade foi observado (PEREZ, Caroline L. *et al.*, 2022, 2021; SOARES *et al.*, 2022). Todas essas linhagens anteriores são semelhantes à MD4, ou seja, contendo apenas modificações genéticas relacionadas à assimilação eficiente de xilose, mas sem capacidade de secretar enzimas. Portanto, esse fato novo está provavelmente relacionado com a expressão das enzimas hidrolíticas e requer mais estudos para sua elucidação.

2.4. Conclusão

A linhagem *S. cerevisiae* AC14 destaca-se por ser até o momento a única relatada na literatura com capacidade de secreção de 7 enzimas hidrolíticas, projetada especificamente para ser usada em Bioprocessamento Consolidado. A incorporação de uma levedura com essas características pode revolucionar a produção de bioetanol por

BPC. Porém, o sucesso dessa estratégia depende do mapeamento das respostas da AC14, não só em termos do seu desempenho fermentativo, mas também da eficiência na produção das enzimas. Neste estudo, a influência de condições de cultivo mais relevantes (composição do meio de cultivo, pH inicial, fornecimento de oxigênio) foi avaliada em batelada simples, utilizando um meio sintético, contendo açúcares simples, dissacarídeos e polissacarídeos (de composição e estrutura conhecidos). De maneira geral, a levedura apresentou excelente robustez, conseguindo atingir a conversão completa de todos os substratos, além de rendimentos em etanol de mais de 90 % do teórico e alta viabilidade, em condições fermentativas. A capacidade hidrolítica da levedura modificada foi ainda confirmada por meio da medida das atividades enzimáticas, mostrando que a produção das enzimas ocorre de forma efetiva e reproduzível em todas as condições estudadas. Porém, quando cultivada em batelada repetida, a síntese de algumas enzimas foi afetada negativamente, sugerindo que o promotor utilizado para flanquear esses genes pode ter interferido na produção das proteínas. Esse resultado ilustra a importância de expor os organismos recombinantes a condições de cultivo similares às empregadas na indústria, para que seu potencial de aplicação seja efetivamente avaliado. A partir dos resultados obtidos no presente estudo, condições de BPC com a AC14 utilizando materiais lignocelulósicos reais poderão ser estabelecidas e as limitações do processo mais facilmente identificadas.

Anexo A – Géis de eletroforese com extratos enzimáticos obtidos nos ensaios fermentativos com AC14 em diferentes substratos conforme Tabela 6.



Capítulo 3 – Avaliação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AC14 no bioprocessamento consolidado de bagaço de cana advindo da indústria sucroalcooleira para produção de etanol 2G

3.1. Introdução

Atualmente no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar é um co-produto agro-industrial que se destaca principalmente pela sua grande disponibilidade. Na safra 2022/2023, está prevista a produção de 572,9 milhões de toneladas de cana no país (CONAB, 2022), sendo que, para cada tonelada de cana processada nas usinas de açúcar e etanol 1G, são gerados 140 kg de bagaço (CANILHA *et al.*, 2012). Entretanto este co-produto agroindustrial ainda não é integralmente aproveitado no contexto da Biorrefinaria, sendo parcialmente queimado nas caldeiras das usinas sucroalcooleiras para a co-geração de eletricidade (ALOKIKA *et al.*, 2021).

Como qualquer biomassa lignocelulósica, o bagaço da cana é rico em carbono, sendo composto principalmente por celulose e hemicelulose, além de lignina e outros componentes em menor quantidade (MIRANDA *et al.*, 2021). Essas cadeias carbônicas podem ser a base para a produção de diversos bioprodutos como, por exemplo, o etanol 2G (HUANG *et al.*, 2020). Um problema na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos é que a levedura amplamente utilizada na produção de etanol 1G não é capaz de assimilar eficientemente a xilose proveniente da porção hemicelulósica, dificultando o aproveitamento integral da biomassa vegetal (AZHAR *et al.*, 2017). Sendo assim, o desenvolvimento de tecnologias escalonáveis que utilizem eficientemente o bagaço e gerem etanol é crucial para o aproveitamento total desse material lignocelulósico.

Para produção de etanol 2G, a estrutura complexa da biomassa deve ser rompida a fim de tornar as frações celulósica e hemicelulósica mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas, viabilizando a liberação dos açúcares livres e sua fermentação a etanol. Diante disso, uma etapa de pré-tratamento deve ser aplicada, a qual pode consistir em processos físicos, químicos, físico-químicos, biológicos ou uma combinação desses processos (SHARMA *et al.*, 2020). Dentre os métodos existentes, o pré-tratamento ácido é um processo bastante estudado, sendo aplicado para uma grande variedade de biomassas (AGUIAR *et al.*, 2021; CHEAH *et al.*, 2020). Essa metodologia, por meio da hidrólise química, transforma a biomassa em uma fração líquida, a qual possui principalmente a

porção hemicelulósica solubilizada, e em outra fração sólida, contendo a celulignina. Uma desvantagem geral desse tipo de pré-tratamento é a formação de inibidores do metabolismo microbiano a partir da degradação de açúcares e decomposição de lignina, além da necessidade de equipamentos resistentes à corrosão (CHEAH *et al.*, 2020; SOLARTE-TORO *et al.*, 2019).

O pré-tratamento hidrotérmico, por sua vez, é mais brando e simples, sendo considerado interessante economicamente por ter um ciclo curto e gerar menos produtos de degradação. Essa tecnologia baseia-se na utilização de água em altas pressões, gerando ácido acético a partir da xilana pela ação de íons provenientes da auto-ionização da água. Isso faz com que seja um processo bastante atraente no ponto de vista da sustentabilidade, pois não necessita de adição de ácidos nem de etapas de recuperação (YUE *et al.*, 2022). Além disso, não é preciso reatores resistentes a corrosão, pode-se usar a biomassa úmida e apresenta custos operacionais menores quando comparado a outros pré-tratamentos que necessitam de diversos insumos e equipamentos específicos. Um ponto negativo é o grande volume de água utilizado (YUE *et al.*, 2022).

Após o pré-tratamento, uma etapa de hidrólise enzimática deve ocorrer no material pré-tratado para liberação dos açúcares fermentescíveis, porém o custo das enzimas hidrolíticas é um gargalo econômico (RAMOS *et al.*, 2022). Por isso, uma técnica que vem ganhando espaço no contexto integrativo da Biorrefinaria, é o Bioprocessamento Consolidado (BPC), pois nesta abordagem um único microrganismo ou um consórcio deles é capaz de produzir enzimas hidrolíticas que atuam no material lignocelulósico e de assimilar pentoses e hexoses simultaneamente em um único reator (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020; SINGHANIA *et al.*, 2022). Dentre os estudos sobre BPC na literatura, a levedura desenvolvida por Claes *et al.* (2020) é bastante atraente, pois produz sete enzimas hidrolíticas.

Para analisar a aplicabilidade deste processo em condições industriais, é fundamental o estudo do BPC com materiais lignocelulósicos reais. Esse tipo de matéria-prima começou a ser estudada para BPC na última década, englobando substratos como palha de milho (CHEN *et al.*, 2018; KHRAMTSOV *et al.*, 2011), palha de trigo (LEE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2017) e palha de arroz (LIU *et al.*, 2020; SAKAMOTO *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2016). Por outro lado, os co-produtos gerados na indústria sucroalcooleira, como o bagaço e palha de cana-de-açúcar, apesar de serem interessantes fontes de carbono, ainda não foram suficientemente investigados em BPC (PEREZ, 2021; AMOAH *et al.*, 2017). Dentre esses estudos, Perez (2021) conduziu

estudos preliminares de BPC a partir do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente, utilizando a cepa AC14. Notou-se que a conversão da biomassa foi parcial, sendo esse resultado atribuído à dificuldade de acesso das enzimas à matriz polimérica e necessitando de mais estudos que investigassem estratégias que favorecessem o processo.

Para buscar um BPC produtivo e eficiente, além do processo padrão que é composto pela adição do microrganismo, do licor, da celulignina e de fontes de nitrogênio, pode-se recorrer a novos recursos para melhorar o processo. Dentre eles, destaca-se a adição de proteína de soja e o congelamento da celulignina. A primeira estratégia está atrelada a um problema que vem sendo reportado na literatura: a adsorção das enzimas responsáveis pela de hidrólise enzimática do material lignocelulósico na lignina presente na fração sólida. Tal fenômeno é extremamente prejudicial à eficiência da etapa de hidrólise, pois uma vez adsorvida, a enzima perde sua funcionalidade (GUO *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2021). Por isso, técnicas que minimizem essa adsorção vêm sendo desenvolvidas, como é o caso da utilização de aditivos que funcionem como “moléculas de sacrifício”. Ou seja, saturam a lignina ocupando o lugar das enzimas, que continuam ativas para catalisar a hidrólise dos materiais (FLORENCIO *et al.*, 2019, 2016). Destaca-se que esta abordagem ainda não foi testada no BPC, tendo sido aplicada na hidrólise enzimática separada seguida de fermentação. A segunda estratégia está ligada ao pré-tratamento aplicado no bagaço. Sabe-se que não existe um pré-tratamento universal que seja eficiente para todos os tipos de materiais lignocelulósicos, variando a eficiência de acordo com a matéria prima (SHARMA *et al.*, 2020). Por isso, existem pesquisas que abordam a utilização sequencial de pré-tratamentos que se complementem e melhorem a exposição da fibra e o acesso posterior das enzimas à matriz polimérica. Neste sentido, o congelamento-descongelamento da biomassa vegetal é um processo interessante como pré-tratamento complementar a outro, porque cria microfendas e poros na estrutura vegetal, aumentando a área de contato, além de ser simples e de baixo impacto ambiental (WANG, Xin Ming *et al.*, 2013).

Sendo assim, neste trabalho estudou-se o BPC do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado (fração sólida e fração líquida), avaliando os pré-tratamentos hidrotérmico e ácido, além das etapas adicionais de congelamento e dopagem do meio com proteína de soja como molécula de sacrifício, visando aumentar a eficiência da etapa de hidrólise e consequentemente do BPC.

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Materiais

Para os cultivos de BPC, utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar doado gentilmente pela usina Ipiranga agroindustrial (Descalvado, SP). Para a composição dos meios sintéticos, utilizou-se extrato de levedura da Fisher Bioreagentes (México), peptona da Pharma & FIA Kerry (Campinas/Brasil), celobiose da Sigma-Aldrich (Reino Unido), xilana de sabugo de milho da Carl Roth (Alemanha) e carboximetilcelulose da Synth (Brasil). Nos cultivos BPC foi aplicado Kamoran gentilmente fornecido pela Química Real (Belo Horizonte, MG). Para as atividades enzimáticas, p-NPX da Sigma-Aldrich (Israel) e xilana da madeira de faia da Carl Roth (Alemanha) foram utilizados. Para estudar o efeito bloqueador da proteína de soja, aplicou-se a proteína isolada da Bremil (Arroio do Meio, RS), com 90% de teor de proteína.

3.2.2. Microrganismo e inóculo

A levedura recombinante *S. cerevisiae* AC14 (CLAES *et al.*, 2020), desenvolvida no laboratório do Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeast, Bélgica), capaz de produzir sete enzimas hidrolíticas e assimilar xilose, glicose e outras hexoses (CLAES *et al.*, 2020), foi utilizada. Inicialmente, uma alçada de cultura estoque da cepa AC14 armazenada a -80°C foi estriada em meio sólido YPÁgar contendo glicose (20 g.L⁻¹), xilose (20 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (10 g.L⁻¹), celobiose (10 g.L⁻¹) e carboximetilcelulose (50 g.L⁻¹), além de extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹) e ágar (15 g.L⁻¹). A placa de Petri foi incubada a 30 °C por 48 h. Em seguida, uma colônia foi ressuspensa em 75 uL de água destilada estéril e a suspensão foi espalhada com alça de Drigalski em meio YPÁgar contendo glicose (20 g.L⁻¹), xilose (20 g.L⁻¹) e ágar (15 g.L⁻¹) e incubada por mais 24 h a 30 °C, para a formação de um “tapete” celular cobrindo toda a superfície. Para preparar o inóculo, o “tapete” celular de uma placa de Petri foi totalmente ressuspensa em meio YPDX (20 g.L⁻¹ de glicose e 20 g.L⁻¹ de xilose) e inoculado em 300 mL do mesmo meio em um frasco Erlenmeyer aletado de 1 L, sendo deixado em incubadora rotatória (150 rpm) por 12 h a 30 °C. As células foram recuperadas por centrifugação (2500 rpm e 10 min) a 4 °C.

3.2.3. Preparo do bagaço de cana

Inicialmente, o bagaço de cana-de-açúcar (39% de celulose, 29% de hemicelulose e 21% de lignina) foi moído e peneirado em moinho de facas Wiley (TE-650/1 Tecnal, Brasil) para obtenção de granulometria ≤ 3 mm. Em seguida, o bagaço foi seco em estufa por 24 h a 45 °C até atingir 10-15% de umidade, quantificada em uma balança determinadora de umidade ID50 Marte (MILESSI, Thais S. *et al.*, 2021).

3.2.4. Pré-tratamentos do bagaço de cana

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado em um reator de aço inoxidável de 5,5 L (Parr Instrument Company 4544, Moline, EUA) com agitador de hélice, dotado de aquecimento e controlador de temperatura. O reator foi operado com uma relação sólido-líquido de 1:10 (p/v) a 250 rpm e a temperatura foi mantida em 195 °C por 10 min, conforme metodologia desenvolvida por (SILVA, G. M., 2015). Após o resfriamento do reator, o licor hidrotérmico (fração líquida) ainda quente foi separado da celulignina hidrotérmica (fração sólida, 35% de celulose, 9% de hemicelulose e 23% de lignina) por filtração e ambos foram armazenados a 4 °C.

O pré-tratamento ácido do bagaço de cana-de-açúcar foi realizado com ácido sulfúrico (1% v/v) na proporção 1:10 de sólido:líquido em frascos Schott a 121°C por 20 min conforme metodologia de (HERNÁNDEZ-PÉREZ *et al.*, 2020). Após o resfriamento, as frações líquida e sólida (62% de celulose, 3% de hemicelulose e 33% de lignina) foram separadas por filtração e armazenadas a 4°C.

Um tratamento adicional foi empregado na fração sólida (celulignina) resultante do pré-tratamento hidrotérmico para estudar o aumento de exposição da fibra. Para isso, seguiu-se a metodologia de Smichi *et al.* (2016) de congelamento e descongelamento de biomassa. O bagaço pré-tratado foi congelado por 24 h a -20°C e descongelado em banho-maria a 100 °C por 15 min. O material resultante foi filtrado e seco a 50°C por 48 h e utilizado em seguida nos ensaios BPC.

3.2.5. Ensaios fermentativos

Os cultivos foram realizados em mini-reatores de 5 mL equipados com saída de CO₂, conforme descritos por Mesquita *et al.* (2021). Os ensaios de BPC foram

monitorados por meio da medição da liberação de massa de CO₂ na fermentação alcoólica, fazendo a pesagem dos mini-reatores periodicamente. A partir desses dados foi possível estimar a conversão por meio da estequiometria (MESQUITA *et al.*, 2021), interrompendo-se os experimentos quando ocorreu estabilização da massa dos mini-reatores, correspondente a uma variação menor de 5% como indicação do fim da fermentação. Com os perfis de liberação de CO₂ e os dados de concentração final de etanol e de substrato, a curva de conversão e os rendimentos globais foram obtidas considerando-se que a formação de outros produtos (além de CO₂ e etanol) e de biomassa foi pouco significativa. Para o acompanhamento das atividades enzimáticas com o tempo, conduziram-se mini-reatores idênticos em paralelo, que foram periodicamente interrompidos ao longo da fermentação para obtenção do extrato enzimático.

As condições de fermentação foram: pH 5,5, 35°C, 4 mL de volume total e, densidade óptica inicial 100 (correspondente a 80 g/L). Utilizou-se os antibióticos Ampicilina (20 ppm) e Kamoran (4 ppm) em todos os experimentos. Foram realizados cultivos em condições estáticas e sob agitação magnética.

Para estudar o BPC com o bagaço de cana-de-açúcar de uma maneira mais ampla e detalhada, foram conduzidos experimentos das frações líquidas e sólidas separadamente e, em seguida cultivos contendo ambas as frações pré-tratadas. Para isso, quando foram feitos os experimentos visando avaliar especificamente a hidrólise das celuligninas pelas enzimas hidrolíticas produzidas pela levedura AC14, utilizou-se meios sintéticos para mimetizar os licores reais e evitar a interferência dos compostos variados presentes nos licores nas metodologias de determinação de atividades enzimáticas. Apenas após se avaliar cada fração separadamente, foram então realizados cultivos com ambas as partes reais. Os meios de fermentação foram preparados conforme descrito abaixo, tendo como substrato o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido e hidrotermicamente, em combinação ou não com o meio sintético e suplementados com extrato de levedura (10 g.L⁻¹) e peptona (20 g.L⁻¹):

- Meio líquido real: formulado apenas com a fração líquida (licor) resultante do pré-tratamento;
- Meio real: composto pelas celuligninas e os licores provenientes dos pré-tratamentos;
- Meio real/sintético: composto pelas celuligninas e por meio sintético mimetizando a composição do licor real (licor sintético hidrotérmico: 0,4 g.L⁻¹ de glicose, 4,0 g.L⁻¹ de xilose, 1 g.L⁻¹ de celobiose, 15 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho; licor sintético ácido:

2,0 g.L⁻¹ de glicose, 20,0 g.L⁻¹ de xilose, 1 g.L⁻¹ de celobiose) de forma a se avaliar a influência dos inibidores presentes no licor real;

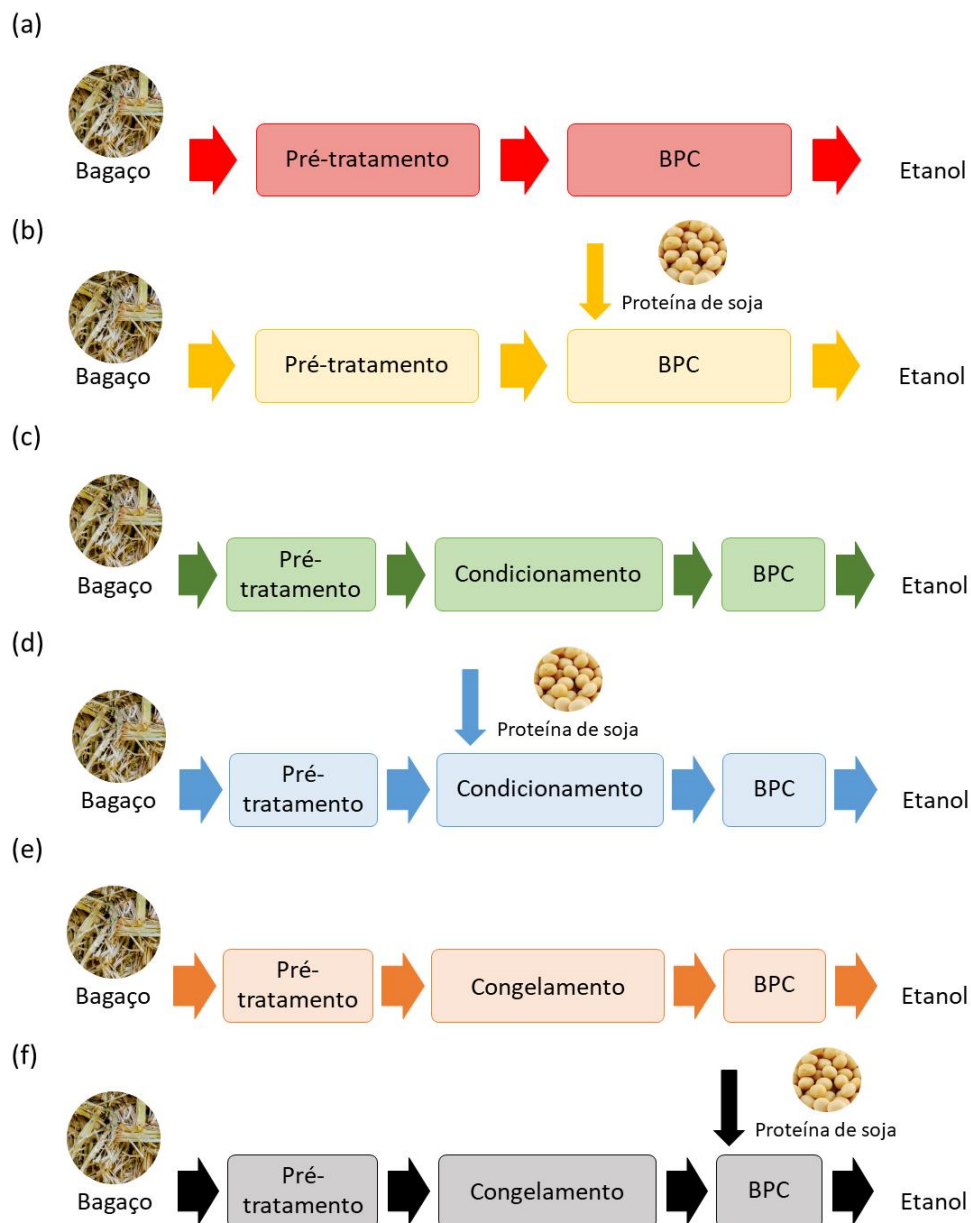
- Meio sintético: experimento controle mimetizando os açúcares potenciais presentes nos licores e celulignina reais (meio sintético hidrotérmico: 0,4 g.L⁻¹ de glicose, 4,0 g.L⁻¹ de xilose, 1 g.L⁻¹ de celobiose, 16 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 3,5 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose; meio sintético ácido: 2,0 g.L⁻¹ de glicose, 20,0 g.L⁻¹ de xilose, 1 g.L⁻¹ de celobiose, 0,5 g.L⁻¹ de xilana de sabugo de milho, 6,0 g.L⁻¹ de carboximetilcelulose).

Nos cultivos com a fração sólida, utilizou-se 10 g.L⁻¹ (1% m/m) de celulignina e também foram estudadas a influência de proteína de soja e do congelamento da fração sólida. Os fluxogramas da Figura 16 mostram as diferentes configurações dos cultivos realizados com a fração sólida.

O BPC padrão foi composto por microrganismo, licor, celulignina, peptona e extrato de levedura como fonte de nitrogênio (Figura 16a). Foram avaliadas duas alternativas de suplementação com proteína de soja para avaliar seu papel como saturadora da lignina. A primeira foi denominada BPC com proteína de soja, a qual foi realizada adicionando-se a proteína de soja junto com os demais componentes do BPC padrão (Figura 16b). Já a segunda alternativa foi chamada de BPC com celulignina condicionada, que foi planejada visando analisar se as fontes de nitrogênio (peptona e extrato de levedura) não interferiam no mecanismo de saturação pela proteína de soja (Figura 16d). Peptona e extrato de levedura são ricos em proteína e podem também contribuir para a saturação da lignina. Para isso, foi feito o condicionamento da celulignina que consistiu em incubá-la (5% p/v) a 50 °C a 200 rpm por 24 h em tampão citrato 50 mM (pH 4,8) na presença de proteína de soja (4% m/m), seguida de filtração, de acordo com metodologia adaptada de Florencio *et al.*, (2016). Como controle, foi realizado o condicionamento da fração sólida sem a proteína, somente com o tampão para averiguar se esta incubação poderia interferir no processo (Figura 16c). Também foi testado o congelamento da celulignina como forma de aumentar a exposição das fibras de celulose conforme detalhes da seção 3.2.4 (Figura 16e). Por fim, realizou-se BPC com proteína de soja combinada com o congelamento (Figura 16f).

Destaca-se que todos os meios e conformações foram testados para o licor e celulignina hidrotérmicos, enquanto que o licor e celulignina ácidos foram utilizados para a avaliação do BPC padrão a fim de comparar a influência da composição das frações líquidas e a as modificações ocorridas na fração sólida por ambos os pré-tratamentos.

Figura 16 - Fluxograma das diferentes configurações estudadas nos ensaios fermentativos de BPC realizados com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido e hidrotérmicamente (a) BPC padrão; (b) BPC com proteína de soja; (c) BPC com celulignina condicionada; (d) BPC com celulignina condicionada e com proteína de soja; (e) BPC com celulignina congelada; (f) BPC com celulignina congelada e com proteína de soja. Condições: 35°C, pH 5,5, DO₀ 100.



Ao final dos cultivos foram quantificados pH final e viabilidade celular. Em seguida, o meio foi centrifugado (2500 rpm, 4 °C por 10 min) e parte do sobrenadante obtido foi congelado a - 20 °C para análise da composição final por cromatografia líquida

de alta eficiência. A outra parte do sobrenadante foi utilizada como extrato enzimático destinada à caracterização das atividades em celulases totais, xilanases, β -glicosidase e β -xilosidase.

3.2.6. Métodos analíticos

Viabilidade celular: A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com metodologia de Sandri *et al.* (2023). A amostra foi incubada com o corante na proporção 1:1 por 5 min em temperatura ambiente. As células não viáveis foram aquelas que adquiriram coloração azul e as células viáveis aquelas que ficaram transparentes. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas em um espaço definido da câmara de contagem (SANDRI *et al.*, 2023).

Atividades enzimáticas: As atividades enzimáticas foram realizadas conforme descrito no tópico 2.2.5.3 do capítulo 2, cujas metodologias encontram-se resumidas na Tabela 11.

Tabela 11 - Protocolos resumidos das atividades enzimáticas utilizadas para caracterizar os extratos enzimáticos gerados nos ensaios de BPC.

Enzima	Celulases totais	Xilanases	β -glicosidase	β -xilosidase
Substrato	Papel de filtro Whatman nº 1 de 15 mm	3 mL de xilana de faia (1% m/v)	50 μ L de celobiose (2%)	p-NPX (5 mmol.L ⁻¹)
Tampão	Citrato de sódio (600 μ L; 50 mmol.L ⁻¹ ; pH 5,0)	Citrato de sódio (50 mmol.L ⁻¹ ; pH 5,5)	Citrato de sódio (50 mmol.L ⁻¹ ; pH 5,5)	Fosfato de potássio (50 mmol.L ⁻¹ ; pH 6,0)
Extrato enzimático	300 μ L	200 μ L	50 μ L	150 μ L
Tempo e temperatura de incubação	1 h a 50 °C	Alíquotas em intervalos de 2 min a 50 °C	15 min a 50 °C	5 min a 50°C
Inativação	-	-	100 °C por 10 min	-
Quantificação	DNS	DNS	GOD-PAP	p-NPX

Quantificação de açúcares e produtos: Inicialmente, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes (2500 rpm, 4 °C por 5 min) conforme (DEMEKE *et al.*, 2013). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtro 0,22 µm e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Para quantificar etanol, glicose, xilose, celobiose, arabinose, glicerol, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural foi utilizada a coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA- Organic acid H+, com H₂SO₄ 5mM como fase móvel no fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de operação 65 °C (PRATTO *et al.*, 2020). Para quantificação total dos xilooligômeros presentes na fração líquida pré-tratada, um volume de 5 mL de amostra foi submetido à hidrólise ácida total para a conversão dos oligômeros a monômeros a partir da reação com 174 µL de H₂SO₄ 72% em tubos de ensaio com tampa, colocados em banho seco a 121°C por 1 h (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Após hidrólise ácida, as amostras foram resfriadas, o pH neutralizado com CaCO₃ e em seguida quantificadas por HPLC. A quantidade total de xilooligômeros presentes na fração líquida foi determinada pela diferença entre a massa de xilose total obtida após hidrólise dos oligômeros em monômeros na hidrólise ácida e a massa de xilose obtida antes da hidrólise ácida (PEREZ, C.L., 2021).

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Estudo dos pré-tratamentos do bagaço

Inicialmente, foi realizado o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por meio de duas metodologias. Em ambos os casos foram geradas duas frações: uma líquida chamada de licor e outra sólida denominada celulignina. O pré-tratamento ácido solubilizou maior porcentagem do bagaço no licor (22,6%) em comparação com o hidrotérmico (14,5%). Isso era esperado porque a adição de ácido favorece o rompimento do material lignocelulósico, principalmente clivando a porção hemicelulósica (ILANIDIS *et al.*, 2021; SOLARTE-TORO *et al.*, 2019).

Em seguida, caracterizou-se a fração líquida conforme consta na Tabela 12. Como esperado, o valor do pH do licor ácido foi menor do que o hidrotérmico, visto que no primeiro há adição de ácido e no segundo só se usa água, ocorrendo somente uma produção *in situ* de ácido acético (SOLARTE-TORO *et al.*, 2019; YUE *et al.*, 2022).

A concentração de xilose foi maior no licor ácido, enquanto a concentração de xilooligômeros foi bem menor, visto que a presença do ácido no pré-tratamento solubiliza a hemicelulose na forma de monômeros. A produção de inibidores (hidroximetilfurfural e furfural) também foi maior no método ácido, o que pode interferir no metabolismo celular e, conseqüentemente, prejudicar o BPC. A maior produção de inibidores no pré-tratamento ácido quando comparado ao hidrotérmico é extensamente relatada na literatura, sendo atribuída à sua maior severidade (PANAKKAL *et al.*, 2021; RAJAN; CARRIER, 2014; RAMOS *et al.*, 2021). Por exemplo, Ilanidis *et al.* (2021) compararam um pré-tratamento baseado na autocatálise e outro com a adição de ácido sulfúrico e perceberam que existe maior produção de inibidores no processo ácido, conforme observado no presente trabalho.

Tabela 12 - Características dos licores advindos dos pré-tratamentos ácido (H₂SO₄ 1% v/v, 1:10 p/v, 121 °C, 20 min) e hidrotérmico (1:10 p/v, 195 °C, 10 min, 250 rpm) do bagaço.

Pré-tratamento	Hidrotérmico	Ácido
pH do licor	3,50	1,30
Glicose (g.L ⁻¹)	0,38	1,85
Xilose (g.L ⁻¹)	4,22	19,29
Celobiose (g.L ⁻¹)	1,15	0,95
Arabinose (g.L ⁻¹)	1,41	2,00
Xilooligômeros totais (g.L ⁻¹)	14,68	1,01
Ácido acético (g.L ⁻¹)	1,67	2,52
HMF (g.L ⁻¹)	0,26	2,25
Furfural (g.L ⁻¹)	1,97	2,33

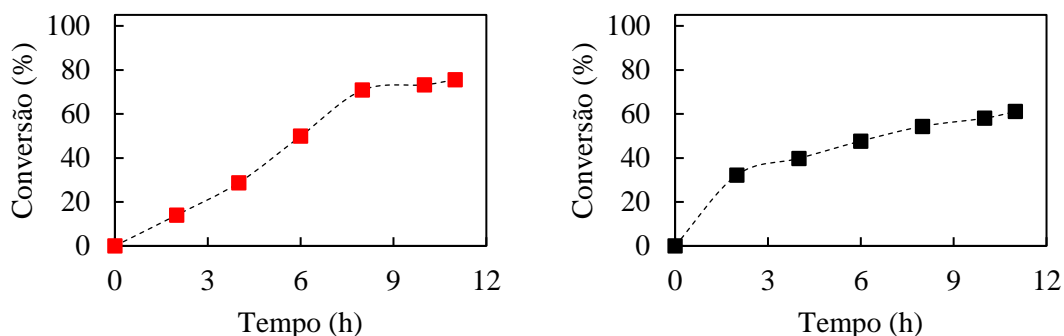
3.3.2. Ensaios fermentativos do BPC

3.3.2.1. Estudo dos licores

Foram conduzidos ensaios fermentativos com os licores obtidos nos pré-tratamentos ácido e hidrotérmico por 11 h, quando a massa dos mini-reatores estabilizou.

Notou-se uma diferença na inclinação entre os perfis (Figura 17), indicando influência da fração líquida no BPC devido as diferentes composições em açúcares e inibidores.

Figura 17 - Perfis de conversão dos ensios de BPCs (pH 5,5, DO₀ 100, agitação magnética) com licores advindo dos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolos vermelhos) e ácido (símbolos pretos).



Na Tabela 13, é possível comparar os licores advindos dos dois pré-tratamentos diferentes. A fermentação do licor hidrotérmico gerou maior concentração de etanol, o que refletiu diretamente nos valores de rendimento e de produtividade, os quais também foram melhores no pré-tratamento hidrotérmico. Isso pode ter ocorrido pela menor presença de inibidores que influenciaram no metabolismo da AC14. Esse resultado é bastante interessante, porque o processo hidrotérmico é mais atraente que o ácido, pois o primeiro é ambientalmente amigável além de ser de simples operação (YUE *et al.*, 2022).

Tabela 13 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios fermentativos com AC14 em licores hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar (DO₀ = 100, 35 °C, pH 5,5, agitação magnética). Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Pré-tratamento	Etanol (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade (%)
Hidrotérmico	9,1±0,6 ^a	0,83±0,06 ^c	75,6±5,3 ^e	96,7±3,3 ^h
Ácido	7,9±0,6 ^b	0,72±0,05 ^d	61,1±4,3 ^f	98,2±5,6 ^h

Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

4.3.2.2. Estudo das frações sólidas

Em sequência, passou-se para o estudo das frações sólidas com licor sintético para analisar sua hidrólise a partir das enzimas produzidas pela cepa AC14. Como a presença de uma fração sólida em suspensão no meio de cultivo pode ocasionar problemas difusionais, principalmente na etapa de hidrólise enzimática (DU et al., 2017), analisou-se a influência da agitação do meio.

Por outro lado, existem relatos na literatura de que a presença de materiais sólidos em sistemas agitados pode reduzir a viabilidade das células, funcionando como uma espécie de moinho de bolas (KOPPRAM e OLSSON, 2014; SANDRI *et al.*, 2023; SASSNER *et al.*, 2006; UNREAN *et al.*, 2016). Sendo assim, é importante avaliar a agitação no BPC e foram conduzidos estudos preliminares para avaliar se a concomitância da presença da celulignina e da agitação alteram significativamente a viabilidade celular da levedura AC14.

Foram conduzidos os seguintes experimentos: cultivo estático com sólido em suspensão e cultivo com agitação magnética com sólido em suspensão, tanto para celulignina advinda do pré-tratamento ácido quanto hidrotérmico. O perfil de conversão dos açúcares está representado na Figura 18. Por meio da inclinação das curvas, notou-se que o ensaio fermentativo com licor hidrotérmico teve maior velocidade sob agitação, enquanto os experimentos com licor ácido não sofreram influência da agitação.

Figura 18 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5). BPC agitado (●), BPC estático (■). Conversão estimada a partir dos dados de massa CO₂ produzido.

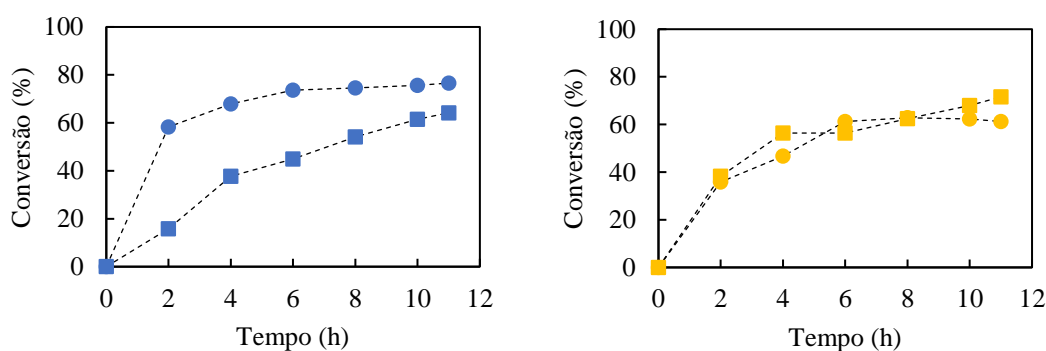


Tabela 14 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC padrão agitados e estáticos com levedura AC14 com licores reais e sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5). Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Pré-tratamento	Agitação	Licor	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade (%)
Hidrotérmico	Sim	Sintético	8,7±0,4 ^a	0,79±0,03 ^b	66,6±2,8 ^c	100,0 ± 0,0 ^d
		Real	9,3±1,1 ^a	0,84±0,08 ^b	71,4±8,5 ^c	83,4 ± 4,7 ^{e, f}
	Não	Sintético	8,4±0,4 ^a	0,76±0,07 ^b	64,2±3,4 ^c	97,7 ± 3,2 ^d
		Real	9,0±0,1 ^a	0,82±0,07 ^b	69,1±0,5 ^c	98,1 ± 2,7 ^d
Ácido	Sim	Sintético	8,8±0,1 ^a	0,80±0,07 ^b	61,3±1,0 ^c	95,2 ± 3,4 ^{d, e}
		Real	9,9±0,1 ^a	0,90±0,08 ^b	68,7±0,7 ^c	82,6 ± 2,5 ^f
	Não	Sintético	10,3±0,4 ^a	0,94±0,04 ^b	71,6±2,9 ^c	97,2 ± 4,0 ^d
		Real	10,0±0,1 ^a	0,91±0,01 ^b	69,4±0,4 ^c	92,6 ± 1,0 ^{d, e}

Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

A Tabela 14 mostra que a agitação não influenciou a produção final de etanol, nem a produtividade e o rendimento para a carga de sólidos utilizada (teste Tukey com 95% de confiança). A agitação também não interferiu na viabilidade celular, de forma que os demais experimentos foram conduzidos sob agitação para favorecer a transferência de massa e certificar-se que o meio estivesse sempre homogêneo durante todo o cultivo. Esse resultado pode ser atribuído a baixa carga de sólidos, ao tamanho do magneto utilizado e a velocidade moderada de agitação que foram suficientes para agitar o meio, mas não prejudicaram os microrganismos. Por outro lado, Perez (2021) havia reportado perda de viabilidade com magneto maior e velocidade de agitação superior a utilizada no presente estudo. Deve-se citar também que, em etapas futuras de escalonamento, com o aumento de volume e de carga de sólido, a agitação será de suma importância, então a incorporação desta condição operacional nos cultivos em escala laboratorial é uma estratégia interessante.

Em seguida, analisou-se duas estratégias para potencializar a hidrólise e, conseqüentemente a produção de etanol 2G, que estão intimamente ligadas à estrutura e composição das frações sólidas geradas nos pré-tratamentos. Para isso, estudou-se a influência da dopagem do meio com proteína de soja (visando minimizar a adsorção das enzimas na lignina) e do congelamento da celulignina no BPC (visando aumentar a exposição das fibras de celulose e o acesso das enzimas). Semelhante aos experimentos anteriores, foram feitos testes iniciais com licores sintéticos para que a presença de inibidores não interferisse na avaliação da influência dos tratamentos da celulignina na ação das enzimas.

Baseado na metodologia proposta por Florencio *et al.* (2019) que estudaram a sacarificação de biomassa, o procedimento mais intuitivo seria adicionar a proteína de soja diretamente ao BPC. Todavia, sabe-se que nos cultivos são necessárias fontes de nitrogênio para o microrganismo, as quais são muitas vezes compostos ricos em proteínas (KHONGSAY *et al.*, 2012). Por isso, para investigar a influência específica da proteína de soja sem interferência das fontes de nitrogênio, foram feitos quatro tipos de ensaios simultaneamente. Realizou-se dois BPC convencionais com fontes de nitrogênio (extrato de levedura e peptona), sendo um na presença e outro na ausência de proteína de soja em um único reator, denominados BPC padrão e BPC padrão-soja, respectivamente. Também foi conduzido um experimento em duas etapas, chamado condicionamento-soja: um condicionamento prévio da celulignina com a proteína de soja, seguido do BPC com as fontes de nitrogênio e essa fração sólida condicionada, ou seja, a celulignina incubada

com tampão e proteína de soja. Neste tipo de experimento, não foi adicionada proteína de soja ao meio de BPC. Adicionalmente, foi feito um controle utilizando a celulignina condicionada apenas com tampão para avaliar se a incubação realizada no condicionamento causaria alguma interferência na fermentação.

O acompanhamento da conversão dos açúcares encontra-se nas na Figura 19. Por causa das curvas sobrepostas, notou-se que a proteína de soja não influenciou no BPC. Adicionalmente, uma vez que a adição da proteína de soja está relacionada com a adsorção das enzimas hidrolíticas, acompanhou-se a produção de enzimas no sobrenadante ao longo do tempo no BPC como mostra a Figura 20

Figura 19 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores sintéticos e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5, agitação magnética), analisando influência da ausência (●) e presença (■) de proteína de soja no BPC (símbolo cheio) ou no condicionamento (símbolo vazio), congelamento da celulignina (▲) e interação da proteína de soja e congelamento (◆).

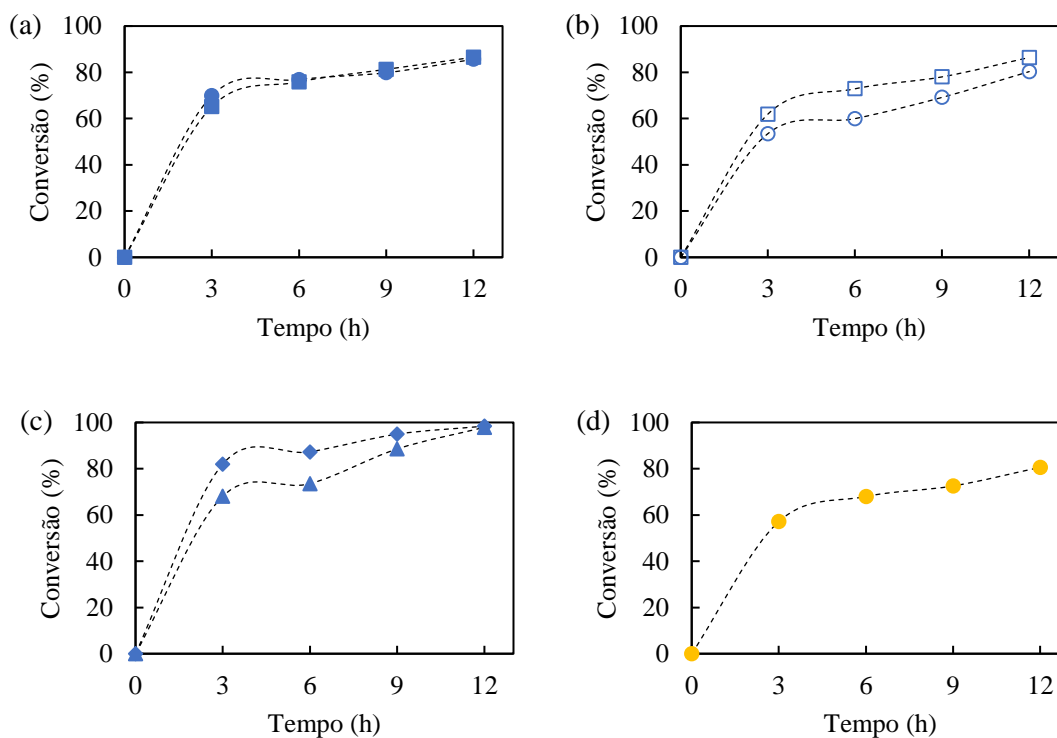
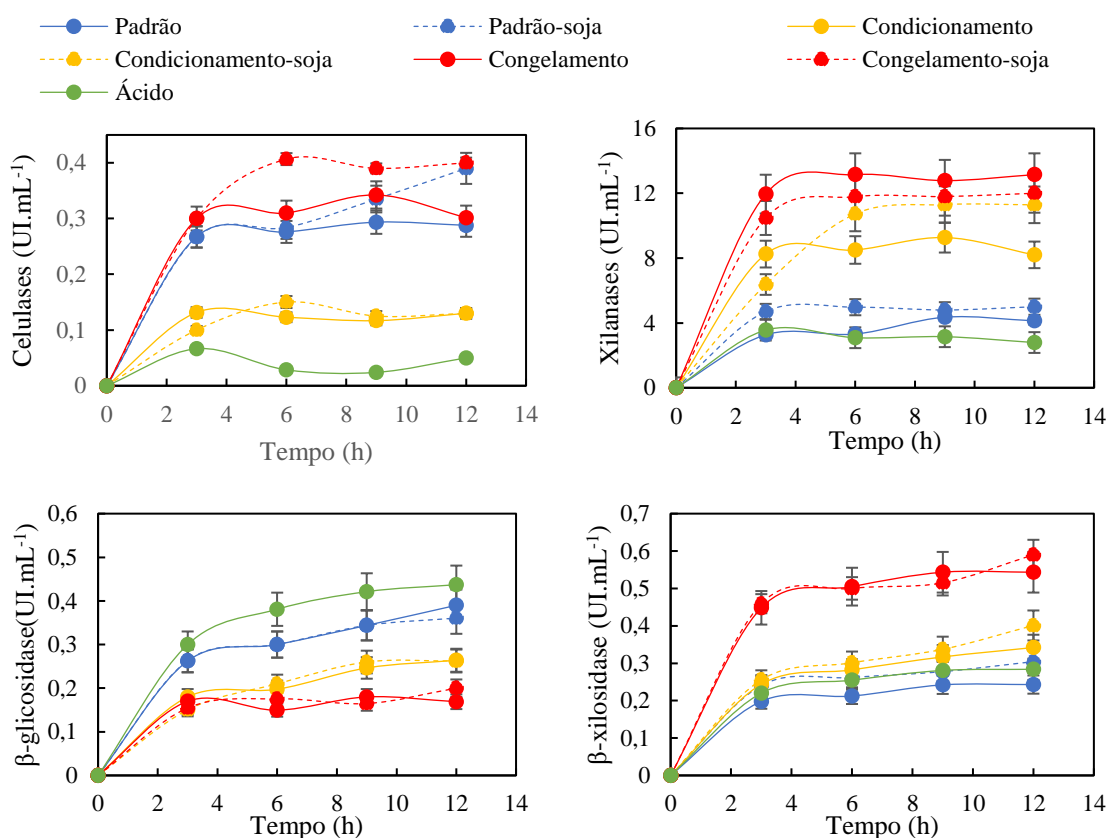


Figura 20 - Cinética da produção enzimática dos ensaios de BPC com levedura AC14. Influência da proteína de soja e do congelamento. $DO_0 = 100$, pH inicial 5,5 e 35 °C, agitação magnética.



Para melhor analisar os processos, com as atividades enzimáticas finais do extrato enzimático, foi possível calcular os incrementos gerados pela proteína de soja, congelamento e sua interação em relação ao BPC padrão como mostra a Figura 21. De maneira geral, a adição de proteína de soja no BPC padrão e o condicionamento com soja não influenciaram significativamente o processo (teste Tuckey com 95% de confiança), o que é reforçado pelos dados da Tabela 15, onde não se observa alteração significativa dos parâmetros fermentativos.

Por outro lado, alguns autores têm mostrado que a soja pode melhorar significativamente a sacarificação de biomassa. (FLORENCIO *et al.*, 2016) comparam o tensoativo Tween, o polietilenoglicol (PEG), a albumina sérica bovina (BSA) e a proteína de soja como aditivos de bloqueio. Estudaram diferentes coquetéis enzimáticos na sacarificação de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com explosão a vapor. A proteína de soja destacou-se por apresentar bloqueio eficiente (duplicou a liberação de glicose) e ter baixo custo. .

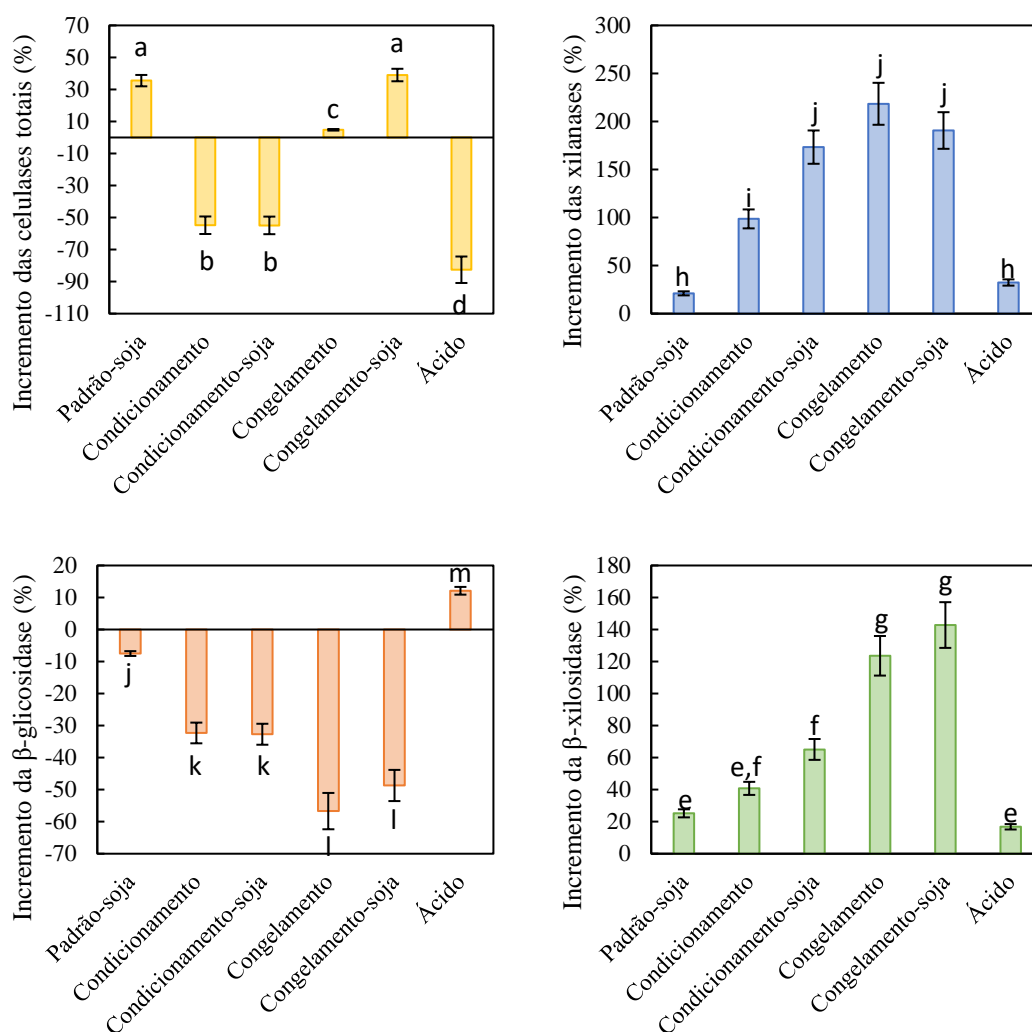
Tabela 15 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores reais e sintéticos e celuligninas gerados nos pré-tratamentos hidrotérmicos e ácidos do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5, magnéticamente), avaliando a presença de proteína de soja e congelamento da celulignina. Letras iguais ao lado dos dados indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Pré-tratamento	Licor/Celulignina	Proteína de soja	Congelamento	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade (%)
Hidrotérmico	Sintético/Pré-tratada	Com	Sem	11,3±0,8 ^{a, b}	1,02±0,07 ^{a, b}	86,5±6,1 ^{a, b}	97,4±2,8 ^g
		Sem	Sem	11,1±0,8 ^{a, c, d}	1,01±0,07 ^{a, c, d}	85,6±6,0 ^{a, c, d}	93,3±3,6 ^g
		Com	Com	14,2±1,0 ^e	1,30±0,09 ^e	98,4±7,9 ^e	94,2±4,6 ^g
		Sem	Com	13,8±1,0 ^{a, e}	1,26±0,09 ^{a, e}	97,9±6,7 ^{a, e}	94,4±4,6 ^g
	Sintético/ Pré-tratada e Condicionada	Com	Sem	11,2±0,8 ^a	1,02±0,07 ^a	86,4±6,0 ^a	97,6±1,8 ^g
		Sem	Sem	10,4±0,8 ^a	0,95±0,07 ^a	80,3±6,1 ^a	93,0±1,6 ^g
	Real/Pré-tratada	Com	Sem	9,8±0,7 ^{b, c, f}	0,89±0,06 ^{b, c, f}	75,6±5,2 ^{b, c, f}	95,6±4,7 ^g
		Sem	Sem	10,1±0,7 ^{b, c, f}	0,91±0,06 ^{b, c, f}	77,3±5,5 ^{b, c, f}	90,2±1,4 ^g
		Com	Com	10,0±0,7 ^{b, c, f}	0,91±0,07 ^{b, c, f}	76,5±5,7 ^{b, c, f}	91,9±2,5 ^g
		Sem	Com	14,1±1,0 ^{a, d, e}	1,28±0,09 ^{a, d, e}	98,3±7,6 ^{a, d, e}	94,5±4,5 ^g
	Real/ Pré-tratada e Condicionada	Com	Sem	7,9±0,6 ^f	0,71±0,05 ^f	60,6±4,2 ^f	95,5±4,7 ^g
		Sem	Sem	11,6±0,8 ^{a, c, e}	1,05±0,07 ^{a, c, e}	89,1±6,2 ^{a, c, e}	95,6±1,7 ^g
Ácido	Sintético/Pré-tratada	Sem	Sem	11,6±1,0 ^{a, d, e}	1,05±0,09 ^{a, d, e}	80,6±6,6 ^{a, d, e}	93,8±3,6 ^g
	Real/Pré-tratada	Sem	Sem	8,6±0,6 ^{b, c, f}	0,78±0,05 ^{b, c, f}	60,1±4,2 ^{b, c, f}	94,2±3,6 ^g

Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Anos depois, (FLORENCIO *et al.*, 2019) reportaram uma melhora na sacarificação (aumento de 61% de liberação de glicose) e na produção de etanol (aumento de 86%) a partir da adição de proteína de soja. Neste segundo estudo, os autores estudaram o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado hidrotérmicamente e realizaram uma sacarificação de 24 h com 15% (m/v) de sólidos e 5 FPU.g⁻¹ do complexo enzimático Cellic Ctec2. No entanto, no presente estudo não foi observada influência da adição da proteína de soja no desempenho do BPC, talvez pela baixa carga de sólidos utilizada no (1% m/v). Como a quantidade de celulignina foi baixa, a adsorção das enzimas pode ter sido reduzida e a dopagem pela soja estatisticamente insignificante.

Figura 21 - Incrementos em porcentagem das atividades enzimáticas do extrato enzimático obtidos nos cultivos em relação ao BPC padrão. Letras iguais acima dos pontos indicam que as médias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.



Ainda avaliando a Figura 21, nota-se que a influência da adição de proteínas no processo provocou diferentes respostas nas atividades enzimáticas no sobrenadante, tendo incrementos em intensidades distintas. De maneira geral a adição de proteína de soja aumentou as atividades, exceto da β -glicosidase. Ao analisar o condicionamento, a incubação em tampão melhorou o BPC independente da adição da proteína. Isso sugere que a interação entre as diferentes proteínas/enzimas com a lignina ocorre de forma seletiva e diferenciada de acordo com a estrutura proteica. Tal comportamento também foi relatado por Simões *et al.*, (2023), os quais realizaram o fracionamento da proteína de soja (composta por glicina, intermediário, B-conglicina, proteína de soro) e aplicaram as diferentes frações obtidas como aditivo na hidólise enzimática de bagaço de cana com CellicCTec3 (10 FPU.g⁻¹), observando interações variadas entre a lignina e as diferentes proteínas e destacando que a glicina teve melhor efeito positivo na sacarificação de bagaço de cana de açúcar.

Já o congelamento do bagaço, por sua vez, foi benéfico para o BPC, favorecendo a atividade de xilanases e β -xilosidase. Durante o congelamento, a água ao redor da biomassa se transforma em gelo, aumentando de volume, contribuindo para o aumento da porosidade e da fragmentação da estrutura do material, que permanecem após o descongelamento. Consequentemente, as pontes de hidrogênio da fibra vegetal são quebradas e ocorre a diminuição da complexidade da matriz lignocelulósica. Essa tecnologia aumenta a superfície de contato entre as enzimas e os polissacarídeos (SUN, Jianhong *et al.*, 2022), liberando os açúcares mais eficientemente, o que se reflete diretamente na maior concentração de etanol obtida no ensaio com congelamento (Tabela 15). O aumento das atividades enzimáticas no extrato enzimático obtidos no ensaio de BPC auxiliado pelo congelamento pode estar relacionado à maior rapidez de adsorção/dessorção da enzima à matriz de celulignina. Ou seja, como a matriz está mais exposta, os biocatalisadores adsorvem, hidrolisam e dessorvem em um menor tempo, por que a difusão provavelmente está mais facilitada. Adicionalmente, notou-se que, ao utilizar a celulignina gerada no pré-tratamento ácido, os incrementos nas atividades foram menores com excessão da β -glicosidase. Isso sugere que a modificação na lignina ou na estrutura lignocelulósica que ocorre durante o pré-tratamento ácido favorece a adsorção das enzimas na lignina. Destaca-se ainda que, para a obtenção de conversão total da biomassa, pode-se recorrer para a suplementação do processo com enzimas exógenas, porém, tal estratégia deve ser feita baseada em estudos técnico-econômicos e utilizando

provavelmente as enzimas de menor custo, visando não interferir negativamente na viabilidade econômica do processo.

Os resultados reunidos na Tabela 15 reforçam a influência positiva do congelamento, pois nota-se um aumento estatisticamente significativo na concentração de etanol produzido (teste Tukey com 95% de confiança). Tal resultado refletiu nas diferenças estatísticas no rendimento e produtividade que também foram maiores nos ensaios com congelamento. Por outro lado, a viabilidade não foi influenciada conforme observado nos outros estudos.

Na literatura, o método de congelamento o descongelamento tem mostrado eficiência na exposição das fibras vegetais de diferentes materiais lignocelulósicos para a ação de enzimas hidrolíticas. (SMICHI *et al.*, 2016) estudaram o *Juncus maritimus* e obtiveram a concentração máxima de 63,8 g.L⁻¹ de glicose após congelarem e descongelarem o material nas mesmas condições aqui aplicadas seguido de sacarificação com CellicCTec2. (SUN *et al.*, 2022) congelaram a palha de trigo e aplicaram 20 FPU.g⁻¹ de β-glicosidase. Os autores destacaram duas condições de processo, ao congelar a biomassa a -80°C por 24 h, obtiveram 57,1% de hidrólise da celulose e a -10 °C por 24h hidrolisou-se 70,7% da hemicelulose. (CHANG *et al.*, 2011) congelaram palha de arroz (tampão acetato 50 mMol.L⁻¹, -20°C, 2h) e conduziram sacarificação com 150 UI.g⁻¹ de celulases ou 100 UI.g⁻¹ de xilanases, obtendo 417,27 g.kg⁻¹ e 138,77 g.kg⁻¹ de açúcar redutor, respectivamente.

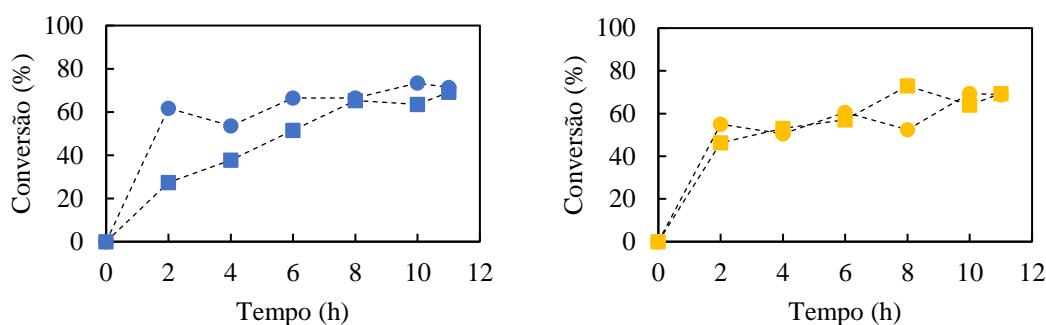
Após constatar que o congelamento influenciou positivamente no BPC e a proteína de soja menos, optou-se por estudar a integração de ambos, estudando-os conjuntamente. Por meio do teste estatístico, a produção de etanol no BPC com congelamento e com proteína de soja foi igual ao cultivo somente com o congelamento. Isso indica que não há sinergia entre ambos, confirmando que a proteína de soja não agregou benefícios ao processo nas condições estudadas.

3.3.2.2. Estudo das frações líquidas e sólidas

Após a avaliação do BPC da celulignina com licor sintético, foram feitos cultivos com as frações sólidas e líquidas reais para avaliar o processo de maneira integrada. Semelhante aos cultivos com licor sintético e celulignina real, ao analisar os perfis de conversão da Figura 22, quando utilizou-se o pré-tratamento hidrotérmico, a velocidade de reação do BPC foi favorecida pela agitação, mas a conversão final foi semelhanteAo

comparar cultivos agitados e estáticos com licores reais as celuligninas reais, notou-se que nos experimentos com agitação magnética, houve perda de viabilidade celular das leveduras (Tabelas 14), sendo estatisticamente significativa de acordo com o teste de Tuckey. Essa redução pode estar ligada com a interação entre presença dos compostos inibidores como ácidos fracos, derivados de furano e compostos fenólicos (CÁMARA *et al.*, 2022) e a agitação na presença de fração sólida. Todavia, a concentração de etanol produzido, produtividade e rendimentos foram semelhantes, indicando que não houve prejuízo do processo dada a alta carga celular nos mini-reatores (DO 100) e a robustez da cepa.

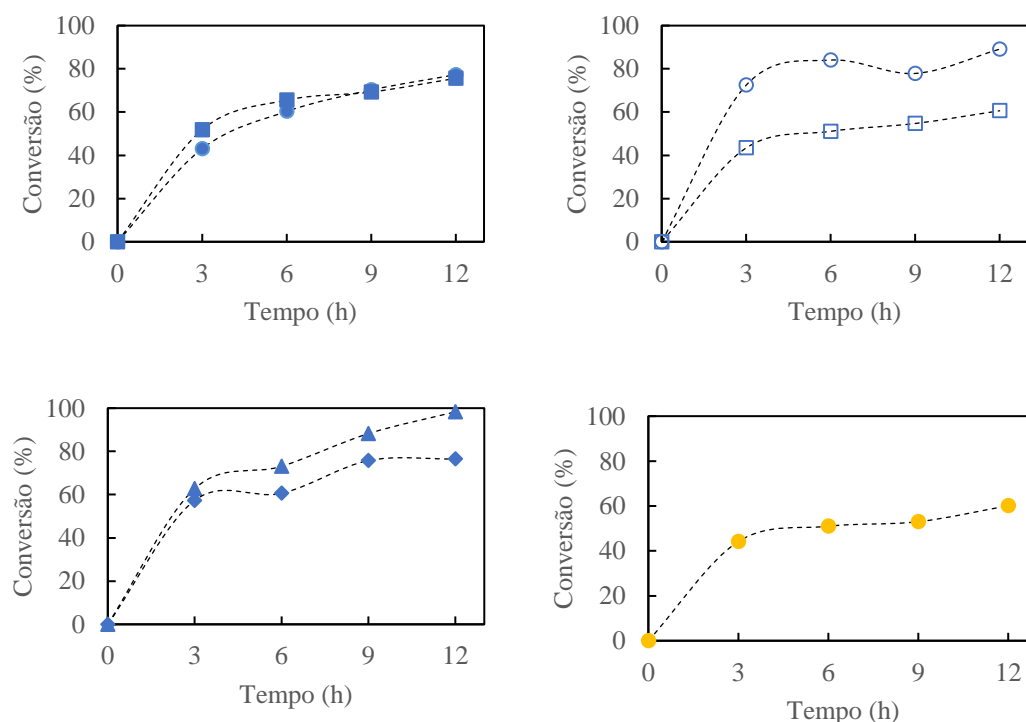
Figura 22 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5). BPC agitado (●), BPC estático (■). Conversão estimada a partir dos dados de produção de CO₂.



Experimentos com proteína de soja e congelamento também foram realizados e os perfis de conversão estão na Figura 23. De maneira análoga aos experimentos anteriores, as curvas com e sem proteína foram semelhantes com exceção do condicionamento que foi melhor sem proteína, levando à conversão maior. Os resultados somente com condicionamento indicam que mais estudos devem ser realizados para elucidar melhor como a incubação da celulignina em tampão afeta a estrutura lignocelulósica, melhorando o BPC. Como mostra a Tabela 15, a dopagem com proteína de soja não foi benéfica para o BPC tal qual com licor sintético, enquanto o congelamento foi atrativo. Comparando os experimentos com licores sintéticos e reais, por meio do teste de Tuckey, notou-se que a presença de inibidores nos hidrolisados não influenciou a viabilidade celular. Tal fato deve-se provavelmente à utilização de hidrolisados hemicelulósicos sem concentrar. De

acordo com Perez *et al.* (2022), a toxidez dos hidrolisados hemicelulósicos pode ser evitada pela utilização dos mesmos em sua forma não concentrada, evitando assim a necessidade de uma etapa de destoxificação e preservando a viabilidade das leveduras. Aplicando hidrolisado ácido de bagaço de cana sem concentrar, os autores atingiram 20 bateladas repetidas para a produção de etanol 2G sem grandes perdas de viabilidade da levedura recombinante *S. cerevisiae* MD130. Sendo assim, indica-se a agitação e o congelamento da celulignina para a realização do BPC de bagaço de cana.

Figura 23 - Perfil de conversão dos ensaios de BPC com levedura AC14 com licores e celuligninas reais gerados nos pré-tratamentos hidrotérmico (símbolo azul) e ácido (símbolo amarelo) do bagaço de cana-de-açúcar (DO = 100, 35 °C, pH 5,5, agitação magnética), analisando influência da ausência (●) e presença (■) de proteína de soja no BPC (símbulo cheio) ou no condicionamento (símbulo vazio), congelamento da celulignina (▲) e interção da proteína de soja e congelamento (◆.) Conversão estimada a partir dos dados de produção de CO₂.



Adicionalmente, ao comparar os experimentos com celulignina congelada na presença e ausência de proteína de soja, notou-se que a adição do insumo reduziu o rendimento. Isso pode ter acontecido porque possivelmente a proteína de soja bloqueou o

os poros e fendas gerados pelo congelamento, reduzindo a área de contato para que a reação acontecesse.

3.4. Conclusões

A utilização integral dos co-produtos agrícolas é de suma importância na Biorrefinaria, como é o caso do bagaço da cana-de-açúcar. A partir dos resultados aqui obtidos, foi possível observar que este material real da indústria sucroalcooleira pode ser utilizado para a produção de etanol 2G em BPC. Por outro lado, a agitação do sistema favorece o processo uma vez que se trata de um sistema heterogêneo. O uso de proteína de soja como molécula bloqueadora para impedir a adsorção das enzimas hidrolíticas na lignina não foi se mostrou eficiente para o processo nas condições estudadas. Porém, o congelamento da celulignina aumentou a atividade enzimática do caldo fermentado, melhorando a hidrólise do material e a produção de etanol, indicando que a adsorção e dessorção dos biocatalisadores possivelmente foi facilitada pelas modificações estruturais da celulignina. Adicionalmente, o condicionamento da celulignina incrementou a conversão do BPC, devendo ser melhor estudado em trabalhos futuros. Assim, as informações aqui levantadas contribuem de forma importante para o desenvolvimento do BPC de bagaço de cana, além de contribuir de forma geral com o BPC de materiais lignocelulósicos reais com potencial de aplicação no contexto da indústria sucroalcooleira.

Capítulo 4 – Bioprocessamento consolidado utilizando células imobilizadas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* AC14: Influência da carga de células e do diâmetro dos *beads*

4.1. Introdução

A biocatálise aplicada a processos industriais é uma vertente interessante na ótica ambiental da atualidade, pois baseia-se na utilização de células inteiras ou enzimas em uma determinada reação catalítica com alta especificidade e em condições amenas de processo (SHELDON e BRADY, 2018). Ao comparar a utilização de células inteiras e enzimas isoladas, a primeira se destaca pois possui alguns pontos positivos como: não ser necessária a adição exógena de cofatores, realização de reações em cascata com um único biocatalisador e não haver a necessidade de etapas de purificação intermediárias (PINTO *et al.*, 2020).

Um processo que se encaixa nesse contexto é o Bioprocessamento Consolidado (BPC) do bioetanol 2G, o qual é produzido a partir de material lignocelulósico. Nessa tecnologia, só se utiliza células inteiras de um microrganismo ou um consórcio deles, não sendo preciso a adição exógena de enzimas (SINGHANIA *et al.*, 2022). Esta característica torna o BPC bastante atraente quando comparado com outras tecnologias, porque o custo das enzimas é uma das desvantagens das rotas bioquímicas para a produção de biocombustíveis (RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos *et al.*, 2022). Neste processo, a produção de enzimas, hidrólise da biomassa e fermentação dos açúcares liberados ocorrem de forma sequenciais e simultâneas no mesmo reator, uma vez que o microrganismo é capaz de produzir as enzimas hidrolíticas (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020; SINGHANIA *et al.*, 2022).

Considerando que a viabilidade de plantas industriais 2G e o desenvolvimento de biorrefinarias requer a utilização completa de todos os componentes da biomassa (UBANDO *et al.*, 2020), BPC também contribui para superar um outro gargalo na produção de etanol 2G: a subutilização da fração hemicelulósica da biomassa. Neste ponto, essa tecnologia também é vantajosa perante outras tecnologias, pois dispõe-se de uma cepa (ou de consórcio de microrganismo) capaz de assimilar eficientemente a fração rica em xilose (fração hemicelulósica), além da parcela que contém glicose (fração celulósica) (OLGUIN-MACIEL *et al.*, 2020).

Nesse cenário, a levedura *S. cerevisiae* AC14 desenvolvida por Claes *et al.*, (2020) se destaca, pois produz sete enzimas (Tabela 1) que atuam na hidrólise do material lignocelulósico, conferindo-lhe um grande potencial no BPC. Essa levedura secreta enzimas que atuam na porção celulósica (β -glicosidase, endoglucanase, celobiohidrolase I e II) e hemicelulósica (β -xilossidase, xilanase e acetilxilana esterase). Adicionalmente, é válido ressaltar que essa cepa foi desenvolvida a partir da levedura industrial *Ethanol Red* (CLAES *et al.*, 2020), sendo mais robusta do que cepas laboratoriais. Até o presente momento, não foi encontrado nenhuma outra levedura selvagem ou recombinante com as características da AC14 na literatura. Perez (2021) obtiveram resultados promissores, alcançando produtividades de etanol de 4,46 g.L⁻¹.h⁻¹ e 1,86 g.L⁻¹.h⁻¹ em meio sintético e industrial (composto pela celulignina e licor de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado), respectivamente. Neste trabalho, os autores utilizaram células livres da levedura AC14, o que pode dificultar o reciclo das células entre as bateladas devido à presença da celulignina remanescente, que se mistura com as células da levedura na fase sólida. Métodos convencionais de separação como centrifugação e filtração não são eficazes na recuperação das células.

Desta forma, um desafio encontrado em bioprocessos nos quais existem fração sólida residual, como é o caso do BPC e da sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), é a dificuldade de separação e recuperação da biomassa celular. Para melhorar esta questão operacional, a imobilização dos microrganismos é uma boa alternativa. Por definição, a imobilização celular é uma técnica onde os microrganismos são confinados em uma matriz sólida e porosa, impedindo que as células escapem, mas que permite a difusão de substratos e produtos. Adicionalmente, a imobilização também pode aumentar a estabilidade do biocatalisador por causa do efeito protetor da matriz, aumentando a eficiência do processo (LAPPONI *et al.*, 2022).

Existem diferentes metodologias de imobilização celular, como a imobilização por aprisionamento, encapsulamento, adesão e adsorção, ligação covalente e crosslinking (LAPPONI *et al.*, 2022). A imobilização por encapsulamento em alginato de cálcio é uma técnica de que merece destaque uma vez que utiliza um material não tóxico, biocompatível e biodegradável (SOARES *et al.*, 2022).

Interessantemente, essa técnica de imobilização é altamente versátil, porque pode ser estudada e possivelmente aplicada em muitos processos catalisados por microrganismos selvagens ou recombinantes e até consórcios microbianos. Na literatura, já existem relatos de sua utilização no tratamento de efluentes (BOUABIDI *et al.*, 2019;

SUZANA *et al.*, 2013), na produção de químicos (GUNGORMUSLER-YILMAZ *et al.*, 2015; TAYLOR *et al.*, 2018) e na produção de biocombustíveis (SEKOAI *et al.*, 2018; SOARES *et al.*, 2022). Paralelamente, a imobilização celular no BPC ainda precisa ser estudada, pois pode melhorar o processo e ainda foi pouco explorada (PEREZ, C.L., 2021).

Uma desvantagem da imobilização é a possível ocorrência de limitação de transferência de massa dos substratos, produtos e enzimas devido à presença do suporte sólido, sendo necessário analisar formas eficientes de minimizar esse problema. O tamanho da microesfera pode interferir na difusão de substratos e produtos, sendo que maiores diâmetros podem aumentar o caminho a ser percorrido por esses componentes. A carga celular nos *beads* merece igual atenção, pois uma alta carga de célula pode tornar o interior do *bead* mais congestionado, diminuindo a porosidade e dificultando o transporte de massa, ou ainda pode gerar um microambiente que favoreça ou desfavoreça o processo (DALILI e CHAU, 1987).

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo analisar a influência das condições de imobilização da levedura AC14 no BPC para a produção de etanol 2G. Para isso, avaliou-se a influência da carga celular nos *beads* e do diâmetro dos *beads* sobre a atividade enzimática dos extratos enzimáticos gerados nos cultivos, a viabilidade celular e os parâmetros fermentativos do BPC por meio de dois planejamentos fatoriais 2^2 , um para os mini-reatores mantidos sob condição estática e outro para mini-reatores operados sob agitação.

4.2. Metodologia

4.2.1. Microrganismo e inóculo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a *S. cerevisiae* AC14 (CLAES *et al.*, 2020). Essa levedura recombinante foi desenvolvida pelo grupo liderado pelo Prof. Johan M. Thevelein (NovelYeast, Bélgica) e é capaz de produzir sete enzimas hidrolíticas, além de consumir eficientemente pentoses e hexoses (CLAES *et al.*, 2020). Para a obtenção da biomassa celular para os cultivos, fez-se a propagação do microrganismo por meio de duas etapas em meio sólido a partir de uma cultura estoque armazenada em ultrafreezer a -80°C , conforme descrito na Seção 2.2.3.

4.2.2. Materiais

O extrato de levedura foi adquirido de Fisher Bioreagentes (México) e a peptona foi gentilmente cedida por de Pharma & FIA Kerry (Campinas/Brasil). Alginato de sódio, celobiose e p-NPX eram da Sigma-Aldrich (Estados Unidos, Reino Unido e Israel, respectivamente). A xilana de sabugo de milho e a xilana de faia foram produzidas por Carl Roth (Alemanha). O papel de filtro foi da marca Cytiva (China) e a carboximetilcelulose da marca Synth (Brasil). O reagente GOD-PAP foi fornecido por Bioclim (Brasil). Outros reagentes eram de grau analítico.

4.2.3. Imobilização da levedura e planejamento experimental

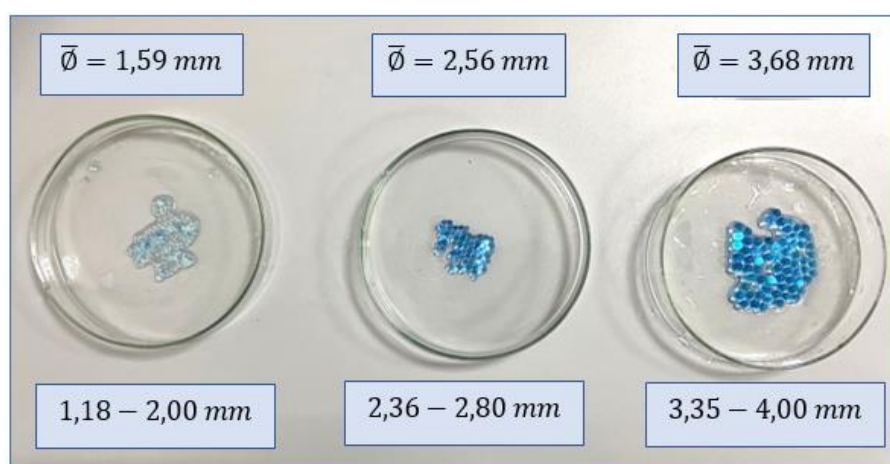
A imobilização foi realizada por encapsulamento em gel de alginato de cálcio de acordo com o procedimento descrito por Milessi *et al.* (2020). As condições de imobilização seguiram um planejamento fatorial, que englobou sete ensaios com a combinação de 2 fatores em 2 níveis e 3 pontos centrais (RODRIGUES e IEMMA, 2005). Inicialmente, a suspensão celular obtida na centrifugação do inóculo foi adicionada a uma solução contendo alginato de sódio (1% m/v). A concentração celular no *beads* variou de acordo com o planejamento experimental da Tabela 16, sendo que os níveis -1, 0 e +1, corresponderam a 1%, 5,5% e 10% (m/m), respectivamente. Em seguida, esta suspensão foi gotejada em solução de coagulação (0,25M de CaCl₂), formando as microesferas, conforme descrito por Silva (2013). Ao final da imobilização, as microesferas foram recolhidas por peneiramento para classificação do diâmetro médio, o qual foi o outro parâmetro avaliado no planejamento (Tabela 16), de forma que os níveis -1, 0 e +1 representaram 1,6, 2,6 e 3,7 mm, respectivamente. A Figura 24 mostra amostras dos *beads* em seus respectivos diâmetros médios. Em seguida, as microesferas foram mantidas a 5 °C por 12 h em uma solução de cura que continha peptona (20 g.L⁻¹) e extrato de levedura (10 g.L⁻¹) em pH 5,5.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Protimiza Experimental Design. Os resultados estão expressos em forma de gráficos de pareto, superfícies de resposta e tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão, análise de variância e nível de significativa (p) em nível de confiança de 90%.

Tabela 16 - Matriz experimental de planejamento fatorial 2² com 3 repetições no ponto central para avaliar a influência do diâmetro médio do *bead* (X1) e a concentração de células imobilizadas (X2) em diferentes variáveis de resposta.

Experimento	X1 (Diâmetro médio)	X2 (Concentração de células)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5 (Ponto central 1)	0	0
6 (Ponto central 2)	0	0
7 (Ponto central 3)	0	0

Figura 24 - Diâmetro dos *beads* testados para imobilização da levedura AC14 a ser utilizada em BPC.



Ensaio fermentativo: Os cultivos foram realizados em mini-reatores de 5 mL dotados de saída de CO₂, conforme detalhadamente descrito em Mesquita *et al.* (2021). O processo fermentativo foi monitorado medindo-se a liberação de massa de CO₂ na fermentação alcoólica por meio da pesagem periódica dos mini-reatores. Os experimentos foram cessados após a variação de massa dos mini-reatores ser inferior a 5%, indicando o fim da fermentação. Conforme descrito no Capítulo 2, o meio fermentativo foi composto por extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), e carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹). Todos os ensaios foram conduzidos a 35°C, 4 mL de volume reacional,

densidade óptica inicial 10 e pH entre 5,5. Foram realizados experimentos em condições estáticas e sob agitação (250 rpm). Ao final da fermentação, o meio foi centrifugado e parte do sobrenadante obtido foi utilizado como extrato enzimático (para determinação das atividades), enquanto a outra parte foi congelada para análises da composição do meio. Todos os experimentos foram realizados em condições assépticas (esterilizados em autoclave 121°C por 20 min). Para efeito comparativo, foi realizado um cultivo com leveduras livres nas mesmas condições dos experimentos com células imobilizadas. Experimentos nas mesmas condições de cultivo com células livres foram conduzidos para comparação.

Viabilidade celular: A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com metodologia de Bortoli et al. (2013) após os *beads* serem dissolvidos em citrato de sódio 8% (m/v) na proporção 100 mg de *beads* por mL de solução sob agitação em vortex e temperatura ambiente conforme Milessi *et al.* (2020). As células não viáveis foram aquelas que permaneceram azuis e as células viáveis que ficaram transparentes. A viabilidade celular foi definida como a razão entre células viáveis e células totais (viáveis e não viáveis) computadas em um espaço definido da câmara de contagem (SANDRI *et al.*, 2023).

4.2.4. Métodos analíticos

Medidas de atividades enzimáticas: Os extratos enzimáticos foram caracterizados conforme a atividade enzimática das celulasas totais, xilanases, β -glicosidase e β -xilosidase. Os protocolos estão descritos na Seção 2.2.5.3.

Medida da concentração de células: A concentração de células livres a ser imobilizada foi determinada por turbidimetria conforme metodologia da Seção 2.2.5.4.

Quantificação de açúcares e produtos: Inicialmente, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes conforme Demeke *et al.* (2013). As amostras foram filtradas em filtro 0,22 μ m e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ($\lambda = 210$ nm). Para quantificar etanol, glicerol, xilitol, ácido acético, celobiose, glicose e xilose foi

utilizada a coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA- Organic acid H+, com H₂SO₄ 5mM como fase móvel no fluxo de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de operação 65 °C (PRATTO *et al.*, 2020).

Para quantificação total dos polissacarídeos residuais (CMC e xilana) após os ensaios fermentativos, um volume de 5 mL de amostra foi submetido à hidrólise ácida total para a conversão dos oligômeros a monômeros a partir da reação com 174 µL de H₂SO₄ 72% em tubos de ensaio com tampa, colocados em banho seco a 121°C por 1 h (NASCIMENTO *et al.*, 2016). Após a hidrólise, as amostras foram quantificadas no HPLC como descrito anteriormente. O cálculo para determinar a quantidade total de polissacarídeos presentes nas amostras foi feito pela diferença entre a massa de glicose ou xilose total obtida após hidrólise e a massa de xilose obtida antes a hidrólise ácida.

4.2.5. Procedimentos de cálculo

Os cálculos dos parâmetros fermentativos conversão de substrato (%), rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico (%) e produtividade volumétrica (g_{etanol}.L⁻¹.h⁻¹) foram realizados pelas Equações 3-5 presentes na Tabela 17 (BARROS-RIOS *et al.*, 2015; MESQUITA *et al.*, 2021; SHULER e KARGI, 2002), sendo C_{Si} a concentração de açúcares totais no tempo inicial (g.L⁻¹); C_{Sf} a concentração de açúcares totais no caldo fermentado (g.L⁻¹); mCO_{2,t} é a massa de CO₂ liberada no tempo t; mCO_{2,f} é a massa de CO₂ liberada no tempo final; C_{Pf} é a concentração de produto formado no tempo t (g.L⁻¹); C_{Pi} a concentração de produto no início do processo (g.L⁻¹); e Δt_f: tempo de processo (h).

Tabela 17 - Parâmetros fermentativos utilizados para avaliar o BPC com levedura AC14 imobilizada em alginato de cálcio (SHULER e KARGI, 2002).

Parâmetro	Equação
Conversão final do substrato - X (%):	$X = \frac{C_{Si} - C_{Sf}}{C_{Si}} \times \frac{mCO_{2,t}}{mCO_{2,f}} \times 100 \quad (3)$
Rendimento relativo em etanol - Y _{P/S} (%):	$Y_{P/S} = \frac{\text{Concentração de etanol produzido}}{\text{Concentração de etanol máxima teórica}} \times 100 \quad (4)$
Produtividade volumétrica - Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹):	$Q_P = \frac{C_{Pf} - C_{Pi}}{\Delta t_f} \quad (5)$

Para o cálculo do $Y_{P/S}$ (Equação 4), os valores de concentração de etanol máximo teórico foram estimados por fatores estequiométricos para a formação de etanol a partir de mono, di e polissacarídeos (0,511; 0,538 e 0,57 g/g, respectivamente) (BARROS-RIOS *et al.*, 2015).

4.3. Resultados e discussão

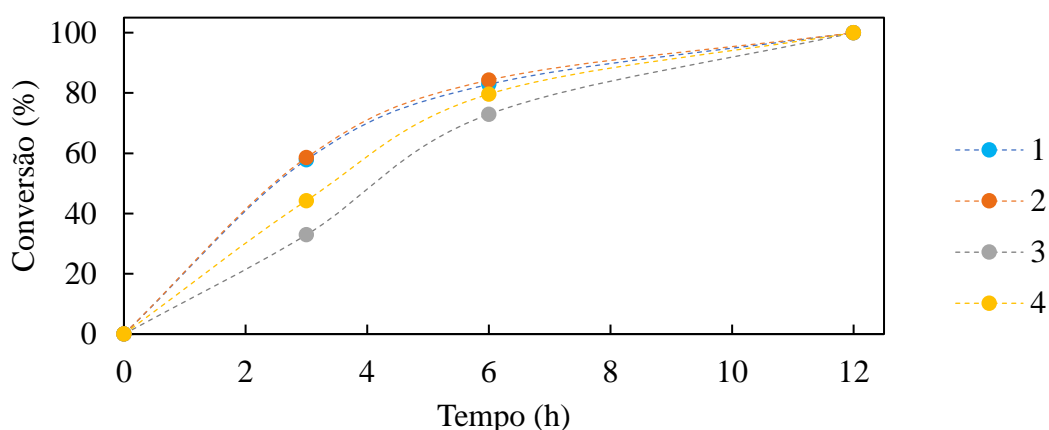
4.3.1. Influência da carga celular e diâmetro dos *beads* em BPC estático

Primeiramente, avaliou-se a influência da carga celular e do diâmetro dos *beads* na imobilização da levedura AC14 por meio de um planejamento experimental. O BPC foi conduzido em condições estáticas utilizando o meio 6 definido no Capítulo 2. Vale destacar que o delineamento fatorial foi utilizado como uma ferramenta para estudar a influências dos fatores no desempenho da BPC, não tendo como objetivo realizar uma otimização do processo, que exigiria estratégias de planejamento experimental mais complexas e maior número de ensaios. Ou seja, o objetivo principal foi avaliar se a imobilização interferiria na difusão das enzimas e substratos e se alterações nas condições de imobilização poderiam atenuar eventuais problemas de transferência de massa. Justamente por isso, selecionou-se o diâmetro dos *beads* e a carga de células nos *beads*, além da presença ou não de agitação, como fatores investigados, já que são amplamente reconhecidos por sua influência em processos limitados por transferência de massa.

Independente da condição de imobilização, todos os cultivos resultaram em total conversão dos substratos oferecidos, mostrando que a imobilização pode ser aplicada ao BPC (Figura 25) sem comprometer seu desempenho, nas condições investigadas. Porém, observa-se que o perfil das curvas variou de acordo com o diâmetro das microesferas e da concentração celular dos *beads*, indicando que houve influência dos dois parâmetros em estudo na hidrólise ou assimilação dos substratos durante o processo, os quais serão elucidados na análise estatística das respostas selecionadas. Destaca-se que houve uma variação entre os perfis de conversão dos pontos centrais (dados não mostrados), a qual está associada a limitação do acompanhamento dos ensaios por meio da saída de CO₂. Ou seja, a diferença não tem relação com o ensio de BPC em si, mas com o escape do gás que pode ser influenciado pelo espaço livre do reator denominado “headspace”. Pontua-se também que isso não influenciou nos resultados do planejamento, pois os perfis foram

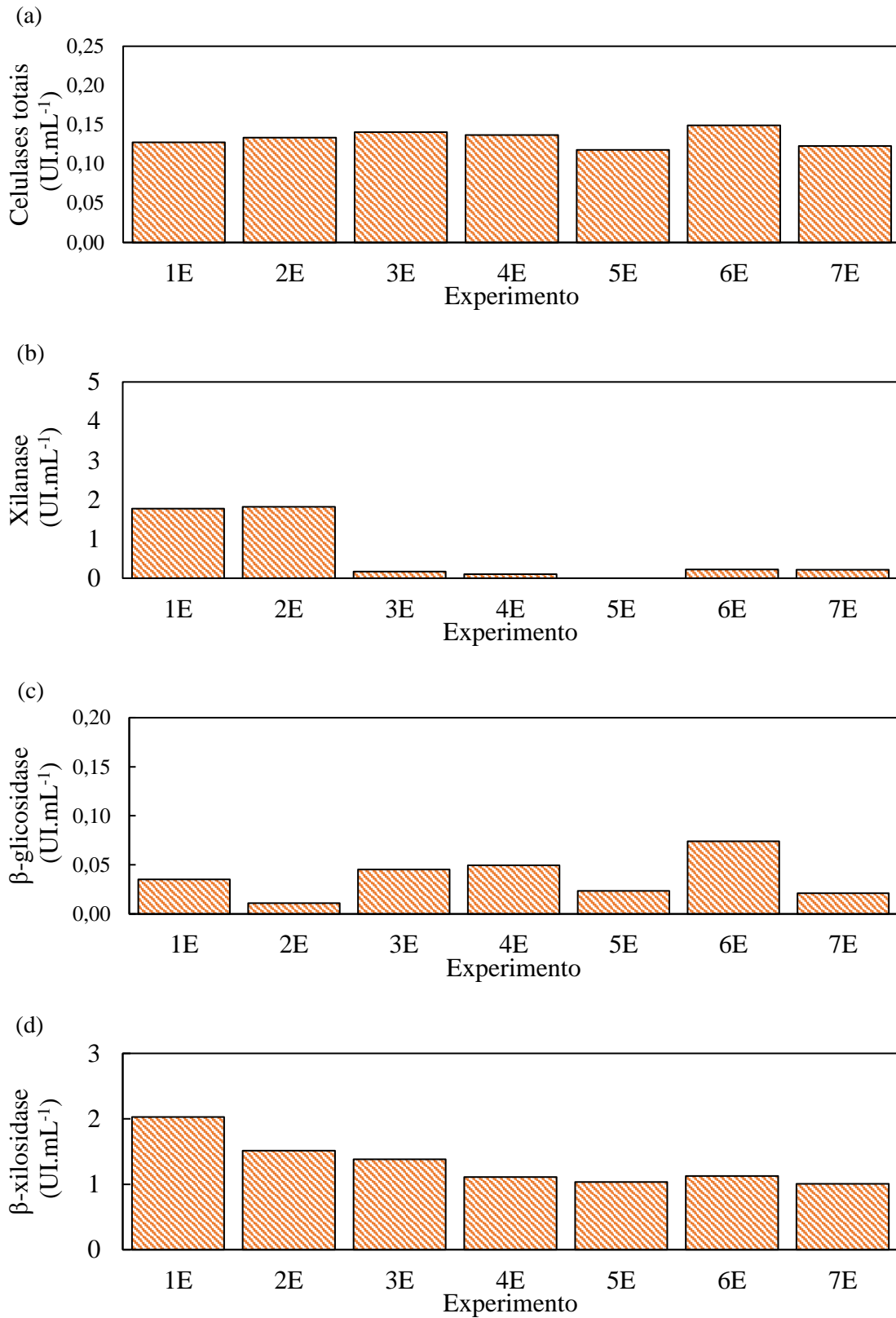
utilizados para acompanhamento dos ensaios e não para o cálculo dos dados utilizados no estudo estatístico.

Figura 25 - Acompanhamento dos ensaios 1-4 de BPC em mini-reatores do planejamento experimental 22 em condição estática. Meio com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹), 35°C, DO₀ 100 e pH 5,5, 8% (V_{bead}/V_{meio}).



A influência dos fatores selecionados sobre a difusão das enzimas produzidas pela AC14 do interior dos *beads* para o meio líquido durante o BPC também foi avaliada, quantificando-se a atividade enzimática no extrato enzimático obtido após 11 h de processo fermentativo. Para avaliar se a imobilização afetou a difusão das enzimas, os resultados apresentados na Figura 26 podem ser comparados com as atividades medidas no extrato enzimático obtido em BPC com realizada com células livres, nas mesmas condições de cultivo (0,92 UI.mL⁻¹ de celulases totais, 8,63 UI.mL⁻¹ de xilanases, 0,49 UI.mL⁻¹ de β -glicosidase e 0,59 UI.mL⁻¹ de β -xilosidase). Notou-se que, em geral, as atividades enzimáticas no sobrenadante foram menores quando as leveduras estavam imobilizadas. Para as celulases totais, as atividades foram em torno de 6 vezes menores, enquanto as xilanases tiveram sua atividade reduzida de 4 a 83 vezes, dependendo da condição de imobilização. A enzima β -glicosidase também sofreu uma redução de atividade de 10 a 45 vezes. Por fim, a β -xilosidase foi a única que não apresentou redução na atividade presente no extrato enzimático, apresentando atividade superior.

Figura 26 - Atividades enzimática dos sobrenadantes do BPC em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹). 35°C, DO₀ 100 e pH 5,5.



Essas menores atividades devem-se provavelmente a limitações difusionais, as quais podem ocorrer pela dificuldade de transferência de massa em virtude da barreira gerada pela carga elevada de células confinadas, pelo diâmetro do *bead* (que aumenta o caminho a ser percorrido pelas enzimas), porque a biomassa celular não é distribuída uniformemente na microesfera ou ainda simplesmente pela presença da membrana de gel ou pela ausência de agitação.

Dentre as enzimas avaliadas, as xilanases foram as mais influenciadas pelas variações das condições de imobilização, apresentando atividades de 0,1 UI.mL⁻¹ a 1,8 UI.mL⁻¹ nos ensaios 4 e 2, respectivamente (Figura 26). Houve uma maior atividade enzimática nos extratos provenientes dos experimentos 1 e 2, os quais foram realizados no limite inferior da carga celular (1%), indicando uma possível influência deste fator na difusão dessa enzima a ser confirmado pela análise estatística. Na Tabela 18, são mostrados a concentração de etanol produzido, os parâmetros fermentativos e a viabilidade celular. De forma geral, não houve um experimento que se destacou em termos de desempenho, que possa ser identificado simplesmente olhando os resultados da Tabela 18.

Tabela 18 - Parâmetros fermentativos do BPC em mini-reatores em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹). 35°C, 250 rpm, DO₀ 100 e pH 5,5.

Exp	Etanol Produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade celular (%)
1E	9,94	1,00	0,42	82,3	93,6
2E	9,74	0,97	0,42	80,7	98,9
3E	10,77	1,08	0,46	89,2	99,0
4E	11,76	1,09	0,50	97,4	98,8
5E	11,26	1,03	0,48	93,3	90,2
6E	11,62	1,08	0,49	96,2	97,9
7E	11,54	1,06	0,49	95,6	91,0

Y_{P/S}: Rendimento; Y_{P/S}: rendimento relativo de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Por isso é importante empregar a análise estatística para avaliar se houve ou não influência do diâmetro e da carga celular nas variáveis resposta do BPC. Inicialmente, analisou-se os gráficos de Pareto presentes na Figura 27 e os valores dos efeitos detalhados no Anexo A para um intervalo de confiança de 90% (p-valor inferior a 0,10).

Ao analisar os dados, notou-se que as atividades enzimáticas de xilanase, β -glicosidase e a produtividade em etanol (Q_P) foram afetadas pela carga celular dentro do *bead*, mas não pelo diâmetro. Paralelamente, as demais variáveis avaliadas não sofreram influência do diâmetro dos *beads* nem da carga celular. Os gráficos de tendência apresentados na Figura 28 auxiliam na melhor visualização da influência dos fatores estudados sobre as variáveis respostas.

Pela Figura 28a, nota-se que a carga celular nos *beads* possui um efeito negativo sobre a atividade enzimática das xilanasas, ou seja, a atividade destas enzimas é incrementada com a diminuição da carga de células dos *beads*. Por outro lado, esta mesma variável possui efeito positivo na atividade da β -glicosidase (Figura 28b), uma vez que esta enzima foi favorecida com o aumento da concentração celular dentro das microesferas. Isso indica uma possível diferença de interação entre produção e difusão da enzima em relação a população celular dentro da microesfera. Por fim, a produtividade também sofreu influência positiva com o aumento da carga.

É importante destacar que este primeiro planejamento foi conduzido com mini-reatores estáticos. Por isso, o estudo do efeito intra-partícula relacionado à carga das células e ao diâmetro dos *beads* pode ter sido comprometido por limitações difusionais externas, provenientes da película estagnada de líquido ao redor das partículas de catalisador.

Conseqüentemente, os resultados apresentados nas Figuras 27 e 28 refletem essas características dos experimentos realizados sem agitação. Sendo assim, prosseguiu-se com um segundo planejamento experimental utilizando os mesmo fatores e respostas, porém sob agitação.

Figura 27 - Gráficos de Pareto para cada variável resposta do BPC em condição estática com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança). (a) Celulases totais; (b) Xilanases; (c) β -glicosidase; (d) β -xilosidase; (e) Concentração de etanol; (f) $Y_{p/s}$; (g) Q_p ; (h) Viabilidade. Diâmetro do *bead* – x_1 ; carga celular – x_2 e suas interações ($x_1 \cdot x_2$)

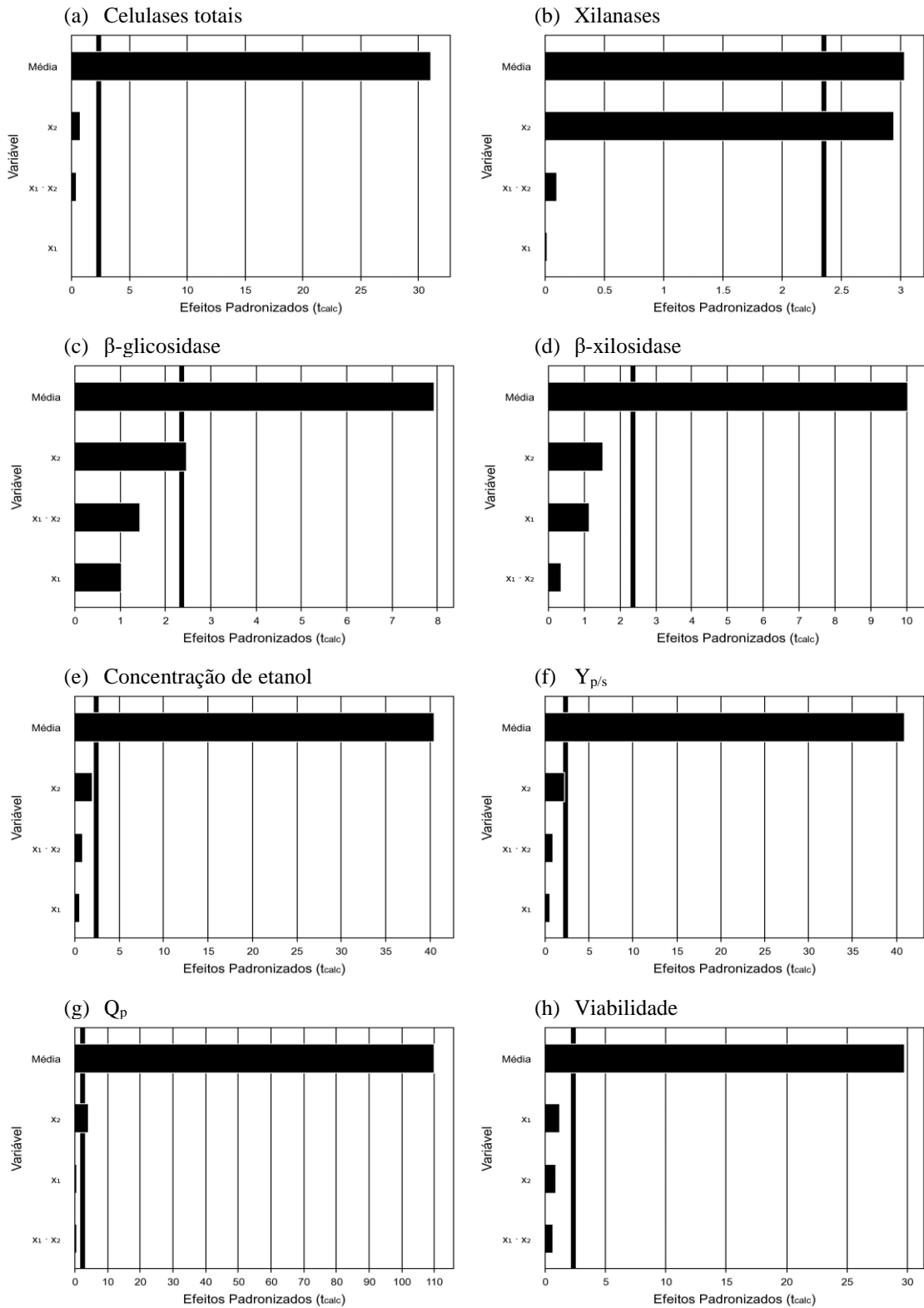
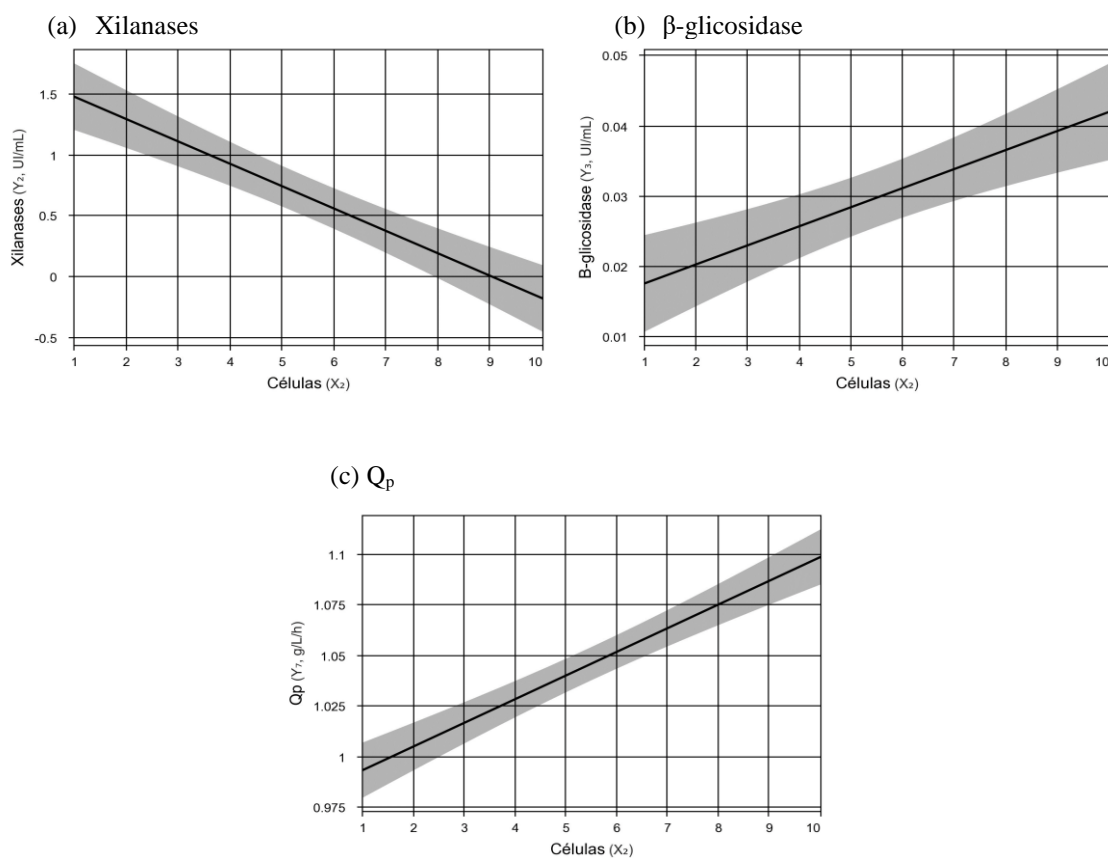


Figura 28 - Variação das variáveis resposta do BPC em condição estática com as condições de imobilização da levedura AC14 em alginato de cálcio: (a) Xilanases, (b) β -glicosidase e (c) Q_p .



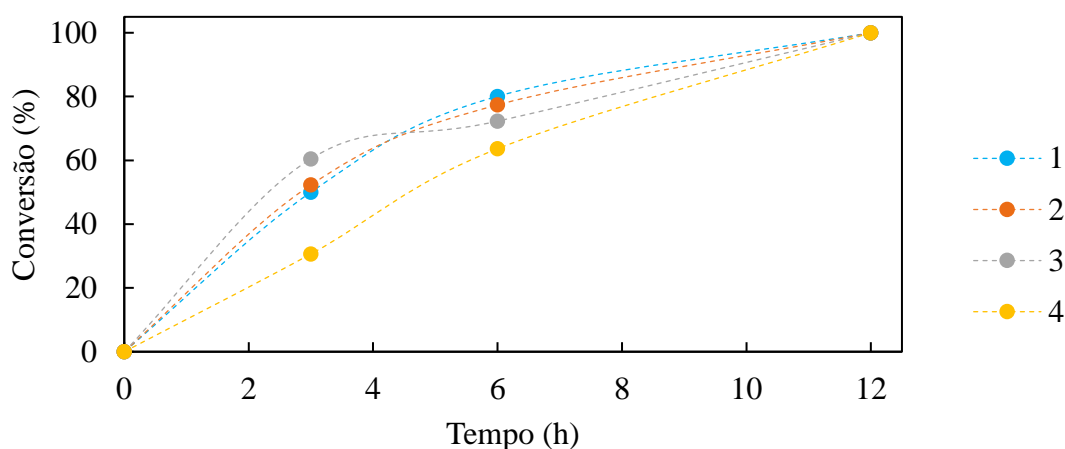
4.3.2. Influência da carga celular e diâmetro dos *beads* BPCs agitados

O segundo planejamento fatorial 2^2 foi realizado sob agitação a fim de melhorar a transferência de massa no seio do fluido. Nos experimentos conduzidos em condição estática, a transferência ocorreu predominantemente por difusão, já que a produção de CO_2 não era suficientemente intensa para gerar turbulência. Na presença de agitação adequada, a transferência de massa passa a ocorrer por convecção, e a velocidade de transporte de enzimas, substratos e produtos do lado de fora das microesferas aumenta.

Esta estratégia foi adotada pois a agitação melhora a transferência de massa e calor, uma vez que reduz a camada estagnada ao redor do suporte sólido de imobilização, incrementando os processos fermentativos com leveduras imobilizadas (RIVALDI et al., 2009; SHEN et al., 2009). Na Figura 29 estão as curvas de conversão, que mostram perfis

mais lentos de conversão para os experimentos 4 (maior diâmetro e maior carga) e 7 (ponto central), enquanto os demais experimentos apresentaram perfis semelhantes.

Figura 29 - Acompanhamento dos experimentos do planejamento fatorial 22 realizado para os ensaios BPC em condição agitada em mini-reatores. Meio com extrato de levedura (10 g.L^{-1}), peptona (20 g.L^{-1}), glicose (5 g.L^{-1}), xilose (5 g.L^{-1}), celobiose (5 g.L^{-1}), xilana de sabugo de milho (5 g.L^{-1}), carboximetilcelulose ($2,5 \text{ g.L}^{-1}$), 35°C , DO_0 100, 250 rpm e pH 5,5, 8% ($v_{\text{bead}}/v_{\text{meio}}$).



O etanol produzido, o rendimento e a produtividade em etanol (Tabela 19) foram semelhantes em todas as condições estudadas, inclusive quando comparados com os experimentos realizados sem agitação (Tabela 18). Isso pode ser atribuído à baixa concentração de substratos presente no meio sintético, de forma que uma baixa atividade enzimática é suficiente para promover a hidrólise completa dos substratos.

As mesmas respostas avaliadas no primeiro planejamento foram analisadas para os experimentos agitados, sendo apresentadas na Figura 30 e na Tabela 19. Ao comparar os ensaios fermentativos estáticos (Figura 26) e agitados (Figura 30), percebe-se um aumento na atividade enzimática dos extratos enzimáticos. Por exemplo, no experimento 1, as xilanases passaram de $1,8 \text{ UI.mL}^{-1}$ para $3,7 \text{ UI.mL}^{-1}$ e a β -glicosidase de $0,04 \text{ UI.mL}^{-1}$ para $0,10 \text{ UI.mL}^{-1}$. Isso pode estar associado à resistência de massa externa, a qual está relacionada ao número adimensional de Dankoler. Esse tipo de limitação pode ser superado pelo aumento da temperatura, o que nem sempre é possível em bioprocessos, ou pela redução da espessura filme estagnado ao redor do suporte sólido de imobilização, a partir do aumento da agitação, conforme observado no presente trabalho (DORAN, 1995; GIORDANO et al., 2000).

Figura 30 - Atividades enzimática dos sobrenadantes do BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹). 35°C, 250 rpm, DO₀ 100 e pH 5,5.

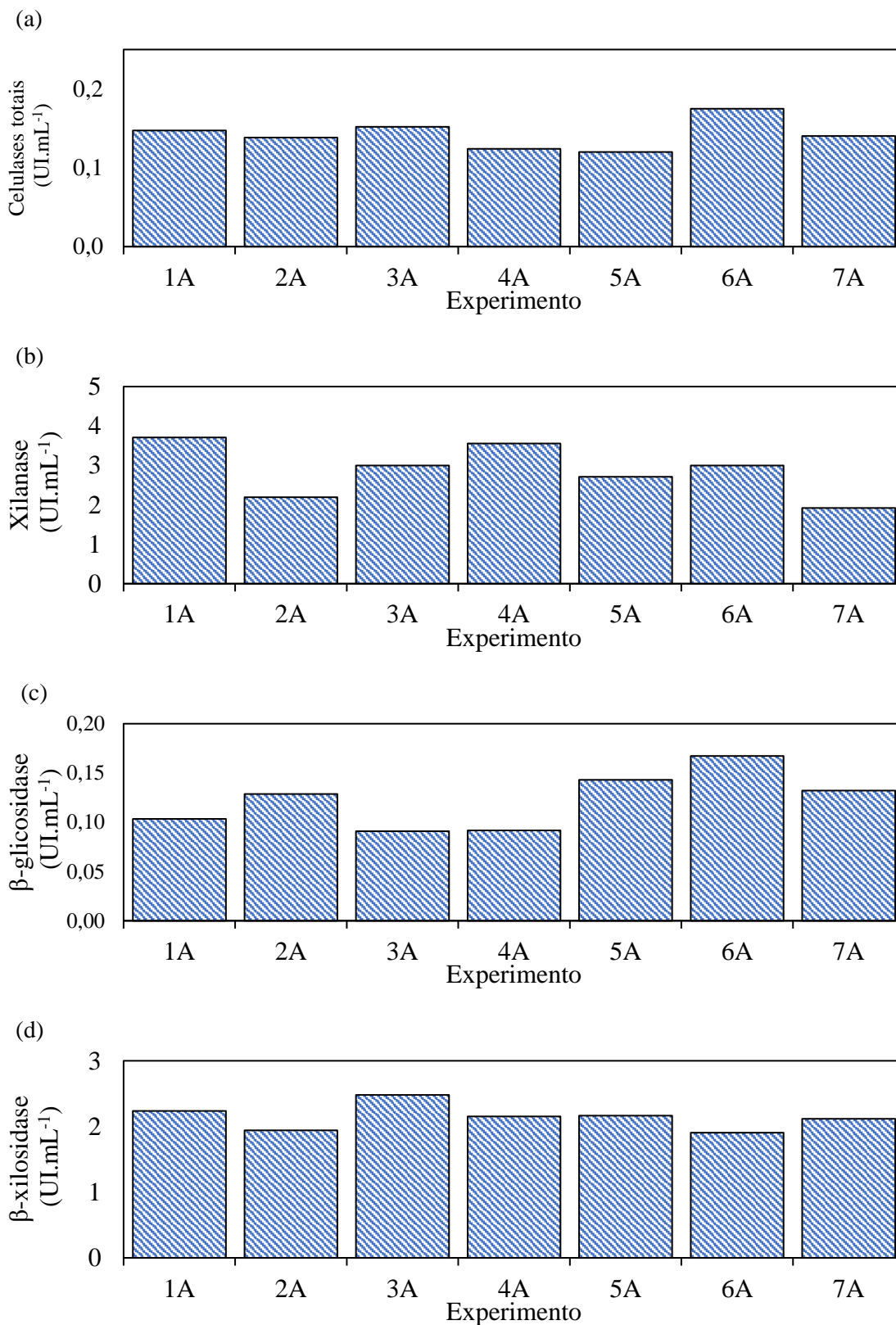


Tabela 19 - Etanol produzido e parâmetros fermentativos do planejamento experimental 2² realizado para os BPCs em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio. Meio com extrato de levedura (10 g.L⁻¹), peptona (20 g.L⁻¹), glicose (5 g.L⁻¹), xilose (5 g.L⁻¹), celobiose (5 g.L⁻¹), xilana de sabugo de milho (5 g.L⁻¹), carboximetilcelulose (2,5 g.L⁻¹). 35°C, 250 rpm, DO₀ 100, 250 rpm e pH 5,5.

Exp	Etanol produzido (g.L ⁻¹)	Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	Y _{P/S} (%)	Viabilidade celular (%)
1	9,34	0,94	0,40	77,3	81,6
2	10,12	1,00	0,43	83,7	96,0
3	11,95	1,09	0,51	99,0	93,3
4	10,61	1,08	0,45	87,9	97,6
5	10,15	1,02	0,43	84,1	81,2
6	11,15	1,02	0,47	92,3	94,4
7	10,92	1,01	0,46	90,4	82,5

Y_{P/S}: Rendimento; Y_{P/S}: rendimento de etanol comparado ao máximo teórico; Q_P: produtividade de etanol.

Tal observação é importante, porque quando o BPC for aplicado em materiais lignocelulósicos reais, a enzima ser transportada no meio fermentativo a fim de hidrolisar a fração sólida. Porém, é válido ressaltar que ainda existem problemas ligados à transferência de massa, pois as atividades nos extratos dos experimentos com agitação (Figura 30) ainda foram inferiores às observadas nos extratos obtidos com a levedura livre, os quais podem estar relacionados com efeitos intra-partícula, que não são superados com a agitação do sistema. Adicionalmente, além da agitação, o fato de as células poderem ser separadas da celulignina residual e reutilizadas com facilidade faz com que o desempenho perdido pela transferência de massa seja superado.

Outra possibilidade é que, como os substratos que compõem o meio sintético são solúveis, as enzimas hidrolisaram o substrato tanto fora quanto dentro do *bead*, uma vez que estes possivelmente foram capazes de difundir para dentro das esferas, sendo assim hidrolisados pelas enzimas que permaneceram retidas na matriz de imobilização. Assim, nas condições estudadas, pode-se afirmar que os problemas difusionais não prejudicaram o desempenho do BPC em termos de rendimento e produtividade em etanol e que a agitação não seria necessária. Porém, como o BPC industrial ocorrerá com materiais lignocelulósicos reais, em concentrações mais altas, a agitação é fortemente indicada para

promover o transporte convectivo e a homogeneização do meio, aumentando assim a atividade enzimática no seio da fase líquida e a velocidade de hidrólise da biomassa.

A análise estatística dos efeitos dos fatores estudados nas variáveis resposta do BPC a partir dos gráficos de Pareto apresentados na Figura 31 e nos dados do Anexo B revelou alguns resultados semelhantes e outros diferentes dos obtidos nos experimentos estáticos (Figura 27), como já era esperado. Viabilidade e atividade de celulase também não foram influenciadas pelos fatores nos experimentos com agitação. Por outro lado, um efeito significativo e positivo da interação entre diâmetro e carga celular na atividade enzimática das xilanases foi identificado, considerando-se um intervalo de confiança de 90% (p-valor inferior a 0,10). Já os parâmetros fermentativos etanol produzido, Q_P e $Y_{P/S}$ apresentam influência positiva da carga celular (como mostrou a Figura 28), porém negativa da interação dos fatores estudados. Adicionalmente, o Q_P também foi influenciado pelo diâmetro. Ao analisar este panorama, destaca-se a importância de se avaliar o efeito de interação entre as variáveis estudadas, pois o diâmetro isolado não causou efeito, mas em conjunto com a carga foi influente.

A regressão multivariável gerada para cada resposta pode ser representada graficamente por meio de superfícies de resposta. Essas superfícies foram então construídas para as variáveis que apresentaram influência significativa dos fatores (Figura 32). Percebe-se que a atividade das xilanases é favorecida em duas condições específicas: diminuição do diâmetro e da carga ou aumento de ambos (Figura 32b). Já a concentração de etanol produzido e o rendimento em etanol (Figura 32e e 32f, respectivamente) são favorecidos pela maior concentração celular no *bead* e pela diminuição do diâmetro, enquanto aumentos de produtividade ocorrem praticamente apenas por aumentos da carga de célula no *bead*.

Embora o meio não fosse composto por inibidores, nem altas concentrações de etanol, o efeito positivo do aumento da carga de células nos índices de desempenho do BPC (rendimento, concentração e produtividade em etanol) pode ser parcialmente atribuído ao microambiente gerado pela maior população celular confinada na microesfera, que protege microrganismos, melhorando a produção de bioetanol 2G (MILESSI *et al.*, 2020; RAZMOVSKI e VUČUROVIĆ, 2012; SOARES *et al.*, 2022). Outro motivo que pode estar associado aos resultados é a combinação entre número de *beads* e carga de célula, pois quando se tem alta carga celular, necessita-se de menos microesferas para que a DO no reator seja a mesma.

Figura 31 - Gráficos de Pareto para cada variável resposta do planejamento fatorial 22 do BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança). Diâmetro do *bead* – x1, carga celular – x2 e interações (x1.x2).

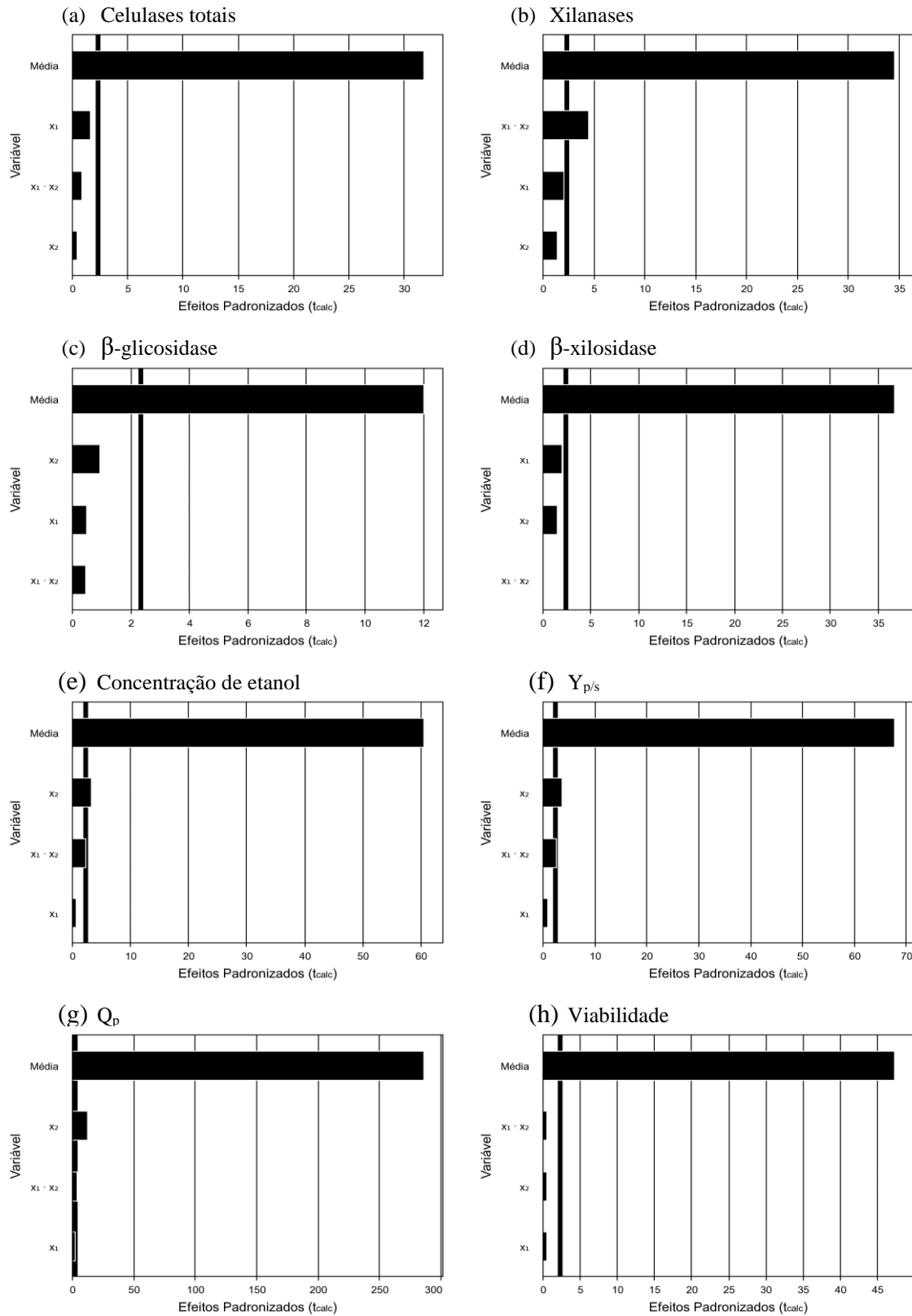
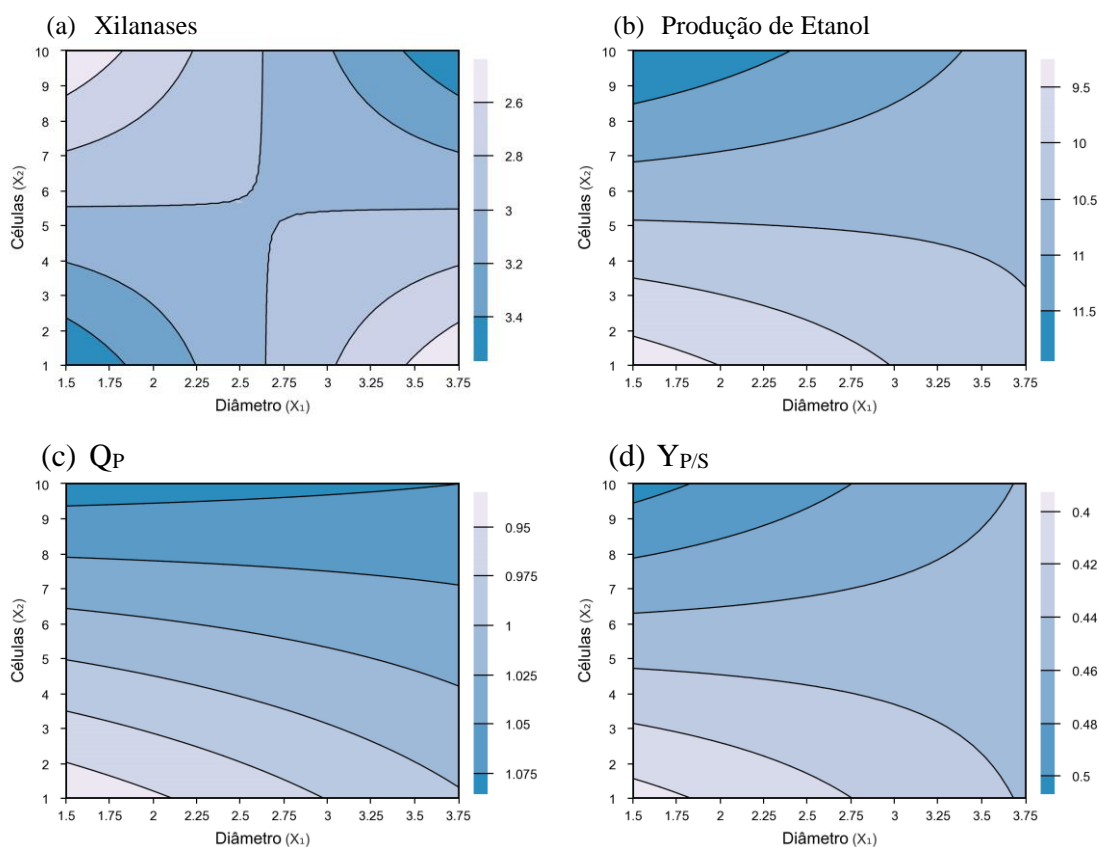


Figura 32 - Superfícies de resposta das variáveis estudadas no planejamento fatorial 22 de BPC em condição agitada com AC14 imobilizada em alginato de cálcio (90% de confiança): (a) Xilanases, (b) Produção de etanol, (c) Q_P e (d) $Y_{P/S}$.



Deste modo, com mais células dentro do *bead*, mais CO_2 é produzido, influenciando a transferência de massa intrapartícula, pois as bolhas podem causar expansão dos *beads*, aumento de pressão interna da microesfera e gerar turbulência, acelerando o transporte de produto, enzimas e substratos.

Paralelamente, diâmetros menores também incrementaram os índices de desempenho. Ou seja, limitações de transferência de massa foram minimizadas em uma microesfera menor. Isso pode ter ocorrido porque o transporte das enzimas, dos substratos e do produto foi facilitado, uma vez que necessitava passar por um menor caminho.

O efeito da diminuição do diâmetro na transferência de massa pode ser melhor compreendida por meio do módulo de Thiele, um grupo adimensional que correlaciona as velocidades de reação e difusão dentro do *bead*, estando associado à difusividade, constante de velocidade e raio do *bead*.

Sendo assim, a redução do diâmetro da partícula do biocatalisador pode atenuar as limitações relacionadas aos efeitos intrapartícula (DORAN, 1995). Orrego *et al.* (2018)

imobilizaram *S. cerevisiae* NRRL Y-1546 em alginato para a produção de etanol a partir de mucilagem de café, variando o diâmetro das microesferas (3 e 7 mm). Valores menores aceleraram o processo por diminuir os problemas difusionais de transporte de massa. Um menor diâmetro de *bead* (1 mm) também favoreceu a geração de ácido lático, como constataram Idris e Suzana (2006) ao imobilizar em alginato de cálcio *Lactobacillus delbrueckii*. Infelizmente, trabalhos que explorem BPC com células imobilizadas não foram encontrados na literatura para comparação, destacando a relevância do presente estudo, o qual contribui para o estado da arte desta tecnologia.

É válido ainda destacar que a viabilidade não sofreu influência dos fatores estudados. Tal variável poderia ter sido influenciada pela geração de um microambiente dentro dos *beads* (MILESSI *et al.*, 2020; RAZMOVSKI e VUČUROVIĆ, 2012; SOARES *et al.*, 2022) que pode se assemelhar com a floculação realizada naturalmente por muitas leveduras (JIN e SPEERS, 2000; AZHAR *et al.*, 2017). Todavia, a ausência de efeitos dos fatores estudados na viabilidade também pode ter ocorrido em virtude das características do microrganismo, que é altamente robusto.

Diante do exposto, como o presente estudo tem como objetivo final a produção de etanol 2G por meio do BPC utilizando células imobilizadas, os parâmetros fermentativos foram cruciais para apontar que o diâmetro e carga de células nos *beads* são fatores importantes para a imobilização da levedura AC14, assim como sua interação. Sendo assim, fica claro que cargas mais altas de leveduras dentro do *bead* e diâmetros menores de microesferas favorecem o BPC com a levedura em estudo.

4.4. Conclusões

Ao estudar a imobilização celular da levedura AC14 em alginato de cálcio para aplicação em BPC, notou-se que a agitação é um importante parâmetro operacional que melhora a transferência das enzimas dos *beads* para o meio líquido, embora não elimine as limitações de transferência de massa intra-partícula. O diâmetro dos *beads* e sua carga celular tiveram influência nos parâmetros fermentativos, de forma que é indicado adotar diâmetros menores em conjunto com maiores cargas celulares nos *beads* para estudos futuros. Sobretudo, a imobilização de células é uma técnica que pode ser aplicada no BPC, principalmente por facilitar e possibilitar a reutilização da biomassa celular, merecendo ser estudada em cultivos contendo materiais lignocelulósicos reais futuramente.

Anexo A – Efeitos e coeficientes das variáveis da influência do diâmetro médio do *bead* (X1) e a concentração de células imobilizadas (X2) no BPC em condições estáticas pelo delineamento fatorial 2² com 3 repetições no ponto central. Efeitos significativos a 90% de confiança (p<0,1) destacados em vermelho.

	Efeito	Erro	T	p	Significativo
Celulases					
Diâmetro (X1)	0,00068	0,00547	0,12345	0,90956	Não
Carga (X2)	0,00403	0,00547	0,73614	0,51498	Não
X1*X2	-0,00238	0,00547	-0,43437	0,69337	Não
Xilanases					
Diâmetro (X1)	-0,00510	0,28146	-0,01812	0,98668	Não
Carga (X2)	-0,82945	0,28146	-2,94699	0,06017	Sim
X1*X2	-0,02780	0,28146	-0,09877	0,92755	Não
β-glicosidase					
Diâmetro (X1)	-0,00505	0,00495	-1,01968	0,38294	Não
Carga (X2)	0,01220	0,00495	2,46340	0,09059	Sim
X1*X2	0,00715	0,00495	1,44371	0,24454	Não
β-xilosidase					
Diâmetro (X1)	-0,19708	0,17301	-1,13912	0,33738	Não
Carga (X2)	-0,26278	0,17301	-1,51888	0,22610	Não
X1*X2	0,06028	0,17301	0,34840	0,75056	Não
Viabilidade					
Diâmetro (X1)	4,67500	3,89264	1,20098	0,31593	Não
Carga (X2)	3,32500	3,89264	0,85418	0,45579	Não
X1*X2	-2,52500	3,89264	-0,64866	0,56279	Não
Etanol					
Diâmetro (X1)	0,19750	0,35762	0,55227	0,61924	Não
Carga (X2)	0,71250	0,35762	1,99236	0,14036	Não
X1*X2	0,30250	0,35762	0,84588	0,45975	Não
Q_p					
Diâmetro (X1)	-0,00750	0,01257	-0,59660	0,59280	Não
Carga (X2)	0,05250	0,01257	4,17620	0,02501	Sim
X1*X2	0,00750	0,01257	0,59660	0,59280	Não
Y_{p/s}					
Diâmetro (X1)	0,00750	0,01499	0,50033	0,65124	Não
Carga (X2)	0,03250	0,01499	2,16810	0,11867	Não
X1*X2	0,01250	0,01499	0,83389	0,46553	Não

Anexo B – Efeitos e coeficientes das variáveis da influência do diâmetro médio do *bead* (X1) e a concentração de células imobilizadas (X2) no BPC em condições agitadas (250 rpm) pelo delineamento fatorial 2² com 3 repetições no ponto central. Efeitos significativos a 90% de confiança (p<0,1) destacados em vermelho.

	Efeito	Erro	t	p	Significativo
Celulases					
Diâmetro (X1)	-0,00915	0,00566	-1,61789	0,20412	Não
Carga (X2)	-0,00235	0,00566	-0,41552	0,70569	Não
X1*X2	-0,00475	0,00566	-0,83989	0,46263	Não
Xilanases					
Diâmetro (X1)	-0,23853	0,11491	-2,07583	0,12952	Não
Carga (X2)	0,16282	0,11491	1,41703	0,25147	Não
X1*X2	0,51873	0,11491	4,51436	0,02032	Sim
β-glicosidase					
Diâmetro (X1)	0,00650	0,01299	0,50030	0,65126	Não
Carga (X2)	-0,01240	0,01299	-0,95441	0,41029	Não
X1*X2	-0,00610	0,01299	-0,46951	0,67072	Não
β-xilosidase					
Diâmetro (X1)	-0,15615	0,07713	-2,02462	0,13605	Não
Carga (X2)	0,11310	0,07713	1,46644	0,23880	Não
X1*X2	-0,00755	0,07713	-0,09789	0,92819	Não
Viabilidade					
Diâmetro (X1)	1,27500	2,64135	0,48271	0,66234	Não
Carga (X2)	1,32500	2,64135	0,50164	0,65042	Não
X1*X2	-1,37500	2,64135	-0,52057	0,63865	Não
Etanol					
Diâmetro (X1)	-0,14000	0,23153	-0,60467	0,58807	Não
Carga (X2)	0,77500	0,23153	3,34730	0,04415	Sim
X1*X2	-0,53000	0,23153	-2,28912	0,10604	Sim
Q_p					
Diâmetro (X1)	0,01250	0,00472	2,64575	0,07727	Sim
Carga (X2)	0,05750	0,00472	12,17046	0,00119	Sim
X1*X2	-0,01750	0,00472	-3,70405	0,03418	Sim
Y_{p/s}					
Diâmetro (X1)	-0,00750	0,00878	-0,85424	0,45576	Não
Carga (X2)	0,03250	0,00878	3,70172	0,03424	Sim
X1*X2	-0,02250	0,00878	-2,56273	0,08302	Sim

Capítulo 5 - Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

O Bioprocessamento Consolidado é uma tecnologia inovadora e atraente no contexto da biorrefinaria, que pode ser aplicada na produção eficiente de etanol 2G e outros bioprodutos. Entretanto, este processo ainda necessita de estudos para que seja possível sua compreensão a fim de escaloná-lo. Neste contexto, a levedura recombinante *S. cerevisiae* AC14 merece destaque após atingir resultados interessantes no presente trabalho.

A partir da análise da influência da composição do meio, do pH e da aeração na produção de enzimas pela AC14 durante o BPC notou-se que a xilana de milho favorece a produção de celulases, provavelmente por causa da modificação genética que a levedura possui. O pH 5,5 foi o mais indicado para o BPC, acarretando maior atividade enzimática das xilanases no meio fermentado e, conseqüentemente, maior produção de etanol. A aeração não favoreceu a produção de enzimas e aumentou a biomassa celular, prejudicando a produção de etanol, não sendo indicada para o BPC. As melhores condições de cultivo foram utilizadas para um estudo de bateladas repetidas, notando-se uma hidrólise total de todos os monômeros, dímeros e polímeros em solução (100% de conversão) por 10 ciclos consecutivos, com um rendimento relativo médio de 80%.

Os cultivos com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado ácido e hidrotérmicamente mostraram que a agitação do meio reacional favorece o processo uma vez que se trata de um sistema heterogêneo com a presença da celulignina. O congelamento da celulignina aumentou a atividade enzimática do caldo fermentado, melhorando a hidrólise do material e, conseqüentemente, a produção de etanol.

Por fim, o estudo de imobilização das células em alginato de cálcio reforçou a necessidade da agitação do meio, uma vez que favorece o transporte de enzimas na região externa ao biocatalisador. Constatou-se ainda que o desempenho do BPC melhora ao se empregar *beads* menores (1,6 mm) e com maior carga celular (10%). De maneira geral, o encapsulamento se mostrou promissor para o BPC, de forma a viabilizar a separação e recuperação das células da fração sólida remanescente.

Após estudar diferentes vertentes atreladas ao Bioprocessamento Consolidado com a levedura AC14, sugere-se para trabalhos futuros o aumento de escala desta tecnologia tanto com célula livre como imobilizada. Visto que o BPC em mini-reatores se mostrou uma alternativa promissora, experimentos em biorreator de bancada são necessários para o desenvolvimento de um processo robusto e escalonável

industrialmente. Neste contexto, um estudo de aumento de carga de sólido pré-tratado (celulignina) e diferentes conformações de bioreatores contribuirão com informações cruciais no escalonamento do BPC. Sugere-se também a análise do BPC com outro material lignocelulósico da indústria sucroalcooleira, a palha de cana-de-açúcar, além da adição de melaço de cana a fim de integrar as rotas de etanol 1G e 2G. Assim, será possível obter um processo que englobe diferentes co-produtos das usinas de açúcar e álcool. Adicionalmente, sugere-se a realização de estudos de avaliação técnico-econômica e ambiental a fim de se identificar a viabilidade de integração deste processo em biorrefinarias.

Referências

- AGUIAR, A.; MILESSI, T. S.; MULINARI, D. R.; LOPES, M. S.; DA COSTA, S. M.; CANDIDO, R. G. Sugarcane straw as a potential second generation feedstock for biorefinery and white biotechnology applications. **Biomass and Bioenergy**, v. 144, p. 105896, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105896>.
- AHORSU, R.; MEDINA, F.; CONSTANTÍ, M. Significance and Challenges of Biomass as a Suitable Feedstock for Bioenergy and Biochemical Production: A Review. **Energies**, v. 11, n. 12, p. 3366, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.3390/en11123366>.
- ALOKIKA; ANU; KUMAR, A.; KUMAR, V.; SINGH, B. Cellulosic and hemicellulosic fractions of sugarcane bagasse: Potential, challenges and future perspective. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 564–582, fev. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.175>.
- AMIT, K.; NAKACHEW, M.; YILKAL, B.; MUKESH, Y. A Review of Factors affecting Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Lignocellulosic Biomass. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 22, n. 7, p. 62–67, 2018. .
- AMOAH, J.; ISHIZUE, N.; ISHIZAKI, M.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, K.; NINOMIYA, K.; YAMADA, R.; KONDO, A.; OGINO, C. Development and evaluation of consolidated bioprocessing yeast for ethanol production from ionic liquid-pretreated bagasse. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1413–1420, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.171>.
- ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; MILESSI, T. S. S.; SANTOS, J. C.; ROSA, C. A.; DA SILVA, S. S. Bioethanol Production from Sugarcane Bagasse by a Novel Brazilian Pentose Fermenting Yeast *Scheffersomyces shehatae* UFMG-HM 52.2: Evaluation of Fermentation Medium. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2014, p. 1–8, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/180681>.
- BARROS-RIOS, J.; ROMANÍ, A.; GARROTE, G.; ORDAS, B. Biomass, sugar, and bioethanol potential of sweet corn. **GCB Bioenergy**, v. 7, n. 1, p. 153–160, jan. 2015. <https://doi.org/10.1111/gcbb.12136>.
- BARUAH, J.; NATH, B. K.; SHARMA, R.; KUMAR, S.; DEKA, R. C.; BARUAH, D. C.; KALITA, E. Recent Trends in the Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Value-Added Products. **Frontiers in Energy Research**, v. 6, p. 141, 18 dez. 2018. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2018.00141>.
- BHARDWAJ, N.; KUMAR, B.; VERMA, P. A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 6, n. 1, p. 40, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>.
- BISSWANGER, H. Enzyme assays. **Perspectives in Science**, v. 1, n. 1–6, p. 41–55, maio 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.005>.

- BOUABIDI, Z. B.; EL-NAAS, M. H.; ZHANG, Z. Immobilization of microbial cells for the biotreatment of wastewater: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 1, p. 241–257, mar. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10311-018-0795-7>.
- BOUIX, M.; GHORBAL, S.; PICQUE, D.; PERRET, B.; SAULOU-BÉRION, C. A rapid method for the assessment of the vitality of microorganisms using flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 101, n. 7, p. 577–587, jul. 2022. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.24553>.
- CÁMARA, E.; OLSSON, L.; ZRIMEC, J.; ZELEZNIAK, A.; GEIJER, C.; NYGÅRD, Y. Data mining of *Saccharomyces cerevisiae* mutants engineered for increased tolerance towards inhibitors in lignocellulosic hydrolysates. **Biotechnology Advances**, v. 57, p. 107947, jul. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107947>.
- CANILHA, L.; CHANDEL, A. K.; SUZANE DOS SANTOS MILESSI, T.; ANTUNES, F. A. F.; LUIZ DA COSTA FREITAS, W.; DAS GRAÇAS ALMEIDA FELIPE, M.; DA SILVA, S. S. Bioconversion of Sugarcane Biomass into Ethanol: An Overview about Composition, Pretreatment Methods, Detoxification of Hydrolysates, Enzymatic Saccharification, and Ethanol Fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/989572>.
- CHANG, K.-L.; THITIKORN-AMORN, J.; HSIEH, J.-F.; OU, B.-M.; CHEN, S.-H.; RATANAKHANOKCHAI, K.; HUANG, P.-J.; CHEN, S.-T. Enhanced enzymatic conversion with freeze pretreatment of rice straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 90–95, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.08.027>.
- CHEAH, W. Y.; SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; TG. IBRAHIM, Tg. N. B.; CHEW, K. W.; CULABA, A.; CHANG, J.-S. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. **Biofuel Research Journal**, v. 7, n. 1, p. 1115–1127, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.18331/BRJ2020.7.1.4>.
- CHEN, L.; DU, J.-L.; ZHAN, Y.-J.; LI, J.-A.; ZUO, R.-R.; TIAN, S. Consolidated bioprocessing for cellulosic ethanol conversion by cellulase–xylanase cell-surfaced yeast consortium. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 48, n. 7, p. 653–661, 9 ago. 2018. <https://doi.org/10.1080/10826068.2018.1487846>.
- CHI, X.; LI, J.; WANG, X.; ZHANG, Y.; ANTWI, P. Hyper-production of butyric acid from delignified rice straw by a novel consolidated bioprocess. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 115–120, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.01.042>.
- CLAES, A.; DEPARIS, Q.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Simultaneous secretion of seven lignocellulolytic enzymes by an industrial second-generation yeast strain enables efficient ethanol production from multiple polymeric substrates. **Metabolic Engineering**, v. 59, p. 131–141, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2020.02.004>.
- CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 30 nov. 2022.

CORRÊA, A. G.; GALLO, J. M. R. **Biomassa - Estrutura, Propriedades e Aplicações**. [S. l.]: EdUFSCar, 2020.

CUNHA, J. T.; ROMANÍ, A.; INOKUMA, K.; JOHANSSON, B.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; DOMINGUES, L. Consolidated bioprocessing of corn cob-derived hemicellulose: engineered industrial *Saccharomyces cerevisiae* as efficient whole cell biocatalysts. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 138, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01780-2>.

CUNHA, J. T.; SOARES, P. O.; ROMANÍ, A.; THEVELEIN, J. M.; DOMINGUES, L. Xylose fermentation efficiency of industrial *Saccharomyces cerevisiae* yeast with separate or combined xylose reductase/xyloitol dehydrogenase and xylose isomerase pathways. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 20, dez. 2019. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1360-8>.

DA SILVA, F. L.; DE OLIVEIRA CAMPOS, A.; DOS SANTOS, D. A.; BATISTA MAGALHÃES, E. R.; DE MACEDO, G. R.; DOS SANTOS, E. S. Valorization of an agroextractive residue—Carnauba straw—for the production of bioethanol by simultaneous saccharification and fermentation (SSF). **Renewable Energy**, v. 127, p. 661–669, nov. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.025>.

DALILI, M.; CHAU, P. C. Intraparticle diffusional effects in immobilized cell particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 500–506, set. 1987. <https://doi.org/10.1007/BF00253021>.

DAVISON, S. A.; KELLER, N. T.; VAN ZYL, W. H.; DEN HAAN, R. Improved cellulase expression in diploid yeast strains enhanced consolidated bioprocessing of pretreated corn residues. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 131, p. 109382, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109382>.

DEMEKE, M. M.; DUMORTIER, F.; LI, Y.; BROECKX, T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Combining inhibitor tolerance and D-xylose fermentation in industrial *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 120, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-120>.

DIAO, L.; LIU, Y.; QIAN, F.; YANG, J.; JIANG, Y.; YANG, S. Construction of fast xylose-fermenting yeast based on industrial ethanol-producing diploid *Saccharomyces cerevisiae* by rational design and adaptive evolution. **BMC Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 110, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-110>.

DIAZ, J. T.; CHINN, M. S.; TRUONG, V.-D. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial sweetpotatoes for ethanol production and anthocyanins extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 53–60, dez. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.07.032>.

DIDIER JEAN LOUIS MEKO'O. Production of ethanol from cellobiose by recombinant β -glucosidase-expressing *Pichia pastoris*: Submerged shake flask fermentation. **AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY**, v. 11, n. 37, 8 maio 2012. DOI 10.5897/AJB11.1332. Disponível em:

<http://www.academicjournals.org/ajb/abstracts/abs2012/8May/Meko'o%20et%20al.htm>.
Acesso em: 14 fev. 2023.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. [S. l.]: Elsevier, 1995.

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

FERREIRA, J. Etanol de segunda geração: definições e perspectivas. **Revista Conexão Eletrônica**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2015. .

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Addition of Soybean Protein Improves Saccharification and Ethanol Production from Hydrothermally Pretreated Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**, v. 12, n. 1, p. 81–93, mar. 2019.
<https://doi.org/10.1007/s12155-018-9956-6>.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Soybean protein as a cost-effective lignin-blocking additive for the saccharification of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 221, p. 172–180, dez. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.09.039>.

FUJITA, Y; ITO, J.; UEDA, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1207–1212, 2004. .

FUJITA, Yasuya; TAKAHASHI, S.; UEDA, M.; TANAKA, A.; OKADA, H.; MORIKAWA, Y.; KAWAGUCHI, T.; ARAI, M.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct and Efficient Production of Ethanol from Cellulosic Material with a Yeast Strain Displaying Cellulolytic Enzymes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 10, p. 5136–5141, out. 2002. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.5136-5141.2002>.

FURLAN, F. F.; FILHO, R. T.; PINTO, F. H.; COSTA, C. B.; CRUZ, A. J.; GIORDANO, R. L.; GIORDANO, R. C. Bioelectricity versus bioethanol from sugarcane bagasse: is it worth being flexible? **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 142, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-6-142>.

GANCEDO, J. M. Yeast Carbon Catabolite Repression. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 334–361, jun. 1998.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.334-361.1998>.

GARCÍA-APARICIO, M. P.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, Maj. Effect of Inhibitors Released During Steam-Explosion Pretreatment of Barley Straw on Enzymatic Hydrolysis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 129, n. 1–3, p. 278–288, 2006.
<https://doi.org/10.1385/ABAB:129:1:278>.

GHOSE, T. K. Measurement of Cellulase Activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257–268, 1987. .

GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; TARDIOLI, P. W.; SILVA, C. R.; AQUINO, P.; SUAREZ, C. A. G.; CAVALCANTI, I.; MILESSI, T. S. S.; ROJAS, M. J.; SILVA, F. **Sistema catalítico e processo de obtenção de bioetanol 2g a partir de xilana/oligômeros de xilose**. [S. l.: s. n.], 2014.

GUNGORMUSLER-YILMAZ, M.; CICEK, N.; LEVIN, D. B.; AZBAR, N. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol. **Critical Reviews in Biotechnology**, , p. 1–13, 20 jan. 2015. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.992386>.

GUO, F.; SHI, W.; SUN, W.; LI, X.; WANG, F.; ZHAO, J.; QU, Y. Differences in the adsorption of enzymes onto lignins from diverse types of lignocellulosic biomass and the underlying mechanism. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 38, dez. 2014. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-38>.

HAAN, R. D.; ROSE, S. H.; LYND, L. R.; ZYL, W. H. V. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 9, p. 87–94, 2007.

HADIYANTO; ARIYANTI, D.; AINI, A. P.; PINUNDI, D. S. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-batch Fermentation Using *Kluyveromyces Marxianus*. **Energy Procedia**, v. 47, p. 108–112, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2014.01.203>.

HAGHIGHI MOOD, S.; HOSSEIN GOLFESHAN, A.; TABATABAEI, M.; SALEHI JOUZANI, G.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 77–93, nov. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.06.033>.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; CHAVES-VILLAMIL, A. C.; DE ARRUDA, P. V.; DOS SANTOS, J. C.; FELIPE, M. das G. de A. Sugarcane Syrup Improves Xylitol Bioproduction from Sugarcane Bagasse and Straw Hemicellulosic Hydrolysate. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 8, p. 4215–4224, ago. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00742-6>.

HONG, J.; YANG, H.; ZHANG, K.; LIU, C.; ZOU, S.; ZHANG, M. Development of a cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced cellobiohydrolase activity. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 11, p. 2985–2993, nov. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1726-9>.

HUANG, J.; KHAN, M. T.; PERECIN, D.; COELHO, S. T.; ZHANG, M. Sugarcane for bioethanol production: Potential of bagasse in Chinese perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 133, p. 110296, nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110296>.

ILANIDIS, D.; STAGGE, S.; JÖNSSON, L. J.; MARTÍN, C. Effects of operational conditions on auto-catalyzed and sulfuric-acid-catalyzed hydrothermal pretreatment of sugarcane bagasse at different severity factor. **Industrial Crops and Products**, v. 159, p. 113077, jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113077>.

ILMÉN, M.; DEN HAAN, R.; BREVNOVA, E.; MCBRIDE, J.; WISWALL, E.; FROEHLICH, A.; KOIVULA, A.; VOUTILAINEN, S. P.; SIIKA-AHO, M.; LA GRANGE, D. C.; THORNGREN, N.; AHLGREN, S.; MELLON, M.; DELEAULT, K.; RAJGARHIA, V.; VAN ZYL, W. H.; PENTTILÄ, M. High level secretion of cellobiohydrolases by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 30, dez. 2011. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-30>.

INOKUMA, K.; BAMBA, T.; ISHII, J.; ITO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide: Enhanced Enzyme Cell-Surface Display and Secretion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 11, p. 2358–2366, nov. 2016a. <https://doi.org/10.1002/bit.26008>.

INOKUMA, K.; BAMBA, T.; ISHII, J.; ITO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Enhanced cell-surface display and secretory production of cellulolytic enzymes with *Saccharomyces cerevisiae* Sed1 signal peptide: Enhanced Enzyme Cell-Surface Display and Secretion. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 11, p. 2358–2366, nov. 2016b. <https://doi.org/10.1002/bit.26008>.

JEON, E.; HYEON, J. eun; SUNG EUN, L.; PARK, B.-S.; KIM, S. W.; LEE, J.; HAN, S. O. Cellulosic alcoholic fermentation using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* engineered for the production of *Clostridium cellulovorans* endoglucanase and *Saccharomycopsis fibuligera* β -glucosidase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 301, n. 1, p. 130–136, dez. 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01808.x>.

JIN, M.; GUNAWAN, C.; UPPUGUNDLA, N.; BALAN, V.; DALE, B. E. A novel integrated biological process for cellulosic ethanol production featuring high ethanol productivity, enzyme recycling and yeast cells reuse. **Energy & Environmental Science**, v. 5, n. 5, p. 7168, 2012. <https://doi.org/10.1039/c2ee03058f>.

JIN, Y.-L.; SPEERS, R. A. Effect of Environmental Conditions on the Flocculation of *Saccharomyces Cerevisiae*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 58, n. 3, p. 108–116, jun. 2000. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0108>.

KARAGOZ, P.; BILL, R. M.; OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, v. 143, p. 741–752, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.045>.

KATAHIRA, S.; FUJITA, Y.; MIZUIKE, A.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Construction of a Xylan-Fermenting Yeast Strain through Codisplay of Xylanolytic Enzymes on the Surface of Xylose-Utilizing *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 9, p. 5407–5414, set. 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5407-5414.2004>.

KHONGSAY, N.; LAOPAIBOON, L.; JAISIL, P.; LAOPAIBOON, P. Optimization of Agitation and Aeration for Very High Gravity Ethanol Fermentation from Sweet Sorghum Juice by *Saccharomyces cerevisiae* Using an Orthogonal Array Design. **Energies**, v. 5, n. 3, p. 561–576, 29 fev. 2012. <https://doi.org/10.3390/en5030561>.

KHRAMTSOV, N.; MCDADE, L.; AMERIK, A.; YU, E.; DIVATIA, K.; TIKHONOV, A.; MINTO, M.; KABONGO-MUBALAMATE, G.; MARKOVIC, Z.; RUIZ-MARTINEZ, M.; HENCK, S. Industrial yeast strain engineered to ferment ethanol from lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8310–8313, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.075>.

KOPPRAM, R.; OLSSON, L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 54, 2014. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-54>.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 7, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0137-9>.

LACHKE, A. H. 4-b-D-xylan xylohydrolase of *Sclerotium rolfsii*. **Methods Enzymol**, v. 160, p. 679–684, 1988. .

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. **Nature**, v. 227, p. 680–685, 1970. .

LAPPONI, M. J.; MÉNDEZ, M. B.; TRELLES, J. A.; RIVERO, C. W. Cell immobilization strategies for biotransformations. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 33, p. 100565, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100565>.

LEE, C.-R.; SUNG, B. H.; LIM, K.-M.; KIM, M.-J.; SOHN, M. J.; BAE, J.-H.; SOHN, J.-H. Co-fermentation using Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strains Hyper-secreting Different Cellulases for the Production of Cellulosic Bioethanol. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4428, 30 jun. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04815-1>.

LIN, W.; YANG, J.; ZHENG, Y.; HUANG, C.; YONG, Q. Understanding the effects of different residual lignin fractions in acid-pretreated bamboo residues on its enzymatic digestibility. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, p. 143, dez. 2021. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-01994-y>.

LIU, J.-C.; CHANG, W.-J.; HSU, T.-C.; CHEN, H.-J.; CHEN, Y.-C. Direct fermentation of cellulose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* displaying a bifunctional cellobiohydrolase gene from *Orpinomyces* sp. Y102. **Renewable Energy**, v. 159, p. 1029–1035, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.118>.

LIU, Y.; LYU, Y.; TIAN, J.; ZHAO, J.; YE, N.; ZHANG, Y.; CHEN, L. Review of waste biorefinery development towards a circular economy: From the perspective of a life cycle assessment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110716, abr. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110716>.

LIU, Z.; INOKUMA, K.; HO, S.-H.; DEN HAAN, R.; VAN ZYL, W. H.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Improvement of ethanol production from crystalline cellulose via optimizing cellulase ratios in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*: Higher Ethanol Yield in Cellulase-Displaying Yeast. **Biotechnology and**

Bioengineering, v. 114, n. 6, p. 1201–1207, jun. 2017.
<https://doi.org/10.1002/bit.26252>.

LIU, Z.; INOKUMA, K.; HO, S.-H.; HAAN, R. den; HASUNUMA, T.; VAN ZYL, W. H.; KONDO, A. Combined cell-surface display- and secretion-based strategies for production of cellulosic ethanol with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 162, dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0344-6>.

MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Cell recycle batch fermentation of high-solid lignocellulose using a recombinant cellulase-displaying yeast strain for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 403–409, maio 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.025>.

MERT, M. J.; ROSE, S. H.; LA GRANGE, D. C.; BAMBA, T.; HASUNUMA, T.; KONDO, A.; VAN ZYL, W. H. Quantitative metabolomics of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain expressing the *Bacteroides thetaiotaomicron* xylose isomerase on glucose and xylose. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 10, p. 1459–1470, 1 out. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1969-1>.

MESQUITA, T. J. B.; SANDRI, J. P.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; HORTA, A. C. L.; ZANGIROLAMI, T. C. A High-Throughput Approach for Modeling and Simulation of Homofermentative Microorganisms Applied to Ethanol Fermentation by *S. cerevisiae*. **Industrial Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 13–26, 1 fev. 2021. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.0034>.

MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; DA SILVA, S. S. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered**, v. 6, n. 1, p. 26–32, 2 jan. 2015. <https://doi.org/10.4161/21655979.2014.983403>.

MILESSI, T. S. S.; CHANDEL, A. K.; ANTUNES, F. A. F.; SILVA, S. S. da. Immobilization of *Scheffersomyces stipitis* cells with calcium alginate beads: A sustainable method for hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioethanol**, v. 1, n. 1, 29 jan. 2013. DOI 10.2478/bioeth-2013-0002. Disponível em: <https://www.degruyter.com/doi/10.2478/bioeth-2013-0002>. Acesso em: 16 fev. 2023.

MILESSI, T. S. S.; KOPP, W.; ROJAS, M. J.; MANRICH, A.; BAPTISTA-NETO, A.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUI SAN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Immobilization and stabilization of an endoxylanase from *Bacillus subtilis* (XynA) for xylooligosaccharides (XOs) production. **Catalysis Today**, v. 259, p. 130–139, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2015.05.032>.

MILESSI, Thais S.; CORRADINI, F. A. S.; MARÇAL, J. V. M.; BALDEZ, T. O.; KOPP, W.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Xylooligosaccharides production chain in sugarcane biorefineries: From the selection of pretreatment conditions to the evaluation of nutritional properties. **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114056, nov. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114056>.

MILESSI, Thais S.; PEREZ, C. L.; ZANGIROLAMI, T. C.; CORRADINI, F. A. S.; SANDRI, J. P.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; GIORDANO, R. C.; THEVELEIN, J. M.; GIORDANO, R. L. C. Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 85, dez. 2020. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-01722-y>.

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

MILESSI, Thais S.; ZANGIROLAMI, T. C.; PEREZ, C. L.; SANDRI, J. P.; CORRADINI, F. A. S.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Bioethanol Production from Xylose-Rich Hydrolysate by Immobilized Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in Fixed-Bed Reactor. **Industrial Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 75–80, 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1089/ind.2020.29198.tsm>.

MILESSI, Thais Suzane; AQUINO, P. M.; SILVA, C. R.; MORAES, G. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. Influence of key variables on the simultaneous isomerization and fermentation (SIF) of xylose by a native *Saccharomyces cerevisiae* strain co-encapsulated with xylose isomerase for 2G ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 277–283, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.016>.

MILESSI-ESTEVEES, T.; CORRADINI, F.; KOPP, W.; ZANGIROLAMI, T.; TARDIOLI, P.; GIORDANO, R.; GIORDANO, R. An Innovative Biocatalyst for Continuous 2G Ethanol Production from Xylo-Oligomers by *Saccharomyces cerevisiae* through Simultaneous Hydrolysis, Isomerization, and Fermentation (SHIF). **Catalysts**, v. 9, n. 3, p. 225, 1 mar. 2019. <https://doi.org/10.3390/catal9030225>.

MILESSI-ESTEVEES, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C.; SANDRI, J. P.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. **Processo integrado para produção de bioetanol de primeira e segunda geração**. [S. l.: s. n.], 2 dez. 2019. Acesso em: 2 dez. 2019.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Suga. **Analytical chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, 1959. .

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

MONTAÑO, I. D. C. **Aplicação de técnicas de modelagem e simulação para a produção de etanol de segunda geração**. 2013. Universidade Federal de São Carlos, 2013.

MORALES-RODRIGUEZ, R.; GERNAEY, K. V.; MEYER, A. S.; SIN, G. A. Mathematical Model for Simultaneous Saccharification and Co-fermentation (SSCF) of

C6 and C5 Sugars. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 2, p. 185–191, abr. 2011. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60152-3](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60152-3).

NAIR, A.; SARMA, S. J. The impact of carbon and nitrogen catabolite repression in microorganisms. **Microbiological Research**, v. 251, p. 126831, out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126831>.

NASCIMENTO, V. M.; MANRICH, A.; TARDIOLI, P. W.; DE CAMPOS GIORDANO, R.; DE MORAES ROCHA, G. J.; GIORDANO, R. de L. C. Alkaline pretreatment for practicable production of ethanol and xylooligosaccharides. **Bioethanol**, v. 2, n. 1, 19 jan. 2016. DOI 10.1515/bioeth-2016-0008. Disponível em: <http://access.portico.org/stable?au=phxzdmxhg4>. Acesso em: 16 fev. 2023.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v. 91, n. 6, p. 659–664, jun. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.03.015>.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000700023>.

OH, E. J.; JIN, Y.-S. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient fermentation of cellulose. **FEMS Yeast Research**, v. 20, n. 1, p. foz089, 1 fev. 2020. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz089>.

OLGUIN-MACIEL, E.; SINGH, A.; CHABLE-VILLACIS, R.; TAPIA-TUSSELL, R.; RUIZ, H. A. Consolidated Bioprocessing, an Innovative Strategy towards Sustainability for Biofuels Production from Crop Residues: An Overview. **Agronomy**, v. 10, n. 11, p. 1834, 22 nov. 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111834>.

ORREGO, D.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; KIM, D. Ethanol production from coffee mucilage fermentation by *S. cerevisiae* immobilized in calcium-alginate beads. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, p. 200–204, set. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2018.08.006>.

PANAKKAL, E. J.; SRIARIYANUN, M.; RATANAPOOMPINYO, J.; YASURIN, P.; CHEENKACHORN, K.; RODIAHWATI, W.; TANTAYOTAI, P. Influence of Sulfuric Acid Pretreatment and Inhibitor of Sugarcane Bagasse on the Production of Fermentable Sugar and Ethanol. **Applied Science and Engineering Progress**, 16 jul. 2021. DOI 10.14416/j.asep.2021.07.006. Disponível em: <http://ojs.kmutnb.ac.th/index.php/ijst/article/view/5238>. Acesso em: 14 fev. 2023.

PATEL, A.; SHAH, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. **Journal of Bioresources and Bioproducts**, v. 6, n. 2, p. 108–128, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jobab.2021.02.001>.

PENG, L.; CHEN, Y. Conversion of paper sludge to ethanol by separate hydrolysis and fermentation (SHF) using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 4, p. 1600–1606, abr. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.01.059>.

PEREZ, Caroline L.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; GIORDANO, R. C.; THEVELEIN, J. M.; GIORDANO, R. de L. C.; ZANGIROLAMI, T. C. Unraveling continuous 2G ethanol production from xylose using hemicellulose

hydrolysate and immobilized superior recombinant yeast in fixed-bed bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 169, p. 107963, maio 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2021.107963>.

PEREZ, Caroline L.; PEREIRA, L. P. R. da C.; MILESSI, T. S.; SANDRI, J. P.; DEMEKE, M.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M.; ZANGIROLAMI, T. C. Towards a practical industrial 2G ethanol production process based on immobilized recombinant *S. cerevisiae*: Medium and strain selection for robust integrated fixed-bed reactor operation. **Renewable Energy**, v. 185, p. 363–375, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.12.044>.

PEREZ, C.L. **Produção de etanol 2G em reator de leito fixo e bioprocessamento consolidado utilizando leveduras recombinantes de última geração**. 2021. Universidade Federal de São Carlos, 2021.

PINTO, A.; CONTENTE, M. L.; TAMBORINI, L. Advances on whole-cell biocatalysis in flow. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 25, p. 100343, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.04.004>.

PRATTO, B.; CHANDGUDE, V.; DE SOUSA, R.; CRUZ, A. J. G.; BANKAR, S. Biobutanol production from sugarcane straw: Defining optimal biomass loading for improved ABE fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 148, p. 112265, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112265>.

RAFTERY, J. P.; KARIM, M. N. Economic viability of consolidated bioprocessing utilizing multiple biomass substrates for commercial-scale cellulosic bioethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 103, p. 35–46, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2017.05.012>.

RAJAN, K.; CARRIER, D. J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 62, p. 222–227, mar. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2014.01.013>.

RAMOS, Márcio Daniel N.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; MILESSI, T. S. SIMULTANEOUS ISOMERIZATION AND FERMENTATION (SIF) OF SUGARCANE BAGASSE HYDROTHERMAL HEMICELLULOSE HYDROLYSATE / ISOMERIZAÇÃO E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS (SIF) DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO HIDROTÉRMICO DE BAGAÇO DE CANA. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 8029–8042, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n1-545>.

RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos; MILESSI, T. S.; CANDIDO, R. G.; MENDES, A. A.; AGUIAR, A. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, v. 68, p. 103–119, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2022.03.007>.

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

REIDER APEL, A.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J. D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 19512, 19 jan. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep19512>.

RODIONOVA, M. V.; POUDYAL, R. S.; TIWARI, I.; VOLOSHIN, R. A.; ZHARMUKHAMEDOV, S. K.; NAM, H. G.; ZAYADAN, B. K.; BRUCE, B. D.; HOU, H. J. M.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Biofuel production: Challenges and opportunities. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 12, p. 8450–8461, mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.125>.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. [S. l.]: Casa do Pão, 2005.

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

SANDRI, J. P.; RAMOS, M. D. N.; PEREZ, C. L.; MESQUITA, T. J. B.; ZANGIROLAMI, T. C.; MILESSI, T. S. Bioreactor and process design for 2G ethanol production from xylose using industrial *S. cerevisiae* and commercial xylose isomerase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 191, p. 108777, fev. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108777>.

SASSNER, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 756–762, ago. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.12.010>.

SEKOAI, P. T.; AWOSUSI, A. A.; YORO, K. O.; SINGO, M.; OLOYE, O.; AYENI, A. O.; BODUNRIN, M.; DARAMOLA, M. O. Microbial cell immobilization in biohydrogen production: a short overview. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 38, n. 2, p. 157–171, 17 fev. 2018. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1312274>.

SHARMA, B.; LARROCHE, C.; DUSSAP, C.-G. Comprehensive assessment of 2G bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 313, p. 123630, out. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123630>.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. The limits to biocatalysis: pushing the envelope. **Chemical Communications**, v. 54, n. 48, p. 6088–6104, 2018. <https://doi.org/10.1039/C8CC02463D>.

SHULER, M.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2. ed. [S. l.]: Prentice Hall PTR, 2002.

SILVA, C. R.; ZANGIROLAMI, T. C.; RODRIGUES, J. P.; MATUGI, K.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L. C. An innovative biocatalyst for production of ethanol from xylose in a continuous bioreactor. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, n. 1, p. 35–42, jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.09.005>.

SILVA, G. M. **Avaliação de diferentes configurações de hidrólise enzimática e fermentação utilizando bagaço de cana-de-açúcar para produção de etanol 2G.** 2015. Universidade Federal de São Carlos, 2015.

SIMÕES, I. R.; BRONDI, M. G.; FARINAS, C. S. In-House Extracted Soybean Protein Can Reduce the Enzyme Dosage in Biomass Saccharification. **Fermentation**, v. 9, n. 2, p. 142, 31 jan. 2023. <https://doi.org/10.3390/fermentation9020142>.

SINGH, N.; MATHUR, A. S.; GUPTA, R. P.; BARROW, C. J.; TULI, D.; PURI, M. Enhanced cellulosic ethanol production via consolidated bioprocessing by *Clostridium thermocellum* ATCC 31924☆. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 860–867, fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.11.048>.

SINGHANIA, R. R.; PATEL, A. K.; SINGH, A.; HALDAR, D.; SOAM, S.; CHEN, C.-W.; TSAI, M.-L.; DONG, C.-D. Consolidated bioprocessing of lignocellulosic biomass: Technological advances and challenges. **Bioresource Technology**, v. 354, p. 127153, jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127153>.

SMICHI, N.; MESSAOUDI, Y.; MOUJAHED, N.; GARGOURI, M. Ethanol production from halophyte *Juncus maritimus* using freezing and thawing biomass pretreatment. **Renewable Energy**, v. 85, p. 1357–1361, jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2015.07.010>.

SOARES, R. C.; ZANGIROLAMI, T. C.; GIORDANO, R. L. C.; DEMEKE, M. M.; THEVELEIN, J. M.; MILESSI, T. S. Cell Immobilization Using Alginate-Based Beads as a Protective Technique against Stressful Conditions of Hydrolysates for 2G Ethanol Production. **Polymers**, v. 14, n. 12, p. 2400, 14 jun. 2022. <https://doi.org/10.3390/polym14122400>.

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

SONG, X.; LI, Y.; WU, Y.; CAI, M.; LIU, Q.; GAO, K.; ZHANG, X.; BAI, Y.; XU, H.; QIAO, M. Metabolic engineering strategies for improvement of ethanol production in cellulolytic *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 8, 1 dez. 2018. DOI 10.1093/femsyr/foy090. Disponível em: <https://academic.oup.com/femsyr/article/doi/10.1093/femsyr/foy090/5071949>. Acesso em: 16 fev. 2023.

SUN, Jianhong; DENG, Y.; LI, S.; XU, W.; LIU, G. Enhanced efficiency of enzymatic hydrolysis of wheat straw via freeze–thaw pretreatment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 37, p. 56696–56704, ago. 2022. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-18893-w>.

SUN, Jie; WEN, F.; SI, T.; XU, J.-H.; ZHAO, H. Direct Conversion of Xylan to Ethanol by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strains Displaying an Engineered

Minihemicellulosome. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 11, p. 3837–3845, 2012. .

SURIYACHAI, N.; WEERASAIA, K.; LAOSIRIPOJANA, N.; CHAMPREDA, V.; UNREAN, P. Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitis* co-culture using design of experiments. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 171–178, ago. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.05.003>.

SUZANA, C. udia S. M.; CLAUDIA, M.; A, M.; LARISSA GUEDES FIUACUTE ZA, M. C. o; RA, T. dde S. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 28, p. 4412–4418, 31 jul. 2013. <https://doi.org/10.5897/AJB12.2677>.

TAYLOR, A.; MOLZAHN, P.; BUSHNELL, T.; CHENEY, C.; LAJEUNESSE, M.; AZIZIAN, M.; SEMPRINI, L. Immobilization of *Methylosinus trichosporium* OB3b for methanol production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 45, n. 3, p. 201–211, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1007/s10295-018-2010-z>.

TIAN, M.; LI, Q.; LIU, Y.; ZHENG, P.; LI, D.; ZHAO, Y.; WANG, B.; LI, C.; WANG, J.; GAO, P.; TANG, Q.; ZHANG, X.; WU, H. Relationship between delayed luminescence emission and mitochondrial status in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 394, 10 jan. 2022. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04290-9>.

TOIVARI, M. H.; SALUSJÄRVI, L.; RUOHONEN, L.; PENTTILÄ, M. Endogenous Xylose Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 6, p. 3681–3686, jun. 2004. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3681-3686.2004>.

TOSCANO MIRANDA, N.; LOPES MOTTA, I.; MACIEL FILHO, R.; WOLF MACIEL, M. R. Sugarcane bagasse pyrolysis: A review of operating conditions and products properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 149, p. 111394, out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.111394>.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W.-H. Biorefineries in circular bioeconomy: A comprehensive review. **Bioresource Technology**, v. 299, p. 122585, mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122585>.

UNREAN, P.; KHAJEERAM, S.; LAOTENG, K. Systematic optimization of fed-batch simultaneous saccharification and fermentation at high-solid loading based on enzymatic hydrolysis and dynamic metabolic modeling of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 5, p. 2459–2470, mar. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7173-1>.

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

VOLTATÓDIO, M. L. **Caracterização bioquímica e biofísica da Celobiohidrolase II do fungo *Trichoderma harzianum* IOC3844 produzida por expressão homóloga.** 2012. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

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

WANG, X. M.; WANG, L. J.; YU, M.; CHEN, H. Freeze-Thaw and Sulfuric Acid Pretreatment of Wheat Straw for Fermentable Sugar Release. **Advanced Materials Research**, v. 724–725, p. 257–260, ago. 2013. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.724-725.257>.

XIAO, Z.; ZHANG, X.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Effects of Sugar Inhibition on Cellulases and β -Glucosidase During Enzymatic Hydrolysis of Softwood Substrates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 115, n. 1–3, p. 1115–1126, 2004. <https://doi.org/10.1385/ABAB:115:1-3:1115>.

YAMADA, R.; NAKATANI, Y.; OGINO, C.; KONDO, A. Efficient direct ethanol production from cellulose by cellulase- and cellodextrin transporter-co-expressing *Saccharomyces cerevisiae*. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 34, dez. 2013. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-34>.

YAMADA, R.; TANIGUCHI, N.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct ethanol production from cellulosic materials using a diploid strain of *Saccharomyces cerevisiae* with optimized cellulase expression. **Biotechnology for Biofuels**, v. 4, n. 1, p. 8, dez. 2011. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-4-8>.

YANASE, S.; HASUNUMA, T.; YAMADA, R.; TANAKA, T.; OGINO, C.; FUKUDA, H.; KONDO, A. Direct ethanol production from cellulosic materials at high temperature using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* displaying cellulolytic enzymes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 381–388, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2784-z>.

YANG, P.; ZHANG, H.; JIANG, S. Construction of recombinant sesc *Saccharomyces cerevisiae* for consolidated bioprocessing, cellulase characterization, and ethanol production by in situ fermentation. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, p. 192, dez. 2016. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0512-9>.

YUE, P.; HU, Y.; TIAN, R.; BIAN, J.; PENG, F. Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides: A review. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126075, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126075>.

ZHAO, L.; SUN, Z.-F.; ZHANG, C.-C.; NAN, J.; REN, N.-Q.; LEE, D.-J.; CHEN, C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 343, p. 126123, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126123>.

ZHAO, X.; KERPES, R.; BECKER, T. Evaluation of microtiter plate as a high-throughput screening platform for beer fermentation. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 7, p. 1831–1846, jul. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04009-8>.