

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

RENAN KIISTER DIAS

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO LEVEDURA RECOMBINANTE DE  
ALTA PERFORMANCE A PARTIR DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

SÃO CARLOS, SP  
2025

RENAN KIISTER DIAS

PRODUÇÃO DE 2,3-BUTANODIOL UTILIZANDO LEVEDURA RECOMBINANTE DE  
ALTA PERFORMANCE A PARTIR DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
CANA-DE-AÇÚCAR

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

Orientadora: Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves

SÃO CARLOS, SP  
2025



**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 Renan Kiister Dias, realizada em 25/02/2025.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves (UFSCar)

Profa. Dra. Raquel de Sousa Paredes (CNPEM)

Prof. Dr. Adilson Jose da Silva (UFSCar).

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

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho à minha vó, Maria  
Kiister (In Memoriam).*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, César de Alencar de Mello Dias e Sandra Maria Kiister Dias, por todo o suporte emocional e financeiro, além de sempre depositarem extrema confiança em mim, acreditando no meu potencial e nos meus sonhos.

À minha irmã, Lorrane Kiister Dias, e aos demais familiares que contribuíram para que eu alcançasse minhas conquistas pessoais.

A todos os meus amigos especiais, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, apoiando e incentivando-me em todas as decisões, especialmente a Elivelton Dorattioto, Eduardo Schwiderke e Leonardo Schwiderke.

À Laila Bratiliari, minha querida amiga, pelo carinho, amor e por ser meu alicerce durante o projeto, além de me inspirar a ter confiança em mim e em minhas capacidades. Aos meus colegas de laboratório, pela receptividade, compreensão e por toda a ajuda dentro e fora dos laboratórios.

Aos demais colegas de pós-graduação, pelas conexões criadas e por qualquer auxílio prestado a mim.

Aos professores, técnicos e demais servidores da UFSCar, que contribuíram tanto para o meu desenvolvimento pessoal quanto para a realização da pesquisa durante o mestrado. Ao Prof. Dr. Johan M. Thevelein (KU Leuven/VIB, Bélgica), por conceder a levedura para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos (PPGEQ-UFSCar) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES – Código de financiamento 001), pelo apoio financeiro.

À minha orientadora, Profa. Dra. Thais Suzane Milessi Esteves, pelos conselhos e mais diversos ensinamentos, sendo o modelo ideal de professora e pesquisadora que quero seguir. Agradeço também pela compreensão, paciência e disponibilidade durante o projeto.

À minha avó, Maria Kiister (in memoriam), que sempre me apoiou nos estudos e me guiava na busca por minhas realizações.

A Deus.

## RESUMO

Diante da necessidade da transição da matriz energética mundial, o desenvolvimento biorrefinarias integradas surge como uma alternativa, promovendo a conversão de subprodutos em produtos de interesse à sociedade por meio de processos sustentáveis. Dentre os subprodutos disponíveis em abundância no Brasil, aqueles provenientes do processamento da cana se destacam, como o melaço e o bagaço de cana. O 2,3-butanodiol (BDO), por sua vez, é um composto químico de grande relevância industrial que possui ampla gama de aplicações, o qual é tradicionalmente produzido por rota não-renovável. Sua produção a partir de fontes renováveis representa um avanço significativo do ponto de vista de sustentabilidade. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo contribuir para o desenvolvimento de um processo de produção de BDO a partir de subprodutos do processamento da cana-de-açúcar utilizando a levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* HGS37. Primeiramente, avaliou-se a performance da cepa utilizando melaço como substrato. Apesar de apresentar metabolismo mais lento do que em glicose por conta da etapa de hidrólise da sacarose, a cepa foi capaz de produzir 56,1 g/L de BDO com uma produtividade de 0,6 g/L/h ao utilizar melaço. Adicionalmente, o uso deste subproduto rico em nutrientes permitiu a remoção da suplementação do meio. Em seguida, as condições de processo foram avaliadas por meio de um planejamento experimental  $2^3$  variando densidade ótica inicial ( $DO_0$  5-50), pH (4-6) e concentração inicial de etanol (5-40 g/L), onde observou-se que a concentração inicial de células impacta significativamente a produção de BDO, com a maior conversão de açúcares e produção de BDO (69,5% e 54,67 g/L) obtidas utilizando  $DO_0$  50, pH 6 e 5g/L de etanol. Neste sentido, visando aumentar a carga de células no processo, a imobilização celular aumentou significativamente a eficiência da cepa em melaço, alcançando resultados notáveis em produção de BDO (122,99 g/L) e produtividade (1,28 g/L/h). A levedura também apresentou bom desempenho em hidrolisado de bagaço de cana sem destoxificação, atingindo 92,15% do rendimento teórico de BDO. Por fim, a produção de BDO em um processo integrado utilizando hidrolisado e melaço mostrou-se uma estratégia interessante para alcançar concentrações elevadas de BDO, acima de 100 g/L, em menor tempo de processo (reduzindo de 96 para 72 horas). Esses resultados reforçam o potencial da cepa HGS37 e a viabilidade técnica da produção de BDO por fermentação utilizando melaço e hidrolisado lignocelulósico como substratos.

**Palavras chaves:** 2,3-Butanodiol; Biorrefinaria; *Saccharomyces cerevisiae*; Levedura recombinante; Melaço; Biomassa lignocelulósica

## ABSTRACT

In light of the global need to transition the current energy matrix, the development of integrated biorefineries emerges as a promising alternative by enabling the conversion of by-products into value-added compounds through sustainable processes. Among the abundantly available by-products in Brazil, those derived from sugarcane processing—such as molasses and bagasse—are particularly noteworthy. 2,3-Butanediol (BDO) is a highly relevant chemical compound with a wide range of industrial applications and is traditionally produced via non-renewable routes. Its production from renewable sources represents a significant advance in terms of sustainability. In this context, the present study aimed to contribute to the development of a BDO production process using by-products from sugarcane processing and the recombinant yeast *Saccharomyces cerevisiae* HGS37. Initially, the performance of the strain was evaluated using molasses as the substrate. Despite exhibiting a slower metabolism compared to glucose due to the need for sucrose hydrolysis, the strain was able to produce 56.1 g/L of BDO with a productivity of 0.6 g/L/h when cultivated in molasses. Additionally, the nutrient-rich composition of molasses enabled the elimination of medium supplementation. Subsequently, process conditions were assessed through a 2<sup>3</sup> factorial experimental design, varying initial optical density (OD<sub>600</sub> 5–50), pH (4–6), and initial ethanol concentration (5–40 g/L). The results indicated that the initial cell density significantly influenced BDO production, with the highest sugar conversion (69.5%) and BDO titer (54.67 g/L) achieved under conditions of OD<sub>600</sub> 50, pH 6, and 5 g/L ethanol. To further enhance cell loading, cell immobilization significantly improved the strain's performance in molasses, leading to remarkable BDO production (122.99 g/L) and productivity (1.28 g/L/h). The yeast also performed well in non-detoxified sugarcane bagasse hydrolysate, reaching 92.15% of the theoretical BDO yield. Finally, BDO production in an integrated process using both hydrolysate and molasses proved to be an effective strategy to achieve high BDO concentrations (above 100 g/L) in a shorter process time (reduced from 96 to 72 hours). These findings highlight the potential of the HGS37 strain and the technical feasibility of BDO production via fermentation using molasses and lignocellulosic hydrolysate as substrates.

**Keywords:** 2,3-Butanediol; Biorefinery; *Saccharomyces cerevisiae*; Recombinant yeast; Molasses; Lignocellulosic biomass.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b> Fluxograma de uma biorrefinaria para a produção de etanol 1G e açúcar a partir de cana-de-açúcar (Adaptado de Nogueira <i>et al.</i> , 2008). .....	19
<b>Figura 3.2.</b> Estrutura da biomassa lignocelulósica (Adaptado de NORFARHANA <i>et al.</i> , 2024). .....	22
<b>Figura 3.3.</b> Rompimento da estrutura lignocelulósica obtida a partir do pré-tratamento (Adaptado de RAMOS, 2023). .....	23
<b>Figura 3.4.</b> Diferentes tipos de pré-tratamentos existentes para materiais lignocelulósicos (adaptado de AGUIAR <i>et al.</i> , 2021). .....	24
<b>Figura 3.5.</b> Estrutura do 2,3-butanodiol (BDO) (Adaptado de KIM <i>et al.</i> , 2017). .....	27
<b>Figura 3.6.</b> Construção da cepa HGS37 de acordo com HUO <i>et al.</i> (2022). .....	36
<b>Figura 3.7.</b> Metabolismo da levedura recombinante <i>S. cerevisiae</i> HGS37 para produção de BDO (adaptado de HUO <i>et al.</i> , 2022). .....	40
<b>Figura 4.1.</b> Etapas de desenvolvimento do presente projeto para a produção de BDO utilizando a levedura HGS37. ....	42
<b>Figura 4.2.</b> Etapas de preparo do pré-inóculo e inóculo da levedura HGS37. ....	43
<b>Figura 4.3.</b> Beads da levedura HGS37 em solução de cura. ....	47
<b>Figura 5.1.</b> Produção de BDO (A) e consumo de açúcares redutores totais (ART) (B) pela levedura <i>S. cerevisiae</i> HGS37 em diferentes meios sintéticos (YPD(E) e YPS(E)) e industriais baseados em melaço (YPM(E) e M(E)) com e sem suplementação com extrato de levedura e peptona (YP). ....	51
<b>Figura 5.2.</b> Concentrações finais de sacarose, glicose e frutose nos experimentos do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para produção de BDO a partir de melaço usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm). .....	58
<b>Figura 5.3.</b> Acompanhamento das concentrações de açúcares no Experimento 4 do planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> para produção de BDO a partir de melaço usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (DO <sub>0</sub> =50; pH 6; [EtOH] <sub>0</sub> =5 g/L; 300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm). .....	58
<b>Figura 5.4.</b> Superfícies de resposta das variáveis estudadas no planejamento fatorial 2 <sup>3</sup> na produção de BDO a partir de melaço pela cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37. (A-C) Variação na produção de BDO; (D-F) Variação da produtividade; e (G-I) variação do rendimento. ....	62
<b>Figura 5.6.</b> Consumo de sacarose, glicose e frutose no experimento com células imobilizadas para produção de BDO a partir de melaço usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm). .....	66

<b>Figura 5.7.</b> Consumo de glicose e xilose no experimento usando hidrolisado lignocelulósico para produção de BDO a partir da cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (80 g/L de ART iniciais, 10 g/L de Y, 20 g/L de P, 30°C e 120 rpm). .....	68
<b>Figura 5.8.</b> Consumo de açúcares e etanol versus produção de BDO e glicerol do experimento com hidrolisado para produção de BDO pela cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (80 g/L de ART iniciais, 10 g/L de Y, 20 g/L de P, 30°C e 120 rpm). .....	70
<b>Figura 5.9.</b> Consumo de sacarose, glicose, xilose e frutose no experimento com hidrolisado suplementado com melaço para produção de BDO usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (80 g/L de ART iniciais, com adição de 150g/L de ART, 30°C e 120 rpm). .....	72
<b>Figura 5.10.</b> Consumo de açúcares e etanol versus produção de BDO e glicerol do experimento com hidrolisado suplementado com melaço para produção de BDO usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (80 g/L de ART iniciais, com adição de 150g/L de ART, 30°C e 120 rpm).....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b> Composição química do melão de cana-de-açúcar.....	20
<b>Tabela 3.2.</b> Comparação entre cepas recombinantes produtoras de BDO.....	33
<b>Tabela 4.1.</b> Diferentes composições dos meios de cultivo avaliados para a produção de BDO. .....	44
<b>Tabela 4.2.</b> Variáveis estudadas e seus respectivos níveis no planejamento fatorial para produção de BDO pela <i>S. cerevisiae</i> HGS37 a partir de melão de cana-de-açúcar.....	45
<b>Tabela 4.3.</b> Matriz do planejamento fatorial para avaliação das condições de produção de BDO pela <i>S. cerevisiae</i> HGS37 a partir de melão de cana-de-açúcar.....	46
<b>Tabela 4.4.</b> Parâmetros fermentativos utilizados para avaliar a produção de BDO com a levedura HGS37 (SHULER e KARGI, 2002).....	49
<b>Tabela 5.1.</b> Parâmetros fermentativos da produção de BDO pela cepa <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i> HGS37 usando meio à base de melão. Letras iguais representam que as medias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%. .....	53
<b>Tabela 5.2.</b> BDO produzido e parâmetros fermentativos do planejamento experimental 2 <sup>3</sup> realizado variando DO inicial, concentração inicial de etanol e pH inicial do cultivo usando a cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm).....	57
<b>Tabela 5.3.</b> Efeitos e coeficientes das variáveis concentração inicial de células (DO), concentração inicial de etanol e do pH inicial na fermentação de melão por <i>S. cerevisiae</i> HGS37 pelo delineamento fatorial 2 <sup>3</sup> com 4 repetições no ponto central (condições de processo: 300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm). Efeitos significativos a 90% de confiança (p<0,1) destacados em vermelho.....	60
<b>Tabela 5.4.</b> BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando células imobilizadas e melão como substrato.....	65
<b>Tabela 5.5.</b> BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando hidrolisado como substrato.....	69
<b>Tabela 5.6.</b> BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando hidrolisado como substrato.....	71
<b>Tabela 5.7.</b> Comparativo entre os experimentos realizados utilizando a HGS37.....	75

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>12</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
3.1	Desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis .....	16
3.2	Subprodutos do processamento da cana-de-açúcar .....	18
3.3	Processamento da biomassa.....	21
3.4	Hidrólise enzimática .....	25
3.5	2,3-Butanodiol (BDO).....	26
3.6	Microrganismos produtores de 2,3-Butanodiol .....	29
3.7	Desenvolvimento de microrganismos para produção de 2,3-Butanodiol .....	30
3.8	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HGS37 .....	35
3.9	Metabolismo da cepa <i>S. cerevisiae</i> HGS37 .....	39
3.8	Imobilização celular .....	40
<b>4.</b>	<b>MÉTODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
4.1	Microrganismo e inóculo.....	43
4.2	Seleção das condições de processo para a produção de BDO .....	44
4.3	Seleção das condições de processo por planejamento fatorial.....	45
4.4	Imobilização celular e cultivo com células imobilizadas .....	46
4.5	Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar .....	47
4.6	Produção de BDO utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado suplementado com melaço.....	47
4.7	Métodos analíticos .....	48
4.7.1	Viabilidade celular .....	48
4.7.2	Quantificação de substratos e produtos.....	48
4.7.3	Cálculos.....	49
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>
5.1	Performance da cepa HGS37 em melaço de cana-de-açúcar .....	51
5.2	Seleção das condições de produção de BDO em melaço de cana-de-açúcar 56	
5.3	Performance da HGS37 imobilizada .....	64
5.4	Performance da HGS37 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.....	67
5.5	Intensificação da produção de BDO utilizando hidrolisado e melaço de cana 70	

<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

## 1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O aquecimento global representa uma grande ameaça a biodiversidade animal e vegetal e por isso é uma das pautas de maior preocupação no atual cenário geopolítico (YUAN *et al.*, 2022). Atualmente, os combustíveis fósseis são as principais fontes de energia e para muitos especialistas e pesquisadores ambientais também são os principais responsáveis pelos danos ambientais e atmosféricos presenciados na atualidade (NONG; SIMSHAUSER; NGUYEN, 2021).

Para minimizar as previsões sobre o aquecimento global, iniciativas são firmadas entre diferentes nações, como o acordo de Paris na 21ª Conferência das Partes (COP21), onde 196 países se responsabilizaram em reduzir as emissões de gases de efeito estufa em um contexto de desenvolvimento sustentável. Mais recentemente, na Conferência das Partes (COP28), realizada em Dubai, Emirados Árabes Unidos, em 2023, a urgência de uma transição energética global foi enfatizada, a qual deve ser baseada em processos sustentáveis, com matérias primas renováveis (BRASIL, 2024).

Nesse contexto, surge o conceito de biorrefinaria como uma estratégia importante para a transição energética global para uma matriz renovável, a qual consiste em uma unidade industrial que contempla uma ampla conversão de biomassa vegetal em biocombustíveis e químicos de alto valor agregado com o objetivo de substituir os recursos fósseis (RAMOS, 2023). A lignina, a celulose e a hemicelulose são os principais componentes da biomassa vegetal e são valorizadas pelas biorrefinarias de forma que o interesse principal é na criação de rotas produtivas que transformem esse material lignocelulósico em produtos de alto valor agregado (USMANI *et al.*, 2021). A utilização dessas matrizes biológicas para a produção de combustíveis é uma estratégia de integração desses insumos na indústria defendida pela economia circular, que visa a produção em larga escala de produtos aliando o ser sustentável com a rentabilidade (UBANDO; FELIX; CHEN, 2020).

O potencial da biomassa como matéria prima em processos fermentativos está ligado à sua composição, onde celulose e hemicelulose são frações ricas em açúcares fermentescíveis. Porém, para se utilizar a biomassa lignocelulósica é necessário que antes haja um pré-tratamento, que consiste na quebra da estrutura recalcitrante da biomassa para que ocorra a liberação da celulose e da hemicelulose da estrutura da matriz da lignina (KUMAR; VERMA, 2021). Essa etapa tem por objetivo facilitar o acesso aos açúcares fermentescíveis para o processo de sacarificação e aumentar o rendimento do produto. O passo subsequente ao pré-tratamento da biomassa é a hidrólise, etapa onde as frações celulósica e hemicelulósica são

convertidas em açúcares fermentescíveis, geralmente pela ação de enzimas hidrolíticas, de forma que o grande desafio dessa etapa é o custo elevado dos coquetéis enzimáticos necessários (RAMOS, 2023).

No Brasil, a biomassa mais abrangente é a cana-de-açúcar, cuja produção, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) está estimada em 678,67 milhões de toneladas de cana na safra de 2024/25. Os principais produtos feitos a partir do processamento da cana de açúcar são o etanol e o açúcar, cuja produção ultrapassa os 36,08 bilhões de litros para o biocombustível e 44 milhões de toneladas para o açúcar (BRASIL, 2024). Além do mais, o processamento da cana-de-açúcar gera subprodutos com potencial como matéria-prima em bioprocessos para obtenção de diversos produtos de interesse a sociedade, sendo que os principais são o melaço, a palha e o bagaço de cana (BRASIL, 2023).

Um importante composto que pode ser produzido a partir de subprodutos do processamento da cana de açúcar é o 2,3-butanodiol (BDO), um produto químico de plataforma com inúmeras aplicações industriais. O BDO pode ser convertido em um aditivo de combustível atraente, também tem seu uso como agente anticongelante, além de poder ser convertido em monômeros para a produção de borracha sintética. Atualmente, sua produção está relacionada a processos químicos a partir do petróleo por meio da hidrólise do óxido de 2,3-butano em um processo com uso intenso de energia e prejudicial ao meio ambiente (HUO *et al.*, 2022).

A produção de compostos de alto valor agregado a partir de biomassa por bioprocessos é a alternativa mais interessante na transição da matriz energética, uma vez que podem contribuir significativamente para a viabilidade econômica da biorrefinaria baseada em biomassa lignocelulósica. Graças aos avanços na engenharia genética, a produção microbiana de BDO tem se tornado promissora. O desafio enfrentando nesse tipo de produção são os baixos rendimentos e altos custos de produção, o que leva à necessidade do desenvolvimento de cepas de microrganismos eficientes, capazes de utilizar substratos baratos e de fácil acesso para que o BDO se torne uma plataforma química acessível (HAKIZIMANA; MATABARO; LEE, 2020).

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 que foi desenvolvida pelo grupo do Prof. Johan M. Thevelein da NovelYeastbv (Bélgica) é um destaque na produção de BDO visto que exibiu um rendimento de 96% do máximo teórico (0,51 g/g) em cultivos com as células livres utilizando glicose como substrato, atingindo 120-130 g/L de BDO e uma alta produtividade de 1,58 g/L/h com níveis mínimos de acetoína e glicerol produzidos como subprodutos (HUO *et al.*, 2022). Estes valores são significativamente superiores aos comparados na literatura, como

reportado por Amraoui *et al.* (2022); Lee et al., (2022); Roncal *et al.* (2023) que obtiveram concentrações de BDO de 9,5g/L; 69,2 g/L e 18g/L, respectivamente.

Porém, muitos esforços vêm sendo dedicados ao desenvolvimento de novas cepas, mas pouco da engenharia de bioprocessos para a produção de BDO é explorado, de forma a se obter um processo escalonável. Adicionalmente, há uma carência de estudos de produção BDO utilizando meios industriais, o que torna de grande relevância a avaliação destes microrganismos em condições reais de processo, uma vez que a presença de compostos inibidores do metabolismo microbiano provenientes da etapa de pré-tratamento, assim como a presença de lignina residual, pode interferir significativamente no desempenho da levedura, levando à baixos rendimentos e produtividades.

A imobilização celular, por sua vez, é uma técnica que além de permitir a fácil recuperação das células, pode aumentar a produtividade e a estabilidade do biocatalisador, uma vez que permite o uso de elevada carga celular e a matriz de imobilização cria um efeito protetor às células por conta do microambiente dentro das esferas do biocatalisador (SOARES et al., 2022). Outro aspecto que reforça a importância da imobilização celular é a simplificação dos processos de separação e purificação dos produtos, devido à ausência de células livres no meio. Essa característica torna a imobilização celular uma estratégia promissora para otimizar o desempenho produtivo de microrganismos em fermentações e outros bioprocessos (ZHENG; LIANG, 2024).

Dessa forma, o presente trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia escalonável para a produção de BDO, empregando a levedura recombinante de alto desempenho HGS37. O processo proposto integra o uso de subprodutos do processamento da cana-de-açúcar, utilizando como substratos tanto o melaço, proveniente da produção de açúcar, quanto o bagaço de cana, obtido após a moagem da matéria-prima.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho foi contribuir para o desenvolvimento de estratégias para a valorização de subprodutos de cana-de-açúcar na produção de 2,3-butanodiol (BDO) utilizando a levedura recombinante de alta performance *Saccharomyces cerevisiae* HGS37.

Objetivos específicos:

- Avaliar a performance da levedura HGS37 na produção de BDO utilizando melão de cana como substrato e selecionar as condições de processo mais adequadas;
- Avaliar a produção de BDO utilizando células imobilizadas;
- Avaliar a performance da levedura HGS37 na produção de BDO utilizando hidrolisado celulósico de cana como substrato;
- Estudar a produção de BDO a partir de meios industriais reais baseados em melão de cana e hidrolisado celulósico de bagaço de cana, considerando um processo integrado.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Desenvolvimento de bioprocessos sustentáveis

O aquecimento global constitui uma ameaça significativa à biodiversidade terrestre e, devido aos seus impactos abrangentes, configura-se como uma das principais questões de preocupação no cenário geopolítico contemporâneo. Esse fenômeno pode ser retratado como o aumento da temperatura média da terra, que é ocasionado graças ao aumento exponencial dos gases do efeito estufa proporcionado após a revolução industrial (YUAN *et al.*, 2022). O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o gás de efeito estufa mais abundante, sendo responsável por cerca de 55% da composição das emissões de gases do efeito estufa no mundo. A liberação de CO<sub>2</sub> na atmosfera está extremamente ligada a queima de combustíveis fósseis para a geração de eletricidade e calor, transporte e inúmeras outras aplicações (GRANGEIA; SANTOS; LAZARO, 2022).

A projeção para o futuro acerca do efeito estufa e os gases que o compõem causam preocupação em inúmeras nações, visto que é esperado que as emissões de CO<sub>2</sub> aumentem em 37 gigatoneladas até 2035 e que a temperatura média da terra aumente em 2°C até 2100 (KIEHBADROUDINEZHAD *et al.*, 2023). Esse aumento deriva do crescimento populacional mundial e do progresso industrial, que apesar de acarretar vários benefícios também ocasiona um aumento na demanda por energia. Hoje, os combustíveis fósseis são as principais fontes de energia e os principais responsáveis pelos danos ambientais e atmosféricos presenciados na atualidade (NONG; SIMSHAUSER; NGUYEN, 2021).

Para reverter as previsões sobre o aquecimento global, em 2015 foi realizado o acordo de Paris na 21ª Conferência das Partes (COP21) da Convenção-Quadro das Nações Unidas sobre a Mudança do Clima (UNFCCC) em que 195 países integrantes aprovaram o acordo e se responsabilizaram em reduzir as emissões de gases de efeito estufa em um contexto de desenvolvimento sustentável. A geração de energia renovável e a eficiência energética são as principais pautas na descarbonização e na melhoria da qualidade ambiental (SHAH *et al.*, 2023).

O Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), por meio dos relatórios de avaliação (AR5 e AR6), destaca que mais de 90% das emissões de gases de efeito estufa são atribuídas a atividades humanas. O aumento no consumo de combustíveis fósseis tem sido um dos principais responsáveis pela elevação dessas emissões, com aproximadamente metade dos gases emitidos permanecendo na atmosfera, intensificando o aquecimento global (MEHMOOD *et al.*, 2024).

A mais recente Conferência das Partes (COP29), realizada em Baku, Azerbaijão, em 2024, trouxe à tona novos relatórios especiais do IPCC sobre mudanças climáticas. A COP29 foi marcada pelo lema "Solidariedade para um Mundo Verde" e teve como principal objetivo estabelecer uma nova meta de financiamento climático global. Entre os principais pontos discutidos, assim como na conferência anterior (COP28), o acordo estabelecido visa triplicar a capacidade global de geração de energia renovável, promovendo uma transição energética mais acelerada. Isso envolve a redução do uso de combustíveis fósseis e carvão mineral, além do aumento da adoção de combustíveis de transição e de tecnologias de captura de carbono e processos alternativos para obtenção de produtos tradicionalmente obtidos de fontes não renováveis (BRASIL, 2024).

Nesse contexto, surge o conceito de biorrefinaria como uma estratégia importante para a transição energética global, a qual consiste em uma unidade industrial que contempla um processo principal (espinha dorsal) e uma ampla variedade de processos integrados de conversão de biomassa em biocombustíveis e químicos de alto valor agregado com o objetivo de substituir os recursos fósseis (KUMAR; VERMA, 2021).

O principal motivo para as biorrefinarias ainda não serem a principal fonte de energia para o mundo, são os obstáculos técnicos, econômicos, sociais e regulatórios relacionados à sua implementação (MAKEPA; CHIHOBHO, 2024). Tendo em vista esses problemas, as biorrefinarias em geral, necessitam estar sempre evoluindo a partir de tecnologias emergentes para ter melhorias de rendimentos, na eficiência e competitividade frente ao mercado.

Existem diversos tipos de biorrefinarias, que podem utilizar uma ampla variedade de subprodutos e métodos para alcançar seus objetivos de produção, com destaque para as biorrefinarias de algas, as biorrefinarias lignocelulósicas e as biorrefinarias de resíduos urbanos (SHARMA *et al.*, 2025; RAMANDANI *et al.*, 2025). Entre os produtos obtidos por meio dessas instalações industriais, destacam-se os biocombustíveis, como biodiesel e etanol; combustíveis gasosos, como o biogás, biohidrogênio e biometano; ácidos orgânicos; pigmentos; biopolímeros; químicos de plataforma como butanodiol e propanodiol; e produtos de alto valor agregado como ácido hialurônico e xilooligossacarídeos (GAUR *et al.*, 2024; PATEL *et al.*, 2025). Adicionalmente, um fator crucial para a consolidação das biorrefinarias em comparação às refinarias tradicionais baseadas em combustíveis fósseis é a produção de produtos de alto valor agregado (HVLV – do inglês *High-value Low-volume*). Esses produtos possuem um valor unitário significativamente maior em relação aos produtos de baixo valor agregado (LVHV – do inglês *Low-value High-volume*). Exemplos de HVLV incluem produtos farmacêuticos,

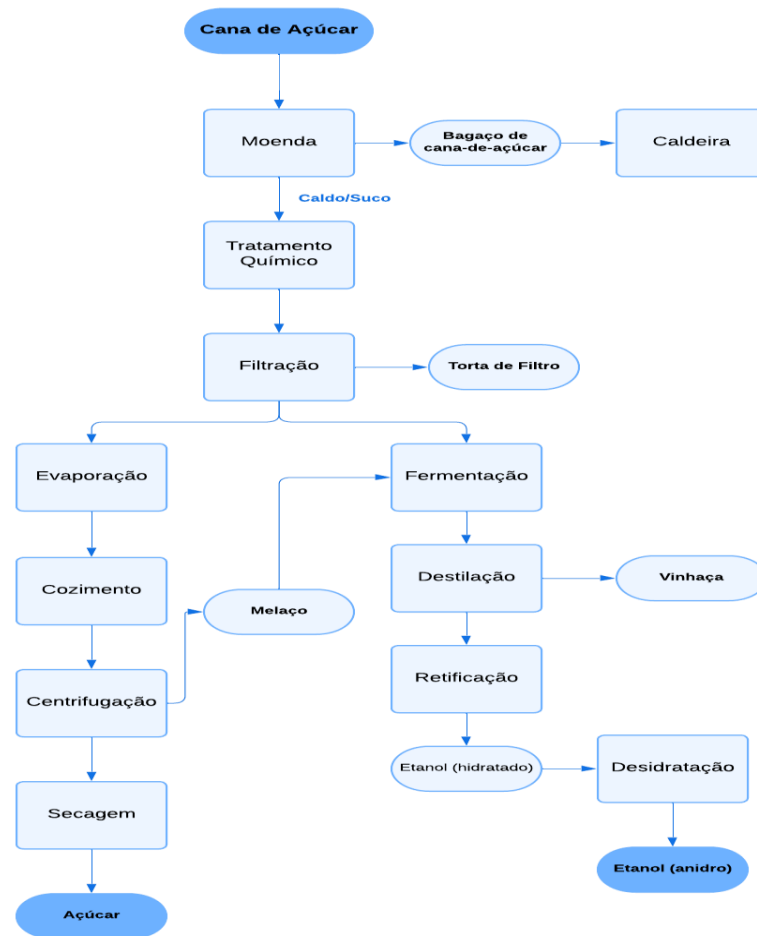
cosméticos e químicos, enquanto exemplos de LVHV são biocombustíveis (SADHUKHAN *et al.*, 2024).

Essa gama de produtos e processos que podem ser implementados nas biorrefinarias está alinhada ao conceito de economia circular, que busca minimizar a formação de resíduos, as emissões e as perdas de energia, além de otimizar o aproveitamento dos recursos, como a biomassa e os subprodutos do seu processamento. Isso é alcançado através da melhoria contínua dos processos e da implementação de novas tecnologias (GAFFEY *et al.*, 2024). Adicionalmente, a diversificação do portfólio de produtos de uma biorrefinaria pela inclusão de diferentes processos de produção de novos produtos por rotas sustentáveis, pode contribuir expressivamente com a viabilidade econômica da planta (MANICARDI *et al.*, 2023). Um produto de alto valor agregado (HVLV) com inúmeras aplicações e que pode ser produzido por rotas biológicas utilizando subprodutos do processamento de cana-de-açúcar é o 2,3-butanodiol (BDO). A inclusão do BDO na cadeia produtiva das biorrefinarias não só agregaria valor significativo, mas também otimizaria o aproveitamento máximo da biomassa (GOUWS *et al.*, 2024).

### **3.2 Subprodutos do processamento da cana-de-açúcar**

No Brasil, a maior parte das biorrefinarias atuais concentra-se na coprodução de açúcar, etanol e bioeletricidade utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima. De acordo com a Figura 3.1, nota-se que o processamento da cana-de-açúcar nas biorrefinarias brasileiras gera diversos subprodutos, como a palha e o bagaço da cana, o melaço proveniente da produção de açúcar, a vinhaça e CO<sub>2</sub>, cada um deles adequado para diferentes usos (BATLLE *et al.*, 2022). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a produção de cana-de-açúcar, etanol e açúcar no Brasil na safra de 2024/25 está estimada respectivamente em 678,67 milhões de toneladas de cana, 36,08 bilhões de toneladas para o biocombustível e 44 milhões de toneladas de açúcar (BRASIL, 2024).

**Figura 3.1.** Fluxograma de uma biorrefinaria para a produção de etanol 1G e açúcar a partir de cana-de-açúcar (Adaptado de Nogueira *et al.*, 2008).



O melço da cana-de-açúcar é um subproduto da produção de açúcar. É um líquido viscoso, de cor marrom escuro e odor pronunciado, composto por aproximadamente 50% (m/m) de açúcar contendo (principalmente sacarose, glicose e frutose), juntamente com outros nutrientes, como ácidos orgânicos, vitaminas e minerais, bem como teor de nitrogênio variando de 0,5% a 0,9% (m/v) (Tabela 3.1), sendo um subproduto interessante para ser utilizado como substrato em bioprocessos em biorrefinarias integradas (EL ASRI *et al.*, 2023; VANDENBERGHE *et al.*, 2022).

**Tabela 3.1.** Composição química do melaço de cana-de-açúcar.

Referências	Matéria seca (%)	Sacarose (%)	Cinzas (%)	Proteínas (%)	Nitrogênio g/Kg
PALMONARI <i>et al.</i> , (2020)	76,8	48,8	13,1	6,7	0,46
ASSIS <i>et al.</i> , (2023)	73,2	40,2	2,0	6,3	-
MORDENTI <i>et al.</i> ,(2021)	72,0	49,0	9,0	3,7	-
AKAR; CANBAZ, (2016)	82,0	50,3	14,0	-	-
MALAIKA <i>et al.</i> , (2025)	60,0	40-68,5	-	-	-
Média	72,8	48,5	9,5	5,6	0,46

O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o principal gás responsável pelo efeito estufa e desempenha um papel fundamental no ciclo do carbono, atuando em diversos processos naturais e industriais. Nas refinarias, independentemente de sua natureza, o CO<sub>2</sub> é emitido para a atmosfera como um resíduo dos processos fermentativos assim como na queima dos compostos de origem fóssil, contribuindo para o aumento das concentrações atmosféricas desse gás e, conseqüentemente, para o agravamento do aquecimento global (PÉREZ- HERNÁNDEZ *et al.*, 2023). Pesquisas recentes afirmam que caso a concentração de CO<sub>2</sub> dobre, os efeitos adversos ocasionados por esse gás na atmosfera aumentariam cerca de 25% (SUN *et al.*, 2024).

Nas biorrefinarias, o CO<sub>2</sub> é amplamente produzido, como por exemplo na produção de bioetanol por fermentação (0,48 gCO<sub>2</sub>/gAçúcar) a partir de biomassa. Nessas plantas industriais, o ciclo do carbono pode ser parcialmente compensado pela captura de CO<sub>2</sub> da atmosfera durante o cultivo de biomassa, como por exemplo a cana-de-açúcar. Durante o crescimento, as plantas absorvem CO<sub>2</sub> por meio da fotossíntese, contribuindo para a mitigação das emissões geradas nos processos industriais, o que torna o ciclo de carbono mais sustentável em comparação com fontes fósseis de energia (LUO *et al.*, 2024).

A vinhaça (também denominada resíduo de lavagem, vinhaça rala ou efluente de destilaria) é um subproduto gerado durante a destilação para recuperação do etanol produzido. Quando tratada adequadamente, a vinhaça apresenta potencial para ser considerada um subproduto valioso, devido às suas propriedades e ao conteúdo de sua estrutura composta principalmente de moléculas orgânicas, incluindo ácidos, açúcares, álcoois, cetonas, aldeídos e ésteres. A partir da digestão anaeróbica da vinhaça por bactérias, é possível produzir biogás, o

que destaca ainda mais seu valor como recurso renovável quando tem o seu uso de forma adequada (MELLYANAWATY *et al.*, 2024).

A vinhaça, quando não adequadamente tratada, deixa de ser um subproduto para se tornar um resíduo altamente poluente, sendo significativamente mais agressiva que o esgoto doméstico. Isso se deve à sua composição rica em matéria orgânica, açúcares residuais, álcool, compostos não voláteis, fenóis, polifenóis, melanoidinas e metais pesados (SILVA *et al.*, 2024). Além disso, a vinhaça pode alterar o pH de ecossistemas aquáticos e apresenta uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), o que a torna um potencial contaminante do solo, bem como das águas subterrâneas e superficiais, agravando os impactos ambientais (DIAS *et al.*, 2024).

Outro subproduto de grande relevância, com ampla gama de aplicações, é a palha da cana-de-açúcar. Trata-se de um material lignocelulósico rico em nutrientes, composto principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. Além de seu potencial como matéria-prima para processos biotecnológicos, a palha desempenha um papel crucial na proteção do solo, atuando como uma camada de cobertura que favorece a recomposição de nutrientes. Esse material também contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, reforçando sua importância tanto ambiental quanto econômica (FIORANELLI; BIZZO, 2023).

O subproduto mais abundante resultante do processamento da cana-de-açúcar é o bagaço de cana-de-açúcar. Este material é constituído predominantemente por celulose (26-47%), hemicelulose (19-33%) e lignina (14-25%) (SIRIWONG *et al.*, 2024). Essa biomassa é gerada em larga escala nos setores agroindustriais e agrícolas, sendo principalmente utilizada para a produção de energia. Por meio dos bioprocessos realizados em biorrefinarias, o bagaço representa matéria-prima importante a ser utilizada na produção de uma ampla variedade de produtos (HASSA *et al.*, 2024). O bagaço de cana corresponde, em média, a 25–30% da massa da cana-de-açúcar processada. Isso significa que, para cada tonelada de cana moída, são gerados aproximadamente 250 a 300 kg de bagaço úmido. Esse valor pode variar dependendo do teor de fibra da cana, da eficiência da extração do caldo e do tipo de equipamento utilizado no processamento. Além disso, o bagaço gerado apresenta, em geral, um teor de umidade em torno de 50% (MATOS *et al.*, 2021).

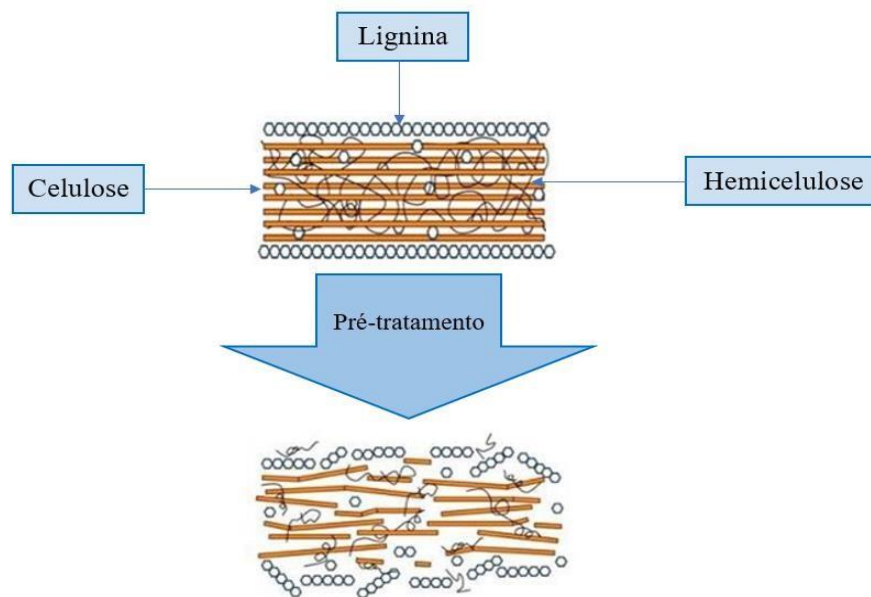
### **3.3 Processamento da biomassa**

O potencial da biomassa lignocelulósica como matéria-prima está relacionado com sua composição, a qual é formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina (Figura 3.2). Estes materiais são valorizados pelas biorrefinarias de forma que o interesse principal é na



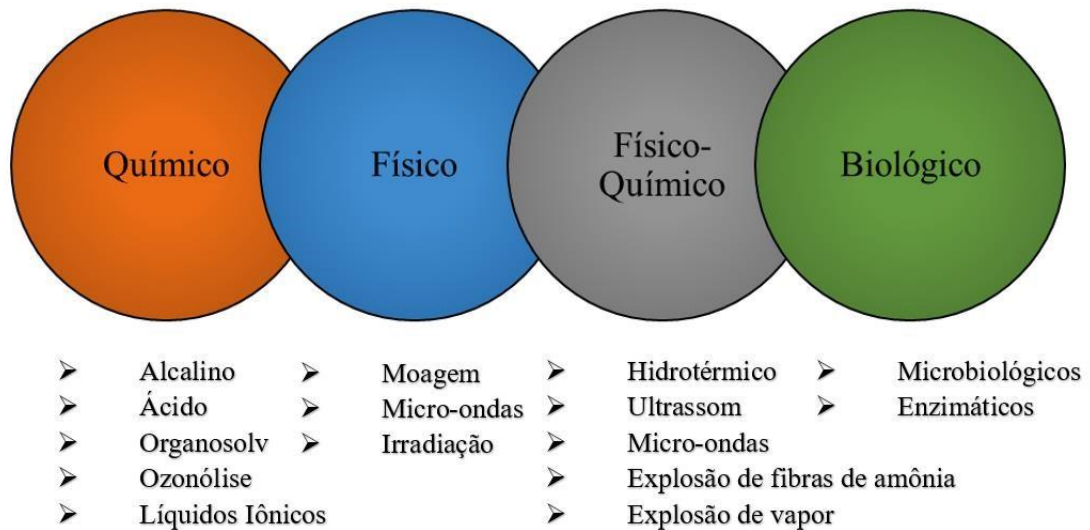
Porém, para se utilizar a biomassa lignocelulósica é necessária a realização de uma etapa de pré-tratamento, que consiste na quebra da estrutura recalcitrante da biomassa para que ocorra a liberação e solubilização da celulose e hemicelulose presente na estrutura da matriz da biomassa (Figura 3.3). Essa etapa tem por objetivo facilitar o acesso aos açúcares fermentescíveis para o processo de sacarificação e aumentar o rendimento em produto.

**Figura 3.3.** Rompimento da estrutura lignocelulósica obtida a partir do pré-tratamento (Adaptado de RAMOS, 2023).



Há inúmeras técnicas para o pré-tratamento, as quais são divididas em físicas, químicas, físico-químicas bem como biológicas (KUMAR; VERMA, 2021). Os métodos de pré-tratamento utilizando agentes físicos e químicos são mais rápidos, mas também são mais caros e podem ser mais danosos ao meio ambiente do que os métodos biológicos (SALEEM *et al.*, 2024). Os pré-tratamentos físicos em sua maioria necessitam de alta energia e equipamentos especiais, o que aumenta o custo em geral. Por outro lado, os pré-tratamentos químicos precisam de uma quantidade de energia comparativamente menor, porém utilizam solventes e produtos químicos, que além de tornarem o processo menos verde também aumenta o custo do processo (LI *et al.*, 2022). É observado que ao combinar e complementar variadas técnicas de pré-tratamento, essas podem ser facilitadas e ter necessidade energética menor em uma escala industrial (CULABA *et al.*, 2022). A Figura 3.4 ilustra os diferentes métodos de pré-tratamento de biomassa disponíveis na atualidade.

**Figura 3.4.** Diferentes tipos de pré-tratamentos existentes para materiais lignocelulósicos (adaptado de AGUIAR *et al.*, 2021).



O pré-tratamento hidrotérmico é um método interessante do ponto de vista ambiental pois emprega apenas água, em contato com a biomassa lignocelulósica, sem a necessidade de catalisadores ou produtos químicos (SHEN *et al.*, 2024). Esse processo gera uma fase sólida, predominantemente composta por celulose e lignina, e uma fração líquida, rica em hemicelulose despolimerizada e solubilizada (ZHENG *et al.*, 2024). Basicamente, dentro de uma faixa de temperatura entre 160°C e 230°C, a constante de ionização da água aumenta, criando um ambiente ácido que facilita a degradação da biomassa. Após o pré-tratamento, ocorrem alterações estruturais na lignina e na celulose, resultando na redistribuição da lignina sobre a superfície da fibra, o que promove o aumento do tamanho dos poros e da área de superfície da celulose pré-tratada (AGUIAR *et al.*, 2021). Simultaneamente, temperaturas mais elevadas promovem a dissolução de moléculas orgânicas pela água, devido à diminuição de sua constante dielétrica (KIM; JEONG, 2024). A autoionização da água em condições de alta temperatura e pressão promove a geração de íons hidrônio, que, em conjunto com o ácido acético liberado pela desacetilação das cadeias de hemicelulose, contribuem para a degradação das moléculas de hemicelulose. O pré-tratamento hidrotérmico é considerado uma alternativa ambientalmente sustentável devido a características como a baixa geração de inibidores, a ausência de catalisadores químicos, a solubilização eficiente da hemicelulose e o baixo custo operacional. No entanto, apresenta algumas desvantagens, como o alto consumo de água e o elevado gasto energético (MILESSI, 2017).

### 3.4 Hidrólise enzimática

Para a liberação dos açúcares presentes na fração sólida pré-tratada, o passo subsequente ao pré-tratamento é a hidrólise, que converte as frações celulósica e hemicelulósica em açúcares fermentescíveis. Nesse contexto, podem ser empregadas duas abordagens principais: a hidrólise ácida, que utiliza ácidos minerais para a quebra das ligações glicosídicas; e a hidrólise enzimática, que se baseia na ação de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas para a conversão dos polímeros em monossacarídeos (SALIHU *et al.*, 2015). A hidrólise ácida se caracteriza por sua alta velocidade de reação e baixo custo. No entanto, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de operar em condições severas, incluindo temperaturas elevadas, risco de corrosão e exigência de equipamentos especializados (HOSSEINZADEH *et al.*, 2024). Além disso, a degradação dos açúcares durante a hidrólise ácida pode levar à formação de compostos inibidores, que podem comprometer a eficiência de processos fermentativos subsequentes (BARRETO *et al.*, 2025). A hidrólise enzimática, por sua vez, ocorre em condições mais brandas, com temperaturas moderadas (40-50 °C) e pH entre 4 e 5 (MOYA *et al.*, 2023). Além disso, apresenta maior especificidade e eficiência na conversão de açúcares quando comparada à hidrólise ácida, resultando em rendimentos superiores e menor formação de compostos inibidores (GOMES *et al.*, 2022). O grande desafio dessa etapa é o custo elevado e a obtenção de um coquetel enzimático eficiente na hidrólise dos polissacarídeos da biomassa lignocelulósica, sendo que as enzimas celulasas e hemicelulasas são as responsáveis pela hidrólise da celulose e hemicelulose, respectivamente (RAMOS *et al.*, 2023).

As celulasas são um conjunto de enzimas que desempenham um papel sinérgico na hidrólise da celulose: as endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e a  $\beta$ -glicosidase (EC 3.2.1.21). As endoglucanases atuam na clivagem das ligações internas da celulose (ligações glicosídicas  $\beta$ -1,4), enquanto as exoglucanases atuam na clivagem de ligações próximas às extremidades do oligossacarídeo para que a  $\beta$ -glicosidase, por sua vez, converta celobiose em glicose (RAMOS *et al.*, 2022). A degradação da celulose pode ser facilitada por enzimas chamadas monooxigenases de polissacarídeos (LPMOs – EC 1.14.99). Essas enzimas atuam por meio de um mecanismo de oxidação, em que quebram as ligações nas cadeias de celulose, tornando-a mais acessível para outras enzimas degradarem (YUAN *et al.*, 2025). Ao oxidar certas regiões da cadeia de celulose, as LPMOs introduzem quebras estruturais que aceleram o processo de decomposição, complementando a ação de enzimas como as celulasas, que fazem a hidrólise das ligações glicosídicas (SHARMA *et al.*, 2024). Já para a degradação da hemicelulose remanescente na fração sólida, por possuir uma heterogeneidade na sua composição, é necessária uma mistura complexa de enzimas, como  $\beta$ -xilosidases (EC

3.2.1.37), mananases (EC 253-446-5), xilanases (EC 3.2.1.8) e arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) para que ocorra a hidrólise (PENDSE *et al.*, 2023). Essas enzimas podem ser classificadas em endo-xilanases, exoxilanases e  $\beta$ -xilosidases, de acordo com seu mecanismo de ação (KAUR *et al.*, 2024).

As xilanases são enzimas responsáveis pela degradação da xilana, catalisando a quebra das ligações  $\beta$ -1,4-glicosídicas entre os monômeros de xilose, o que resulta na conversão do xilana em oligossacarídeos menores e, eventualmente, em xilose livre (JAILANI *et al.*, 2025). Atualmente, as xilanases possuem ampla aplicação industrial, sendo utilizadas na produção de biocombustíveis, alimentos e ração animal, além de desempenharem um papel fundamental na indústria de papel e celulose, entre outros setores (RASHID *et al.*, 2024). Sua produção ocorre principalmente por bactérias, fungos e actinomicetos, com destaque para os gêneros *Trichoderma*, *Aspergillus* e *Bacillus*, considerados alguns dos principais produtores industriais dessas enzimas (MU *et al.*, 2024).

As  $\beta$ -xilosidases são enzimas de ampla aplicação industrial, derivadas de diversos microrganismos, especialmente fungos. Essas enzimas desempenham um papel essencial na hidrólise de materiais lignocelulósicos, promovendo a conversão de xilooligossacarídeos por meio da clivagem de suas extremidades não redutoras, o que resulta na liberação de resíduos de xilose como produtos da degradação da xilana (MARTINS *et al.*, 2018).

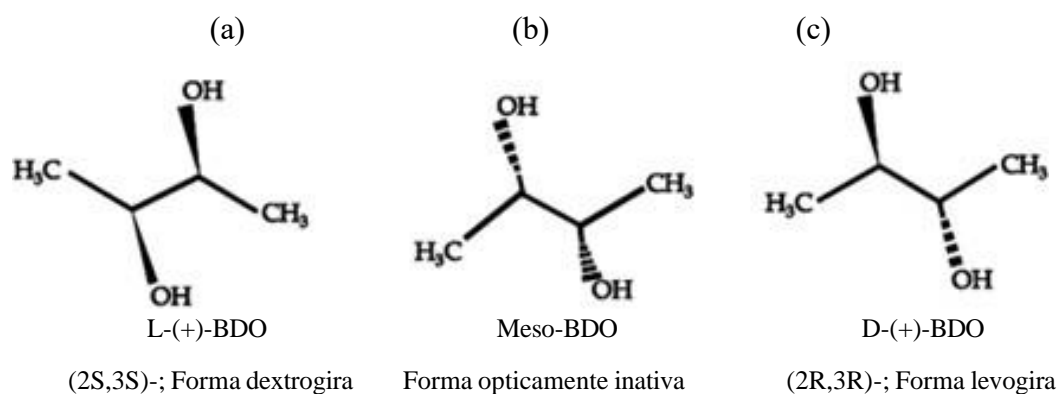
Além disso, enzimas acessórias, como  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase,  $\alpha$ -D-glucuronidase (EC 3.2.1.139) e acetil xilano esterase (EC 3.1.1.72), desempenham um papel fundamental na remoção das cadeias laterais do xilana. Atuando de forma sinérgica com outras enzimas hidrolíticas, essas enzimas auxiliam na degradação da estrutura da xilana, promovendo sua conversão em unidades monoméricas de xilose (CINTRA *et al.*, 2017). Uma vez liberados, os açúcares fermentescíveis se encontram disponíveis para serem transformados em bioprodutos de interesse.

### **3.5 2,3-Butanodiol (BDO)**

O 2,3-butanodiol (BDO) é um composto orgânico que possui dois grupos hidroxilas cuja estrutura molecular consiste em quatro átomos de carbono e apresenta três estereoisômeros distintos. Este composto possui uma vasta gama de aplicações industriais, abrangendo os setores alimentício, farmacêutico, de combustíveis, cosmético e agrícola (NARISSETTY *et al.*, 2022). Devido à sua estrutura molecular, o BDO pode participar de diversas reações químicas, incluindo desidratação e desidrogenação, ampliando seu potencial para a produção de vários derivados químicos (KARAYANNIS *et al.*, 2024).

A fórmula química do BDO é  $C_4H_{10}O_2$ , com um peso molecular de 90,1 g/mol. O BDO (Figura 3.5) apresenta um ponto de ebulição que varia entre 177 e 182°C e um ponto de congelamento relativamente baixo, em torno de -60°C. Além disso, pode ser encontrado tanto no estado líquido quanto na forma cristalina e é uma substância inodora (MAINA *et al.*, 2022).

**Figura 3.5.** Estrutura do 2,3-butanodiol (BDO) (Adaptado de KIM *et al.*, 2017).



O BDO apresenta grande relevância industrial devido à sua versatilidade estrutural, permitindo uma ampla gama de aplicações. É amplamente utilizado na produção de polímeros industriais, como o poliuretano comercialmente conhecido como "Vulkollan" (DUVAL *et al.*, 2022). Além disso, devido ao seu baixo ponto de fusão (-60 °C), o BDO demonstra potencial como agente anticongelante (AGLIARDI, 2018). Também encontra aplicação como aditivo em combustíveis, tintas de impressão, fumigantes e agentes umectantes. Entre os principais produtos químicos derivados do BDO, destacam-se a metil-etil-cetona, o 1,3-butadieno e o diacetil (GOUWS *et al.*, 2024).

Prevê-se que o mercado global de BDO atinja seu auge por volta de 2030 (JO *et al.*, 2024). Além disso, estima-se que o mercado de metil-etil-cetona, um dos principais derivados do BDO, avaliado em US\$ 3,36 bilhões em 2021, apresente uma taxa composta anual de crescimento (CAGR) de 4,62% até 2030 (VARMA *et al.*, 2024). Estima-se que o BDO atinja até 2032 e uma CAGR de 18,92% e 600 milhões de dólares anuais de valor de mercado em comparação aos atuais 150 milhões de dólares (Market Research Intellect, 2025, online). O preço de venda do BDO é em torno de 3,23 US\$/kg (TINOCO *et al.*, 2021). Seu valor comercial é calculado considerando também o mercado de seus derivados, como a metil-etil-cetona, que é formada pela desidratação do BDO e é usada como aditivo de combustível ou solvente para resinas (TORRES-VINCES *et al.*, 2020).

O processo de recuperação do BDO representa um dos principais desafios para sua produção em larga escala, devido ao elevado ponto de ebulição e à alta hidrofobicidade da molécula, associados às baixas concentrações de produto obtidas ao final do processo fermentativo. Essas características dificultam a separação do BDO dos demais componentes da mistura reacional (JANKOVIC *et al.*, 2025). Atualmente, a recuperação do BDO em bioprocessos é realizada predominantemente por meio da tecnologia de leito móvel simulado, um método de separação baseado em adsorção com fluxo contracorrente, desenvolvido e patentado pela LanzaTech. Embora essa técnica apresente alta eficiência, seu elevado custo operacional limita sua aplicabilidade em larga escala. Uma alternativa promissora para a recuperação do BDO é a extração por *salting-out* (SOE), um processo de grande potencial que se baseia na redução da solubilidade das moléculas na fase aquosa devido ao aumento da concentração salina, favorecendo a separação do composto de interesse (KARAVANNIS *et al.*, 2024).

Na atualidade, a produção de BDO está relacionada a processos químicos baseados em petróleo, especificamente através da hidrólise do óxido de 2,3-butano. Este processo é altamente intensivo em energia e prejudicial ao meio ambiente (HUO *et al.*, 2022). Adicionalmente, de acordo com Tinoco *et al.*, (2021), o preço de químicos de plataforma deve ficar em torno de 1 US\$/kg para ser viável, de forma que a produção via rota biotecnológica a partir de matérias-primas de baixo custo pode ser uma estratégia para se atingir competitividade de mercado.

Dentre microrganismos que naturalmente produzem BDO se destacam *Klebsiella pneumoniae*, atingindo 150 g/L de produto em batelada alimentada (MA *et al.*, 2009), e *Serratia marcescens* com 139,9 g/L de BDO (ZHANG *et al.*, 2010). No entanto, ambas as bactérias são patogênicas, e a atenção da biotecnologia para a produção industrial de BDO vai para microrganismos com status geralmente reconhecido como seguro (GRAS – do inglês *Generally Recognized as Safe*).

Graças aos avanços na engenharia genética, a produção microbiana de BDO tornou-se promissora. No entanto, o desafio nesse tipo de produção é a baixa produtividade e os altos custos de produção, o que torna necessário desenvolver cepas eficientes, capazes de utilizar substratos baratos e de fácil acesso, para que o BDO obtido por rota sustentável se torne uma plataforma química viável (HAKIZIMANA *et al.*, 2020).

### 3.6 Microrganismos produtores de 2,3-Butanodiol

A produção de BDO por rota microbiana apresenta-se como uma alternativa mais sustentável quando comparada à produção a partir de combustíveis fósseis. Diversas bactérias, incluindo *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Ralstonia*, *Paenibacillus*, *Serratia marcescens*, além de leveduras geneticamente modificadas como *Saccharomyces cerevisiae* (YG01\_SDBN e YPH499/pol3/BD\_392), podem ser empregadas na produção de BDO (FERNÁNDEZ-DELGADO *et al.*, 2024).

Em escala laboratorial, o principal substrato utilizado para a produção biológica de BDO é a glicose. No entanto, a glicose comercial é um substrato de custo elevado e um importante produto alimentício, o que motiva a busca por substratos alternativos que não comprometam a rentabilidade das biorrefinarias e não concorram como recursos alimentares. Entre esses substratos alternativos, destacam-se o glicerol bruto, melaço de cana-de-açúcar e biomassa lignocelulósica (JIANG *et al.*, 2021).

Os microrganismos selvagens produtores de BDO geralmente apresentam baixa eficiência na síntese de BDO a partir de xilose. Isso ocorre principalmente porque muitos desses microrganismos não conseguem metabolizar eficientemente os açúcares presentes nas biomassas lignocelulósicas. A xilose, um dos principais componentes desses materiais, representa um desafio significativo para a conversão biológica em BDO devido à limitada capacidade metabólica dos microrganismos naturais em utilizar esse açúcar como fonte de carbono (YANG; ZHANG, 2019).

A busca por células capazes de metabolizar novos substratos e fontes de nitrogênio, como alternativa à glicose, ao extrato de levedura e à peptona, é essencial para reduzir os custos operacionais de biorrefinarias, particularmente na produção de BDO. Tinoco *et al.* (2024) investigaram a utilização da cepa *Paenibacillus peoriae* NRRL BD- 62 para a produção de BDO, substituindo fontes comerciais de carbono e nitrogênio por substratos mais econômicos, como melaço de cana-de-açúcar, licor de maceração de milho e cloreto de amônio. O estudo demonstrou uma economia de 75,2% nos custos operacionais, com a célula produzindo BDO de alta pureza óptica, alcançando um título de 8,56 g/L e um rendimento de 0,28 g/g. Esses resultados destacam o potencial do uso de substratos alternativos, promovendo uma abordagem mais sustentável para bioprocessos industriais.

A polpa de beterraba sacarina (SBP), um subproduto relevante da indústria sucroalcooleira, é geralmente utilizada na alimentação de bovinos e suínos como fonte de fibras. Narisetty *et al.* (2022) investigaram o uso do SBP como substrato, suplementado com hidrolisado de arabinose puro, em fermentações com uma cepa mutante de *Enterobacter*

*ludwigii* para a produção de BDO. O cultivo, conduzido em reatores de batelada alimentada, resultou na produção de 42,9 g/L de BDO, com um rendimento de 0,31 g/g.

A cepa mutante de *Enterobacter ludwigii* também demonstrou capacidade de produzir BDO a partir de outras fontes de carbono, como o bagaço de malte, um subproduto da indústria cervejeira, e pães residuais (BW do inglês “bread waste”) da indústria alimentícia. Amraoui *et al.* (2021) investigaram a produção de BDO utilizando um mutante de *Enterobacter ludwigii* com bagaço de malte como substrato, alcançando um rendimento de 0,48 g/g e um título de 9,5 g/L de BDO. Narisetty *et al.* (2022), com o objetivo de reaproveitar pães residuais, utilizaram como substrato para a produção de BDO por *E. ludwigii*. Em reatores de batelada alimentada, utilizando glicose pura e hidrolisados ácidos e enzimáticos dos pães, obtiveram títulos de BDO de 144,5, 135,4 e 138,8 g/L após 96 horas, com rendimentos de 0,47, 0,42 e 0,48 g/g, respectivamente.

O coeficiente de transferência volumétrica de oxigênio, conforme os resultados obtidos no estudo de Maina *et al.* (2021), tornou-se um parâmetro crucial para aumentar a eficiência da produção de BDO por *Bacillus amyloliquefaciens*. Os melhores resultados foram observados em biorreatores com fermentações descontínuas. No estudo, foram realizados experimentos utilizando resíduos de pães como substrato, resultando em uma produção de BDO de 55,2 g/L. Além disso, foi observado que o baixo fornecimento de oxigênio favorece a produção de BDO.

O estudo realizado por Ebrahimian *et al.* (2022) relatou a produção de 42,5 g de BDO por quilograma de fração biodegradável de resíduos sólidos urbanos, utilizando fermentação com culturas de *Clostridium acetobutylicum* e *Enterobacter aerogenes*. A pesquisa destacou uma vantagem sinérgica significativa no cocultivo bacteriano, por meio de bioprocessamento integrado para a geração de biocombustíveis, quando comparado aos monocultivos de *C. acetobutylicum* ou *E. aerogenes*. O processo integrou várias etapas, incluindo pré-tratamento com etanol, hidrólise enzimática, fermentação com cocultivo bacteriano e digestão anaeróbica dos sólidos residuais não fermentados. O melaço de cana é um importante subproduto do processamento de cana-de-açúcar, com isso o estudo de Omeroglu *et al.* (2024) utilizou células imobilizadas da cepa *Bacillus licheniformis* BD43 para realizar uma fermentação utilizando melaço como substrato, obtendo 31,6 g/L de BDO ao fim do processo.

### **3.7 Desenvolvimento de microrganismos para produção de 2,3-Butanodiol**

A capacidade de metabolizar diferentes substratos é um fator crucial para os microrganismos utilizados na produção de BDO. Com os avanços na engenharia genética, as pesquisas têm se concentrado nas possíveis modificações que podem ser realizadas nas cepas

para aumentar a eficiência da produção de BDO, utilizando uma variedade mais ampla de fontes de carbono. Essas modificações genéticas visam otimizar as vias metabólicas dos microrganismos, permitindo a utilização de substratos alternativos e não convencionais, o que pode reduzir os custos de produção e evitar a competição com recursos alimentares.

O estudo realizado por Lee *et al.* (2022) teve como objetivo a produção de meso- BDO por meio da engenharia metabólica da cepa *Saccharomyces cerevisiae*. Para otimizar os rendimentos de produção, a cepa foi geneticamente modificada para eliminar a dependência de compostos formados por dois carbonos (C2), através da introdução de um gene negativo para *piruvato descarboxilase* (*PDC*) no contexto do efeito Crabtree. Além disso, a cepa foi geneticamente modificada por meio da introdução de cromossomos adicionais contendo o gene *budC*, que codifica a enzima *meso-2,3-butanodiol desidrogenase* (BIBDH) da bactéria *Bacillus licheniformis*. Essa modificação tem como objetivo reduzir o acúmulo de acetoína e otimizar a conversão metabólica para aumentar a produção de BDO.

Outra abordagem utilizada para aprimorar a capacidade produtiva das cepas envolve a otimização dos fluxos de carbono e o balanço de NADH/NAD<sup>+</sup>. Nesse contexto, o estudo de Lu *et al.* (2022) com a cepa *Enterobacter aerogenes* interrompeu os genes que codificam a *lactato desidrogenase* (*ldh*) e a *piruvato formato liase* (*pfl*) utilizando o método de recombinação  $\lambda$ -Red e a técnica CRISPR-Cas9, com o objetivo de reduzir a produção de subprodutos e o consumo de NADH. Adicionalmente, a pesquisa superexpressou dois genes, sendo eles a *acetolactato sintase* (*budB*) e a *acetoína redutase* (*budC*), para direcionar ainda mais o fluxo metabólico em direção à produção de BDO.

Wang *et al.* (2022) desenvolveram uma cepa recombinante de *Raoultella terrigena* HC6 com superexpressão do gene *xynB* para utilizar frações de hemicelulose como substrato na produção de BDO. O estudo focou na otimização da despolimerização da xilana, na identificação dos metabólitos resultantes de sua degradação por HC6, e no mapeamento e análise dos perfis de expressão de genes metabólicos envolvidos na produção de BDO.

Islam *et al.* (2023) desenvolveram uma cepa de *Escherichia coli* com superexpressão dos genes *beta-cetotiolase* (*phaA*), *acetoacetil-CoA redutase* (*phaB*), *Butiraldeído desidrogenase* (*bld*) e *álcool desidrogenase* *yqhD*, visando otimizar a produção de BDO. Para maximizar a eficiência do processo, foram deletadas vias metabólicas concorrentes, evitando a formação de subprodutos. De forma semelhante, Jantama *et al.* (2015) eliminaram as enzimas *álcool desidrogenase E* (*adhE*), *acetato quinase A-fosfoacetilase* (*ackApta*) e *lactato desidrogenase A* (*ldhA*) na cepa *Klebsiella oxytoca* KMS005, selecionada por suas modificações genéticas que favorecem o consumo de glicose para a produção de BDO,

minimizando a coprodução de subprodutos indesejados. Um dos desafios na engenharia genética de cepas para a produção de BDO é a redução no consumo de glicose observada quando os genes envolvidos na síntese de etanol e coprodutos são deletados. Morita *et al.* (2022) desenvolveram uma cepa da levedura YPH499 com deleções nos genes *PDC5* e *PDC6* (*pdc56Δ*), controlando a expressão de *PDC1* por meio da utilização de *dCas9*. Essa abordagem resultou em uma diminuição na produção de etanol sem comprometer o consumo de glicose.

O estudo conduzido por Jiang *et al.* (2024) examinou os impactos da inativação do gene *hycEFG* (*hidrogenase-3*) em *Klebsiella pneumoniae* na produção de BDO. O estudo investigou os efeitos da deleção dos genes responsáveis pela síntese de etanol e ácido lático, observando inicialmente um aumento na produção, seguido de uma diminuição quando a produção de etanol foi completamente eliminada. A produção de BDO foram substancialmente aprimoradas com a supressão de *hycEFG* utilizando glicose como fonte de carbono. A Tabela 3.2 mostra o comparativo entre diversas cepas recombinantes com capacidade de produzir BDO a partir de diferentes tipos de substrato.

**Tabela 3.2.** Comparação entre cepas recombinantes produtoras de BDO.

Microrganismo	Substrato	Qp			Tempo de cultivo (h)	Referências
		[BDO](g/L)	(g/L/h)	Rendimento (g/g)		
<i>Klebsiella pneumoniae</i> $\Delta$ ldhA $\Delta$ adhE $\Delta$ hycEFG	Glicose/Glicerol	6,88	0,49	0,73 (mol/mol)	14	(Jiang <i>et al.</i> , 2024)
<i>Raoultella terrigena</i> HC6-xynB	Hemicelulose	3,53	0,015	0,39 (g/g)	240	(Wang <i>et al.</i> , 2022)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> SCM116	Glicose	0,70	0,014		48	(Morita <i>et al.</i> , 2022)
<i>Klebsiella oxytoca</i> KMS005-73T	Glicose	117,47	1,20	0,49 (g/g)	96	(Jantama <i>et al.</i> , 2015)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S5_mBDO4	Glicose	171	1,80	0,49 (g/g)	96	(Lee <i>et al.</i> , 2022)
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM1183-LPBC	Sacarose	10,75	0,24	0,42 (g/g)	44	(Lu <i>et al.</i> , 2022)
<i>P. polymyxa</i> M1-L31-Pb	Glicose/Xilose	21,70	0,52	0,46 g/g	42	(Zhang <i>et al.</i> , 2024)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> HGS37 (cepa utilizada nesse estudo)	Glicose	130,64	1,58	0,48 (g/g)	96	(Huo <i>et al.</i> , 2022)

Com base no exposto na Tabela 3.2, dentre os estudos de produção de BDO reportados na literatura, as três cepas que mais se destacam são: *Saccharomyces cerevisiae* S5\_mBDO4, *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 e *Klebsiella oxytoca* KMS005-73T.

Outra cepa que apresentou resultados promissores foi *Klebsiella oxytoca* KMS005-7, alcançando um rendimento de 0,49 g/g, superior ao obtido pela cepa deste estudo. Além disso, essa cepa também demonstrou uma produção elevada de BDO, com 117,47 g/L, e uma produtividade de 1,2 g/L/h. As cepas *Enterobacter aerogenes* IAM1183-LPBC e *Paenibacillus polymyxa* M1-L31-Pb demonstraram rendimentos satisfatórios de 0,42 g/g e 0,46 g/g, respectivamente, destacando-se por sua capacidade de metabolizar substratos diferentes da glicose, como a sacarose e a xilose. No entanto, em seus respectivos estudos, as produções de BDO não atingiram concentrações elevadas, sendo 10,75 g/L para a cepa IAM1183-LPBC e 21,7 g/L para a cepa M1-L31-Pb.

Visando aproveitar resíduos dos laticínios, Roncal *et al.* (2023) utilizaram a cepa mutante não modificada *Lactococcus lactis* 43103 para produzir BDO a partir da lactose dos soros de leite. A cepa apresentou uma concentração de BDO próxima de 18 g/L, representando 76,8% do rendimento teórico máximo. Com a adição de acetoína, que é o precursor imediato na via metabólica da cepa, esse rendimento aumentou para 94,7%.

O estudo de Li *et al.* (2024) identificou a cepa *Raoultella ornithinolytica* TH-21 como um biocatalisador promissor para a produção de BDO. A cepa TH-21 demonstrou a capacidade de utilizar uma variedade de substratos como fonte de carbono, incluindo xilose, manitol, celobiose e xilana e teve produção máxima 20,04 g/L, 16,56 g/L, 20,06 g/L e 11,25 g/L, respectivamente. Além disso, essa cepa mostrou-se capaz de degradar lignina, celulose e hemicelulose presentes no bagaço de cana-de-açúcar, ampliando seu potencial para a produção eficiente de BDO a partir de biomassa lignocelulósica. Os principais desafios residem no microrganismo empregado e nas baixas concentrações obtidas nos experimentos. A cepa *Raoultella ornithinolytica* é classificada como um patógeno com potencial risco à saúde humana, o que inviabiliza sua aplicação em escala industrial ou fora de ambientes laboratoriais controlados.

Zhang *et al.* (2010) investigaram diferentes estratégias de alimentação com o objetivo de otimizar o desempenho do bioprocessamento. O estudo propôs uma abordagem combinada, integrando o controle do quociente respiratório com a manutenção constante da concentração residual de sacarose em um sistema de alimentação por batelada alimentada (*fed-batch*). Essa estratégia visou maximizar a eficiência do processo e a produtividade do sistema. Utilizando insumos comerciais e a cepa mutante *Serratia marcescens* H30, obtiveram uma concentração máxima de BDO de 139,92 g/L e com uma produtividade de 3,49 g/L/h. Apesar dos resultados promissores obtidos nos experimentos, as cepas da família *Serratia marcescens* são patogênicas e amplamente reconhecidas como altamente agressivas à saúde humana. Elas estão associadas a uma variedade de doenças graves, como pneumonia, septicemia e infecções urinárias, o que limita seu uso em aplicações biotecnológicas de larga escala.

Um fator diferencial na produção de BDO é a utilização dos açúcares disponíveis na biomassa lignocelulósica, como demonstrado pela cepa *Raoultella terrigena* HC6- xynB, que utilizou hemicelulose como substrato para a produção de BDO. No entanto, os resultados foram modestos, com uma produção de 3,53 g/L, produtividade de 0,015 g/L/h e um rendimento de 0,39 g/g. Além disso, o longo tempo de cultivo, de 240 horas, representou uma desvantagem significativa.

A cepa recombinante *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 foi desenvolvida por Huo et al., (2022) com o objetivo de aumentar sua eficiência na produção de BDO e será a cepa utilizada no presente trabalho. Ao comparar a cepa utilizada neste estudo com outras cepas geneticamente modificadas para o mesmo fim, apenas a cepa *Saccharomyces cerevisiae* S5\_mBDO4 (LEE et al., 2022) demonstrou resultados superiores em todos os parâmetros de produção analisados. Porém, vale destacar que a cepa S5\_mBDO4 obteve esta performance em condições já otimizadas e utilizando pulsos de glicose (até 100 g/L de concentração de açúcar no reator) sempre que a glicose era totalmente consumida, enquanto a cepa HGS37 ainda não teve suas condições de cultivo em meios industriais exploradas e otimizadas, o que será o foco deste trabalho.

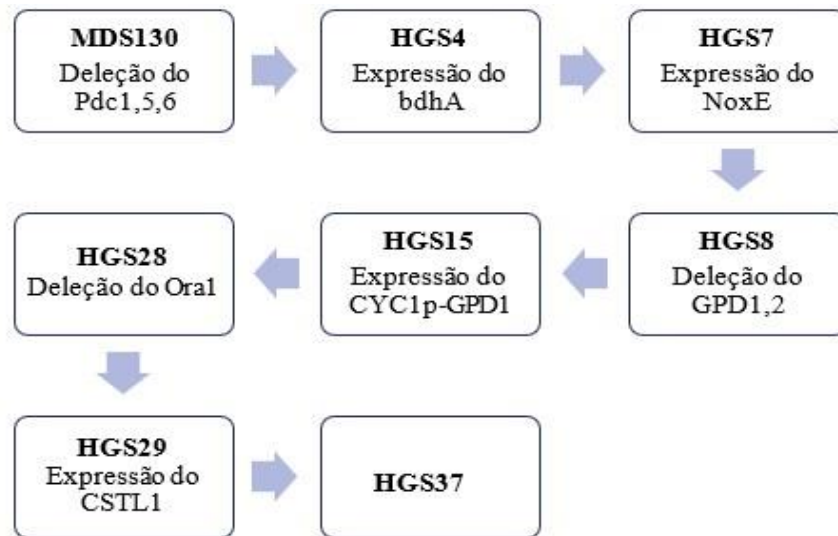
### 3.8 *Saccharomyces cerevisiae* HGS37

A *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura eucariota unicelular do reino Fungi, amplamente utilizada na produção de pão, cerveja e etanol combustível. Cepas geneticamente modificadas desta levedura também podem gerar bioquerosene, biodiesel e outros biocombustíveis. Esta espécie é conhecida por sua excelente capacidade fermentadora, um histórico genético bem definido e a facilidade de edição genética (ZHANG et al., 2024). A utilização de *Saccharomyces cerevisiae* na produção de BDO é particularmente interessante devido à sua elevada robustez, além de sua resistência a altos teores de etanol e altas concentrações de açúcares iniciais. Essas características tornam a levedura altamente adaptável a diferentes tipos de meios, favorecendo sua aplicação em bioprocessos industriais (CHEN et al., 2025).

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 foi desenvolvida por Huo et al. (2022) com o objetivo de maximizar a produção de BDO por meio da expressão e deleção de genes como mostrado na Figura 3.6. A levedura parental utilizada foi a MDS130, a qual apresenta deleções direcionadas em genes-chave que afetam aspectos específicos do metabolismo e da seleção em meios definidos. As deleções nos genes *galactose-1-fosfato uridililtransferase* - *GAL1* (EC 2.7.1.6), *UDP-galactose-4-epimerase* - *GAL10* (EC 5.1.3.2) e *galactose-1-fosfato uridililtransferase* - *GAL7* (EC 2.7.7.12), envolvidos no metabolismo da galactose, impedem a utilização desse açúcar como fonte de carbono, o que pode ser explorado para controle metabólico ou em estratégias de engenharia genética dependentes de promotores galactose-indutíveis. Além disso, as mutações nos genes tróficos *imidazolglicerol-fosfato desidratase* (biossíntese de histidina) *HIS3* (EC 4.2.1.19),  *$\beta$ -isopropilmalato desidrogenase* (biossíntese de leucina) *LEU2* (EC 1.1.1.85) e *orotidina-5'-fosfato descarboxilase* (biossíntese de uridina

monofosfato, UMP) *URA3* (EC 4.1.1.23) inviabilizam a síntese dos respectivos aminoácidos e nucleotídeos, permitindo a seleção da cepa em meios mínimos quando esses genes são complementados por plasmídeos ou inserções cromossômicas (DEMEKE *et al.*, 2024; PÉREZ *et al.*, 2022). A MDS130 foi desenvolvida a partir da cepa *Ethanol Red*, uma cepa industrial caracterizada por sua elevada tolerância ao etanol e altos rendimentos na produção desse biocombustível, além de manter viabilidade celular em diversas condições de fermentação.

**Figura 3.6.** Construção da cepa HGS37 de acordo com HUO *et al.* (2022).



A cepa MDS130 destacou-se pela capacidade de consumir completamente glicose e xilose nos ensaios conduzidos por Demeke *et al.* (2024), apresentando rendimentos próximos ao limite teórico em substratos lignocelulósicos. Adicionalmente, a cepa MDS130 tem sido empregada como plataforma para engenharia metabólica com o objetivo de viabilizar a produção de compostos de alto valor agregado, como o BDO. Nesse contexto, genes codificadores de enzimas-chave da via de biossíntese de BDO, como *alsS* e *alsD* de *Bacillus subtilis*, bem como *BDH1*, endógeno de *Saccharomyces cerevisiae*, foram superexpressos na MDS130, com a finalidade de redirecionar o fluxo metabólico em direção ao produto de interesse. A introdução dos genes *alsS* e *alsD* de *Bacillus subtilis* em cepas de *Saccharomyces cerevisiae* visa redirecionar o metabolismo do piruvato para a produção de BDO, representando uma estratégia promissora para reduzir a formação de etanol e aumentar o rendimento de produtos de maior valor agregado. Essa abordagem aproveita a robustez natural da levedura frente a estresses industriais, como alta osmolaridade e variações de pH, aliada à capacidade de utilizar substratos variados, incluindo hidrolisados lignocelulósicos. No entanto, a engenharia

dessa via heteróloga apresenta desafios, como o desequilíbrio no metabolismo central, especialmente no balanço redox (NADH/NAD<sup>+</sup>), além de dificuldades na expressão funcional das enzimas bacterianas devido às diferenças entre os sistemas de expressão de procariotos e eucariotos. Além disso, a eficiência do processo pode depender da deleção de genes endógenos que desviam o fluxo metabólico, como os envolvidos na produção de etanol. Comparada a bactérias naturalmente produtoras de BDO, como *Klebsiella pneumoniae*, a levedura oferece maior segurança e tolerância industrial, embora exija maior modificação genética para alcançar produtividades competitivas (LI *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2019; YOON *et al.*, 2013).

As modificações genéticas realizadas na cepa ocorreram sem a aplicação de mutagênese externa, com o objetivo de minimizar potenciais efeitos adversos sobre outras propriedades comerciais importantes da cepa. Entre as estratégias exploradas para o aprimoramento da cepa, os principais fatores que contribuíram positivamente para a produção de BDO incluíram a eliminação das vias de produção de etanol, a regulação negativa da produção de acetoína, glicerol e do consumo de piruvato mitocondrial. Além disso, a supressão da produção de 2,3-dimetilglicerato e a redução da osmossensibilidade também favoreceram aumentos na produção. O aumento adicional da tolerância à glicose na cepa contribuiu ainda mais para melhorar os rendimentos de BDO. Os genes *piruvato-descarboxilase PDC1*, *PDC5* e *PDC6* são fundamentais no metabolismo celular, sendo precursores na produção de álcoois, óleos fúsel e ácidos aromáticos. Assim, a deleção desses genes é uma estratégia eficaz para inibir a produção de etanol e outros produtos indesejados. No entanto, essa inibição leva a um problema significativo: a célula se torna auxotrófica para compostos C2, como etanol ou acetato, comprometendo seu crescimento e metabolismo e uma das maneiras de contornar esse problema é com a adição de etanol ao meio de cultivo. (HASSING *et al.*, 2021).

O piruvato é um precursor tanto da produção de etanol quanto de BDO. Com base nisso, Huo *et al.* (2022) deletaram os genes *PDC1*, *PDC5* e *PDC6* e expressaram os genes da *acetolactato sintase (alsS)* e *acetolactato descarboxilase (alsD)*, além de promoverem a superexpressão do gene endógeno da *BDO desidrogenase 1*, codificado por *BDH1*. Essas modificações visaram bloquear a produção de etanol e redirecionar o fluxo de carbono para a síntese de BDO. Na sequência da construção da cepa de levedura HGS37, ocorreu a expressão do gene *NoxE*, que codifica a enzima NADH oxidase, a qual desempenha um papel crucial no metabolismo redox das células microbianas. Essa enzima catalisa a oxidação do NADH a NAD<sup>+</sup>, utilizando o oxigênio molecular como aceptor final de elétrons e gerando água como subproduto. Além disso, a NADH oxidase é fundamental para a manutenção do equilíbrio redox intracelular em organismos que dependem de NAD<sup>+</sup>/NADH como cofatores em diversas vias

metabólicas. Sua atividade é indispensável para garantir a eficiência metabólica e a adaptação celular em condições de alta demanda energética ou de estresse oxidativo (SHAH *et al.*, 2025). Por fim, os genes *glicerol- fosfato desidrogenase 1 e 2 (GPD1 e GPD2)* foram deletados, e o gene *CYC1p- GPD1* foi expresso.

A produção de glicerol representa um fator que pode influenciar negativamente a síntese de BDO, uma vez que o glicerol pode atuar como inibidor ou competir metabolicamente pela utilização de precursores e enzimas essenciais no metabolismo da cepa. Em leveduras, os genes *GPD1* e *GPD2* são os principais responsáveis pela biossíntese de glicerol. A deleção desses genes, ou sua substituição por versões de menor atividade, como *CYC1p-GPD1*, pode redirecionar o fluxo metabólico e, conseqüentemente, favorecer o aumento na produção de BDO (WYK *et al.*, 2020).

No estudo de Huo *et al.* (2022), os últimos passos para a construção da cepa HGS37 incluíram a deleção do gene *Oral1*, responsável pela produção de 2,3- dimetilglicerato, e a introdução do gene *STL1* de *Candida albicans* (denominado CSTL1). Essa modificação visou aumentar a resistência da célula a concentrações iniciais elevadas de açúcares, otimizando o desempenho metabólico da cepa em condições de alta carga osmótica. Porém é válido ressaltar que a levedura HGS37 ainda é considerada NB1 (nível de biossegurança 1), pois de acordo com a Resolução normativa 2 de 27 de novembro de 2006 da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) (CAPÍTULO IV DA CLASSIFICAÇÃO DE RISCO):

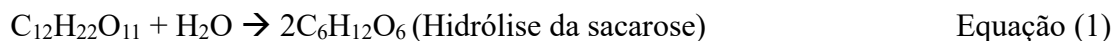
Art. 8º As classes de risco dos OGM serão assim definidas: “§ 3º O OGM que contenha sequências de ADN/ARN derivadas de organismos de classe de risco superior e com potencial de expressão poderá, a critério da CTNBio, ser classificado na classe de risco do organismo receptor, desde que reconhecidamente não associadas à toxicidade ou patogenicidade nas atividades e projetos propostos (disponível em <https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas>).

O gene *STL1* codifica um simportador de glicerol/próton que desempenha um papel crucial na resposta ao estresse osmótico. Este gene está presente tanto em *Saccharomyces cerevisiae* quanto em *Candida albicans*, evidenciando sua homologia e função similar em ambas as espécies (ZHANG *et al.*, 2020). Embora o STL1 não esteja diretamente associado à virulência, *C. albicans* é comumente encontrada em humanos e atua como um patógeno oportunista, afetando indivíduos com comprometimento imunológico. Os fatores de virulência dessa espécie incluem sua capacidade de aderir a superfícies, invadir tecidos, formar biofilmes, secretar enzimas e realizar alterações morfológicas (JHA; KUMAR, 2024). Porém, o alvo de modificação na cepa HGS37, não está diretamente relacionado a essas propriedades de

virulência. O acúmulo de glicerol é um processo natural em leveduras convencionais que atua como um mecanismo de proteção contra o estresse, especialmente o estresse osmótico. Essa diferença é principalmente atribuída à resposta ao carbono: enquanto em *S. cerevisiae* o *STL1* transporta ativamente glicerol apenas quando as células são cultivadas em fontes de carbono não fermentáveis, em *C. albicans* sua expressão ocorre também na presença de glicose (KAYINGO et al., 2009).

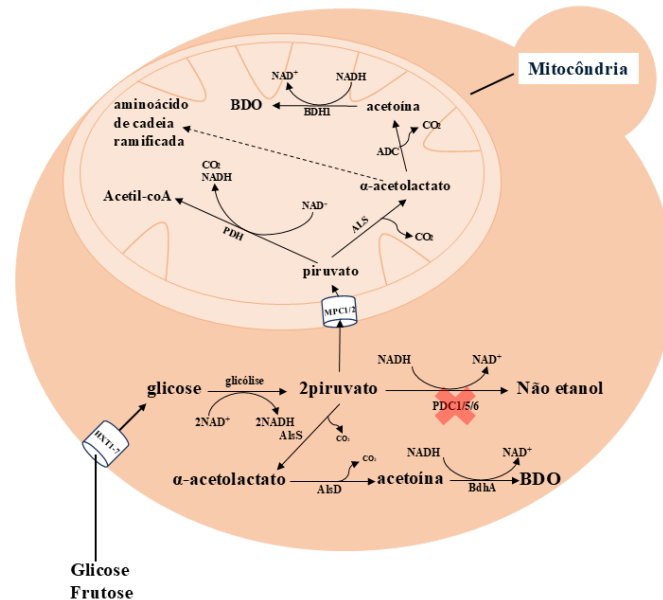
### 3.9 Metabolismo da cepa *S. cerevisiae* HGS37

A produção de BDO a partir de subprodutos do processamento da cana exigirá a assimilação eficiente dos açúcares disponíveis nestes compostos. O melaço de cana é rico em sacarose, glicose e frutose, enquanto hidrolisados lignocelulósicos são ricos em glicose e xilose e, dependendo do tratamento pode apresentar inibidores (ZETTY-ARENAS et al., 2021). A conversão da sacarose em *S. cerevisiae* inicia-se pela sua hidrólise em glicose e frutose pela enzima invertase, que são subsequentemente canalizadas para a via glicolítica (MARQUES et al., 2016). Durante o processo fermentativo para a produção de BDO, cada molécula de glicose/frutose é metabolizada, resultando na formação de BDO, dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) como produtos. As Equações 1 e 2 ilustram o processo.



Desta forma, considerando a massa molar dos compostos envolvidos (Sacarose: 342,296 g/mol, Glicose: 180,156 g/mol e BDO: 90,122 g/mol), o rendimento teórico de BDO a partir da sacarose do melaço de cana ( $Y_{\text{BDO}/\text{Sacarose}}$ ) é dado por 0,526 g/g. Já considerando os hidrolisados lignocelulósicos, o rendimento de BDO a partir de glicose será de 0,50 g/g e de xilose 0,51 g/g. Na prática, o rendimento real em BDO é inferior ao rendimento teórico devido a fatores como a formação de subprodutos, além de perdas metabólicas e ineficiências do processo fermentativo (LEE et al., 2019). A Figura 3.7 ilustra o metabolismo celular da cepa.

**Figura 3.7.** Metabolismo da levedura recombinante *S. cerevisiae* HGS37 para produção de BDO (adaptado de HUO et al., 2022).



### 3.8 Imobilização celular

A imobilização celular é uma técnica biotecnológica que visa fixar microrganismos de interesse em bioprocessos sobre suportes sólidos ou dentro de matrizes, restringindo seus movimentos sem comprometer a atividade metabólica. Essa abordagem é amplamente empregada em processos fermentativos e biocatalíticos, proporcionando maior estabilidade, possibilidade de reutilização das células e aumento da eficiência do bioprocessos (KHUMSUPAN *et al.*, 2025).

Diversas metodologias são empregadas para a imobilização celular, destacando-se quatro abordagens amplamente utilizadas em bioprocessos: ligação a superfícies, aprisionamento em matrizes porosas, autoagregação e contenção por barreiras. A adsorção celular, por sua vez, baseia-se na adesão física das células a um suporte sólido, mediada por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas. Essa técnica se destaca por sua simplicidade operacional e baixo custo, porém apresenta a limitação de possível liberação das células ao longo do processo, o que pode comprometer a estabilidade do sistema (YOUNGWILAI *et al.*, 2020). O encapsulamento é outra técnica amplamente utilizada, na qual as células são aprisionadas dentro de uma matriz porosa, permitindo a difusão de nutrientes e produtos. Materiais como alginato de cálcio, quitosana, carragenana e gel de sílica são comumente empregados nessa abordagem, que

protege as células contra variações ambientais, mas pode apresentar limitação na difusão de substratos e produtos (COSTA *et al.*, 2024). O aprisionamento em gel, que envolve a mistura das células com um gel polimérico que, ao ser polimerizado, forma uma rede tridimensional, mantendo as células aprisionadas. Essa técnica permite um controle adequado do ambiente microbiano, porém pode restringir a troca de nutrientes e produtos (SAXENA *et al.*, 2021). A ligação covalente é uma alternativa na qual as células são quimicamente fixadas a uma superfície ou suporte sólido por meio de ligações covalentes. Essa técnica promove uma fixação robusta, reduzindo a perda celular, mas pode levar à inativação parcial das células devido à agressividade das reações químicas envolvidas (YANG *et al.*, 2025). Por fim, a técnica de formação de biofilme consiste em incentivar as células a desenvolverem biofilmes sobre superfícies sólidas, criando uma camada biológica funcional. Entre as vantagens dessa técnica estão a resistência a variações ambientais e a capacidade de automanutenção, embora o controle preciso da estrutura do biofilme represente um desafio técnico significativo (REN *et al.*, 2025).

A imobilização por alginato de cálcio merece destaque entre as técnicas de imobilização celular, pois utiliza um material não tóxico, biocompatível e biodegradável. Além dessas características, o processo apresenta alta versatilidade, podendo ser aplicado em uma ampla variedade de bioprocessos que envolvem cepas selvagens, organismos geneticamente modificados e até consórcios microbianos (RAMOS, 2023).

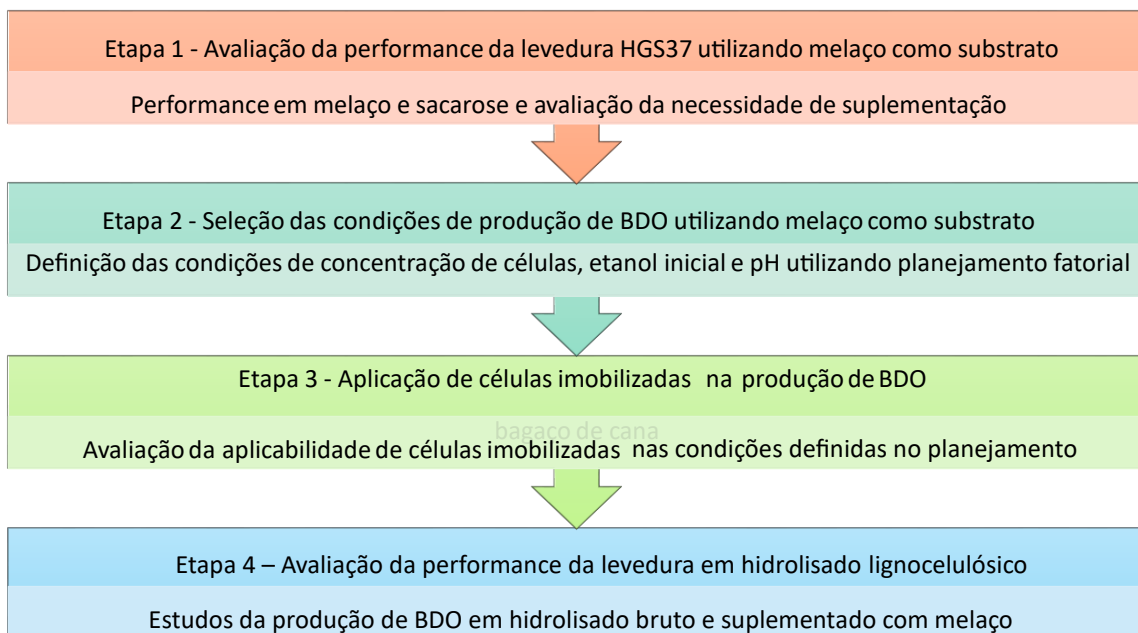
A literatura disponível sobre a aplicação de técnicas de imobilização celular na produção de BDO é extremamente limitada, evidenciando a necessidade de mais pesquisas nessa área para explorar o potencial dessa abordagem na otimização do bioprocessos. O estudo de Joshi *et al.* (2025), ao investigar a imobilização de células de *Paenibacillus polymyxa* não patogênico, comparando os métodos de encapsulamento por carragenina-quitosana e alginato de cálcio para a produção de BDO, demonstrou que as células imobilizadas em carragenina produziram 3,58 g/L de BDO, representando um aumento de 16,2% em relação à produção obtida pelas células imobilizadas em alginato.

A pesquisa de Omeroglu *et al.* (2024), utilizando *Bacillus licheniformis* BD43 para a produção de BDO a partir de células imobilizadas por meio da técnica de encapsulamento com alginato de sódio como agente de aprisionamento, obteve uma produção de 31,6 g/L de BDO.

#### 4. MÉTODOLOGIA

O desenvolvimento do presente trabalho foi dividido em quatro etapas principais (Figura 8). Desta forma, primeiramente a performance da levedura em meio baseado em melaço foi avaliada (Etapa1), uma vez que a sua performance em sacarose, assim como no melaço, era desconhecida. Nesta etapa, considerando que o melaço de cana é um meio complexo rico em nutrientes, avaliou-se também a necessidade da suplementação do meio de fermentação com extrato de levedura e peptona (fontes de nitrogênio), uma vez que a eliminação destes componentes no meio significa uma redução importante de custos no processo. Em seguida, por ser uma levedura nova desenvolvida recentemente, as condições de processo (concentração do inóculo, pH e concentração de etanol inicial) foram avaliadas por planejamento fatorial na Etapa 2, de forma a se determinar as condições que levassem à maiores produtividades e concentrações de BDO.

**Figura 4.1.** Etapas de desenvolvimento do presente projeto para a produção de BDO utilizando a levedura HGS37.



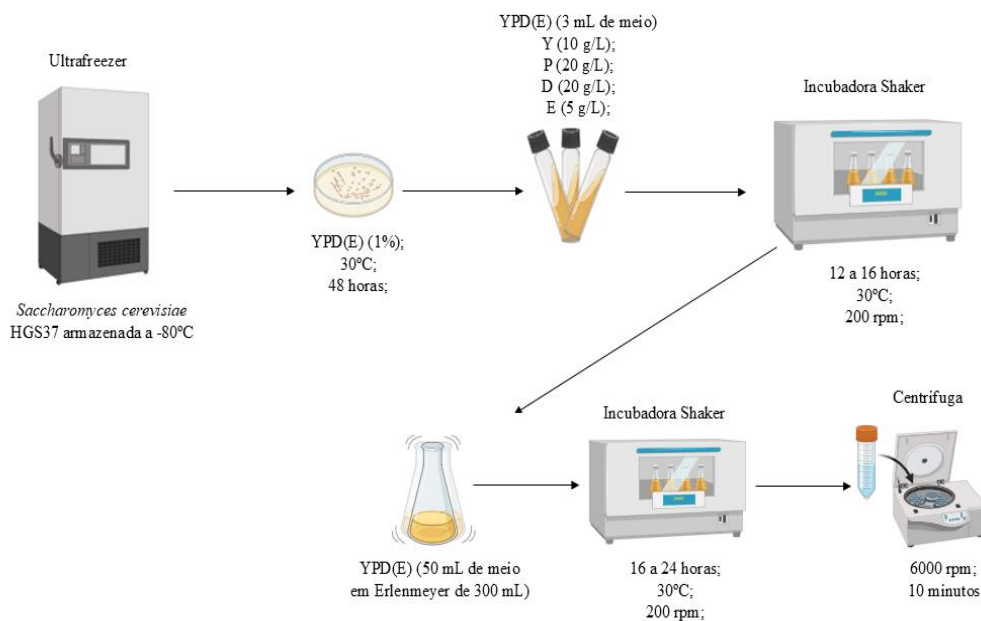
Em seguida, a viabilidade técnica da produção de BDO utilizando células imobilizadas (Etapa 3) foi analisada nas condições selecionadas na Etapa 2. Por fim, na Etapa 4, foi avaliada a performance da cepa em diferentes fontes de carbono industriais com o objetivo de integrar a

produção de BDO em biorrefinarias, sendo testados meios à base de melão e hidrolisado bruto sem destoxificação.

#### 4.1 Microrganismo e inóculo

A levedura HGS37 foi desenvolvida a partir da levedura MDS130, que por sua vez foi desenvolvida a partir da levedura industrial *Ethanol Red* (HUO *et al.*, 2022), a qual é amplamente utilizada na Europa e Estados Unidos para a produção industrial de etanol a partir de milho (SECCHES *et al.*, 2022). A Figura 4.2 expõe a metodologia utilizada para o processo de pré-inóculo e inóculo do microrganismo.

**Figura 4.2.** Etapas de preparo do pré-inóculo e inóculo da levedura HGS37



Em todos os experimentos, foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* HGS37, desenvolvida e gentilmente cedida pelo grupo do Prof. Johan Thevelein (NovelYeast/Bélgica). Inicialmente, uma alçada da levedura estoque (mantida a -80°C) foi estriada em placa de Petri em meio YPD(E)-ágar 0,5% (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L peptona, 20 g/L glicose, 15 g/L ágar e 5 g/L etanol) e mantida a 30°C por 48h. Uma colônia de levedura (retirada da placa de Petri) foi transferida para 3 mL de meio YPD(E) 0,5% (10 g/L extrato de levedura, 20 g/L

peptona, 20 g/L glicose, 5 g/L etanol) e mantida por 12h a 200 rpm e 30 °C em incubadora rotatória. Após este período, os 3 mL do pré- inóculo foram totalmente transferidos para 50 mL de meio YPD(E) 0,5 em Erlenmeyers de 300 mL e mantidos por 16-20h a 30 °C e 200 rpm para propagação celular. Em todas as etapas utilizou-se ampicilina (1 ppm). As células em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas (6000 rpm por 10 minutos e 4°C) e utilizadas nos ensaios de produção de BDO (HUO *et al.*, 2022).

#### 4.2 Seleção das condições de processo para a produção de BDO

Com o objetivo de substituir os componentes comerciais por alternativas industriais e reduzir o custo do meio de cultivo, experimentos foram realizados conforme os meios descritos na Tabela 4.1, onde foram testados o melaço de cana além da remoção dos suplementos extrato de levedura e peptona (YP) do meio, os quais possuem alto custo. Em estudos anteriores do grupo, a levedura recombinante *S. cerevisiae* T18 apresentou desempenho similar em meio à base de melaço, tanto na presença quanto na ausência desses componentes (PEREZ *et al.*, 2022), o que motivou o presente estudo. Meio sintético utilizando sacarose comercial foi utilizado como controle positivo e meio baseado em glicose comercial foi utilizado como controle negativo, reproduzindo o experimento de Huo *et al.* (2022) durante o desenvolvimento da levedura. Da mesma forma, a concentração inicial de açúcares foi baseada nos resultados destes autores. Os experimentos foram realizados em duplicatas, e a principal variável resposta foi a produção de BDO. Devido à modificação genética realizada na cepa HGS37 (deleção dos genes *PCD*) que causou auxotrofia de compostos C2, os meios foram suplementados com etanol (40 g/L). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 300 mL, com 50mL de meio de cultivo, pH 5, DO<sub>0</sub>= 5 e mantidos por 96 h a 30 °C e 120 rpm. Vale destacar que os meios baseados em melaço foram preparados a quente para possibilitar a manipulação deste subproduto extremamente viscoso.

**Tabela 4.1.** Diferentes composições dos meios de cultivo avaliados para a produção de BDO.

Ensaio/Meio	Glicose (g/L)	Sacarose (g/L)	Melaço (ART*) (g/L)	Peptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	[EtOH] (g/L)
1/YPD(E)	300	0	0	20	10	40
2/YPS(E)	0	300	0	20	10	40
3/YPM(E)	0	0	300	20	10	40
4/ M(E)	0	0	300	0	0	40

\*açúcares redutores totais

### 4.3 Seleção das condições de processo por planejamento fatorial

O planejamento fatorial consiste em uma técnica estatística voltada para a avaliação estratégica de múltiplas variáveis simultaneamente, com o intuito de identificar os fatores que otimizam os resultados em relação ao objeto de estudo (RIND *et al.*, 2024). Com base nos dados obtidos no tópico anterior, foi elaborado um planejamento fatorial  $2^3$  visando analisar, de maneira simultânea, três variáveis: pH, Densidade Ótica (DO) e concentração inicial de etanol. Esse método permite a redução do número de ensaios experimentais em comparação com abordagens uni-variadas, promovendo uma análise mais eficiente e abrangente dos parâmetros investigados. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyers de 300 mL, com 50mL de meio de cultivo por 96 h a 30 °C e 120 rpm. Os níveis e valores das variáveis estudadas encontram-se na Tabela 4.2. A matriz do planejamento fatorial encontra-se apresentada na Tabela 4.3.

A análise estatística do planejamento fatorial foi realizada utilizando-se o software Protimiza® Experimental Design. Os resultados estão expressos em forma de 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 4.2.** Variáveis estudadas e seus respectivos níveis no planejamento fatorial para produção de BDO pela *S. cerevisiae* HGS37 a partir de melão de cana-de-açúcar.

Variáveis				
Nome da variável	Unidades	-1	0	+1
DO ( $x_1$ )		5	27,5	50
pH ( $x_2$ )		4	5	6
[Etanol] $_0$ ( $x_3$ )	(g/L)	5	22,5	40

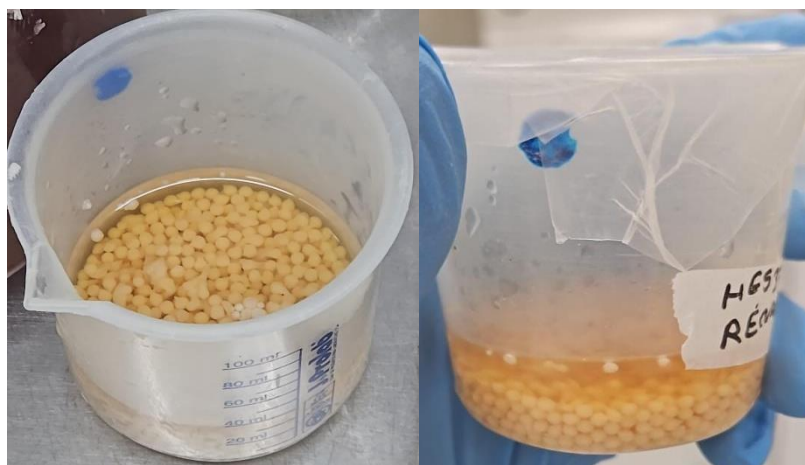
**Tabela 4.3.** Matriz do planejamento fatorial para avaliação das condições de produção de BDO pela *S. cerevisiae* HGS37 a partir de melão de cana-de-açúcar.

Ensaio	X1	X2	X3
1	5	4	5
2	50	4	5
3	5	6	5
4	50	6	5
5	5	4	40
6	50	4	40
7	5	6	40
8	50	6	40
9	27,5	5	22,5
10	27,5	5	22,5
11	27,5	5	22,5
12	27,5	5	22,5

#### 4.4 Imobilização celular e cultivo com células imobilizadas

A imobilização celular foi realizada conforme a metodologia descrita por Milesi (2017). Inicialmente, a suspensão de biomassa concentrada, obtida após centrifugação, foi incorporada na proporção de 10% m/m a uma solução contendo 1% m/m de alginato de sódio. A mistura resultante, contendo células e alginato, foi gotejada em uma solução de coagulação composta por CaCl<sub>2</sub> 0,25 M, promovendo a formação dos *beads*. Após a imobilização, os *beads* foram coletados por peneiramento e mantidos a 4°C por 12 horas em solução de cura (Figura 4.3), composta por extrato de levedura (10 g/L) e peptona (20 g/L) (PEREZ *et al.*, 2022). Após a etapa de cura das células, os cultivos foram conduzidos em duplicata utilizando células imobilizadas e melão como substrato (300 g/L), sem suplementação adicional. O processo foi conduzido com DO<sub>0</sub> 100, pH 6,0 e concentração de etanol 5,0 g/L, foram estabelecidas com base no planejamento fatorial. Os cultivos foram realizados em Erlenmeyers de 125 mL, contendo 25 mL de meio de cultivo, com os *beads* imobilizados na proporção de 50% v/v a 30 °C e 200 rpm.

**Figura 4.3.** Beads da levedura HGS37 em solução de cura.



#### 4.5 Pré-tratamento e hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar

O pré-tratamento hidrotérmico do bagaço de cana-de-açúcar foi conduzido em um reator de alta pressão Parr, modelo 4848, com capacidade de 2 L, equipado com controle de agitação mecânica e aquecimento. O processo foi realizado conforme as condições estabelecidas por Furlong (2015), utilizando uma temperatura de 195 °C por 10 minutos e uma relação sólido:líquido de 1:10 (m/v). Ao término do pré-tratamento, o bagaço foi filtrado ainda quente para evitar a precipitação da lignina solubilizada. A fração sólida obtida foi submetida à hidrólise enzimática conforme descrito por Sandri *et al.* (2023). As hidrólises foram realizadas utilizando a enzima Cellic® CTec 2 (Novozymes, Dinamarca), com uma carga sólida de 15% m/v (base seca) a 50 °C. O processo foi conduzido em frascos de 50 mL contendo bagaço de cana pré-tratado, garantindo a carga sólida necessária para um volume final de 20 mL (relação Vmeio:Vfrasco de 1:2,5). A carga enzimática utilizada foi de 45 FPU/g<sub>celulose</sub>. Além disso, foram adicionados ampicilina (100 µg/mL) e polietilenoglicol (PEG: 0,05 g/g de biomassa seca), conforme metodologia descrita por Cebreiros *et al.* (2019). O pH inicial foi ajustado para 5 com NaOH (3 mol/L). O líquido resultante foi posteriormente analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação dos açúcares liberados.

#### 4.6 Produção de BDO utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e hidrolisado suplementado com melão

A capacidade fermentativa da levedura HGS37 no hidrolisado celulósico obtido no item 4.5 foi avaliada por meio de ensaios utilizando o hidrolisado bruto, sem destoxificação. O cultivo, realizado em duplicata, foi conduzido a 30 °C e 120 rpm em Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de volume reacional, sob as condições de pH e concentração celular

previamente definidas neste estudo. Os hidrolisados foram suplementados com YP (10 g/L de extrato de levedura e 20 g/L de peptona) e etanol (5 g/L). Após a avaliação do hidrolisado individualmente, foi realizada a adição de melaço ao meio visando representar a integração entre os processos de primeira e segunda geração. Esses cultivos tiveram como objetivo atingir uma elevada concentração de BDO utilizando hidrolisado como substrato. Para isso, o cultivo com hidrolisado foi realizado e, após 24h de processo, foi realizada uma suplementação de 6 mL de melaço, o que corresponde a uma adição de 150 g/L de açúcares redutores totais (ART). O cultivo com hidrolisado suplementado com melaço seguiu os mesmos procedimentos dos cultivos utilizando apenas hidrolisado.

## 4.7 Métodos analíticos

### 4.7.1 Viabilidade celular

A viabilidade das leveduras foi avaliada por coloração com azul de metileno e contagem em câmara de Neubauer de acordo com a 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.

### 4.7.2 Quantificação de substratos e produtos

A quantificação de açúcares e produtos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Inicialmente, as amostras foram tratadas para remoção dos sólidos insolúveis por meio da centrifugação, sendo congeladas por pelo menos 24 h, descongeladas e centrifugadas duas vezes conforme Demeke *et al.* (2013). As análises foram realizadas em um cromatógrafo Waters e2695 dotado de detectores de índice de refração e UV-VIS ( $\lambda=210$  nm). Para quantificar etanol, glicerol e BDO, foi utilizada a coluna de exclusão iônica Rezex<sup>TM</sup> ROA-Organic acid H<sup>+</sup>, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM como fase móvel no fluxo de 0,6 mL/min e temperatura de operação 65 °C (RAMOS, 2023). Os açúcares sacarose, glicose, xilose e frutose foram quantificados em coluna Sugar Pak I 6.5×300 mm (Waters, USA) com detector RID usando água ultrapura com 50 mg/g Ca-EDTA como fase móvel (0.5 mL/min) a 80 °C (SANDRI *et al.*, 2023).

### 4.7.3 Cálculos

Para avaliação dos ensaios de produção de BDO, a partir dos dados obtidos pelas análises em HPLC foram calculados a conversão de substrato (X, %), o fator de rendimento (YP/S, g/g) e a produtividade volumétrica (QP, g<sub>BDO</sub>/L/h) (SHULER e KARGI, 2002), conforme apresentado na Tabela 4.4, onde CS<sub>0</sub> é a concentração de açúcares redutores totais (ART) no tempo inicial (g/L); CS<sub>f</sub> é a concentração de ART final no caldo fermentado (g/L); CP<sub>f</sub> é a concentração final de BDO (g/L); CP<sub>0</sub> a concentração de produto no início do processo (g/L); C<sub>EtOHf</sub> é a concentração final de etanol (g/L) C<sub>EtOH0</sub> a concentração de etanol no início do processo (g/L); e Δt é tempo de processo (h). CP<sub>BDO</sub> é a concentração de BDO final e CP<sub>GliOH</sub> é a concentração final de glicerol do cultivo.

**Tabela 4.4.** Parâmetros fermentativos utilizados para avaliar a produção de BDO com a levedura HGS37 (SHULER e KARGI, 2002).

Parâmetro	Equação
Conversão final de substrato - X (%)	$X = \frac{CS_0 - CS_f}{CS_0} \times 100 \quad (3)$
Rendimento de substrato em BDO - YP/S (g/g)	$y_{p/s} = \frac{CP_f - CP_0}{CS_0 - CS_f} \quad (4)$
Produtividade volumétrica - Qp (g/L/h)	$Qp = \frac{CP_f - CP_0}{\Delta t} \quad (5)$
Seletividade de BDO/GliOH em g <sub>BDO</sub> /g <sub>GliOH</sub>	$S = \frac{CP_{BDO}}{CP_{GLIOH}} \quad (6)$

### 4.7.4 Análise de variância e método Tukey

A Análise de Variância (ANOVA) é uma ferramenta estatística amplamente utilizada para comparar as médias de três ou mais grupos de dados, com o objetivo de determinar a existência de diferenças estatisticamente significativas entre eles. Esse método avalia se a variação observada nas médias pode ser atribuída a diferenças entre os grupos (variabilidade intergrupos) ou se é decorrente de variações dentro dos próprios grupos (variabilidade intragrupos). A ANOVA calcula a estatística F, que representa a razão entre a variabilidade

intergrupos e a variabilidade intragrupos. Um valor elevado de F sugere que as diferenças entre as médias são maiores do que seria esperado ao acaso, levando à rejeição da hipótese nula, o que indica que pelo menos um dos grupos apresenta uma média significativamente diferente. No entanto, a ANOVA não especifica quais grupos diferem entre si. Para identificar essas diferenças específicas, são necessários testes pós- hoc, como o teste de Tukey, que compararam pares de grupos individualmente (CORDEIRO *et al.*, 2018).

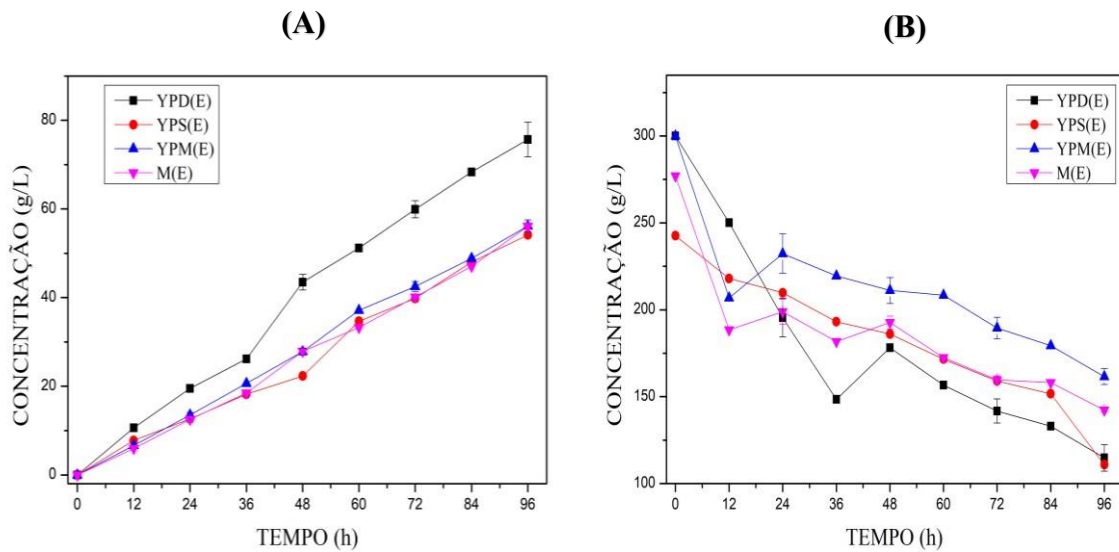
O teste de Tukey é um procedimento estatístico que realiza comparações entre todas as combinações de pares de grupos, ajustando o nível de significância para controlar o erro do tipo I (falsos positivos). Este teste calcula a diferença entre as médias de cada par de grupos e a compara a um valor crítico, que é determinado em função do número total de comparações realizadas e da variabilidade observada dentro dos grupos. Quando a diferença entre as médias de dois grupos ultrapassa o valor crítico, conclui-se que esses grupos apresentam médias significativamente diferentes. Além disso, o teste de Tukey pode fornecer intervalos de confiança para as diferenças entre as médias, o que facilita a interpretação e visualização das comparações realizadas (SILVA *et al.*, 2022). O teste de Tukey dos resultados obtidos foi realizado utilizando o software OriginPro® 8.5.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Performance da cepa HGS37 em melão de cana-de-açúcar

Considerando que a cepa *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 foi desenvolvida a partir da cepa MDS130, a qual possui como parental a cepa industrial *Ethanol Red*, sua performance em melão foi avaliada. A Figura 5.1 apresenta uma comparação da produção de BDO em meios com diferentes composições. O meio contendo sacarose comercial foi testado com o intuito de investigar se as variações na taxa de consumo de açúcares e na produção de BDO entre os meios contendo melão e glicose comercial são atribuíveis ao metabolismo específico da cepa ou à complexidade composicional do melão.

**Figura 5.1.** Produção de BDO (A) e consumo de açúcares redutores totais (ART) (B) pela levedura *S. cerevisiae* HGS37 em diferentes meios sintéticos (YPD(E) e YPS(E)) e industriais baseados em melão (YPM(E) e M(E)) com e sem suplementação com extrato de levedura e peptona (YP).



De maneira geral, a levedura foi capaz de produzir BDO a partir de substratos alternativos aos comerciais, como o melão. Apesar do meio YPM(E) apresentar menor velocidade de produção de BDO quando comparado ao meio sintético YPD(E), o processo foi semelhante ao meio contendo sacarose comercial YPS(E), o que sugere que a taxa de consumo desse açúcar está associada ao metabolismo da cepa microbiana utilizada e não pela influência do melão. A diferença observada na produção e consumo entre os meios contendo açúcares na

forma de sacarose e o meio à base de glicose pode ser atribuída à necessidade de hidrólise da sacarose, que provavelmente retarda a assimilação dos açúcares e, conseqüentemente, a produção de BDO (HAWAZ *et al.*, 2024). A sacarose é um dissacarídeo composto por glicose e frutose ligadas por ligações  $\beta$ -1,4, que precisa ser previamente hidrolisada pela enzima invertase produzida pelas leveduras *S. cerevisiae*, gerando frutose e glicose, que são açúcares diretamente assimiláveis pelo metabolismo celular. Esse processo de hidrólise adiciona uma etapa extra no uso da sacarose, o que retarda o consumo dos açúcares e, conseqüentemente, diminui a produtividade em comparação à utilização direta de glicose (MARQUES *et al.*, 2018).

O estudo dirigido por Marques *et al.* (2016) demonstrou uma diferença significativa na taxa de consumo de sacarose e glicose por *Saccharomyces cerevisiae*. Foi observado que a taxa específica de consumo do substrato foi 50% inferior em meios contendo sacarose, em comparação aos meios contendo glicose. Dário (2012), utilizando um cultivo contínuo em condições de quimiostato com a cepa *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-5D, avaliou a eficiência da cepa em diferentes substratos, especificamente glicose e sacarose. Os resultados indicaram que a velocidade específica de consumo de substrato foi 10% maior em meios contendo glicose em comparação aos meios com sacarose. Dessa forma, os cultivos realizados exclusivamente com glicose como substrato demonstraram resultados superiores quando comparados às células cultivadas com sacarose em termos de produtos formados e açúcares consumidos.

O estudo conduzido por Silva *et al.* (2024) teve como objetivo analisar os parâmetros cinéticos em cultivos anaeróbicos utilizando diferentes substratos e 13 cepas distintas de *S. cerevisiae*. Entre as cepas avaliadas, destacaram-se *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 e *S. cerevisiae* BB9. Ao comparar o desempenho dessas cepas em meios contendo glicose e sacarose, verificou-se que as taxas específicas de consumo de substrato foram maiores nos cultivos com glicose. Além disso, os meios contendo sacarose apresentaram maiores concentrações de açúcares residuais e com um tempo total para consumo de todo o substrato maior em ambas as cepas, em comparação aos meios com glicose.

Desta forma, percebe-se que quando a sacarose é a única fonte de carbono disponível, o consumo pela levedura ocorre de forma menos eficiente em comparação à glicose, devido à etapa adicional de hidrólise extracelular. Desta forma, essa característica parece ser intrínseca à espécie (BADOTTI *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2016), evidenciando que as modificações genéticas da HGS37 não influenciaram negativamente a produção de invertase na levedura, o que era uma preocupação considerando a menor velocidade dos ensaios em sacarose observada.

De maneira geral, essa diferença de assimilação dos monossacarídeos e da sacarose resultou em parâmetros fermentativos superiores para o meio YPD(E) (diferença significativa a 95% de confiança de acordo com teste de Tukey, Tabela 5.1), porém vale ressaltar que todos os meios baseados em sacarose tiveram desempenhos semelhantes. Entretanto, a substituição da glicose comercial por sacarose e melaço de cana-de-açúcar como substratos não apresentou impacto significativo no metabolismo celular da cepa, o que é demonstrado pelo rendimento semelhante de 0,41 g/g em todos os meios avaliados, o que sugere que o microrganismo foi capaz de converter um grama de qualquer substrato na mesma quantidade de BDO, sem desvio de metabolismo. Os resultados experimentais corresponderam a 81% do rendimento teórico máximo de 0,51 g/g para glicose, conforme descrito por Huo *et al.*, (2022) e 77,94% do rendimento teórico máximo de 0,526 g/g para sacarose.

**Tabela 5.1.** Parâmetros fermentativos da produção de BDO pela cepa *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 usando meio à base de melaço. Letras iguais representam que as medias não diferiram significativamente, de acordo com o teste de Tukey com nível de confiança de 95%.

Meio	BDO (g/L)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Q <sub>P</sub> (g/L/h)	Y <sub>P/S</sub> (%)	X (%)
YPDE	75,70±3,93 <sup>a</sup>	0,41±0,04 <sup>c</sup>	0,8±0,08 <sup>d</sup>	81,00±1,32 <sup>f</sup>	65±0,02 <sup>g</sup>
YPSE	54,15±0,72 <sup>b</sup>	0,41±0,00 <sup>c</sup>	0,6±0,00 <sup>e</sup>	77,94±1,32 <sup>f</sup>	54±0,04 <sup>h</sup>
YPME	56,16±1,38 <sup>b</sup>	0,41±0,04 <sup>c</sup>	0,6±0,02 <sup>e</sup>	77,94±1,32 <sup>f</sup>	48±0,01 <sup>h</sup>
ME	56,10±0,69 <sup>b</sup>	0,41±0,05 <sup>c</sup>	0,6±0,01 <sup>e</sup>	77,94±1,32 <sup>f</sup>	49±0,00 <sup>h</sup>

Y<sub>P/S</sub>: rendimento de BDO; Q<sub>P</sub>: produtividade de BDO; Y<sub>P/S</sub> (%): porcentagem do rendimento teórico alcançado (0,51 g/g para glicose; 0,526 g/g para sacarose); X: conversão de açúcares redutores totais;

Y<sub>P/EtOH</sub>: rendimento de BDO por grama de etanol consumido.

Além disso, a produção de BDO foi equivalente tanto nos meios suplementados com extrato de levedura e peptona quanto no meio sem essa suplementação (não há diferença significativa de acordo com teste de Tukey 95% de confiança), indicando que a cepa pode manter sua eficiência produtiva mesmo sem adição destas fontes de nitrogênio.

A ausência de necessidade de suplementação com nutrientes torna o uso do melaço para a produção de BDO economicamente interessante, uma vez que esses suplementos elevam os custos do processo produtivo, podendo comprometer sua viabilidade. Em pesquisas anteriores

conduzidas pelo grupo, também foi constatada a ausência de necessidade de suplementação de nutrientes para fermentações eficientes. No estudo de Perez *et al.* (2022), foi utilizado melaço associado a hidrolisado bruto de cana-de-açúcar para a produção de etanol de segunda geração (2G) pela levedura *S. cerevisiae* T18, e os autores observaram produtividades equivalentes aos meios contendo suplementações comerciais. Esses resultados reforçam a evidência de que a suplementação de nutrientes em meios contendo melaço não é indispensável para se obter fermentações de alto desempenho.

Na literatura, há poucos relatos sobre a produção de BDO utilizando melaço como substrato. A maioria das publicações que abordam esse tema foca na produção de BDO a partir de glicose, geralmente resultando em baixos rendimentos e produtividades como respectivamente descritos nos seguintes estudos de HE *et al.* (2025) 22,0 (g/L) e 0,30 (g/L/h), JIANG *et al.* (2024) 6,88 (g/L) e 0,73 (g/L/h); e Morita *et al.* (2022) 0,70 (g/L) e 0,014 (g/L/h). Esses dados sugerem que, apesar do potencial do melaço como uma fonte de carbono alternativa e mais acessível, ele permanece pouco explorado em relação à produção de BDO.

Apesar do número limitado de publicações, alguns estudos exploraram essa alternativa. Um exemplo é o trabalho de Tinoco *et al.* (2024), que visou reduzir os custos de produção de BDO. Nesse estudo, uma economia de 75,2% foi alcançada através do cultivo da cepa *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 em meio contendo melaço como substrato, suplementado com NH<sub>4</sub>Cl como fonte de nitrogênio de baixo custo. O custo final de produção foi de 42,69 US\$/m<sup>3</sup> de BDO, comparado com 171,87 US\$/m<sup>3</sup> do meio de controle com glicose como substrato e suplementado com extrato de levedura e sais minerais, evidenciando o potencial econômico do uso de melaço nesse processo.

O estudo de Yang *et al.* (2022) focou na produção de BDO por *Clostridium ljungdahlii*, uma cepa não patogênica, utilizando melaço como substrato sem suplementação adicional. A pesquisa alcançou uma produtividade de 0,46 g/L/h. No entanto, o estudo enfrentou o desafio da inibição por substrato, o que exigiu a utilização de concentrações iniciais de açúcares relativamente baixas. Concentrações superiores a 35 g/L de açúcares tornaram o processo inviável devido à inibição, limitando o potencial de escalonamento e eficiência do processo fermentativo.

No estudo de Stoklosa *et al.* (2022), a produção de BDO foi investigada utilizando a cepa *Paenibacillus polymyxa* em bateladas alimentadas com melaço sem suplementação. Os resultados mostraram baixas concentrações de BDO (25 g/L), além da produção concomitante de acetoína e etanol. Durante o processo, parte do BDO formado foi convertido em acetoína pela própria célula, resultando em uma concentração final de acetoína superior à de BDO. O

estudo também identificou o mesmo problema relatado por Yang *et al.* (2022), no qual altas concentrações iniciais de açúcares inibiram a produção de BDO, limitando a eficiência do processo fermentativo.

A cepa utilizada neste trabalho foi geneticamente modificada para não ser afetada por altas concentrações de açúcares iniciais, superando um dos principais desafios observados em outros estudos. Além disso, essa cepa não produz produtos concorrentes ao BDO no metabolismo celular, uma vez que os genes responsáveis pela síntese desses metabólitos foram deletados. Outro diferencial importante é a resistência da cepa a concentrações elevadas de etanol, o que potencializa sua eficiência em processos fermentativos. O estudo demonstrou que o melão, sem necessidade de suplementação, serviu como substrato autossuficiente para a produção de BDO, destacando o potencial do processo para aplicações industriais.

Outro aspecto relevante observado nesses ensaios foi o consumo incompleto dos açúcares redutores totais fermentescíveis (ART). Durante todos os cultivos, a levedura não foi capaz de consumir totalmente o açúcar disponível, o que sugere que a produção de BDO pode ser aumentada se o consumo de ART for otimizado. As concentrações de açúcares remanescentes após o processo de fermentação nos meios YPD(E), YPS(E), YPM(E) e M(E) foram, respectivamente, 114,8 g/L, 110,9 g/L, 161,59 g/L e 142,29 g/L, indicando uma variação no grau de consumo de açúcares dependendo da composição do meio.

A Figura 5.1 B mostra que o consumo de açúcares totais foi menor nos meios à base de melão em comparação aos meios contendo sacarose e glicose comercial, o que pode ser atribuído à maior complexidade do substrato de melão e à hidrólise da sacarose, conforme discutido anteriormente. Tal comportamento pode também ser explicado pela baixa densidade celular no meio ( $DO_0$  5), além de um sinergismo entre a alta concentração inicial de etanol (40 g/L) com a complexidade do meio à base de melão, que podem exercer um efeito inibitório sobre o metabolismo celular e, conseqüentemente, sobre o consumo de açúcares.

Analisando a produtividade, a concentração de BDO e o rendimento apresentados na Tabela 3.2, a cepa HGS37 destacou-se como mais eficiente na produção de BDO, superando os demais estudos, com exceção de *Klebsiella oxytoca* KMS005-73T e *Saccharomyces cerevisiae* S5\_mBDO4. Estas últimas mostraram resultados superiores em todos os parâmetros analisados, especialmente a cepa S5\_mBDO4, que alcançou uma produção de BDO de 171 g/L. A HGS37, quando cultivada em meio de melão sem suplementação. Embora as cepas IAM1183-LPBC e M1-L31-Pb tenham apresentado rendimentos superiores, seus valores de produtividade e produção de BDO foram consideravelmente mais baixos.

Além disso, é importante destacar que todos os estudos comparados na tabela utilizaram substratos comerciais e suplementação de nutrientes extras, diferentemente do presente estudo, que se baseou exclusivamente no uso de melaço como substrato sem suplementação. Ademais, alguns microrganismos mencionados anteriormente têm alto potencial de patogenicidade, o que os torna inviáveis para escalonamento industrial, reforçando a viabilidade e segurança da HGS37 no contexto de bioprocessos industriais.

## **5.2 Seleção das condições de produção de BDO em melaço de cana-de-açúcar**

Uma vez determinada a capacidade da HGS37 de produzir BDO a partir de melaço sem suplementação, as condições de processo foram selecionadas. Para isso, foi realizado um planejamento experimental  $2^3$  com o objetivo de avaliar a influência da carga de células iniciais, da concentração inicial de etanol e do pH na produção de BDO por fermentação utilizando a cepa HGS37 em melaço. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5.2, onde é possível verificar que a produção de BDO variou consideravelmente de 13,04 a 60,60 g/L, assim como as demais variáveis resposta estudadas. De maneira geral, o consumo de açúcares não foi completo em todos os experimentos, atingindo a maior conversão (69,5%) no Experimento 4, onde se utilizou  $DO_0$  50, pH 6 e 5 g/L de etanol inicial.

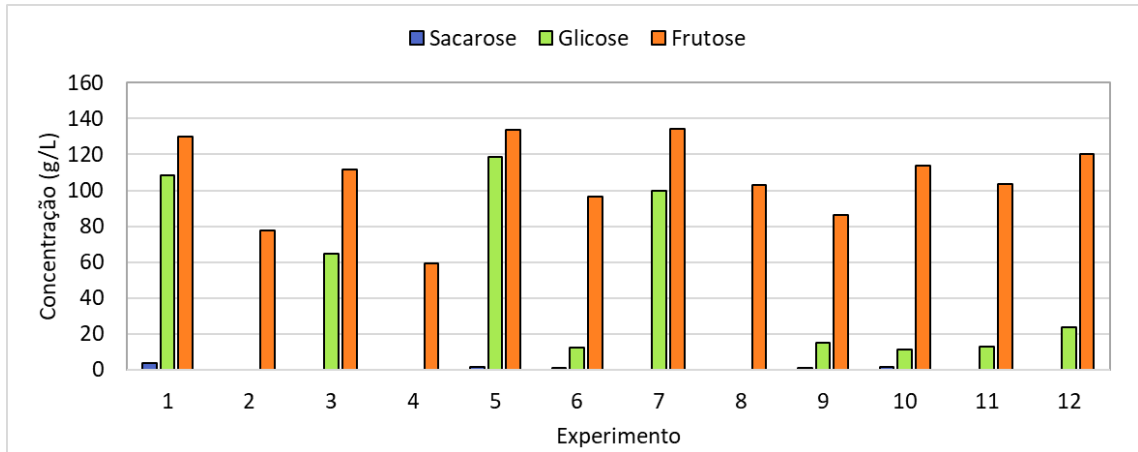
**Tabela 5.2.** BDO produzido e parâmetros fermentativos do planejamento experimental 2<sup>3</sup> realizado variando DO inicial, concentração inicial de etanol e pH inicial do cultivo usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm).

Exp.	DO <sub>0</sub>	pH	[EtOH] <sub>0</sub> (g/L)	Q <sub>s</sub> (g/L/h)	BDO (g/L)	Q <sub>p</sub> (g/L/h)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Y <sub>P/S</sub> (%)	X (%)	Viabilidade celular (%)	DO <sub>final</sub>
1	5	4	5	0,60	6,69	0,07	0,12	22,81	19,3	14	7,25
2	50	4	5	1,14	46,10	0,48	0,42	79,84	58,5	64	37,5
3	5	6	5	0,59	36,70	0,38	0,30	57,03	41,3	38	2,9
4	50	6	5	1,41	54,67	0,57	0,40	76,04	69,5	50	52,4
5	5	4	40	0,30	13,04	0,14	0,46	87,45	15,8	82	3,35
6	50	4	40	1,46	49,66	0,52	0,35	66,53	56	72	49,7
7	5	6	40	0,11	14,74	0,15	0,38	72,24	14,3	77	6,2
8	50	6	40	1,53	60,60	0,63	0,41	77,94	58,8	67	50,3
9	27,5	5	22,5	1,23	55,05	0,57	0,46	85,55	53,5	87	26
10	27,5	5	22,5	1,23	57,66	0,60	0,45	85,55	50,5	84	25,2
11	27,5	5	22,5	1,37	50,32	0,52	0,38	72,24	53	73	26,6
12	27,5	5	22,5	1,33	47,04	0,49	0,37	70,34	47	86	26,8

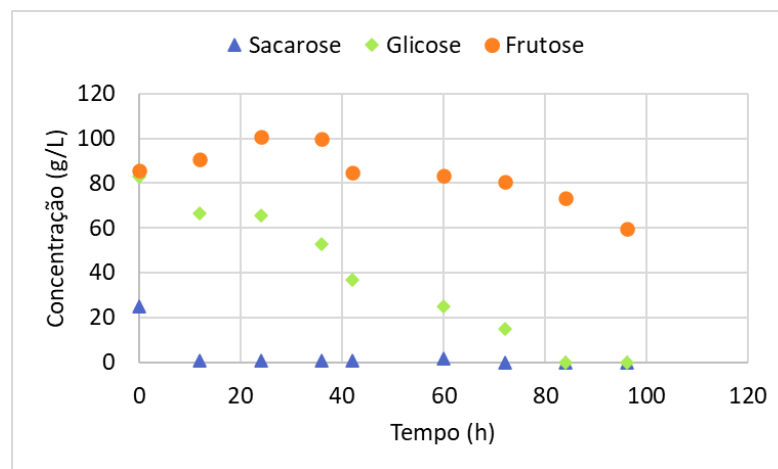
DO<sub>0</sub>: densidade óptica inicial; Q<sub>s</sub>: produtividade de substrato; Y<sub>P/S</sub>: rendimento de BDO; Y<sub>P/S</sub> (%): porcentagem sobre o rendimento teórico; X (%): conversão de substrato em porcentagem; DO<sub>final</sub>: densidade óptica final;

Considerando o consumo incompleto de açúcares em todos os experimentos, a Figura 5.2 traz as concentrações de sacarose, glicose e frutose finais para cada um dos experimentos do planejamento fatorial realizado, onde é possível se observar que nos experimentos onde obteve-se maiores quantidades de açúcares consumidos (2, 4 e 8), tanto sacarose quanto glicose foram totalmente consumidas, enquanto a frutose manteve-se como o principal açúcar residual. Um detalhamento do acompanhamento das concentrações de açúcares com o tempo de processo para o Experimento 4, o qual apresentou menor concentração de açúcares residuais, é apresentado na Figura 5.3, onde é possível observar o esgotamento da sacarose, assim como o consumo da glicose preferencialmente à frutose. Embora o experimento 8 tenha apresentado a maior concentração de BDO em g/L, ele não foi o mais adequado a ser considerado uma vez que apresentou maior concentração de açúcar residual devido ao fato de ter utilizado concentrações elevadas de etanol.

**Figura 5.2.** Concentrações finais de sacarose, glicose e frutose nos experimentos do planejamento fatorial  $2^3$  para produção de BDO a partir de melaço usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm).



**Figura 5.3.** Acompanhamento das concentrações de açúcares no Experimento 4 do planejamento fatorial  $2^3$  para produção de BDO a partir de melaço usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 ( $DO_0=50$ ; pH 6;  $[EtOH]_0=5$  g/L; 300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm).



Uma característica marcante das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* é sua preferência pelo metabolismo fermentativo em presença de glicose, mesmo na disponibilidade de oxigênio, um fenômeno conhecido como efeito crabtree. Nesse estado, a levedura prioriza a fermentação em vez da respiração celular, suprimindo o uso de fontes alternativas de carbono e inibindo a glicogênese (repressão catabólica). A via de sinalização Snf3/Rgt2 é responsável por detectar os níveis extracelulares de glicose e regular sua captação, enquanto a via de sinalização Snf1 é crucial para a regulação da repressão catabólica por glicose, desempenhando um papel central no equilíbrio dos níveis de energia celular (KAYIKCI; NIELSEN, 2015).

Em concentrações elevadas de glicose, a quinase Snf1 permanece inativa, o que mantém o fator de transcrição Mig1 desfosforilado. Isso permite que Mig1, em conjunto com o complexo Ssn6/Tup1, reprima genes envolvidos na utilização de outras fontes de carbono. Quando os níveis de glicose se tornam limitados, a quinase Snf1 é ativada e fosforila Mig1, aliviando a repressão e permitindo a expressão de genes previamente reprimidos pela presença de glicose (GANCEDO, 1998; HEDBACKER e CARLSON, 2008).

No presente estudo, o efeito da repressão catabólica por glicose é evidenciado pela diferença no consumo de glicose e frutose observada na Figura 5.2. Durante o cultivo, a levedura demonstrou uma preferência clara pela glicose, resultando em altas concentrações de açúcares residuais na forma de frutose. É provável que, à medida que a glicose se esgota, a repressão catabólica seja aliviada, permitindo o consumo completo da frutose. No entanto, do ponto de vista industrial, não seria viável estender o cultivo até que toda a frutose fosse consumida, uma vez que o tempo de 96 horas já é considerado elevado para processos de fermentação.

Outro fator que pode ter contribuído para a elevada concentração de frutose residual é o fato de a cepa utilizada ser derivada da *Ethanol Red*, uma cepa industrial conhecida por seu alto desempenho na produção de etanol a partir de milho, onde o substrato é principalmente composto por amido, e não sacarose (HUO *et al.*, 2022). Como essa cepa foi desenvolvida para metabolizar preferencialmente glicose, e não frutose, é possível que a capacidade de consumo de frutose seja limitada nesse microrganismo, refletindo sua adaptação a processos industriais que priorizam a eficiência no uso de glicose (CAGNIN *et al.*, 2021). Em experimentos onde a glicose não foi totalmente consumida (Exp 3, Figura 5.2), a concentração de frutose permaneceu constante durante todo o experimento, ou seja, não foi nem parcialmente consumida.

De maneira geral, os ensaios com densidade celular mais elevada apresentaram os melhores desempenhos na produção de BDO, levando à hipótese de que a concentração celular influencia diretamente no processo e na produção de BDO. Assim, os resultados obtidos foram analisados utilizando o software PRO\TIMIZA® e a estimativa dos efeitos de cada variável encontra-se na Tabela 5.3.

**Tabela 5.3.** Efeitos e coeficientes das variáveis concentração inicial de células (DO), concentração inicial de etanol e do pH inicial na fermentação de melaço por *S. cerevisiae* HGS37 pelo delineamento fatorial  $2^3$  com 4 repetições no ponto central (condições de processo: 300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm). Efeitos significativos a 90% de confiança ( $p < 0,1$ ) destacados em vermelho.

	Efeito	Erro	T	p	Significativo
<b>Consumo de substrato</b>					
DO ( $X_1$ )	50,72	11,02	4,60	<b>0,0058</b>	<b>SIM</b>
pH ( $X_2$ )	5,38	11,02	0,49	0,6463	NÃO
Etanol inicial ( $X_3$ )	-7,67	11,02	-0,70	0,5171	NÃO
$X_1 * X_2$	2,88	11,02	0,26	0,8045	NÃO
$X_1 * X_3$	18,27	11,02	1,66	0,1581	NÃO
$X_2 * X_3$	-0,93	11,02	-0,08	0,9363	NÃO
<b>Conversão (X)</b>					
DO ( $X_1$ )	0,21	0,03	7,01	<b>0,0009</b>	<b>SIM</b>
pH ( $X_2$ )	0,06	0,03	2,06	<b>0,0942</b>	<b>SIM</b>
Etanol inicial ( $X_3$ )	-0,07	0,03	-2,47	<b>0,0562</b>	<b>SIM</b>
$X_1 * X_2$	-0,03	0,03	-0,91	0,4059	NÃO
$X_1 * X_3$	0,04	0,03	1,32	0,2441	NÃO
$X_2 * X_3$	-0,02	0,03	-0,66	0,5385	NÃO
<b>Y/P/S</b>					
DO ( $X_1$ )	0,10	0,03	2,95	<b>0,0319</b>	<b>SIM</b>
pH ( $X_2$ )	0,07	0,03	2,20	<b>0,0792</b>	<b>SIM</b>
Etanol inicial ( $X_3$ )	-0,01	0,03	-0,34	0,7486	NÃO
$X_1 * X_2$	-0,06	0,03	-1,91	0,1146	NÃO
$X_1 * X_3$	0,00	0,03	-0,09	0,9295	NÃO
$X_2 * X_3$	0,03	0,03	1,01	0,3600	NÃO
<b>Qp</b>					
DO ( $X_1$ )	0,20	0,05	3,72	<b>0,0137</b>	<b>SIM</b>
pH ( $X_2$ )	0,08	0,05	1,56	0,1788	NÃO
Etanol inicial ( $X_3$ )	-0,02	0,05	-0,47	0,6607	NÃO
$X_1 * X_2$	-0,03	0,05	-0,61	0,5662	NÃO
$X_1 * X_3$	0,05	0,05	0,93	0,3962	NÃO
$X_2 * X_3$	-0,02	0,05	-0,31	0,7665	NÃO
<b>Produção de BDO</b>					
DO ( $X_1$ )	19,13	5,14	3,72	<b>0,0137</b>	<b>SIM</b>
pH ( $X_2$ )	8,03	5,14	1,56	0,1794	NÃO
Etanol inicial ( $X_3$ )	-2,40	5,14	-0,47	0,6603	NÃO
$X_1 * X_2$	-3,15	5,14	-0,61	0,5669	NÃO
$X_1 * X_3$	4,78	5,14	0,93	0,3957	NÃO
$X_2 * X_3$	-1,63	5,14	-0,32	0,7648	NÃO

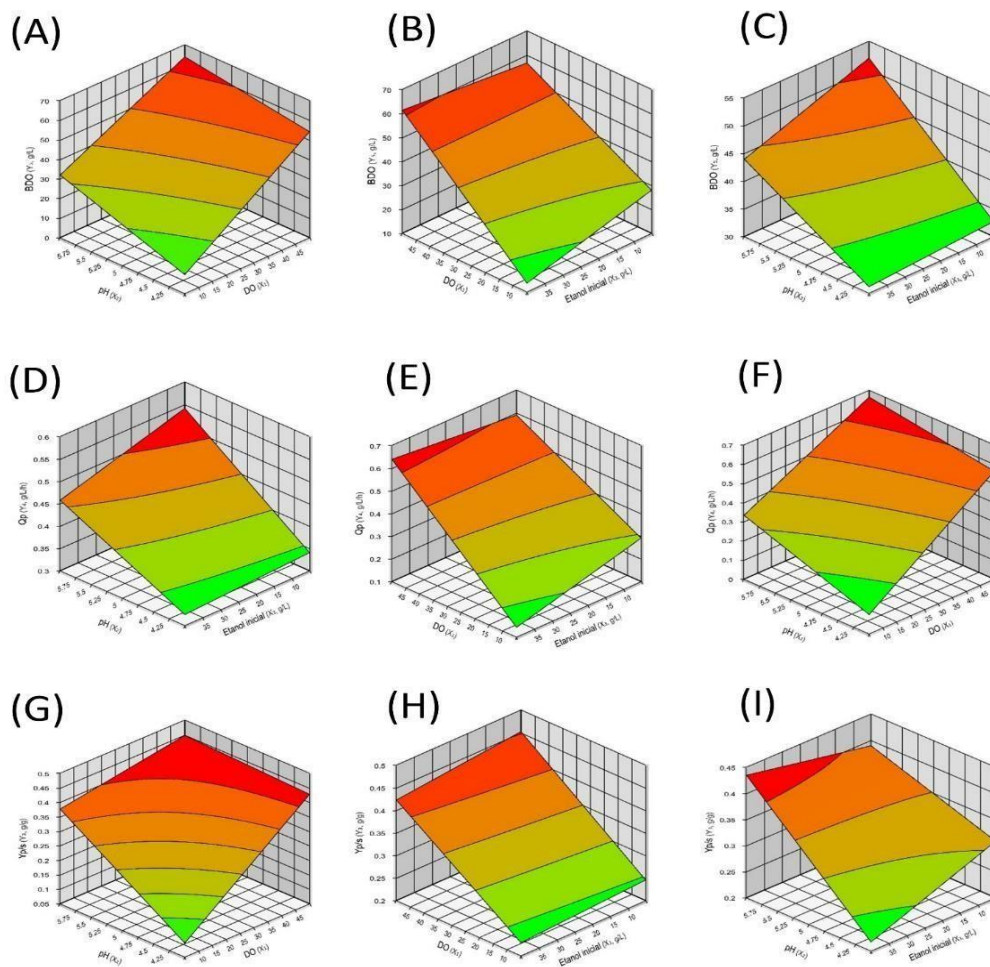
Pelos dados estatísticos é possível verificar que o uso de altas cargas celulares iniciais é fundamental para aumentar a eficiência do processo, uma vez que possui efeito positivo e significativo em todas as variáveis resposta estudadas, ou seja, um aumento na concentração celular provoca um aumento na variável resposta. De fato, o consumo de substrato, a produtividade e a produção de BDO dependeram exclusivamente da densidade celular inicial. Os experimentos que apresentaram os melhores resultados foram aqueles em que a concentração celular inicial estava elevada, com uma densidade óptica (DO) inicial de 50 (25 g/L de células). Além disso, os pontos centrais, que também apresentaram densidades ópticas relativamente altas (DO de 27,5), também obtiveram bom desempenho nos parâmetros mencionados, reforçando a importância da densidade celular no sucesso do processo fermentativo.

O desenvolvimento de bioprocessos que mantenham altas densidades celulares, visando aumentar os rendimentos, é de grande relevância para a indústria atual. A pesquisa de Zhang *et al.* (2024) explorou a estratégia de fermentações sob alta densidade celular utilizando *Bacillus subtilis* para otimizar o rendimento na produção de lipopeptídeos cíclicos. O aumento da densidade celular promoveu a ativação da via do metabolismo energético, resultando na produção elevada de ATP, o que contribuiu para a manutenção da vitalidade celular e, conseqüentemente, para o aumento dos rendimentos dos lipopeptídeos. Pawar *et al.* (2021) desenvolveram uma estratégia baseada em altas cargas celulares para a produção de óleo rico em ácido docosaheptaenóico por meio da fermentação de *Thraustochytrids*. O estudo evidenciou que a adoção de altas densidades celulares resultou em um aumento significativo na produtividade de ácido docosaheptaenóico durante o cultivo contínuo. Adicionalmente, processos bem estabelecidos industrialmente também são conduzidos com alta carga celular, como por exemplo a produção de etanol de primeira geração no Brasil (LOPES *et al.*, 2016).

A regressão multivariável gerada para cada resposta foi representada graficamente por meio de superfícies de resposta, as quais permitem a visualização das interações entre as variáveis estudadas. As Anovas referentes aos modelos encontram-se no Anexo A. Essas superfícies foram construídas com base nas principais variáveis resposta do planejamento experimental, levando em consideração os resultados significativos observados na Tabela 5.3. Esse método de análise facilita a interpretação dos efeitos das variáveis independentes sobre o consumo de substrato, produtividade e produção de BDO, destacando as condições mais adequadas para maximizar os resultados. Os modelos analisados por meio da ANOVA apresentaram coeficientes de determinação ( $R^2$ ) dentro de uma faixa de excelência, indicando que explicam os dados de maneira confiável. Os parâmetros avaliados, como conversão,

rendimento, produtividade e produção de BDO, apresentaram  $R^2$  em torno de 80%, (ANEXO A) enquanto o consumo de substrato alcançou um  $R^2$  próximo de 90%, demonstrando uma elevada aderência dos modelos aos dados experimentais.

**Figura 5.4.** Superfícies de resposta das variáveis estudadas no planejamento fatorial  $2^3$  na produção de BDO a partir de melão pela cepa *S. cerevisiae* HGS37. (A-C) Variação na produção de BDO; (D-F) Variação da produtividade; e (G-I) variação do rendimento.



Observa-se que, de maneira geral, a produção de BDO (Figura 5.4A-C), a produtividade (Figura 5.4D-F) e o rendimento (Figura 5.4G-I) são favorecidos por maiores concentrações celulares iniciais, pH mais básico e concentrações iniciais de etanol mais baixas, desde que uma alta densidade celular inicial seja mantida. Esse fator foi identificado como o determinante para o aumento da eficiência nos experimentos em bancada. A combinação de um pH alcalino e baixa concentração de etanol otimiza o processo, mas sua eficácia depende diretamente da elevada carga celular no início da fermentação. Além disso, conforme mostrado na Tabela 5.3, tanto o pH quanto a concentração de etanol foram variáveis significativas para o metabolismo

celular na conversão do substrato. O pH, em particular, demonstrou ser um fator determinante para alcançar melhores rendimentos. Desta forma fica evidente que, dentre as condições estudadas, DO<sub>0</sub> 50, pH 6,0 e concentração de etanol inicial 5 g/L são mais adequados para a condução do processo.

Entre os principais desafios que podem surgir nas condições estabelecidas pelo planejamento fatorial estão as limitações impostas pelas altas cargas celulares, que podem gerar problemas de transferência de massa. Essas limitações podem restringir o acesso das células aos açúcares e ao oxigênio. Diante desses obstáculos, torna-se essencial desenvolver estratégias que minimizem os impactos negativos associados a essas condições de processo. Isso pode incluir a otimização das condições de cultivo, como a densidade celular e a implementação de técnicas de alimentação que favoreçam a transferência de massa e a redução da inibição por etanol, visando aumentar a eficiência e a produtividade do processo fermentativo.

Para a condução de bioprocessos com elevadas cargas celulares, a imobilização celular se apresenta como uma alternativa promissora, oferecendo diversas vantagens. Dentre elas, destacam-se a facilidade de separação das células do meio de cultivo, a possibilidade de conduzir processos com alta densidade celular e a proteção das células contra contaminantes, bem como a inibição causada pelo etanol no meio (SOARES *et al.*, 2022). Esses benefícios ajudam a mitigar efeitos inibitórios, promovendo um ambiente mais favorável as células e para a produção de BDO. Além disso, a imobilização permite a operação de processos contínuos, aumentando a eficiência e a produtividade das fermentações (ORTIZ, 2017). Essa abordagem pode ser uma solução viável para enfrentar os desafios associados ao processo em questão em larga escala.

A faixa de pH ideal para a produção de BDO, conforme descrito pelo delineamento fatorial, tende à basicidade. Essa preferência está diretamente relacionada à cepa doadora dos genes, que também realiza processos fermentativos de maneira eficiente em pH básico. A pesquisa de Perez *et al.* (2022), que avaliou a tolerância ao etanol em fermentações com xilose, revelou que a cepa parental da HGS37, *S. cerevisiae* MDS130, opera preferencialmente em pH mais básico, com valor ideal próximo de 5,6. Rehman *et al.* (2022) conduziram uma pesquisa sobre a produção de BDO pela cepa *Enterococcus faecalis* OPS1 em diferentes níveis de pH e identificaram que o melhor desempenho em termos de produção, medido em g/L de BDO, ocorreu em um pH de 6,5. Este valor foi determinado como o pH ótimo para o bioprocessos com essa cepa específica. O estudo de Karayannis *et al.* (2024) sobre a produção de BDO pela cepa *Klebsiella oxytoca* ACA-DC1581 também identificou que um pH básico é mais favorável para seu processo fermentativo. Os pesquisadores implementaram um sistema de duas bombas

automatizadas para garantir a manutenção do efeito tampão durante as bateladas, de modo a estabilizar o pH em 6. A faixa de pH entre 5 e 7 é frequentemente explorada nos estudos para a produção de BDO. Outro aspecto observado, conforme descrito na Tabela 5.2, foi a baixa de produção de BDO no experimento 5. Esse experimento se caracterizou pela alta concentração inicial de etanol (40 g/L) e pelo pH reduzido (4), o que possivelmente gerou um efeito sinérgico entre esses fatores, aliado à baixa carga celular inicial. Essa combinação pode ter comprometido a viabilidade celular, inibindo a produção de BDO.

Da mesma forma que a levedura HGS37 necessita do etanol para crescimento e produção de BDO por conta das modificações genéticas realizadas, o mesmo pode ser tóxico em altas concentrações. O etanol age de forma a diminuir a capacidade de seletividade da membrana plasmática da célula, ocasionando deficiências nutricionais na cepa o que intensifica a inibição alcoólica. Em altas concentrações o etanol tende a inibir de forma não competitiva o transporte de substratos por meio da membrana plasmática de *S. cerevisiae* (DORTA, 2006). Adicionalmente, a elevada concentração de etanol combinada com um meio ácido (pH 4) pode induzir a um sinergismo negativo entre o etanol e o pH, resultando em estresse extremo nas células (DORTA, 2006). Essa condição adversa pode levar à diminuição da viabilidade celular, comprometendo, assim, a produtividade de BDO, conforme observado nos experimentos com um pH ácido e alta concentração de etanol.

### **5.3 Performance da HGS37 imobilizada**

Os experimentos anteriores foram caracterizados pela presença de elevados níveis de açúcar residual. Para otimizar o consumo total de açúcares pela cepa HGS37, foi realizado um experimento em melaço empregando células imobilizadas (IM), sob as condições de processo estabelecidas pelo delineamento fatorial:  $DO_0$  de 100, pH 6 e concentração de etanol de 5 g/L. Um aspecto crucial avaliado nesse experimento foi o impacto da imobilização celular na capacidade produtiva da cepa. Embora a técnica de imobilização ofereça vantagens, ela também apresenta desafios, como a limitação na disponibilidade de oxigênio e nutrientes, fatores que poderiam comprometer o desempenho fermentativo. Como demonstrado em tópicos anteriores, a cepa HGS37 necessita de oxigênio devido à dependência ocasionada pela expressão do gene NoxE, que catalisa a oxidação do NADH em  $NAD^+$ , transferindo elétrons para o oxigênio molecular. Esse processo desempenha um papel crucial na regeneração do  $NAD^+$ , influenciando diretamente os processos fermentativos, o metabolismo energético e o balanço redox. Desta forma, a avaliação do impacto da imobilização na performance da levedura se mostra crucial.

Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 5.4, onde atingiu-se o melhor desempenho na produção de BDO dentre todos os experimentos realizados neste estudo, com uma concentração de 123,0 g/L de BDO. Embora o consumo de açúcares não tenha sido completo, observou-se uma melhora significativa em relação aos experimentos anteriores. Os resultados também indicaram um rendimento de 0,50 g/g, o que corresponde a 94,4% do máximo teórico, uma conversão de açúcares de 89,90% e uma produtividade de 1,28 g/L/h.

**Tabela 5.4.** BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando células imobilizadas e melaço como substrato.

Parâmetros	Unidade de medida	Valor
BDO	g/L	123,0±4,63
X	%	89,9±0,01
$Y_{P/S}$	g/g	0,50±0,06
$Y_{P/S}$ (%)	%	94,4±11,47
$Q_p$	g/L/h	1,28±0,05
$Q_s$	g/L/h	2,58±0,18

$Y_{P/S}$ : rendimento BDO;  $Q_p$ : produtividade BDO;  $Y_{P/S}$  (%): porcentagem sobre o  $Y_{P/S}$  teórico (0,526 g/g); X: conversão de açúcares redutores totais;  $Q_s$  produtividade por substrato; BDO concentração de BDO final.

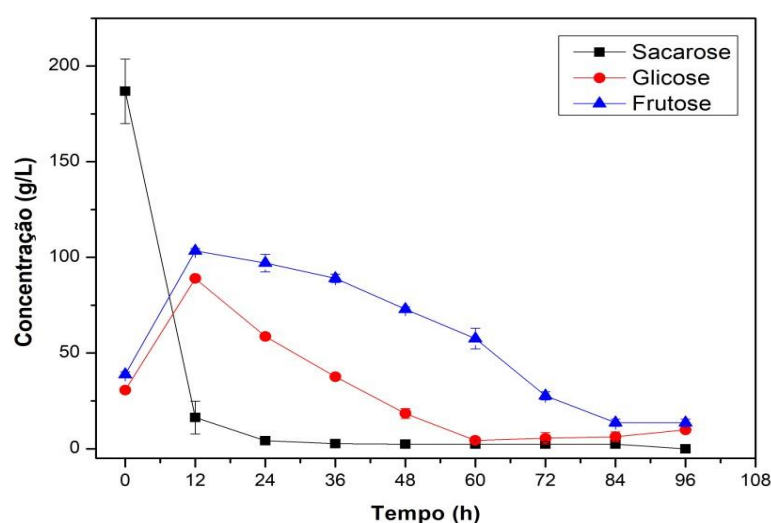
O experimento com células imobilizadas destacou-se como aquele com a maior conversão de açúcares entre todos os realizados neste estudo. Até então, o Experimento 04 do planejamento fatorial havia apresentado a melhor conversão de açúcares, porém uma vez que a concentração de células apresentou efeito positivo na produção de BDO, o experimento com células imobilizadas foi realizado com  $DO_0$  100, uma vez que a aplicação de microorganismos imobilizados possibilita a aplicação de elevadas densidades celulares. A produção de BDO em g/L praticamente dobrou com a adoção da imobilização celular, enquanto o consumo de açúcares também foi significativamente favorecido, com um incremento na velocidade de consumo de substrato de 1,41 g/L/h para 2,40 g/L/h, resultando em uma menor quantidade de açúcares residuais no meio fermentativo.

A literatura apresenta uma escassez significativa de estudos envolvendo células imobilizadas para a produção de BDO. No entanto, a pesquisa conduzida por Omeroglu *et al.* (2024) demonstrou resultados promissores. Utilizando fermentação não estéril de melaço com células imobilizadas de *Bacillus licheniformis* BD43, constatou-se que, sob condições ótimas

de processo, a imobilização celular aumentou a eficiência e a produção de BDO. Além disso, o estudo evidenciou uma redução no consumo energético durante a produção e comprovou a viabilidade de reutilização das células imobilizadas. Observouse que somente após a 4ª e 5ª reutilizações houve diminuições perceptíveis na concentração final de BDO. A pesquisa alcançou uma concentração máxima de BDO de 31,6 g/L ao final de 24 horas de incubação. Comparativamente, a cepa HGS37 apresentou uma produção de BDO semelhante à relatada por Omeroglu *et al.* (2024), atingindo 32,48 g/L em 24 horas de fermentação. Um ponto relevante é que, enquanto Omeroglu *et al.* (2024) utilizou melação suplementado com peptona e minerais para otimizar a produção, este estudo empregou apenas o melação como substrato, sem qualquer adição suplementar.

O consumo de açúcares seguiu o mesmo padrão observado nos experimentos anteriores: inicialmente, houve a hidrólise completa da sacarose, seguida pelo consumo da glicose e, por fim, da frutose, conforme ilustrado na Figura 5.6. O diferencial em relação aos experimentos prévios foi a significativa redução nas concentrações de açúcares residuais. É provável que, com a extensão do experimento por mais algumas horas, todo o açúcar remanescente fosse consumido. Contudo, do ponto de vista industrial, um tempo de fermentação de 96 horas já é considerado elevado e, portanto, inviável para processos de larga escala, devido às implicações econômicas e operacionais.

**Figura 5.5.** Consumo de sacarose, glicose e frutose no experimento com células imobilizadas para produção de BDO a partir de melação usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 (300 g/L de ART iniciais, 30°C e 120 rpm).



A melhoria de bioprocessos pela aplicação de células imobilizadas, apesar de pouco explorada para BDO, é amplamente relatada na literatura. Milessi *et al.* (2020) estudaram a aplicação de células da levedura *S. cerevisiae* T18 imobilizadas na produção de etanol a partir de xilose e, utilizando a mesma concentração de células livres e imobilizadas, observaram um aumento na produtividade do processo de 0,64 para 1,32 g/L/h. Perez *et al.* (2022) utilizaram a levedura *S. cerevisiae* MDS130 imobilizada em alginato de cálcio para a produção de etanol a partir de uma mistura de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e melaço, e obtiveram produtividades de 22 g/L/h em 20 bateladas repetidas. O estudo de Kong *et al.* (2025) investigou a produção de etanol a partir da celulose, utilizando um sistema de biocatálise que combinou celulase imobilizada em nanopartículas e a cepa *Saccharomyces cerevisiae* pYD1-LV imobilizada na superfície celular. Essa abordagem sinérgica permitiu a conversão eficiente da celulose em etanol, resultando em um título máximo de 79,5 g/L e um rendimento teórico de 88,2%. Além disso, o processo demonstrou elevada eficiência enzimática, alcançando esses resultados com uma baixa carga de celulase de apenas 10 FPU/g de celulose.

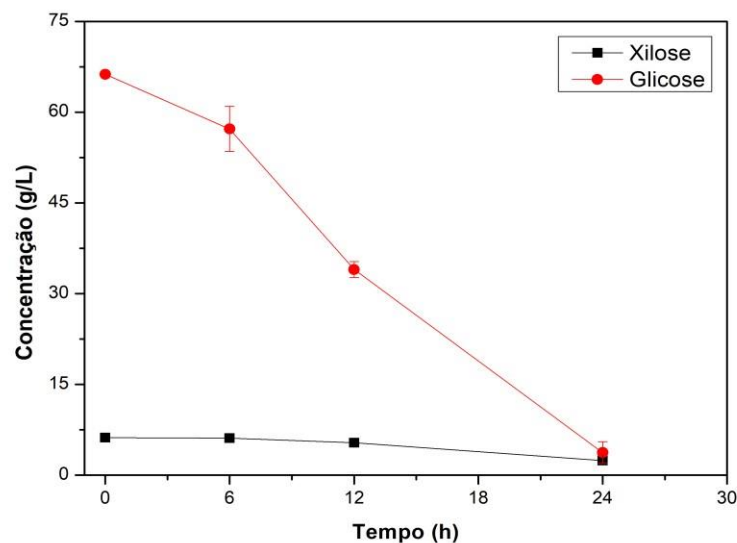
Comparando os resultados com as pesquisas apresentadas na Tabela 3.2, os valores obtidos para rendimento, produtividade e produção de BDO superaram os relatados na maioria dos estudos. As únicas exceções foram os trabalhos de Lee *et al.* (2022) e Huo *et al.* (2022), que alcançaram concentrações e produtividades de BDO superiores. Com base nesses resultados, pode-se afirmar que a técnica de imobilização celular melhora significativamente o consumo de açúcares e aumenta a produção de BDO, especialmente quando associada às condições otimizadas de processo estabelecidas pelo delineamento fatorial. Esses avanços destacam o potencial dessa abordagem para aplicações industriais.

#### **5.4 Performance da HGS37 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**

Visando avaliar a eficiência da cepa HGS37 em substratos provenientes de diferentes subprodutos do processamento de cana, foram realizados experimentos em hidrolisado celulósico de bagaço de cana. A fermentação foi conduzida sob as condições definidas pelo delineamento fatorial: DO<sub>0</sub> 50, pH 6 e concentração de etanol de 5 g/L. O hidrolisado lignocelulósico, proveniente do bagaço de cana-de-açúcar, é a fração líquida obtida após pré-tratamento do bagaço e subsequente hidrólise enzimática, sendo composto principalmente de glicose e xilose (72,2 g/L glicose, 5,4 g/L xilose, 0 g/L ácido acético, 3,0 g/L furfural e 10,8 g/L HFM). No entanto, a concentração de açúcares disponível no hidrolisado (~80 g/L) é inferior à presente no melaço. Esse menor teor de açúcares permitiu que a cepa consumisse todo o

substrato em aproximadamente 24 horas, com uma velocidade de consumo de substrato de 2,76 g/L/h conforme ilustrado na Figura 5.7.

**Figura 5.6.** Consumo de glicose e xilose no experimento usando hidrolisado lignocelulósico para produção de BDO a partir da cepa *S. cerevisiae* HGS37 (80 g/L de ART iniciais, 10 g/L de Y, 20 g/L de P, 30°C e 120 rpm).



O elevado consumo dos açúcares em um período reduzido pode ser atribuído ao fato de o hidrolisado lignocelulósico conter predominantemente hexoses já na forma de glicose. Em contraste, nos meios à base de melaço, a maior parte dos açúcares está presente como sacarose, exigindo uma etapa adicional de hidrólise mediada pela invertase para liberar glicose e frutose, o que prolonga o tempo necessário para a fermentação. Além disso, vale ressaltar que os experimentos foram realizados com o hidrolisado bruto, sem uma etapa de destoxificação para remoção de compostos tóxicos como ácido acético, furfural e HMF, o que torna o desempenho da HGS37 notável, alcançando uma produção de 31,19 g/L de BDO e um rendimento de 0,47 g/g, correspondendo a 89,39% do rendimento teórico máximo (Tabela 5.5).

**Tabela 5.5.** BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando hidrolisado como substrato.

Parâmetros	Unidade de medida	Valor
BDO	g/L	31,19±0,06
X	%	91,53±0,02
Y <sub>P/S</sub>	g/g	0,47±0,02
Y <sub>P/S</sub> (%)	%	89,39±3,62
Q <sub>s</sub>	g/L/h	2,76±0,10
Q <sub>p</sub>	g/L/h	1,30±0,00

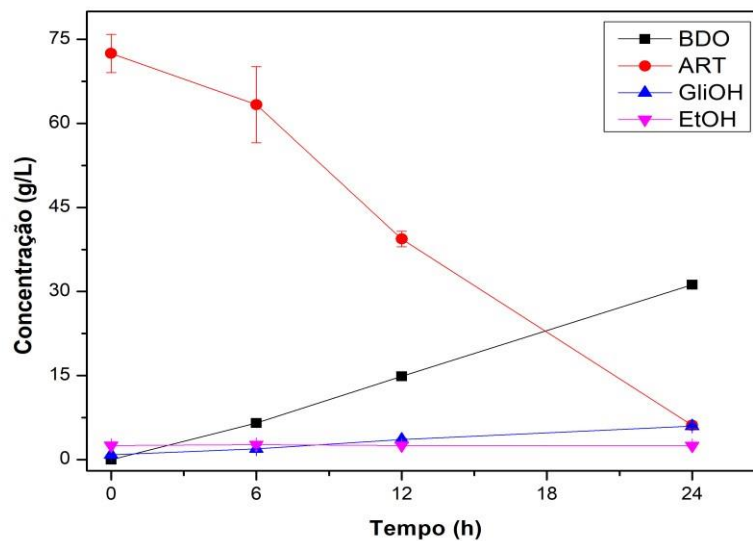
Y<sub>P/S</sub>: rendimento de BDO; Y<sub>P/S</sub> (%): porcentagem do rendimento sobre o rendimento teórico; Q<sub>s</sub>: produtividade de substrato; Q<sub>p</sub>: produtividade de BDO; X: conversão de substrato

Em comparação, o estudo de Stoklosa *et al.* (2024), utilizando hidrolisados lignocelulósicos como substrato e a bactéria *Paenibacillus polymyxa*, alcançou concentrações finais entre 14 e 18 g/L de BDO após 24 horas de fermentação em garrafas anaeróbicas. O trabalho de Um *et al.* (2017) obteve um rendimento de 0,395 g/g com hidrolisado de bagaço de cana como fonte de carbono, com uma produção de aproximadamente 3 g/L de BDO em 72 horas. Já Hazeena *et al.* (2016), utilizando hidrolisados de folhas de palmeira e a cepa isolada *Enterobacter cloacae* SG-1, reportou uma concentração de 7,67 g/L de BDO ao final de 36 horas de fermentação. Esses resultados ressaltam a superioridade da cepa HGS37, tanto em termos de concentração quanto de eficiência, destacando seu potencial para aplicações industriais na produção de BDO a partir de substratos lignocelulósicos.

Outro destaque importante da fermentação com hidrolisado foi a produtividade de BDO, que atingiu 1,30 g/L/h. Conforme indicado na Tabela 3.2, apenas duas pesquisas apresentaram produtividades superiores. Durante o processo, a produção de glicerol foi relativamente baixa, assim como o experimento com células imobilizadas descrito anteriormente, um fator que corrobora isso é a seletividade entre BDO/Glicerol, que foi semelhante entre os dois experimentos com 4,40 g<sub>BDO</sub>/g<sub>GliOH</sub> para o imobilizado, utilizando melão, e 5,22 g<sub>BDO</sub>/g<sub>GliOH</sub> para o hidrolisado. A concentração final de glicerol foi de 5,97 g/L, e a produção de BDO acompanhou o consumo de açúcares, cessando assim que os açúcares foram completamente consumidos, conforme ilustrado na Figura 5.8. Outro indicativo da estabilidade da cepa em

relação à produção de glicerol, independentemente do meio de cultivo, foi o fator de rendimento de glicerol por substrato.

**Figura 5.7.** Consumo de açúcares e etanol versus produção de BDO e glicerol do experimento com hidrolisado para produção de BDO pela cepa *S. cerevisiae* HGS37 (80 g/L de ART iniciais, 10 g/L de Y, 20 g/L de P, 30°C e 120 rpm).



### 5.5 Intensificação da produção de BDO utilizando hidrolisado e melão de cana

Diante do desempenho positivo da HGS37 na produção de BDO a partir de hidrolisado, experimentos foram realizados visando aumentar a concentração final de BDO, de forma a se tornar o processo de purificação economicamente mais viável. Tal objetivo poderia ser alcançado realizando-se a concentração do hidrolisado. Porém, ao se concentrar o hidrolisado, os demais compostos presentes também são concentrados, como os compostos inibidores. Perez et al., (2022) demonstrou que a toxicidade dos hidrolisados hemicelulósicos aumenta significativamente após a etapa de concentração. Adicionalmente, a etapa de concentração está atrelada a um consumo energético significativo. Assim sendo, o melão de cana surge como uma opção de integração de processo para a produção de BDO, especialmente considerando-se o escalonamento da produção de BDO para uma biorrefinaria de cana-de-açúcar.

Desta forma, a performance da levedura foi avaliada em um processo utilizando hidrolisado de bagaço suplementado com melão de cana. Para isso, após a fermentação do hidrolisado (24h), melão foi adicionado ao meio de forma a se obter açúcares disponíveis para atingir-se concentrações superiores de BDO. Tal estratégia já foi aplicada com sucesso por

Sandri (2023) na produção de etanol de segunda geração. A fermentação foi conduzida sob as condições ótimas estabelecidas pelo planejamento fatorial ( $DO_0$  50, pH 6 e concentração de etanol de 5 g/L).

A cepa demonstrou eficiência, atingindo uma conversão de açúcares de 90,27 % (Tabela 5.6) em 72 horas de processo, com uma produção de BDO de 106,10 g/L, valor dentro da meta de 100 g/L estabelecida para esse experimento.

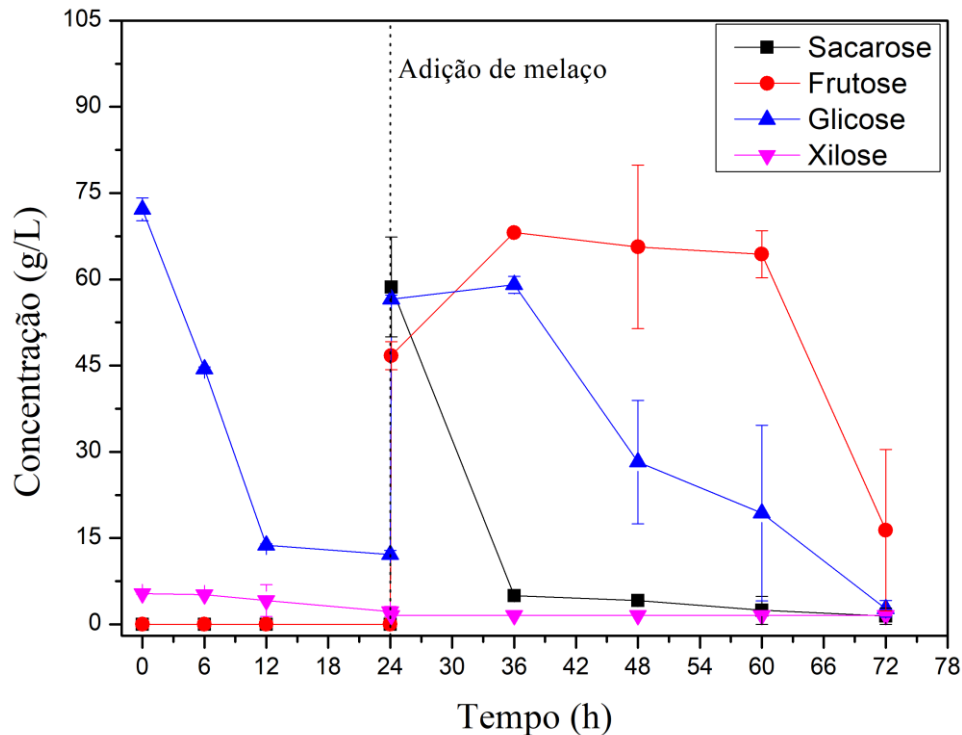
**Tabela 5.6.** BDO produzido e parâmetros fermentativos do experimento utilizando hidrolisado como substrato.

<b>Parâmetros</b>	<b>Unidade de medida</b>	<b>Valor</b>
$Y_{P/S}$	g/g	0,49±0,13
X	%	90,27±6,87
$Q_p$	g/L/h	1,48±0,19
$Q_s$	g/L/h	2,84±0,33
BDO	g/L	106,10±13,60
$\Delta ART$	g/L	204,60±24,44

$Y_{P/S}$ : rendimento de BDO;  $Y_{P/S}$  (%): porcentagem do rendimento sobre o rendimento teórico;  $Q_s$ : produtividade de substrato;  $Q_p$ : produtividade de BDO; X: conversão de substrato;  $\Delta ART$  açúcares redutores totais consumidos;

A cepa não consumiu completamente todos os açúcares disponíveis nas primeiras 24 horas, antes da suplementação com o melaço, como evidenciado pela Figura 5.9, que ilustra o consumo de açúcares ao longo do experimento. No entanto, ao final do processo fermentativo, os açúcares residuais foram mínimos, refletidos pelo elevado  $\Delta ART$  de 204,60 g/L e pelo alto consumo de substrato de 1,48 g/L/h. Esse comportamento é uma característica observada em experimentos com a HGS37, que frequentemente apresenta melhores resultados com períodos mais longos de cultivo, um fator que pode ser atribuído ao seu metabolismo e capacidade adaptativa às condições do meio.

**Figura 5.8.** Consumo de sacarose, glicose, xilose e frutose no experimento com hidrolisado suplementado com melaço para produção de BDO usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 (80 g/L de ART iniciais, com adição de 150g/L de ART, 30°C e 120 rpm).



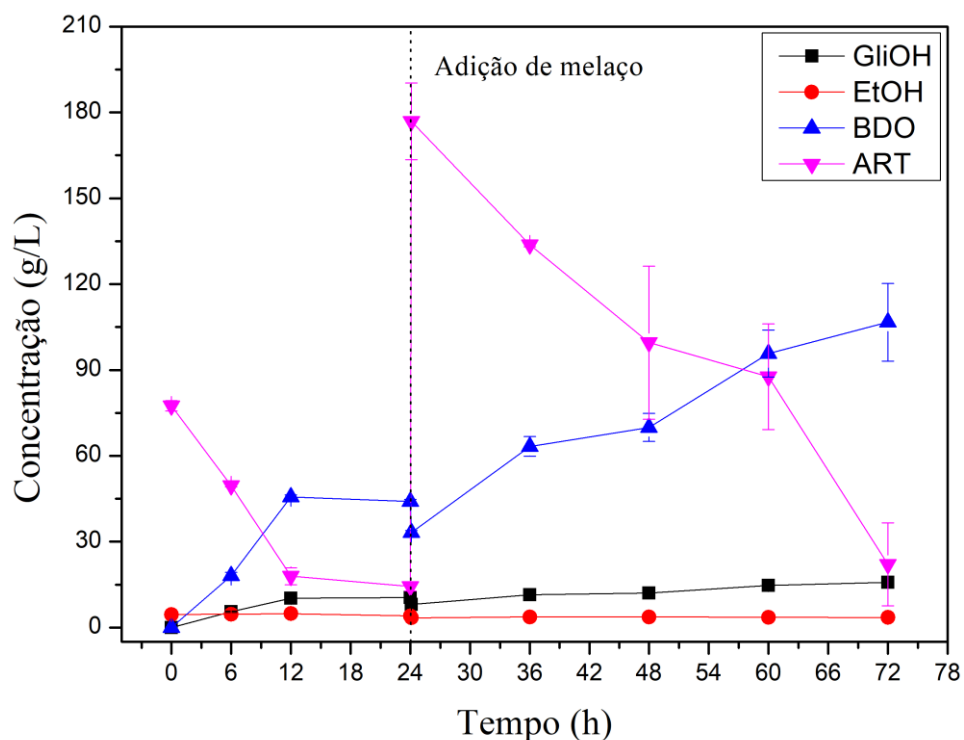
Outro parâmetro analisado, que segue o padrão observado em outros experimentos, foi o rendimento. Nesse experimento, a cepa alcançou um rendimento de 0,49 g/g (89,66% do rendimento máximo teórico) além de apresentar uma produtividade de 1,48 g/L/h de BDO. Esses resultados reforçam a consistência da HGS37 em manter bons índices de eficiência em diferentes condições de processo.

A análise da suplementação de meios contendo hidrolisado como substrato primário com melaço para a produção de BDO é pouco explorada na literatura científica. Por isso, é desafiador encontrar pesquisas que abordem especificamente esse tema para efeito comparativo. Um exemplo é o estudo conduzido por Neves (2021), que investigou a produção de BDO utilizando melaço e substratos sintéticos em fermentações por batelada e batelada alimentada. Ao realizar a batelada alimentada com hidrolisado de bagaço, foi observada uma

improdutividade da cepa *Paenibacillus polymyxa*. O estudo sugere que componentes presentes no hidrolisado podem ter causado inibição na produção de BDO durante a alimentação. Esse cenário ressalta ainda mais o potencial da cepa HGS37, utilizada no presente estudo, pois, diferentemente de outras cepas, conseguiu consumir os açúcares presentes no hidrolisado sem apresentar sinais de inibição quando submetida à alimentação com melaço.

É possível observar que a sacarose foi praticamente consumida nas primeiras 12 horas após a adição do melaço, o que resultou no aumento das concentrações dos açúcares fermentescíveis, glicose e frutose, no cultivo. Ao final do experimento, praticamente todos os açúcares disponíveis haviam sido consumidos, e a concentração final de BDO não sofreu alterações significativas (Figura 5.10), comportamento distinto do observado nos primeiros momentos do cultivo, quando a presença de ART era abundante. O acúmulo de frutose apresentado na figura é explicado pela preferência metabólica da célula em consumir glicose, quando essa se encontra em maior concentração, em relação à frutose.

**Figura 5.9.** Consumo de açúcares e etanol versus produção de BDO e glicerol do experimento com hidrolisado suplementado com melaço para produção de BDO usando a cepa *S. cerevisiae* HGS37 (80 g/L de ART iniciais, com adição de 150g/L de ART, 30°C e 120 rpm).



Nesse experimento, a cepa produziu baixas concentrações de glicerol, alcançando 15,86 g/L, enquanto as concentrações de etanol permaneceram praticamente constantes ao longo do cultivo. A produção máxima de BDO foi de 106,10 g/L ao término das 72 horas de fermentação. Nas primeiras 24 horas, a cepa conseguiu atingir 44,06 g/L de

BDO, sem consumir completamente os açúcares disponíveis, resultando em um ART residual de 22,04 g/L. Esses resultados indicam que a suplementação com melaço não é absolutamente necessária, considerando que ainda houve uma quantidade significativa de açúcares residuais e a cepa conseguiu alcançar alta concentração de BDO. Sob a perspectiva de um processo industrial, o tempo de fermentação é um parâmetro fundamental para determinar a viabilidade do bioprocessamento. Dessa forma, atingir as maiores concentrações de BDO no menor tempo possível é crucial para viabilizar a aplicação de uma rota biotecnológica nas indústrias, garantindo maior eficiência e competitividade do processo. Adicionalmente, não foram encontrados estudos de análise técnico-econômica da purificação do BDO, indicando concentrações mínimas necessárias para viabilidade do processo.

Neste contexto, a condução de um estudo para determinar a concentração necessária para purificação pode orientar a tomada de decisão no desenvolvimento do processo, assim como a inclusão da adição do melaço. De toda forma, os resultados obtidos no presente estudo se destacam pela elevada produção de BDO e elevada produtividade em diferentes meios industriais sem destoxificação, representando um avanço no desenvolvimento de um processo sustentável de produção deste composto. Os principais resultados obtidos no presente estudo são destacados na Tabela 5.7.

**Tabela 5.7.** Comparativo entre os experimentos realizados utilizando a HGS37.

<b>Experimento</b>	<b>BDO (g/L)</b>	<b>Produtividade (g/L/h)</b>	<b>Conversão (%)</b>	<b>Rendimento YP/S (g/g)</b>
YPM(E)	75,9±3,93	0,80±0,08	65,00±0,02	0,41±0,04
YPS(E)	54,15±0,72	0,60±0,00	54,00±0,04	0,41±0,00
M(E)	56,10±0,69	0,60±0,01	49,00±0,00	0,41±0,05
EXP4	54,67	0,57	69,5	0,40
Imobilizado (Melaço)	123,00±4,63	1,28±0,05	89,90±0,0	0,50±0,06
Hidrolisado	31,19±0,06	2,76±0,10	91,53±0,02	0,47±0,02
Hidrolisado + melaço	106,10±13,60	1,48±0,19	89,66±8,13	0,49±0,12

Os experimentos iniciais demonstraram a capacidade da cepa em produzir BDO a partir de substratos alternativos, como o melaço, sem a necessidade de suplementação nutricional (YPM(E), YPS(E) E M(E)). Na sequência, o planejamento fatorial permitiu a identificação das condições fermentativas mais favoráveis à produção de BDO, evidenciando que maiores concentrações de inóculo (densidade óptica inicial), pH neutro e menores concentrações iniciais de etanol favorecem a síntese do produto (Exp 4). Em seguida, a técnica de imobilização celular foi empregada com sucesso, aumentando expressivamente a conversão dos açúcares, com concentração final de BDO de 122,99 g/L. Por fim, a levedura foi capaz de consumir hidrolisado de bagaço de cana sem destoxificação em 24h e a integração do processo utilizando hidrolisado suplementado com melaço possibilitou alcançar concentrações superiores a 100 g/L de BDO em menor tempo. Nesse ensaio, a concentração de BDO atingiu 106 g/L, com produtividade de 1,48 g/L/h – a maior produtividade obtida entre todos os experimentos realizados, evidenciando o potencial dessa estratégia.

## 6. CONCLUSÕES

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* HGS37 demonstrou elevada eficiência na produção de 2,3-butanodiol utilizando melão como substrato, sem perdas de rendimento associadas a desvios metabólicos e sem a necessidade de suplementação com extrato de levedura ou peptona. Este estudo evidenciou a viabilidade técnica do processo de produção microbiana de BDO a partir de melão, contribuindo para o desenvolvimento de bioprocessos mais sustentáveis. A análise por planejamento fatorial revelou que a concentração inicial de células é um fator determinante na produção de BDO, influenciando diretamente a produtividade, o rendimento e a eficiência de conversão dos substratos. A operação do processo com elevadas cargas celulares favoreceu a produção de BDO. As condições selecionadas para produção de BDO foram pH 6,0, 5 g/L de etanol e elevada concentração celular inicial.

A imobilização celular se mostrou uma técnica viável que resultou em melhorias significativas no desempenho da levedura, tanto no consumo completo dos substratos quanto na produção de BDO, atingindo a maior concentração do produto observada neste trabalho (122,99 g/L). Apesar da dependência de O<sub>2</sub> para a produção de BDO, a presença do suporte de imobilização não prejudicou a transferência de massa desse composto, proporcionando operação em cargas de células elevadas.

Ademais, o uso de meio de cultivo baseado em hidrolisado sem destoxificar como substrato provou ser uma alternativa viável para a produção de BDO via bioprocessos utilizando a cepa HGS37. Desta forma, a integração da produção de BDO em biorrefinarias pode ser uma importante maneira de valorizar o bagaço de cana gerado na planta. Além disso, a integração do processo por meio da suplementação extra de melão ao hidrolisado provou ser uma estratégia interessante para elevar a concentração de BDO produzida utilizando hidrolisado, sem a necessidade de concentração dele, e reduzindo o tempo de cultivo do processo utilizando o melão separadamente.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGLIARDI, C. B. **Produção biotecnológica de 2,3-butanodiol a partir de diferentes fontes de carbono**. Porto-Alegre-RS, [s.n.], 2018.

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, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2020.105896>.

AMRAOUI, Y.; PRABHU, A. A.; NARISSETTY, V.; COULON, F.; KUMAR CHANDEL, A.; WILLOUGHBY, N.; JACOB, S.; KOUTINAS, A.; KUMAR, V. Enhanced 2,3-Butanediol production by mutant *Enterobacter ludwigii* using Brewers' spent grain hydrolysate: Process optimization for a pragmatic biorefinery loom. **Chemical Engineering Journal**, v. 427, p. 130851, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.130851>.

ANDRADE SILVA, C. A. D.; OKA, M. L.; DA SILVA, P. G. P.; HONMA, J. M.; LEITE, R. S. R.; FONSECA, G. G. Physiological evaluation of yeast strains under anaerobic conditions using glucose, fructose, or sucrose as the carbon source. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 137, n. 6, p. 420–428, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2024.02.003>.

ASSIS, A. D.; DA SILVA, B. P.; TOLEDO, R. C. L.; PARRELLA, R. A. D. C.; GLAHN, R. P.; CARVALHO, I. M. M. D.; QUEIROZ, V. A. V.; MARTINO, H. S. D. Sweet sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) molasses: physicochemical characterization and in vitro bioavailability of different genotypes. **Journal of Cereal Science**, v. 113, p. 103759, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2023.103759>.

AKAR, C.; CANBAZ, M. Effect of molasses as an admixture on concrete durability. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 2374–2380, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.09.081>.

BATLLE, E. A. O.; JULIO, A. A. V.; SANTIAGO, Y. C.; PALÁCIO, J. C. E.; BORTONI, E. D. C.; NOGUEIRA, L. A. H.; DIAS, M. V. X.; GONZÁLEZ, A. M. Brazilian integrated oilpalm-sugarcane biorefinery: An energetic, exergetic, economic, and environmental (4E) assessment. **Energy Conversion and Management**, v. 268, p. 116066, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2022.116066>.

BADOTTI, F.; DÁRIO, M. G.; ALVES, S. L.; et al. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microb Cell Fact**, v. 7, p. 4, 2008. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-4>.

BARRETO, E. D. S.; DA FONSECA, Y. A.; ADARME, O. F. H.; SILVA, D. F.; BRANDÃO, R. L.; BAÊTA, B. E. L.; GUIMARÃES, V. M.; GURGEL, L. V. A. Optimization of 2G ethanol production from sugarcane bagasse: upscaling of soda pretreatment with redox mediator followed by fed-batch enzymatic hydrolysis and cofermentation. **Energy Conversion and Management**, v. 323, p. 119225, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2024.119225>.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Relatórios Especiais do IPCC. Brasília, 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/sirene/publicacoes/relatorios-do-ipcc>. Acesso em: 27 de agosto de 2024.

BRASIL. Produção de cana-de-açúcar na Safra 2024/25 sofre redução devido a condições climáticas adversas. **Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB**. Publicado em: 28 de novembro de 2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5841-producao-de-cana-de-acucar-nasafra-2024-25-sofre-reducao-devido-a-condicoes-climaticas-adversas#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20cana%2Dde,em%20rela%C3%A7%C3%A3o%20%C3%A0%20safra%20anterior.>>

BRASIL. COP29: compromissos do Brasil marcam avanço global na luta contra a mudança do clima. **Secretária de Comunicação Social**. Publicado em: 11 de novembro de 2024. Disponível em: <<https://www.gov.br/secom/pt-br/assuntos/noticias/2024/11/cop29-compromissos-do-brasil-marcam-avanco-global-naluta-contra-a-mudanca-do-clima>>.

BRASIL. Biossegurança: página de resoluções normativas. **Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações**. Disponível em: <<https://ctnbio.mctic.gov.br/resolucoes-normativas>>.

B. W. EVARISTO, R.; C. DUTRA, R.; A. Z. SUAREZ, P.; F. GHESTI, G. Materials from Cellulose: Origin, Synthesis and Applications. **Revista Virtual de Química**, v. 15, n. 6, p. 1154–1162, 2023.

CAGNIN, L.; GRONCHI, N.; BASAGLIA, M.; FAVARO, L.; CASELLA, S. Selection of Superior Yeast Strains for the Fermentation of Lignocellulosic Steam-Exploded Residues. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 756032, nov. 2021. doi: 10.3389/fmicb.2021.756032.

CEBREIROS, F.; FERRARI, M. D.; LAREO, C. Cellulose hydrolysis and IBE fermentation of eucalyptus sawdust for enhanced biobutanol production by *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. **Industrial Crops and Products**, v. 134, p. 50–61, ago. 2019.

CHEN, Y.; LEI, X.; SUN, L.; GAO, B.; AN, P.; YE, D.; MU, H.; QIN, Y.; SONG, Y.; LIU, Y. Exploring the potentials of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia kudriavzevii* for enhancing flavour and aromatic characteristics in apricot wines. **Food Chemistry: X**, v. 25, 102178, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102178>.

CINTRA, L. C.; FERNANDES, A. G.; OLIVEIRA, I. C. M. D.; SIQUEIRA, S. J. L.; COSTA, I. G. O.; COLUSSI, F.; JESUÍNO, R. S. A.; ULHOA, C. J.; FARIA, F. P. D. Characterization of a recombinant xylose tolerant  $\beta$ -xylosidase from *Humicola grisea* var. *Thermoidea* and its use in sugarcane bagasse hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 262–271, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.039>.

CONAB. Produção de cana-de-açúcar deve crescer 4,4% na safra 2023/24, estimada em 637,1 milhões de toneladas. **Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB**. Publicado em: 18 abr. 2024. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5489-producao-de>

cana-de-acucar-na-safra-2023-24-chega-a-713-2-milhoes- detoneladas-a-maior-da-serie-historica#:~:text=A%20produ%C3%A7%C3%A3o%20brasileira%20de%20cana,Nacional%20de%20Abastecimento%20(Conab).

CONAB. Produção de cana-de-açúcar deve crescer 4,4% na safra 2023/24, estimada em 637,1 milhões de toneladas. **Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB.**

Publicado em: 26 abr. 2023. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4982-producao-de-cana-de-acucar-deve-crescer-4-4-na-safra-2023-24-estimada-em-637-1-milhoes-de-](https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/4982-producao-de-cana-de-acucar-deve-crescer-4-4-na-safra-2023-24-estimada-em-637-1-milhoes-de-toneladas#:~:text=A%20Produ%C3%A7%C3%A3o%20Institucional-,Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20cana%2Dde%2Da%C3%A7%C3%BAcar%20de%20crescer%204%2C4,637%2C1%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas)

toneladas#:~:e%20Promo%C3%A7%C3%A3o%20Institucional-,Produ%C3%A7%C3%A3o%20de%20cana%2Dde%2Da%C3%A7%C3%BAcar%20de%20crescer%204%2C4,637%2C1%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas>.

CORDEIRO, E.; MELO, M.; FERNANDES, S. Um Estudo sobre a Utilização da ANOVA de uma Via na Produção Científica na Área de Psicologia. **Revista Meta: Avaliação**, v. 10, p. 139, 2018. doi: 10.22347/2175-2753v10i28.1455.

COSTA, J. B.; NASCIMENTO, L. G. L.; MARTINS, E.; CARVALHO, A. F. D. Immobilization of the  $\beta$ -galactosidase enzyme by encapsulation in polymeric matrices for application in the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 107, n. 11, p. 9100–9109, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2024-24892>.

CRIPWELL, R. A.; ROSE, S. H.; FAVARO, L.; VAN ZYL, W. H. Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 201, dez. 2019.

CULABA, A. B.; MAYOL, A. P.; SAN JUAN, J. L. G.; VINOYA, C. L.; CONCEPCION, R. S.; BANDALA, A. A.; VICERRA, R. R. P.; UBANDO, A. T.; CHEN, W.-H.; CHANG, J.-S. Smart sustainable biorefineries for lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 344, p. 126215, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126215>.

DARIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012. <https://doi.org/10.11606/T.87.2012.tde-04062012-114632>.

DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A. Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Washington, D.C: Amer. Soc. for **Microbiology**, 466 p., 1986.

DEMEKE, M. M.; ECHEMENDIA, D.; BELO, E.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Enhancing xylose-fermentation capacity of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by multistep evolutionary engineering in inhibitor-rich lignocellulose hydrolysate. **FEMS Yeast Research**, v. 24, p. foae013, 2024. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foae013>.

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 177 *Saccharomyces cerevisiae* for efficient lignocellulose-based bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v.6, p.120, 2013.

DIAS, A. S.; CARNEIRO, P. A.; BOLOY, R. A. M.; CÉSAR, A. D. S.; DE OLIVEIRA, U. R. Advancements in vinasse application: An integrated analysis of patents, literature and research profile. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 22, p. 100795, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.clet.2024.100795>.

DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26**. Universidade do estado de São Paulo, Rio Claro – SP. 2006.

EBRAHIMIAN, F.; KARIMI, K.; ANGELIDAKI, I. Coproduction of hydrogen, butanol, butanediol, ethanol, and biogas from the organic fraction of municipal solid waste using bacterial cocultivation followed by anaerobic digestion. **Renewable Energy**, v. 194, p. 552–560, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.05.067>.

EL ASRI, O.; FARAG, M. A. The potential of molasses from different dietary sources in industrial applications: A source of functional compounds and health attributes, a comprehensive review. **Food Bioscience**, v. 56, p. 103263, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.103263>.

FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; RODRÍGUEZ-SARMIENTO, M.; CORAL MEDINA, J. D.; LUCAS, S.; GARCÍA-CUBERO, M. T.; COCA, M.; LÓPEZ-LINARES, J. C. Bio2,3-butanediol production from banana waste: Preliminary techno-economic evaluation of processing strategies. **Biomass and Bioenergy**, v. 184, p. 107218, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2024.107218>.

FIORANELLI, A.; BIZZO, W. A. Generation of surplus electricity in sugarcane mills from sugarcane bagasse and straw: challenges, failures and opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 186, p. 113647, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113647>.

FLÁVIA REZENDE SILVA, A.; ABNER ROCHA LEBRON, Y.; ALMEIDA RIBEIRO, L.; ALICE DIAS ARAUJO, A.; COELHO ANDRÉ, L.; JOSÉ NUNES DE PAIVA, M.; MACIEL D'AURIOL SOUZA, M.; KOCH, K.; AMARAL, M. Thermophilic anaerobic membrane distillation bioreactor for sugarcane vinasse treatment-maximizing pollutants removal and resources recovery. **Chemical Engineering Journal**, v. 496, p. 153680, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153680>.

FURLONG, V. B. **Design and Automation of a New Reactor For Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass at High Solids Loading**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2019.

GAFFEY, J.; COLLINS, M. N.; STYLES, D. Review of methodological decisions in life cycle assessment (LCA) of biorefinery systems across feedstock categories. **Journal of Environmental Management**, v. 358, p. 120813, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120813>.

GANCEDO, J. M. Yeast Carbon Catabolite Repression. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, p. 334-361, 1998. <https://doi.org/10.1128/mmbr.62.2.334-361.1998>.

GAUR, S.; KAUR, M.; KALRA, R.; RENE, E. R.; GOEL, M. Application of microbial resources in biorefineries: current trend and future prospects. **Heliyon**, v. 10, n. 8, e28615, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28615>.

GOMES, M. G.; PARANHOS, A. G. D. O.; CAMARGOS, A. B.; BAËTA, B. E. L.; BAFFI, M. A.; GURGEL, L. V. A.; PASQUINI, D. Pretreatment of sugarcane bagasse with dilute citric acid and enzymatic hydrolysis: use of black liquor and solid fraction for biogas production. **Renewable Energy**, v. 191, p. 428–438, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.04.057>.

GOUWS, M. R.; BOSMAN, C. E.; DOGBE, E. S.; GÖRGENS, J. F. Comparative techno-economics of 2,3-butanediol, polyhydroxybutyrate and citric acid production in a biorefinery using 1G and 1G2G sugarcane-based feedstocks. **Chemical Engineering Science**, v. 286, p. 119649, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2023.119649>.

GRANGEIA, C.; SANTOS, L.; LAZARO, L. L. B. The Brazilian biofuel policy (RenovaBio) and its uncertainties: An assessment of technical, socioeconomic and institutional aspects. **Energy Conversion and Management: X**, v. 13, 1 jan. 2022.

HAKIZIMANA, O.; MATABARO, E.; LEE, B. H. The current strategies and parameters for the enhanced microbial production of 2,3-butanediol. **Biotechnology Reports**, v. 25, p. e00397, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00397>.

HASSA, W.; FIALA, K.; APIRAKSAKORN, J.; LEESING, R. Sugarcane bagasse valorization through integrated process for single cell oil, sulfonated carbon-based catalyst and biodiesel co-production. **Carbon Resources Conversion**, p. 100245, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2024.100245>.

HASSING, E.-J.; BUIJS, J.; BLANKERTS, N.; LUTTIK, M. A.; HULSTER, E. A. DE; PRONK, J. T.; DARAN, J.-M. Elimination of aromatic fusel alcohols as by-products of *Saccharomyces cerevisiae* strains engineered for phenylpropanoid production by 2-oxo- acid decarboxylase replacement. **Metabolic Engineering Communications**, v. 13, p. e00183, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mec.2021.e00183>.

HAWAZ, E.; TAFESSE, M.; TESFAYE, A. et al. Bioethanol production from sugarcane molasses by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* isolate TA2 and *Wickerhamomyces anomalus* isolate HCJ2F-19. **Annals of Microbiology**, v. 74, p. 13, 2024. <https://doi.org/10.1186/s13213-024-01757-8>.

HAZEENA, S. H.; PANDEY, A.; BINOD, P. Evaluation of oil palm front hydrolysate as a novel substrate for 2,3-butanediol production using a novel isolate *Enterobacter cloacae* SG1. **Renewable Energy**, v. 98, p. 216–220, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2016.02.030>.

HE, H.; XU, Y.; LI, S.; DENG, X.; SHI, G.; LI, Y. Time-controlled dual-stage strategy for bioproduction of high-purity (R-R) 2,3-butanediol and acetoin in *Bacillus licheniformis*. **Food Bioscience**, v. 63, p. 105574, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2024.105574>.

HEDBACKER, K.; CARLSON, M. SNF1/AMPK pathways in yeast. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, p. 2408-2420, 2008. <https://doi.org/10.2741/2854>.

HOSSEINZADEH, J.; ABDULKHANI, A.; ASHORI, A.; DMIRIEVICH, P. S.; ABDOLMALEKI, H.; HAJIAHMAD, A.; SUN, F.; ZADEH, Z. E. Comparative study on liquid versus gas phase hydrochloric acid hydrolysis for microcrystalline cellulose isolation from sugarcane bagasse. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 264, p. 130674, 2024.

HUO, G.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. Development of an industrial yeast strain for efficient production of 2,3-butanediol. **Microbial Cell Factories**, v. 21, p. 199, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01924-z>.

ISLAM, T.; NGUYEN-VO, T. P.; GAUR, V. K.; LEE, J.; PARK, S. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biological production of 1,3-Butanediol. **Bioresource Technology**, v. 376, p. 128911, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.128911>.

JANKOVIĆ, T.; SHARMA, S.; STRAATHOF, A. J. J.; KISS, A. A. Adaptable downstream processing design for recovery of butanediols after fermentation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 213, p. 210–220, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2024.12.011>.

JANTAMA, K.; POLYIAM, P.; KHUNNONKWAO, P.; CHAN, S.; SANGPROO, M.; KHOR, K.; JANTAMA, S. S.; KANCHANATAWEE, S. Efficient reduction of the formation of by-products and improvement of production yield of 2,3-butanediol by a combined deletion of alcohol dehydrogenase, acetate kinase-phosphotransacetylase, and lactate dehydrogenase genes in metabolically engineered *Klebsiella oxytoca* in mineral salts medium. **Metabolic Engineering**, v. 30, p. 16–26, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2015.04.004>.

JAILANI, N.; JAAFAR, N. R.; AZELEE, N. I. W.; RAHMAN, R. A.; ILLIAS, R. M.; WAHAB, M. K. H. A. Bioconversion of oil palm empty fruit bunches waste into prebiotic xylooligosaccharides using a genetic modified cross-linked endoxylanase aggregates immobilization. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 64, p. 103489, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2025.103489>.

JHA, A.; KUMAR, A. Piperazine reveals as a cell wall targeting antifungal agent against *Candida albicans*. **Gene Reports**, v. 37, p. 102044, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2024.102044>.

JIANG, W.; CAI, Y.; SUN, S.; WANG, W.; TIŠMA, M.; BAGANZ, F.; HAO, J. Inactivation of hydrogenase-3 leads to enhancement of 1,3-propanediol and 2,3butanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 177, p. 110438, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110438>.

JIANG, Y.; YE, X.; ZHENG, T.; DONG, W.; XIN, F.; MA, J.; JIANG, M. Microbial production of L-malate from renewable non-food feedstocks. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 30, p. 105–111, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.10.017>.

JO, M.-H.; JU, J.-H.; HEO, S.-Y.; SON, C.-B.; JEONG, K. J.; OH, B.-R. Production of high levels of 2,3-butanediol from renewable crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GEM167 using metabolic engineering and control of oxygen transfer efficiency. **Renewable Energy**, v. 230, p. 120793, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.120793>.

JOSHI, J.; LANGWALD, S. V.; KRUSE, O.; PATEL, A. Immobilization of *Paenibacillus polymyxa* with biopolymers to enhance the production of 2,3-butanediol. **Microbial Cell Factories**, v. 24, n. 1, p. 15, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12934024-02633-5>.

KARAYANNIS, D.; ANGELOU, N.; VASILAKIS, G.; CHARISTEIDIS, I.; LITINAS, A.; PAPANIKOLAOU, S. A non-aseptic bioprocess for production and recovery of 2,3butanediol via conversion of crude glycerol and corn steep liquor at pilot-scale. **Carbon Resources Conversion**, p. 100242, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.crcon.2024.100242>.

KAYINGO, G.; MARTINS, A.; ANDRIE, R.; NEVES, L.; LUCAS, C.; WONG, B. A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1547–1557, 2009. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023457-0>.

KAUR, G.; KAUR, P.; KAUR, J.; SINGLA, D.; TAGGAR, M. S. Xylanase, xylooligosaccharide and xylitol production from lignocellulosic biomass: exploring biovalorization of xylan from a sustainable biorefinery perspective. **Industrial Crops and Products**, v. 215, p. 118610, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118610>.

KIEHBADROUDINEZHAD, M. et al. The role of biofuels for sustainable microgrids: A path towards carbon neutrality and the green economy. *Heliyon*, Elsevier Ltd., 1 fev. 2023.

KHAN RIND, I.; SARI, A.; TUZEN, M.; SALEH, T. A. Adsorption of bromophenol blue from aquatic media using polymer-modified silica fume: Factorial design optimization, kinetic evaluation and adsorption mechanism. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 168, p. 112953, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112953>.

KHATUN, M. S.; HASSANPOUR, M.; MUSSATTO, S. I.; HARRISON, M. D.; SPEIGHT, R. E.; O'HARA, I. M.; ZHANG, Z. Transformation of sugarcane molasses into fructooligosaccharides with enhanced prebiotic activity using whole-cell biocatalysts from *Aureobasidium pullulans* FRR 5284 and an invertase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* 1403-7A. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 8, n. 1, p. 85, 2021. <https://doi.org/10.1186/s40643-021-00438-7>.

KHUMSUPAN, D.; LIN, S.-C.; HUANG, Y.-C.; CHEN, C.-M.; CHI, H.-W.; JANTAMA, K.; LIN, H.-W.; CHENG, K.-C. Creating a robust and reusable cell immobilization system for bioethanol production by thermotolerant yeast using 3D printing and soybean waste. **Industrial Crops and Products**, v. 224, p. 120434, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.120434>.

KIM, D. E.; JEONG, G.-T. Production of 2,3-butanediol from *Ulva pertusa* hydrolysate using hydrothermal pretreatment followed by enzymatic hydrolysis. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 6, p. 114225, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.114225>.

KIM, S.-J.; SIM, H.-J.; KIM, J.-W.; LEE, Y.-G.; PARK, Y.-C.; SEO, J.-H. Enhanced production of 2,3-butanediol from xylose by combinatorial engineering of xylose metabolic pathway and cofactor regeneration in pyruvate decarboxylase-deficient *Saccharomyces*

*cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1551–1557, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.034>.

KONG, D.; CHEN, Z.; LIU, H.; QI, X.; LIU, Y.; XU, S.; YE, Y.; LI, J.; LIANG, P.; WANG, S.; HU, W.; JIN, X.; LIU, X.; ZHANG, C.; TIAN, S. A combined immobilization system for high-solids cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy**, v. 241, p. 122304, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.122304>.

KUMAR, B.; VERMA, P. Biomass-based biorefineries: An important archetype towards a circular economy. *Fuel*, Elsevier Ltd., 15 mar. 2021.

LEE, Y.-G.; SEO, J.-H. Production of 2,3-butanediol from glucose and cassava hydrolysates by metabolically engineered industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, p. 204, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1545-1>.

LEE, Y.-G.; BAE, J.-M.; KIM, S.-J. Enantiopure meso-2,3-butanediol production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing 2,3-butanediol dehydrogenase from *Klebsiella oxytoca*. **Journal of Biotechnology**, v. 354, p. 1–9, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.05.001>.

LI, X. et al. Improving enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by bio-coordinated physicochemical pretreatment—A review. **Energy Reports**, Elsevier Ltd., 1 nov. 2022.

LI, F.; PAN, S.; YANG, L.; LIAO, S.; YANG, D.; WANG, Q.; HUANG, S. Efficient production of 2,3-butanediol from biomass-derived sugars by *Raoultella ornithinolytica* TH-21, a newly isolated lignocellulose-degrading bacterium. **Industrial Crops and Products**, v. 217, p. 118841, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118841>.

LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. D. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; AMORIM NETO, H. B. D.; AMORIM, H. V. D. Ethanol production in Brazil: A bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.003>.

LU, P.; GAO, T.; BAI, R.; YANG, J.; XU, Y.; CHU, W.; JIANG, K.; ZHANG, J.; XU, F.; ZHAO, H. Regulation of carbon flux and NADH/NAD<sup>+</sup> supply to enhance 2,3-butanediol production in *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Biotechnology**, v. 358, p. 67–75, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.09.001>.

LUO, L.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; FENG, D.; LI, Y.; ZHU, X.; YE, H.; CHEN, W.; QIN, Y. Study on life-cycle carbon emission accounting of cane sugar products based on ammonia-based CO<sub>2</sub> capture method. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 68, p. 103858, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.seta.2024.103858>.

MA, C.; WANG, A.; QIN, J.; LI, L.; AI, X.; JIANG, T.; TANG, H.; XU, P. Enhanced 2,3-butanediol production by *Klebsiella pneumoniae* SDM. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, p. 49–57, 2009.

MAINA, S.; MALLOUCHOS, A.; NYCHAS, G. E.; FREIRE, D. M.; DE CASTRO, A. M.; PAPANIKOLAOU, S.; KOOKOS, I. K.; KOUTINAS, A. Bioprocess development for (2R,3R)-butanediol and acetoin production using very high polarity cane sugar and sugarcane

molasses by a *Bacillus amyloliquefaciens* strain. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 94, n. 7, p. 2167–2177, 2019. <https://doi.org/10.1002/jctb.5997>.

MAINA, S.; PRABHU, A. A.; VIVEK, N.; VLYSIDIS, A.; KOUTINAS, A.; KUMAR, V. Prospects on bio-based 2,3-butanediol and acetoin production: Recent progress and advances. **Biotechnology Advances**, v. 54, p. 107783, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107783>.

MAINA, S.; SCHNEIDER, R.; ALEXANDRI, M.; PAPAPOSTOLOU, H.; NYCHAS, G.-J.; KOUTINAS, A.; VENUS, J. Volumetric oxygen transfer coefficient as fermentation control parameter to manipulate the production of either acetoin or D-2,3- butanediol using bakery waste. **Bioresource Technology**, v. 335, p. 125155, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125155>.

MAKEPA, D. C.; CHIHOBBO, C. H. Barriers to commercial deployment of biorefineries: A multi-faceted review of obstacles across the innovation chain. **Heliyon**, v. 10, n. 12, p. e32649, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32649>.

MALAIKA, A.; EBLAGON, K. M.; MATUSZEK, N.; PEREIRA, M. F. R.; KOZŁOWSKI, M. Towards valorization of glycerol and molasses: carbon-based catalysts from molasses for the synthesis of acetins. **Bioresource Technology**, v. 417, p. 131834, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.131834>.

MANICARDI, T.; BAIONI E SILVA, G.; LONGATI, A. A.; PAIVA, T. D.; SOUZA, J. P. M.; PÁDUA, T. F.; FURLAN, F. F.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C.; MILESSI, T. S. Xylooligosaccharides: a bibliometric analysis and current advances of this bioactive food chemical as a potential product in biorefineries' portfolios. **Foods**, v. 12, n. 16, p. 3007, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12163007>.

MARQUES, W. L.; MANS, R.; HENDERSON, R. K.; MARELLA, E. R.; HORST, J. T.; HULSTER, E. DE; POOLMAN, B.; DARAN, J.-M.; PRONK, J. T.; GOMBERT, A. K.; VAN MARIS, A. J. A. Combined engineering of disaccharide transport and phosphorolysis for enhanced ATP yield from sucrose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 45, p. 121–133, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2017.11.012>.

MARQUES, W. L.; RAGHAVENDRAN, V.; STAMBUK, B. U.; GOMBERT, A. K. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: A relationship most sweet. **FEMS Yeast Research**, v. 16, n. 1, p. fov107, 2016. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov107>.

MARROCCHI, A. A review of lignin as a precursor for macromonomers: Challenges and opportunities in utilizing agri-food waste. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 300, p. 140332, abr. 2025.

MARTINS, M. P.; VENTORIM, R. Z.; COURA, R. R.; MAITAN-ALFENAS, G. P.; ALFENAS, R. F.; GUIMARÃES, V. M. The  $\beta$ -xylosidase from *Ceratocystis fimbriata* RM35 improves the saccharification of sugarcane bagasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 13, p. 291–298, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.01.009>.

MATOS, W. E. D. C.; SILVA, H. D. J. B. D.; PAZ, G. M. D.; SANTOS, V. B. D. Utilização de cinzas do bagaço de cana-de-açúcar como material de preenchimento estrutural ou pozolânico

para a produção de argamassas cimentícias: uma revisão. **Matéria (Rio J.)**, v. 26, n. 4, e13122, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1517707620210004.1322>.

MELLYANAWATY, M.; MARBELIA, L.; SARTO; PRIJAMBADA, I. D.; ROCHMAN, Y. A. Y.; BUDHIJANTO, W. Application of anaerobic digestion model no. 1 on thermophilic anaerobic digestion with microbial immobilization media for biogas production from sugarcane vinasse. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 12, n. 2, p. 112209, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112209>.

MEHMOOD, K.; TAUSEEF HASSAN, S.; QIU, X.; ALI, S. Comparative analysis of CO<sub>2</sub> emissions and economic performance in the United States and China: navigating sustainable development in the climate change era. **Geoscience Frontiers**, v. 15, n. 5, p. 101843, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gsf.2024.101843>.

MILESSI, T. S. D. S. **Produção de etanol 2G a partir de hemicelulose de bagaço de cana-de-açúcar utilizando *Saccharomyces***. São Carlos - SP, [s.n], 2017.

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

MORDENTI, A. L.; GIARETTA, E.; CAMPIDONICO, L.; PARAZZA, P.; FORMIGONI, A. A review regarding the use of molasses in animal nutrition. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 115, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11010115>.

MORITA, K.; SEIKE, T.; ISHII, J.; MATSUDA, F.; SHIMIZU, H. Improvement of 2,3-butanediol production by dCas9 gene expression system in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 133, n. 3, p. 208–212, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.12.007>.

MOYA, E. B.; SYHLER, B.; MANSO, J. O.; DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I. Enzymatic hydrolysis cocktail optimization for the intensification of sugar extraction from sugarcane bagasse. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 125051, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125051>.

MU, D.; LI, P.; MA, T.; WEI, D.; MONTALBÁN-LÓPEZ, M.; AI, Y.; WU, X.; WANG, Y.; LI, X.; LI, X. Advances in the understanding of the production, modification and applications of xylanases in the food industry. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 179, p. 110473, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110473>.

NASCIMENTO, M. H. L. D.; VILLELA, V.; GONÇALVES, T. E. D. S.; SANTANA, R. P. Instrumentos utilizados por fisioterapeutas para a avaliação de pacientes com sequelas de acidente vascular cerebral. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 4, p. 12568–12584, 13 jul. 2022.

NARISSETTY, V.; AMRAOUI, Y.; ABDULLAH, A.; AHMAD, E.; AGRAWAL, D.; PARAMESWARAN, B.; PANDEY, A.; GOEL, S.; KUMAR, V. High yield recovery of 2,3-

butanediol from fermented broth accumulated on xylose rich sugarcane bagasse hydrolysate using aqueous two-phase extraction system. **Bioresource Technology**, v. 337, 125463, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125463>.

NARISSETTY, V.; NARISSETTY, S.; JACOB, S.; KUMAR, D.; LEEKE, G. A.; CHANDEL, A. K.; SINGH, V.; SRIVASTAVA, V. C.; KUMAR, V. Biological production and recovery of 2,3-butanediol using arabinose from sugar beet pulp by *Enterobacter ludwigii*. **Renewable Energy**, v. 191, p. 394–404, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2022.04.024>.

NARISSETTY, V.; ZHANG, L.; ZHANG, J.; SZE KI LIN, C.; WAH TONG, Y.; LOKE SHOW, P.; KANT BHATIA, S.; MISRA, A.; KUMAR, V. Fermentative production of 2,3-butanediol using bread waste – a green approach for sustainable management of food waste. **Bioresource Technology**, v. 358, p. 127381, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127381>.

NEVES, T. C. **Produção de 2,3-butanediol a partir do hidrolisado hemicelósico do bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com melão**. 2021. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP.

NOGUEIRA, L.; SEABRA, J.; BEST, G.; LEAL, M.R.; POPPE, M. **Sugarcane based bioethanol: energy for sustainable development**. 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.13140/2.1.3774.1122>.

NONG, D.; SIMSHAUSER, P.; NGUYEN, D. B. Greenhouse gas emissions vs CO<sub>2</sub> emissions: comparative analysis of a global carbon tax. **Applied Energy**, v. 298, p. 15, set. 2021.

NORFARHANA, A. S.; ILYAS, R. A.; NGADI, N.; OTHMAN, M. H. D.; MISENAN, M. S. M.; NORRAHIM, M. F. Revolutionizing lignocellulosic biomass: a review of harnessing the power of ionic liquids for sustainable utilization and extraction. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 256, p. 128256, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128256>.

OMEROGLU, M. A.; BALTACI, M. O.; TASKIN, M.; ADIGUZEL, A. Turning waste into biofuel: non-sterile fermentation of molasses using immobilized cells of *Bacillus licheniformis* BD43 for efficient 2,3-butanediol production. **Industrial Crops and Products**, v. 211, p. 118265, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.118265>.

ÖMÜR KAYIKCI, J.; NIELSEN, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 15, n. 6, p. fov068, set. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>.

ORTIZ, S. **Imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio com nanopartículas magnéticas**. 2017. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

PALMONARI, A.; CAVALLINI, D.; SNIFFEN, C. J.; FERNANDES, L.; HOLDER, P.; FAGIOLI, L.; FUSARO, I.; BIAGI, G.; FORMIGONI, A.; MAMMI, L. Short communication: characterization of molasses chemical composition. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 7, p. 6244–6249, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17644>.

PATEL, R.; RAJARAMAN, T. S.; RANA, P. H.; AMBEGAONKAR, N. J.; PATEL, S. A review on techno-economic analysis of lignocellulosic biorefinery producing biofuels and high-value products. **Results in Chemistry**, v. 13, p. 102052, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2025.102052>.

PAWAR, P. R.; LALI, A. M.; PRAKASH, G. Integration of continuous-high cell density fed-batch fermentation for *Aurantiochytrium limacinum* for simultaneous high biomass, lipids and docosahexaenoic acid production. **Bioresource Technology**, v. 325, p. 124636, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124636>.

PENDSE, D. S.; DESHMUKH, M.; PANDE, A. Different pre-treatments and kinetic models for bioethanol production from lignocellulosic biomass: a review. **Heliyon**, v. 9, n. 6, e16604, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e16604>.

PEREZ, C. L.; PEREIRA, L. P. R. D. 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, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2021.12.044>.

PÉREZ-HERNÁNDEZ, R.; MARTÍNEZ, A. G.; GALICIA, G. M.; FERNÁNDEZ GARCÍA, M. E.; NÚÑEZ, O. C.; HERNÁNDEZ, M. V.; LÓPEZ, P.; GUTIÉRREZ WING, C. E. Carbon cycle using the CO<sub>2</sub> conversion to methane as environmental feasibility on Ni/TiO<sub>2</sub>-Na nanotubes catalysts. **Renewable Energy**, v. 217, p. 119145, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2023.119145>.

PETHEŐ, G. L.; SZELE, Z.; GEISZT, M. NADPH oxidase 5: where are we now and which way to proceed? **Redox Biochemistry and Chemistry**, v. 9, p. 100036, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbc.2024.100036>.

RAMANDANI, A. A.; LEE, S. Y.; JAMBRAK, A. R.; CHEN, W.-H.; LIM, J. W.; KHOO, K. S. Synergizing food waste management and microalgae biorefinery for bioenergy production: recent advance on direct and indirect conversion pathways. **Process Biochemistry**, v. 151, p. 14–26, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.01.006>.

RAMOS, M. D. N. **Desenvolvimento de bioprocessamento consolidado utilizando levedura com secreção de enzimas hidrolíticas**. São Carlos - SP: [s.n.], 2023.

RAMOS, M. D. N.; MILESSI, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C. et al. Effective application of immobilized second generation industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain on consolidated bioprocessing. **New Biotechnology**, v. 78, p. 153–161, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2023.10.011>.

RAMOS, M. D. N.; MILESSI, T. S.; ZANGIROLAMI, T. C. et al. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**. [S.l.]: Elsevier B.V., 1 jun. 2022.

RASHID, R.; EJAZ, U.; MOIN, S. F.; SOHAIL, M. Xylanase from *Neobacillus sedimentimangrovi* UE25: characterization, purification and applications. **Biocatalysis and**

**Agricultural Biotechnology**, v. 60, p. 103331, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103331>.

REHMAN, S.; LENG, L.; ZHUANG, H.; VUPPALADADIYAM, A. K.; LIN, C. S. K.; LEU, S.-Y. Genomic insights to facilitate the construction of a high-xylose-utilization *Enterococcus faecalis* OPS2 for 2,3-BDO production. **Chemical Engineering Journal**, v. 448, p. 137617, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.137617>.

REN, P.; DONG, Q.; ZHOU, C.; CHEN, T.; SUN, W.; CHEN, Y.; YING, H. Enhanced pullulanase production through expression system optimization and biofilm-immobilized fermentation strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 297, p. 139933, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139933>.

RONCAL, T.; MAESTRO, B.; PRIETO-FERNÁNDEZ, S. Fermentative production of 2,3-butanediol from cheese whey by a non-engineered mutant strain of *Lactococcus lactis*. **Bioresource Technology Reports**, v. 24, p. 101637, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2023.101637>.

SALEEM, S.; ULLAH, Z.; RASHID, N.; SHEIKH, Z. Effect of hydrothermal pretreatment on leachate fed *Scenedesmus* sp. biomass solubilization and biogas production. **Journal of Environmental Management**, v. 365, p. 121515, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121515>.

SADHUKHAN, J.; MARTINEZ-HERNANDEZ, E.; AMEZCUA ALLIERI, M. A.; ZERMEÑO EGUÍA-LIS, J. A.; CASTILLO, A.; DOMINGUILLO, D.; TORRES- GARCÍA, E.; ABURTO, J. Strategic navigation of world-leading biorefineries and Mexico's policy landscape: a gateway to a sustainable circular bioeconomy. **Journal of Cleaner Production**, v. 434, p. 140386, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.140386>.

SALIHU, A.; ABBAS, O.; SALLAU, A. B.; ALAM, Md. Z. Agricultural residues for cellulolytic enzyme production by *Aspergillus niger*: effects of pretreatment. **3 Biotech**, v. 5, n. 6, p. 1101–1106, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0294-5>.

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>.

SÁNCHEZ-SANTILLÁN, P.; HERRERA-PÉREZ, J.; TORRES-SALADO, N.; ALMARAZ-BUENDÍA, I.; REYES-VÁZQUEZ, I.; ROJAS-GARCÍA, A. R.; GOMEZTRINIDAD, M.; CONTRERAS-RAMÍREZ, E. O.; MALDONADO-PERALTA, M. de los A.; MAGADAN-OLMEDO, F. Chemical composition, and in vitro fermentation of ripe mango silage with molasses. **Agroforestry Systems**, v. 94, n. 4, p. 1511–1519, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10457-019-00442-z>.

SARIC, L.; FILIPCEV, B.; SIMURINA, O.; PLAVSIC, D.; SARIC, B.; LAZAREVIC, J.; MILOVANOVIC, I. Sugar beet molasses: properties and applications in osmotic dehydration of fruits and vegetables. **Food and Feed Research**, v. 43, n. 2, p. 135–144, 2016. DOI: <https://doi.org/10.5937/FFR1602135S>.

SAXENA, A.; MISHRA, B.; TIWARI, A. Development of diatom entrapped alginate beads and application of immobilized cells in aquaculture. **Environmental Technology & Innovation**, v. 23, p. 101736, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101736>.

SCAPINI, T.; DOS SANTOS, M. S. N.; BONATTO, C.; WANCURA, J. H. C.; MULINARI, J.; CAMARGO, A. F.; KLANOVICZ, N.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; FONGARO, G.; TREICHEL, H. Hydrothermal pretreatment of lignocellulosic biomass for hemicellulose recovery. **Bioresource Technology**, v. 342, p. 126033, dez. 2021.

SECCHES, T. O.; SANTOS VIERA, C. F.; PEREIRA, T. K. E. et al. Brazilian industrial yeasts show high fermentative performance in high solids content for corn ethanol process. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, p. 97, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00580-w>.

SHAH, W. U. H.; et al. Role of renewable, non-renewable energy consumption and carbon emission in energy efficiency and productivity change: evidence from G20 economies. **Geoscience Frontiers**, 2023.

SHAH, K.; KRACHER, D.; MACHEROUX, P.; WALLNER, S.; PICK, A.; KOURIST, R. Discovery and characterization of NADH oxidases for selective sustainable synthesis of 5-hydroxymethylfuran carboxylic acid. **Journal of Biotechnology**, v. 398, p. 18–28, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2024.11.009>.

SHARMA, S.; MODI, R.; KAUR, A. Lytic polysaccharide monooxygenases producing microbes: a key indicator for biomass-degrading enzymes. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 60, p. 103337, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103337>.

SHARMA, D.; SHARMA, V.; TSAI, M.-L.; NARGOTRA, P.; YADAV, A.; SUN, P.P.; CHEN, C.-W.; DONG, C.-D. Recent advances in ultrasound-assisted technologies for improved bioproduct recovery in lignocellulosic and microalgal biorefineries. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2025, p. S1226086X24009109. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2024.12.082>.

SHEN, F.; HE, C.; WANG, Y.; XU, J.; HUANG, M.; ZHAO, L.; HU, J.; TIAN, D.; SHEN, F. Revealing the intensification effect of circulating hydrothermal pretreatment: a sustainable route for biorefinery. **Chemical Engineering Journal**, v. 497, p. 154931, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.154931>.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. Prentice Hall International, Englewood Cliffs, 2002.

SIRIWONG, T.; LUNPROM, S.; SALAKKAM, A. Integrating use of sugarcane bagasse with sugarcane juice for efficient L-lactic acid production through fed-batch simultaneous saccharification and fermentation: process configurations and kinetic analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 222, p. 119724, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2024.119724>.

ŠIURKUS, J.; PANULA-PERÄLÄ, J.; HORN, U. et al. Novel approach of high cell density recombinant bioprocess development: optimisation and scale-up from microlitre to pilot

scales while maintaining the fed-batch cultivation mode of *E. coli* cultures. **Microbial Cell Factories**, v. 9, p. 35, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-35>.

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, p. 2400, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/polym14122400>.

STOKLOSA, R. J.; LATONA, R. J.; JOHNSTON, D. B. Assessing oxygen limiting fermentation conditions for 2,3-butanediol production from *Paenibacillus polymyxa*. **Frontiers in Chemical Engineering**, v. 4, p. 1038311, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fceng.2022.1038311>.

SUN, S.; JIAN, Z.; RAO, Q.; CHEN, J.; ZHONG, M.; WANG, Y.; WANG, Y.; CHEN, J.; XIE, P.; SU, H. Diversity of carbon cycle-linked phyllosphere microorganisms: a key driver of CO<sub>2</sub> flux in macrophyte-dominated aquatic systems. **Water Biology and Security**, p. 100289, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.watbs.2024.100289>.

SILVA, J. P. D.; SANTOS, Y. R. P. D.; BELLO, M. I. M. D. C. Aplicação da ANOVA e dos testes de Fisher e Tukey em dados de recalque de edifícios de múltiplos pavimentos. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do IFPB**, v. 59, n. 3, p. 829, 2022. DOI: <https://doi.org/10.18265/1517-0306a2021id5388>.

SILVA, A. F. R.; LEBRON, Y. A. R.; RIBEIRO, L. A.; ARAUJO, A. D.; ANDRÉ, L. C.; PAIVA, M. J. N.; SOUZA, M. M. D.; KOCH, K.; AMARAL, M. Thermophilic anaerobic membrane distillation bioreactor for sugarcane vinasse treatment maximizing pollutants removal and resources recovery. **Chemical Engineering Journal**, v. 496, p. 153680, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.153680>.

STOKLOSA, R. J.; GARCÍA-NEGRÓN, V.; LATONA, R. J.; TOHT, M. Limiting acetoin generation during 2,3-butanediol fermentation with *Paenibacillus polymyxa* using lignocellulosic hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 393, p. 130053, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130053>.

TINÔCO, D.; FREIRE, D. M. G. Scale-up of 2,3-butanediol production by *Paenibacillus peoriae* NRRL BD-62 using constant oxygen transfer rate-based strategy. **Fuel**, v. 340, p. 127603, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2023.127603>.

TINÔCO, D.; PATERAKI, C.; KOUTINAS, A. A.; FREIRE, D. M. G. Bioprocess development for 2,3-butanediol production by *Paenibacillus* strains. **ChemBioEng Reviews**, v. 8, p. 44–62, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/cben.202000022>.

TINÔCO, D.; SELDIN, L.; COUTINHO, P. L. D. A.; FREIRE, D. M. G. Sustainable production of optically pure platform chemical bio-based (R,R)-2,3-butanediol from sugarcane molasses in a low-cost salt medium. **Industrial Crops and Products**, v. 209, p. 117931, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117931>.

TORRES-VINCES, L.; CONTRERAS-ZARAZUA, G.; HUERTA-ROSAS, B.; SANCHEZ-RAMIREZ, E.; SEGOVIA-HERNANDEZ, J. G. Methyl ethyl ketone production through an intensified process. **Chemical Engineering & Technology**, v. 43, n. 7, p. 1433–1441, 2020.

UBANDO, A. T.; FELIX, C. B.; CHEN, W. H. Biorefineries in circular bioeconomy: a comprehensive review. *Bioresource Technology*. [S.l.]: Elsevier Ltd., 1 mar. 2020.

UM, J.; KIM, D. G.; JUNG, M.-Y.; SARATALE, G. D.; OH, M.-K. Metabolic engineering of *Enterobacter aerogenes* for 2,3-butanediol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 1567–1574, dez. 2017.

USMANI, Z.; et al. Lignocellulosic biorefineries: the current state of challenges and strategies for efficient commercialization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 148, 1 set. 2021.

VAN WYK, N.; KROUKAMP, H.; ESPINOSA, M. I.; VON WALLBRUNN, C.; WENDLAND, J.; PRETORIUS, I. S. Blending wine yeast phenotypes with the aid of CRISPR DNA editing technologies. **International Journal of Food Microbiology**, v. 324, p. 108615, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108615>.

VANDENBERGHE, L. P. S.; VALLADARES-DIESTRA, K. K.; BITTENCOURT, G. A.; ZEVALLOS TORRES, L. A.; VIEIRA, S.; KARP, S. G.; SYDNEY, E. B.; DE CARVALHO, J. C.; THOMAZ SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. Beyond sugar and ethanol: the future of sugarcane biorefineries in Brazil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 167, p. 112721, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112721>.

VARMA, A. R.; SHRIRAME, B. S.; GADKARI, S.; RAJA VANAPALLI, K.; KUMAR, V.; MAITY, S. K. Techno-economic viability of bio-based methyl ethyl ketone production from sugarcane using integrated fermentative and chemo-catalytic approach: process integration using pinch technology. **Chemical Engineering Journal**, v. 489, p. 151297, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.151297>.

VELOSO, I. I. K.; RODRIGUES, K. C. S.; ESPERANÇA, M. N.; BATISTA, G.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. A more accurate modeling for fed-batch ethanol fermentation with high cell density. **Biochemical Engineering Journal**, v. 193, p. 108855, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2023.108855>.

WANG, Y.; WU, B.; MA, T.; MI, Y.; JIANG, H.; YAN, H.; ZHAO, P.; ZHANG, S.; WU, L.; CHEN, L.; ZANG, H.; LI, C. Efficient conversion of hemicellulose into 2,3-butanediol by engineered psychrotrophic *Raoultella terrigena*: mechanism and efficiency. **Bioresource Technology**, v. 359, p. 127453, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127453>.

YANG, Z.; ZHANG, Z. Recent advances on production of 2,3-butanediol using engineered microbes. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 4, p. 569–578, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.019>.

YANG, Z.; LEERO, D. D.; YIN, C.; YANG, L.; ZHU, L.; ZHU, Z.; JIANG, L. *Clostridium* as microbial cell factory to enable the sustainable utilization of three generations of feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127656, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127656>.

YANG, F.; ZHANG, P.; QU, J.; CAI, Y.; YANG, X.; LI, C. M.; HU, J. Covalent organic framework-immobilized enzymes: A robust engineered catalytic platform for diverse applications. **Nano Energy**, v. 136, p. 110682, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2025.110682>.

YOUNGWILAI, A.; KIDKHUNTHOD, P.; JEARANAIKOON, N.; CHAIPRAPA, J.; SUPANCHAIYAMAT, N.; HUNT, A. J.; NGERNYEN, Y.; RATPUKDI, T.; KHAN, E.; SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI, S. Simultaneous manganese adsorption and biotransformation by *Streptomyces violarius* strain SBP1 cell-immobilized biochar. **Science of The Total Environment**, v. 713, p. 136708, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136708>.

YUAN, J.; et al. Influence of global warming and urbanization on regional climate of Megacity: a case study of Chengdu, China. **Urban Climate**, v. 44, p. 1 jul. 2022.

YUAN, Y.; WU, J.; WEI, F.; WAN, Z.; DONG, Y.; LU, Y.; YANG, P.; JIN, Y.; SADDLER, J. Elucidating the synergistic action between sulfonated lignin and lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in enhancing cellulose hydrolysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 296, p. 139674, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.139674>.

ZETTY-ARENAS, A. M.; TOVAR, L. P.; ALVES, R. F.; MARIANO, A. P.; VAN GULIK, W.; MACIEL FILHO, R.; FREITAS, S. Co-fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate and molasses by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum*: Effect on sugar consumption and butanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 167, p. 113512, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113512>.

ZHANG, B.; REN, L.; WANG, H.; XU, D.; ZENG, X.; LI, F. Glycerol uptake and synthesis systems contribute to the osmotic tolerance of *Kluyveromyces marxianus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 140, p. 109641, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109641>.

ZHANG, B.; XU, L.; YANG, H.; PANG, Z.; ZHANG, W.; WANG, F.; LIU, H.; FAN, J.; ZHANG, B. Integrative proteomic-metabolomics strategy reveals the regulators and mechanism of enhancing cyclic lipopeptides in the high-cell-density fermentation of *Bacillus subtilis* S1702. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 187, p. 1517–1526, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.psep.2024.05.090>.

ZHANG, J.; ZHAO, J.; FU, Q.; LIU, H.; LI, M.; WANG, Z.; GU, W.; ZHU, X.; LIN, R.; DAI, L.; LIU, K.; WANG, C. Metabolic engineering of *Paenibacillus polymyxa* for effective production of 2,3-butanediol from poplar hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 392, p. 130002, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2023.130002>.

ZHANG, L.; YANG, Y.; SUN, J.; SHEN, Y.; WEI, D.; ZHU, J.; CHU, J. Microbial production of 2,3-butanediol by a mutagenized strain of *Serratia marcescens* H30. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1961–1967, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.052>.

ZHENG, Q.; MA, Y.; WAN, J.; WANG, Y.; LONG, Y.; XIA, X.; SUN, X. Hydrolysate derived from sugarcane bagasse by hydrothermal and enzymatic treatment as an external carbon source for wastewater nitrogen removal. **Journal of Water Process Engineering**, v. 59, p. 105039, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2024.105039>.

ZHENG, A.; LIANG, H. Immobilization of Bgps-expressing Escherichia coli cells coated with ZIF-67 for the production of rare ginsenoside F1. **Biochemical Engineering Journal**, v. 210, p. 109432, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2024.109432>.

## APÊNDICE

### ANEXO A – Parâmetros da análise de variância (ANOVA) utilizados na regressão multivariável

<b>Análise de variância - ANOVA</b>						
Consumo de Substrato						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor	
Regressão	23256,0	2	11628,0	18,6	0,00064	
Resíduos	5630,8	9	625,6			
Falta de ajuste	5491,3	6	915,2	19,7	0,01656	
Erro puro	139,5	3	46,5			
Total	28886,8	11				
$R^2 = 80,51\%$						
Conversão (X)						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor	
Regressão	0,4	3	0,1	19,8	0,00005	
Resíduos	0,1	8	0,0			
Falta de ajuste	0,1	5	0,0	11,2	0,03735	
Erro puro	0,0	3	0,0			
Total	0,5	11				
$R^2 = 88,15\%$						
YP/S						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor	
Regressão	0,2	6	0,0	3,1	0,12060	
Resíduos	0,0	5	0,0			
Falta de ajuste	0,0	2	0,0	8,9	0,05515	
Erro puro	0,0	3	0,0			
Total	0,2	11	0,0			
$R^2 = 78,56\%$						
Qp						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor	
Regressão	0,4	6	0,1	3,0	0,12621	
Resíduos	0,1	5	0,0			
Falta de ajuste	0,1	2	0,1	21,9	0,01622	
Erro puro	0,0	3	0,0			
Total	0,5	11				
$R^2 = 78,10\%$						
Produção de BDO						
Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Fcal	p-valor	
Regressão	3770,3	6	628,4	3,0	0,12625	
Resíduos	1057,6	5	211,5			
Falta de ajuste	988,8	2	494,4	21,5	0,01662	
Erro puro	68,9	3	23,0			
Total	4828,0	11				
$R^2 = 78,09\%$						