



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
ALIMENTOS

Isabela de Oliveira Pereira

APROVEITAMENTO DA XILOSE PRESENTE NA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA
ESTABELEECER UMA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL

Florianópolis, 2020

Isabela de Oliveira Pereira

**APROVEITAMENTO DA XILOSE PRESENTE NA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA
ESTABELEECER UMA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE
ETANOL**

Dissertação submetida ao programa de Pós graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do grau Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Jaciane Lutz Ienczak
Coorientador: Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk

Florianópolis, 2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Isabela de Oliveira

Aproveitamento da xilose presente na fração hemicelulósica do bagaço de cana de açúcar para estabelecer uma estratégia de produção de etanol / Isabela de Oliveira Pereira ; orientadora, Jaciane Lutz Ienczak, coorientador, Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk, 2020.

128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Etanol 2G. 3. xilose. 4. Saccharomyces cerevisiae recombinante. 5. Spathaspora passalidarum. I. Ienczak, Jaciane Lutz. II. Stambuk, Boris Juan Carlos Ugarte. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Isabela de Oliveira Pereira

**APROVEITAMENTO DA XILOSE PRESENTE NA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA
ESTABELEECER UMA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Gláucia Maria Falcão de Aragão, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Zaira Bruna Hoffman, Dra.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia de Alimentos.

Prof^a. Sandra Regina Salvador Ferreira, Dra.
Coordenadora do Programa

Prof^a. Jaciane Lutz Ienczak, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2020.

Ao meu pai (em memória).

Agradecimentos

Começo agradecendo ao meu pai e contando uma breve história. Em 2011, no fim do meu primeiro ano de graduação, decidi me candidatar a uma vaga de iniciação científica no antigo CTBE e ele me acompanhou para a entrevista. Ele leu nos pôsteres do corredor, enquanto me esperava, que o uso de bagaço de cana na produção de etanol aumentaria em 40% a produção atual. Se tornou a empolgação em pessoa e naquele dia voltando pra casa me convenceu sobre como aquela oportunidade era incrível e grandiosa. Eu acreditei, abracei e ela realmente era (ele sempre acertava). Fiquei lá por dois anos e até hoje colho muitos frutos dessa etapa, incluindo os resultados obtidos durante o mestrado. Revisitei essa etapa da vida ao conhecer a professora Jaciane, orientadora desse projeto, a quem já aproveito para agradecer todos os ensinamentos, a paciência e colaboração na etapa de escrita e, principalmente, por todos os desafios propostos que me fazem olhar para trás hoje e me orgulhar por ter conseguido vencer todos eles. Obrigada por me fazer enxergar minha força.

Agradeço à UFSC e ao PPGEAL pela oportunidade e apoio científico e à CAPES e pelo apoio financeiro.

Agradeço ao professor Boris pela orientação e por todas as colaborações, pela parceria cedendo as cepas para desenvolvimento do projeto e, principalmente disponibilizando os equipamentos para que o projeto fosse realizado. Aos alunos do professor no laboratório LBMBL, em especial Eduardo e Angela pela ajuda com as infinitas análises de HPLC.

À professora Sarita Rabelo da UNESP, por gentilmente ceder o hidrolisado, e à professora Aline Costa da FEQ/UNICAMP pela disponibilização de equipamento para análise em seu laboratório.

Também preciso agradecer aos companheiros de Lieb e todos os integrantes do ScinFer por compartilhar o dia a dia (e noites) no laboratório. Destacando o companheirismo e enorme ajuda do aluno de iniciação científica (e amigo) que me acompanhou e abraçou comigo todos os desafios do projeto. Muito obrigada, Nick!

Agradeço a Deus pela força e por sempre iluminar meu caminho.

E, por último, mas não menos importante, agradeço à minha família pelo apoio desde sempre. Não foi fácil ficar longe de vocês por tanto tempo (ainda mais com os novos integrantes que chegaram), por isso agradeço por se fazerem presentes mesmo com a distância. Sem palavras para agradecer também ao meu companheiro de todos os dias, Luiz, que me ajudou a superar os desafios da saudade, da distância, do excesso de trabalho, do cansaço, sempre com um sorriso enorme no rosto, uma piada pronta e um misto quente (sem lactose) pra alegrar meu dia. Obrigada por fazer tudo parecer possível e mais leve. Amo todos vocês!

Resumo

O etanol de segunda geração (E2G) tornou-se uma possibilidade para contornar problemas com o excedente de resíduos lignocelulósicos e sazonalidade da cana de açúcar na produção de etanol de primeira geração (E1G), uma vez que utiliza o bagaço e palha de cana de açúcar hidrolisados para a produção de etanol. Porém, existem alguns desafios a serem solucionados para implementação e viabilização dessa nova tecnologia destacando-se a fermentação da fração de pentoses provenientes da hidrólise da hemicelulose e os altos custos de instalação de uma usina *greenfield* para segunda geração. Neste trabalho foram avaliadas duas leveduras não convencionais (*Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum*) e duas industriais geneticamente modificadas (*S. cerevisiae* MP-C5 e MP-C5H1) para o consumo de xilose, presente na fração de pentoses provenientes da hidrólise da hemicelulose. Neste contexto, estudou-se uma estratégia de escalonamento de processo, selecionando as melhores cepas, condições de crescimento em pré-inóculo e inóculo, determinando a composição do meio de fermentação e por fim, propagações e fermentações em biorreator. O protocolo de pré inóculo foi estabelecido em meio YPSX (contendo sacarose, xilose, extrato de levedura e peptona) por 12 h a 30 °C para as quatro cepas testadas. As cepas *S. cerevisiae* MP-C5H1 e *Sp. passalidarum* foram selecionadas para os testes seguintes devido ao melhor desempenho. Para o inóculo, o meio YPSX também foi selecionado com valores finais de concentração de biomassa celular (8 g L e 7 g L) e velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) 0,34 h⁻¹ e 0,31 h⁻¹ para *S. passalidarum* e MP-C5H1, respectivamente. Foi estabelecida também a proporção de açúcares no meio de fermentação em 70% de xilose e 30% sacarose, concentração inicial de substrato em 90 g L⁻¹, para ambas as leveduras, por apresentarem melhores rendimentos globais em etanol, título de etanol e consumo dos substratos. Destaque para a levedura recombinante *S. cerevisiae* MP-C5H1 selecionada para fermentação em reator, justificada pelo maior rendimento global (65,75%) obtido na fermentação em frasco e melhor adequação a estratégia de integração proposta. Nas fermentações em meio rico em biorreator, destaca-se o resultado inédito encontrado de produtividade volumétrica global em etanol de 2,24 g L⁻¹ h⁻¹ e consumo de 4,36 g L⁻¹ h⁻¹ de xilose. Com o parâmetro de consumo estabelecido, fez-se a fermentação em batelada alimentada com hidrolisado hemicelulósico e melaço reproduzindo as proporções e concentrações determinadas anteriormente, obtendo título de etanol de 44,5 g L⁻¹, e produtividade de 1,59 g L⁻¹ h⁻¹, resultados superiores aos descritos até o presente na literatura científica internacional.

Palavras Chave: *Spathaspora passalidarum*, *Saccharomyces cerevisiae* OGM, Xilose, Sacarose.

Abstract

Second generation ethanol (E2G) has become a possibility to solve problems with excess lignocellulosic waste and sugarcane seasonality in the production of first generation ethanol (E1G), since it uses sugarcane bagasse and straw hydrolysed sugar for ethanol production. However, there are some challenges to be solved for the implementation and viability of this new technology, highlighting the fermentation of the fraction of pentoses from the hydrolysis of hemicellulose and the high costs of installing a second generation greenfield plant. In this work, two unconventional yeasts (Scheffersomyces stipitis and Spathaspora passalidarum) and two industrial genetically modified yeasts (S. cerevisiae MP-C5 and MP-C5 H1) were evaluated for the consumption of xylose, present in the fraction of pentoses from the hydrolysis of the hemicellulose. In this context, a process scaling strategy was studied, selecting the best strains, growth conditions in pre-inoculum and inoculum, determining the composition of the fermentation medium and, finally, propagation and fermentation in a bioreactor. The pre-inoculum protocol was established in YPSX medium (containing sucrose, xylose, yeast extract and peptone) for 12 h at 30 °C for the four strains tested. The strains S. cerevisiae MP-C5H1 and Sp. passalidarum were selected for the following tests with best growing performance. For inoculum, the YPSX medium was also selected with final values of cell biomass concentration (8 g L⁻¹ and 7 g L⁻¹) and specific growth rate (μ_{max}) 0.34 h⁻¹ and 0.31 h⁻¹ for S. passalidarum and MP-C5H1, respectively. The proportion of sugars in the fermentation medium was established in 70% xylose and 30% sucrose, initial substrate concentration in 90 g L⁻¹, for both yeasts, as they achieve better ethanol yields, ethanol titer and substrate consumption. The recombinant yeast MP-C5H1 was selected to the next step (bioreactor fermentation), justified by the highest ethanol yield (65,75%) obtained in the flask fermentation and better adaptation to the proposed integration strategy. In fermentations in medium rich on bioreactor, we highlight the unprecedented result of global volumetric productivity in ethanol of 2.44 g L⁻¹ h⁻¹ and consumption. of 4.36 g L⁻¹ h⁻¹ of xylose. With the consumption parameter established, batch fermentation was carried out with hemicellulosic hydrolysate and sugarcane molasses, reproducing the proportions and concentrations previously determined, obtaining an ethanol titer of 44,5 g L⁻¹, and ethanol productivity 1,59 g L⁻¹ h⁻¹, results superior to those described in the international scientific literature.

Key words: Spathaspora passalidarum, Saccharomyces cerevisiae GMO, Xylose, Sucrose.

Lista de Figuras

Figura 1: Processo de produção de etanol em uma usina integrada ou anexa.

Fonte: Adaptado de UDOP (2018).

Figura 2: Dados de produção mensal de etanol no Brasil de 2012 a agosto de 2019. Fonte: ANP (2019)

Figura 3: Comparação entre as demandas de etanol e gasolina em 2018 no Brasil. Fonte: ANP (2018).

Figura 4: Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento. Fonte: adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

Figura 5: Fluxograma do processo com separação de correntes para produção de etanol 2G. Onde C5 equivale a fração de pentoses (xilose e arabinose), C6 de hexose (glicose) e C12 sacarose. Fonte: BNDES (2013).

Figura 6: Produção de etanol em milhões de litros/ano em diversos cenários avaliados. (Fonte: BNDS, 2013)

Figura 7: Custo total de produção de etanol 1G2G e 2G em diversos cenários (Vasconcelos, 2017)

Figura 8: Vias de produção de etanol a partir de xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras e fungos filamentosos. Via XI (xilose isomerase), encontrada principalmente em bactérias. Fonte: adaptado de Kuhad et al (2011).

Figura 9: Representação das vias de metabolização de sacarose em *S. cerevisiae*. Fonte: adaptado de Gonçalves (2014).

Figura 10: Resumo das etapas envolvidas em testes para desenvolvimento de um bioprocesso. Fonte: Adaptado de Schmidell (2001).

Figura 11: Diagrama com o resumo de todas as etapas do projeto

Figura 12: Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de pré inóculo.

Figura 13: Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de inóculo.

Figura 14: Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de fermentação em frasco variando a proporção entre os substratos xilose e sacarose.

Figura 15: Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato.

Figura 16: Resumo das etapas, condições experimentais e meios envolvidos na etapa de obtenção do protocolo de propagação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em biorreator.

Figura 17: Resumo das etapas, condições experimentais e meios envolvidos na etapa de fermentação em reator em meio rico com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, variando a concentração inicial de células.

Figura 18: Fluxograma com as etapas de obtenção, tratamento e fermentação do hidrolisado hemicelulósico. Fonte: Este trabalho.

Figura 19: Perfil de $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ versus o tempo para as leveduras na etapa de pré inóculo em meios contendo diferentes substratos. A) MP-C5; B) MP-C5H1; C) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907; D) *Sc. stipitis* NRRL Y-7124.

Figura 20: Cinéticas de crescimento das leveduras na etapa de inóculo para os meios YPD, YPX, YPDX, YPSX,. A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante B) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907.

Figura 21: Cinéticas de consumo de substratos e formação de produtos durante o teste de inóculo realizado em meio (A) YPD (B) YPSX (C) YPX e (D) YPDX com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1.

Figura 22: Cinéticas de consumo de substratos e formação de produtos durante o teste de inóculo realizado em meio (A) YPD (B) YPSX (C) YPX e (D) YPDX com a levedura *Sp. passalidarum*.

Figura 23: Velocidade específica de consumo de xilose pela levedura (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 e (B) *Sp. passalidarum* durante a etapa de inóculo em diferentes meios.

Figura 24: Dados de concentração de sacarose, frutose e glicose ao longo do tempo nas fermentações em frasco com (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 e (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907. Teste 1 (\circ), 2 (\bullet), 3 (\blacksquare), 4 (\square), 5 (\triangle).

Figura 25: Relação entre a concentração inicial de sacarose e o fator de conversão de substrato em células $Y_{X/S}$ (\bullet) e os valores de $\mu_{\text{máx}}$ (\square), obtidos na fermentações em frasco variando a proporção entre xilose e sacarose no meio, com (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907.

Figura 26: Dados de $Y'_{P/S}$, Q_p , título de etanol e consumo de substrato em todas fermentações com diferentes concentrações iniciais de substrato. (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante; (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907.

Figura 27. Dados de rendimento (barras) e produtividade global em etanol (linha pontilhada) para testes de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato para as leveduras *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante e *Sp. passalidarum* NRRL Y27907. Onde: (6) 30g L⁻¹; (7) 60g L⁻¹; (8) 90g L⁻¹; (9) 120g L⁻¹; (10) 150g L⁻¹; (11) 180g L⁻¹.

Figura 28: Cinéticas de crescimento, consumo de glicose e formação de produto durante as propagações com protocolos A, B e C realizadas com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, onde os triângulos preenchidos representam etanol, círculos vazados DCW (*Dry cell weight*, massa seca), triângulos vazados glicerol, e (x) representa glicose. A linha tracejada indica o momento do início da alimentação contínua de glicose.

Figura 29: Resumo das etapas e resultados obtidos antes da etapa de fermentação em reator.

Figura 30: Cinéticas de fermentação da levedura MP-C5H1 em meio rico contendo glicose e sacarose variando X₀. (A) Experimento B1, (B) Experimento B2, (C) Experimento B3. Legenda: (◆)Glicose; (■)Xilose; (▲)Sacarose; (×)Frutose, (✱)Etanol, (●)Xilitol, (○)Glicerol, (---)DCW. As linhas contínuas representam ajuste polinomial para cálculo das velocidades específicas de consumo de substrato e formação dos produtos.

Figura 31: Relação entre a produtividade e a concentração inicial de células nas fermentações em biorreator com a levedura recombinante MP-C5H1 em batelada e meio rico. A linha pontilhada representa o ajuste polinomial dos pontos.

Figura 32: Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio rico contendo xilose e sacarose em baixa densidade celular em reator. Experimento (B1).

Figura 33: Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio rico contendo xilose e sacarose em média densidade celular. Experimento (B2).

Figura 34: Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio rico contendo xilose e sacarose em alta densidade celular. Experimento (B3).

Figura 35: Balanço de massa do processo de obtenção do hidrolisado hemicelulósico concentrado.

Figura 36: Cinética de fermentação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante em hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar em reator operado em sistema de batelada alimentada em alta densidade celular.

Legenda:

(♦)Glicose; (■)Xilose; (▲)Sacarose; (×)Frutose, (✱)Etanol, (●)Xilitol, (○)Glicerol, (---)X. A linha tracejada representa o fim da alimentação do reator.

Figura 37: Imagem de microscopia obtida com objetiva de 40x em microscópio óptico de uma amostra da fermentação de levedura MP-C5H1 com hidrolisado hemicelulósico e melaço.

Figura 38: Balanço de massa da fermentação em biorreator com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em regime de batelada alimentada com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar em alta densidade celular.

Figura 39: Resumo de todas as etapas e resultados obtidos no escalonamento de processo de fermentação obtido para aproveitamento da fração de hemicelulose contida no bagaço de cana de açúcar pela levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Tabela de microrganismos geneticamente modificados e derivados aprovados comercialmente no Brasil para uso industrial.

Tabela 2: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Tabela 3: Protocolos e meios testados na etapa de propagação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em reator.

Tabela 4: Fórmulas utilizadas para análise dos resultados

Tabela 5: Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e X_f (concentração final, massa seca) obtidos na avaliação do crescimento das leveduras *Sc. stipitis*, *Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* MPC5 e MPC5 H1 recombinantes durante o pré inóculo em diferentes substratos

Tabela 6: Velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e X_{final} (massa seca) obtidos na avaliação do crescimento das leveduras *Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* MPC5 H1 recombinante durante o inóculo em diferentes substratos

Tabela 7: Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), consumo de substrato e produtividade volumétrica de etanol (Q_p) para as leveduras *S. cerevisiae* MP-C5H1 e *Sp. passalidarum* testando diferentes proporções de substrato.

Tabela 8: Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), título de etanol, consumo de substrato, rendimento global (η'), produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e velocidade de formação de etanol (dP/dt) para levedura MP-C5H1 testando diferentes concentrações iniciais de substrato.

Tabela 9: Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), título de etanol, consumo de substrato, rendimento global (η'), produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e velocidade de formação de etanol (dP/dt) para levedura *Sp. passalidarum* NRRL -Y27907 testando diferentes concentrações iniciais de substrato.

Tabela 10: Parâmetros cinéticos das propagações com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em biorreator com meio contendo glicose como substrato.

Tabela 11: Parâmetros de consumo de xilose, título, produtividade global e rendimento em etanol, fatores de conversão de substrato em produto (etanol, xilitol e glicerol), obtidos na fermentações em reator com *S. cerevisiae* MP-

C5H1 recombinante em meio rico com diferentes concentrações iniciais de biomassa (X_0)

Tabela 12: Resumo dos principais resultados de literatura com leveduras geneticamente modificadas para produção de xilose em meio rico (sintético)

Tabela 13: Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar concentrado e após detoxificado.

Tabela 14: Resumo dos principais resultados encontrados na literatura para produção de etanol de segunda geração utilizando hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

Lista de abreviações e siglas

ART: açúcares redutores totais

C5: pentoses (xilose, arabinose)

C6: hexose (glicose)

C12: sacarose

DCW: *dry cell weigh*, concentração de célula em base seca [g L⁻¹]

E1G: Etanol de primeira geração

E2G: Etanol de segunda geração

E1G2G: Etanol de primeira e segunda geração integrados

etOH: etanol

HMF: hidroximetilfurfural

OGM: Organismo Geneticamente Modificado

P: concentração de produto [g L⁻¹]

Q_p: produtividade volumétrica global de etanol [g L⁻¹ h⁻¹]

Q_x: produtividade volumétrica global de célula [g L⁻¹ h⁻¹]

R²: coeficiente de correlação

r_P: velocidade de formação de produto [g h⁻¹]

r_S: velocidade de consumo de substrato [g h⁻¹]

S: concentração de substrato [g L⁻¹]

S₀: concentração inicial de substrato [g L⁻¹]

S_f: concentração final de substrato [g L⁻¹]

Y_{P/S}: fator de conversão de substrato em etanol [g g⁻¹]

Y'_{P/S}: fator de conversão de substrato em etanol considerando a concentração inicial de substrato somente [g g⁻¹]

Y_{etanol/S}: fator de conversão de substrato em etanol [g g⁻¹]

Y_{xilitol/S}: fator de conversão de substrato em xilitol [g g⁻¹]

Y_{glicerol/S}: fator de conversão de substrato em glicerol [g g⁻¹]

Y_{X/S}: fator de conversão de substrato em célula [g g⁻¹]

X: concentração de célula em base seca [g L⁻¹]

X₀: concentração inicial de célula em base seca [g L⁻¹]

Xr: concentração final de célula em base seca [g L⁻¹]

XI: enzima xilose isomerase

XR: enzima xilose redutase

XDH: enzima xilitol desidrogenase

XK: enzima xilulose quinase

Lista de Símbolos

η : rendimento em etanol (%)

η' : rendimento considerando a concentração inicial de substrato somente

$\mu_{\text{máx}}$: velocidade específica máxima de crescimento [h^{-1}]

μ_{s} : velocidade específico de consumo de substrato [$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$]

μ_{p} : velocidade específico de formação de produto [$\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$]

μ_{x} : velocidade específico de crescimento [h^{-1}]

Sumário

1. Introdução	17
2. Revisão bibliográfica	20
2.1. Produção de etanol de primeira geração	20
2.2. Produção de etanol de segunda geração	24
2.3. Integração 1G e 2G	29
2.4. Consumo de xilose para produção de etanol por diferentes microorganismos	32
2.5. Consumo de sacarose por leveduras geneticamente modificadas e não convencionais na produção de etanol	39
2.6. Aspectos importantes de escalonamento de novos processos fermentativos	41
3. Objetivos	43
3.1. Objetivo geral	43
3.2. Objetivos específicos	43
4. Materiais e Métodos	45
4.1. Microrganismos	45
4.2. ETAPA 1: Perfil de crescimento e consumo de açúcares	46
4.2.1. Testes de pré inóculo com diferentes substratos e leveduras	46
4.2.2. Testes de inóculo com diferentes substratos e leveduras	47
4.3. ETAPA 2: Determinação da composição do meio de fermentação	48
4.3.1. Determinação da proporção de xilose e sacarose	49
4.3.2. Determinação da concentração inicial de substrato	50
4.4. ETAPA 3: Fermentação em Biorreator em meio rico	51
4.4.1. Propagação	51
4.4.2. Reativação das células	55
4.4.3. Fermentação em batelada em modo batelada	55
4.5. ETAPA 4: Fermentação com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar	56
4.6. Métodos analíticos	59
4.7. Cálculos e modelos utilizados para análise dos dados	61
5. Resultados e discussões	63
5.1. ETAPA 1: Perfil de crescimento e consumo de açúcares	63
5.1.1. Testes de pré inóculo com diferentes substratos e leveduras	63
5.1.2. Testes de inóculo com diferentes substratos e leveduras	65
5.2. ETAPA 2: Determinação da composição do meio de fermentação	70
5.2.1. Determinação da proporção de xilose e sacarose	70
5.2.2. Determinação da concentração inicial de substrato	74
5.3. ETAPA 3: Fermentação em Biorreator	80

5.3.1. Propagação	80
5.3.2. Fermentação em batelada	84
5.4. ETAPA 4: Fermentação com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar.....	93
5.4.1. Balanço de massa e caracterização do hidrolisado hemicelulósico.....	93
5.4.2. Fermentação em batelada alimentada	95
6. Conclusões	104
7. Sugestões para trabalhos futuros	106
Referências Bibliográficas	107
Apêndice	119

1. Introdução

O Brasil é o país que mais utiliza energia renovável no mundo (80,4 % da matriz energética nacional) com destaque para a fonte hídrica que responde por 65,2 % da oferta interna (FGV, 2018). Porém, a necessidade de diversificar as fontes de energia promove incentivo à pesquisa e ao desenvolvimento de utilização de novas matrizes, buscando o melhor aproveitamento dos recursos naturais disponíveis.

O bagaço de cana de açúcar é uma destas alternativas que merece destaque, pois o país apresenta ampla disponibilidade desta matéria prima que é resultante da produção de açúcar e álcool. A expectativa da produção brasileira para a safra de 2018/2019 era de 615,84 milhões de toneladas de cana de açúcar, e 32,3 bilhões de litros de etanol, este último teve incremento de 18,6 % em relação à safra passada (CONAB, 2019). Aliado a isto, a cada tonelada de cana de açúcar processada são gerados 250 kg de bagaço com 50 % de umidade (Cerqueira et al. 2009), o que gera cerca de 172,43 milhões de toneladas de bagaço apenas nesta safra. Esta biomassa vem sendo utilizada para geração de energia através da queima em caldeira de alta pressão. Apesar dessa aplicação, cerca de 10 % a 15 % do bagaço são gerados como excedente de processo, não tendo destinação apropriada e tornando-se poluente (Oliveira, 2010). Portanto, pesquisadores e a indústria sucroalcooleira buscam dar uma finalidade mais nobre econômica e ambientalmente a este resíduo, como a produção de bioetanol ou etanol 2G.

Nesta biomassa lignocelulósica, predomina-se as macromoléculas celulose, hemicelulose e lignina, sendo a segunda responsável por 30 % (m/m) da composição do bagaço e rico em xilose (Rocha et al., 2011). Sabe-se que por meio de um pré-tratamento catalisado tanto de forma alcalina quanto ácida, seguido de hidrólise enzimática, converte-se a celulose em glicose e é possível realizar a fermentação alcoólica deste açúcar com leveduras convencionais (*Saccharomyces cerevisiae*). A hemicelulose, por sua vez, necessita de um pré-tratamento físico-químico para liberação das pentoses (xilose e arabinose) e ainda o uso de microrganismos capazes de fermentar xilose a etanol, pois *S. cerevisiae* não possui esta capacidade (Patiño et al., 2019). Neste sentido,

tanto leveduras não-convencionais quanto *S. cerevisiae* geneticamente modificadas para o consumo de xilose podem ser utilizadas.

Outro ponto importante para a fermentação da fração de hemiceluloses está no fato que durante o pré-tratamento da biomassa vegetal, em que há liberação de pentoses, ocorre também a formação e liberação de inibidores como hidroximetilfurfural (degradação da glicose), furfural (degradação da xilose), ácido acético (presente na estrutura da hemicelulose) e compostos fenólicos (oriundos da degradação parcial da lignina). Visando contornar este problema, uma alternativa é misturar xarope ou melaço de cana de açúcar (composto majoritariamente por sacarose) ao hidrolisado hemicelulósico, diluindo esses inibidores e estabelecendo, assim, uma integração entre primeira e segunda geração. Essa alternativa de integração, além de promover a melhora das condições de fermentação por diluir os inibidores presentes, também tem sido apontada como a alternativa mais viável economicamente, com maiores índices de produção e com etanol em menor custo a curto, médio e longo prazo (Vasconcelos, 2017; BNDES, 2013). Isso se justifica devido ao uso de instalações já estabelecidas e completação da capacidade ociosa da usina de E1G no período de entressafra.

Sendo assim, neste trabalho avaliamos o desempenho fermentativo das leveduras não-convencionais *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum* e das leveduras geneticamente modificadas *Saccharomyces cerevisiae* MP-C5 e MP-C5H1 em substratos que simulam os licores de pentoses obtidos do pré-tratamento ácido do bagaço da cana de açúcar e sua mistura com o açúcar de primeira geração (sacarose).

O estudo cinético de crescimento destas leveduras em diferentes substratos também foi realizado, visto que estabelecer protocolos de pré inóculo e inóculo são extremamente importantes para poder dimensionar processos de propagação, indicando qual a melhor metodologia para se obter o inóculo no menor tempo possível e que leve a maiores rendimentos e/ou produtividade no processo industrial. Parton & Willis (1990) apresentaram dados interessantes, mostrando que determinados autores conseguiram aumento de produção de um metabólito secundário quando utilizaram, por exemplo, um pré fermentador (acrescentando uma etapa de crescimento) para inocular o fermentador de produção, em vez de utilizar o inóculo proveniente de

cultivo em agitador rotativo. Também relatam que outros autores conseguiram produzir mais células num cultivo para obtenção de biomassa quando utilizaram, como inóculo do fermentador de produção, células na fase logarítmica de crescimento, em vez daquelas em estado de autólise, demonstrando a importância de conhecer o perfil e parâmetros cinéticos do microrganismo utilizado para estabelecer protocolos otimizados.

As fontes de carbono e nitrogênio são muito importantes no cultivo de microrganismos. Isso porque o modo de aplicação e seleção de fontes de carbono é um dos fatores críticos dos processos fermentativos, pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem causar intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas, além da redução na velocidade de crescimento de determinados microrganismos (Miguel, 2006). Nesse sentido, foram testadas nesse trabalho diferentes fontes de carbono, além de variações de proporção e concentração dos mesmos no meio afim de avaliar o impacto no crescimento e/ou fermentação das leveduras testadas.

Para estudar, comparar e selecionar as leveduras estudadas foram estabelecidas quatro etapas nesse estudo, com o intuito de avaliar desde as cinéticas de crescimento para obtenção do inóculos de fermentação, como avaliar também fermentações em frasco visando otimizar o meio utilizado e por fim trabalhar com a levedura de melhor desempenho em biorreator (tanto em meio sintético quanto com hidrolisado hemicelulósico e melaço). Isso porque sabe-se que a definição adequada do microrganismo, assim como do meio de cultura para este microrganismo durante seu escalonamento, são etapas fundamentais para o sucesso de um processo fermentativo (Schimidell, 2001).

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produção de etanol de primeira geração

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. O etanol de primeira geração (E1G) é obtido de matérias primas sacarinas, como a cana de açúcar no Brasil, ou amiláceas, como o milho nos Estados Unidos e Brasil (Machado, 2013; CONAB, 2019).

O processo de produção de E1G a partir de cana de açúcar no Brasil compreende as etapas de recebimento e limpeza da cana, extração do caldo nas moendas ou difusores, clarificação e concentração do caldo (evaporação para a concentração de 12 °Brix até 20 °Brix) para posterior fermentação a etanol (Figura 1). Existem três principais tipos de instalações industriais produtoras de açúcar e/ou etanol a partir de cana de açúcar: usina produtoras de açúcar, destilarias autônomas com produção apenas de etanol e usinas integradas (anexas) com a produção conjunta de açúcar e etanol (Alcarde, 2007). Para produção do açúcar o caldo passa por um cozimento (até atingir cerca de 60-80 °Brix) e cristalização. Na produção do álcool, existirá a mistura do melaço com parte do caldo, dando origem ao mosto. Este é destinado para reatores onde ocorrerá fermentação a partir de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e, por fim, a destilação para a obtenção do etanol.

As usinas brasileiras utilizam um processo de fermentação conhecido como *Melle-Boinot* adaptado, que consiste em fermentação em batelada alimentada do mosto de cana de açúcar por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em alta concentração celular (20–40 g L⁻¹) (Amorim et al., 2011; Basso et al., 2011; Lopes et al., 2016). Após o fim de cada fermentação, emprega-se o processo de centrifugação para separar as células de levedura (creme) do vinho, este último é submetido à destilação para separação do produto final. O creme de leveduras é destinado a um tratamento com ácido sulfúrico diluído em água (pH 2,0-2,5 por 30 min), e então um novo ciclo de fermentação é iniciado com o retorno da biomassa celular às dornas, que recebem novamente a alimentação de mosto de cana de açúcar (Boinot & Melle, 1936; Alcarde, 2007). Este processo é utilizado em 80 % das destilarias

nacionais e é possível executar 2 ciclos por dia em 250 dias de operação em que 90 % das leveduras são reutilizadas com viabilidade entre 90–80% (Godoy et al., 2008).

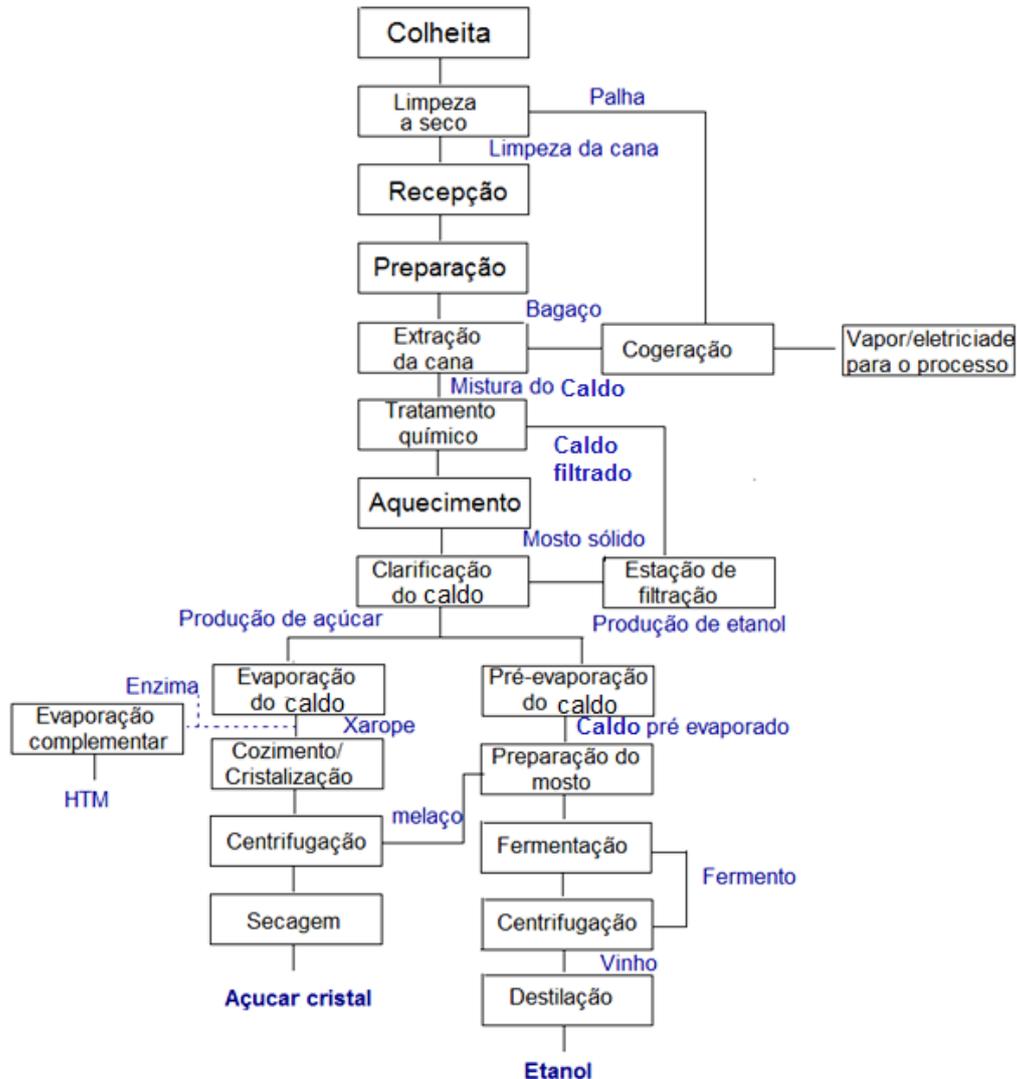


Figura 1: Processo de produção de etanol em uma usina integrada ou anexa. Fonte: adaptado de UDOP (2018).

Os principais resíduos produzidos na usina de açúcar e etanol são o bagaço de cana (resíduo da moagem), o qual pode ser usado na queima de caldeiras; o melaço (no processo de obtenção do açúcar), o qual pode ser designado para o mosto de fermentação do álcool ou utilizado em outros processos; e a vinhaça, que é resíduo da centrifugação pós-fermentação para obtenção o álcool.

Segundo Melo (2003) o melaço de cana de açúcar é um resíduo do processo de fabricação do açúcar, o qual tem sido usado como componente na alimentação animal e também utilizado com grande frequência como fonte de carbono na indústria de fermentações. O melaço é composto por (% m/m), açúcares redutores totais (54 ± 4), óxido de fósforo ($0,039 \pm 0,030$), óxido de cálcio ($0,475 \pm 0,325$), óxido de magnésio ($0,525 \pm 0,275$), óxido de potássio ($1,5 \pm 0,7$), dióxido de silício ($0,175 \pm 0,125$), óxido de alumínio ($0,025 \pm 0,015$), Fe_2O_2 ($0,0055 \pm 0,0045$), cinzas ($5,5 \pm 2$), nitrogênio ($0,29 \pm 0,21$), soma dos ácidos cítrico, málico, succínico e mesacônico ($1,8 \pm 0,7$) e ácido aconítico ($3,5 \pm 2,5$) (Soukoulis; Tzia, 2018). O melaço contém em média 90 °Brix (SILVA, 2008). Essa composição rica em nutrientes faz do melaço um ótimo substrato para crescimento e fermentação de leveduras e outros microrganismos.

A Figura 2 mostra os dados de produção de etanol (anidro e hidratado) no Brasil de 2012 a 2019. É possível verificar a diferença de produção nos meses de safra e entre as safras, sendo que para o período de dezembro a março é verificada uma produção bem abaixo da média de produção anual. Uma das alternativas propostas para suprir o período de entre safra é a produção do etanol a partir do bagaço e palha de cana, gerados como resíduo no processo 1G, o que será abordado nos próximos itens dessa revisão. É válido citar que o etanol de milho também vem ganhando importância e relevância em produção no Brasil, sendo também uma alternativa já utilizada em usinas *flex* para contornar o problema da entressafra de cana. Contudo, o uso dessas culturas agrícolas para a produção de etanol compete com a produção de alimentos, e nesse sentido cresce a demanda por tecnologias que permitam a produção de etanol a partir de plantas não alimentares e biomassa lignocelulósica como, por exemplo, resíduos agrícolas, palha e lascas de madeira (HOU, 2012).

Além do desafio da baixa produção destacada na entressafra, existe uma demanda crescente de consumo de etanol que precisa ser suprida no país. Como demonstrado na Figura 3, a demanda de etanol é superior à produção nacional e já ultrapassa a demanda por gasolina. Esses números tendem a aumentar ainda mais, segundo especialistas, devido às políticas de incentivo à produção de bioetanol como o RenovaBio que entrou em vigor em dezembro de 2019 (Lorenzi & Andrade, 2019).

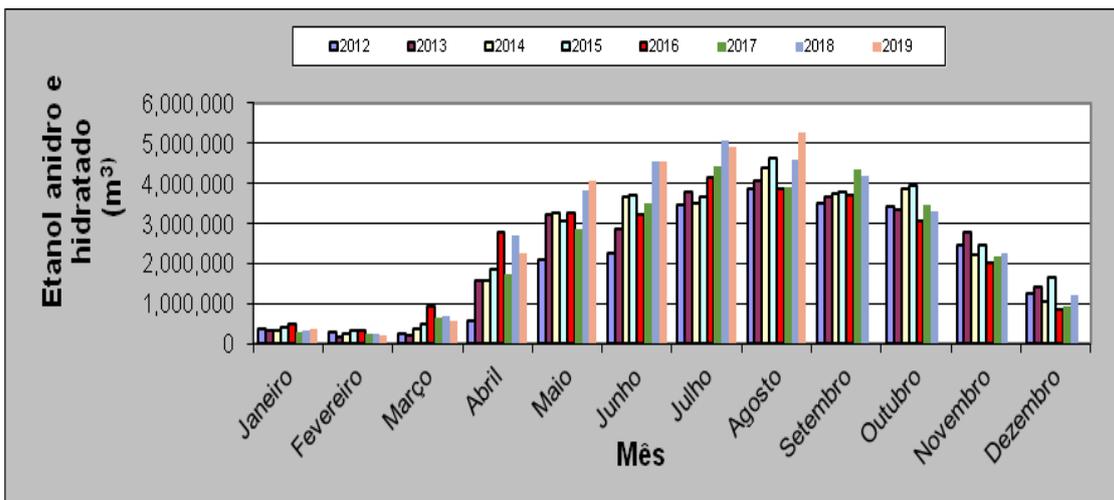


Figura 2: Dados de produção mensal de etanol no Brasil de 2012 a agosto de 2019.
Fonte: ANP (2019)



Figura 3: Comparação entre as demandas de etanol e gasolina em 2018 no Brasil.
Fonte: ANP (2018).

Somando a crescente demanda com a necessidade de produzir combustíveis de forma sustentável, a produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica se apresenta como a principal saída para aumento de produtividade sem que se aumente a área plantada. Salientando as questões ambientais, segundo o último relatório especial do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), o uso da terra também é criticamente

importante, tanto como fonte de emissões de gases de efeito estufa, quanto como parte da solução para as mudanças climáticas. De fato, o relatório constatou que, uma vez que o solo sequestra quase um terço de todas as emissões de dióxido de carbono causadas pelo homem, será impossível limitar a elevação da temperatura a níveis seguros sem alterar fundamentalmente a forma como o mundo produz e administra o uso da terra (IPCC, 2019).

2.2. Produção de etanol de segunda geração

Como citado anteriormente, os processos de produção de etanol de segunda geração utilizam os açúcares contidos na estrutura lignocelulósica das plantas. Isso cria a oportunidade de usar fontes como resíduos agrícolas, cortes florestais e outros resíduos sólidos, para produção de etanol. A estrutura lignocelulósica é formada por macromoléculas que podem conter até 80 % (m/m) de açúcares (principalmente presentes na hemicelulose e celulose), além da lignina. Por ser uma estrutura recalcitrante e naturalmente resistente à hidrólise, os processos propostos de etanol lignocelulósico tendem a ser mais complicados do que os processos à base de amido ou açúcar, sendo constituído por basicamente três etapas: pré tratamento, hidrólise e fermentação.

As tentativas de se produzir E2G no país até o momento partem da GranBio, da Raízen e do CTC (Centro de Tecnologia Canavieira). Somadas, essas empresas possuem plantas com uma capacidade instalada de 125 milhões de litros de E2G por ano, o que torna o Brasil o quarto país do mundo em capacidade instalada de segunda geração, atrás somente dos Estados Unidos, China e Canadá. Entretanto, apenas uma pequena fração (cerca de 10% ou menos) desse potencial anual foi produzida até agora, e o maior problema para a operação dessas plantas ainda são dificuldades na etapa de pré-tratamento (Lorenzi & Andrade, 2019).

Os próximos itens desta revisão abordarão sobre a estrutura de um material lignocelulósico, em especial a cana de açúcar, e as etapas que integram o processo de produção do E2G.

2.2.1. Bagaço de cana de açúcar como potencial biomassa lignocelulósica para a produção de E2G

Como consequência da grande produção brasileira de etanol de primeira geração, tem-se a crescente produção de resíduos do setor. Segundo a União da Indústria de Cana de açúcar (UNICA, 2012), cada tonelada de cana moída para a fabricação de açúcar e etanol gera, em média em base úmida, 250 kg de bagaço e 200 kg de palha. Segundo os dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2019), a produção de cana de açúcar, estimada para a safra 2019/2020, é de 622,3 milhões de toneladas, um acréscimo de 0,3 % em relação à safra anterior, o que equivale à geração de aproximadamente 155 milhões de toneladas de bagaço e 124 milhões de toneladas de palha.

Atualmente, a maior parte do bagaço de cana de açúcar é usada como fonte energética em substituição à queima do óleo para geração de energia elétrica, o que resulta na autossuficiência energética das usinas além de representar uma alternativa com menor impacto ambiental (CONAB, 2011). Ainda assim, existe um excedente de cerca de 10 a 15 % desse material (Oliveira, 2010) o que resulta em problemas de estocagem e poluição ambiental. Diversos autores descrevem pesquisas na busca por produtos obtidos a partir de bagaço de cana com o intuito de aumentar o rendimento econômico da indústria.

O bagaço de cana apresenta significativa heterogeneidade morfológica e consiste em feixes de fibras e outros elementos estruturais. Em relação à sua composição, apresenta de 19-24 % de lignina, 27-32 % de hemicelulose, 32-44 % de celulose e 4,5-9,0 % de cinzas. A celulose e a hemicelulose correspondem às frações de polissacarídeos que podem ser extraídas, fermentadas e transformadas em etanol, dando origem ao etanol 2G (Cardona et al., 2010). A lignina, constituinte em menor porcentagem na estrutura do bagaço de cana, é um polímero complexo, cuja natureza hidrofóbica e as fortes ligações químicas com a celulose e a com a hemicelulose fazem com que ela desempenhe um papel de proteção na estrutura da biomassa contra o ataque de microrganismos. É constituída por unidades básicas de 3-5-dimetoxi-4-hidroxi-fenilpropano, 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano e 4-hidroxi-fenilpropano (Fengel e Wegener, 1989). A celulose, por sua vez, é o maior componente da

biomassa lignocelulósica e consiste em um polímero longo e linear formado por monômeros de glicose, unidas por ligações glicosídicas β -1,4 (Zhang et al., 2012). A hemicelulose, o segundo maior componente dessa biomassa, é um polímero heterogêneo e muito ramificado, formado pelas pentoses xilose e arabinose, e pelas hexoses manose, glicose e galactose. Esse heteropolímero geralmente é classificado de acordo com o carboidrato mais abundante em sua cadeia principal, sendo que o mais encontrado em gramíneas como a cana de açúcar é a xilana, um polissacarídeo formado por unidades de xiloses unidas por ligações glicosídicas β -1,4, sendo a xilose, portanto, a pentose predominante na biomassa lignocelulósica em questão (Gírio et al., 2010). O conteúdo de açúcares gerados após a hidrólise deste material compreende uma substancial porção para a produção de E2G. Como resultado, muitos pesquisadores têm focado em desenvolver e identificar microrganismos capazes de fermentar as pentoses (xilose e arabinose) a bioetanol.

2.2.2. Etapas do processo E2G

Para que os açúcares da biomassa estejam disponíveis para a assimilação dos micro-organismos, são necessários dois principais processos. O primeiro é a desestruturação da estrutura lignocelulósica, chamado de pré-tratamento, sendo esta etapa usada principalmente para abrir a estrutura das fibras e aumentar sua acessibilidade às enzimas. Dependendo do método usado, alguns açúcares também podem ser solubilizados nesta fase (como é o caso da hemicelulose em tratamentos ácidos). Vários métodos e tecnologias diferentes de pré-tratamento, a maioria dos quais físico-químicos, foram propostos e extensivamente revisados. A segunda etapa é a de hidrólise enzimática, onde uma mistura complexa de enzimas celulolíticas é adicionada à biomassa pré-tratada para converter a celulose e hemicelulose em monômeros, sendo eles a glicose e a xilose, em maior quantidade, respectivamente. Por fim, têm-se a fermentação dos açúcares em etanol e destilação (Lima, 2019).

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica representa grande parte dos custos e gargalos ainda existentes na tecnologia de produção de etanol 2G, representando, pelo menos, 20 % dos custos de produção total do

combustível (Yang; Wyman, 2008). A finalidade dessa etapa do processo é solubilizar e/ou modificar, de forma eficiente, os principais componentes da biomassa (celulose, hemiceluloses e lignina), promovendo a recuperação das frações solubilizadas e favorecendo a digestibilidade da biomassa durante a etapa subsequente do processo, a hidrólise enzimática.

Vários processos têm sido descritos na literatura, sendo eles métodos físicos (cominuição mecânica, radiação e extrusão), físico-químicos (explosão a vapor catalisada com ácido sulfúrico diluído e pré-tratamento alcalino), biológicos (fungos e enzimas) ou ainda uma combinação desses métodos para uma maior eficiência de degradação da biomassa lignocelulósica. Porém, destaca-se o processo de explosão a vapor catalisada com ácido sulfúrico diluído (usado pelas usinas GranBio e Raízen) e o pré-tratamento alcalino (usado atualmente nas indústrias de papel e celulose) que tem sido amplamente estudados (Lorenzi & Andrade, 2019; Lima, 2019).

Durante o pré tratamento, são liberados subprodutos indesejados, como aldeídos furânicos, ácidos fracos e compostos fenólicos, que são tóxicos para as células, influenciando assim a produção de etanol. A partir da desidratação das hexoses é gerado o 5-hidroximetilfurfural (HMF) (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida et al., 2007). Da desidratação das pentoses, presentes na hemicelulose, o principal subproduto é o furfural (Palmqvist e Hahn-Hägerdal, 2000), este com particularidades indesejáveis devido a sua abundância e efeito tóxico (Heer & Sauer, 2008). Os ácidos acético e fórmico são gerados, respectivamente, a partir da desacetilação da hemicelulose e da degradação do furfural e HMF (Figura 4).

Zanella (2018) comprovou a influência desses inibidores no crescimento e fermentação da linhagem industrial *S. cerevisiae* PE-2, além de algumas recombinantes isogênicas a esta levedura, e também espécies nativas isoladas em diferentes biomas brasileiros dos gêneros *Scheffersomyces*, *Candida*, *Spathaspora* e *Kluyveromyces*. Soares (2018) avaliou e comprovou o efeito inibitório dos inibidores HMF, furfural e ácido acético sobre as leveduras *Sp. passalidarum* e *Sc. stipitis*.

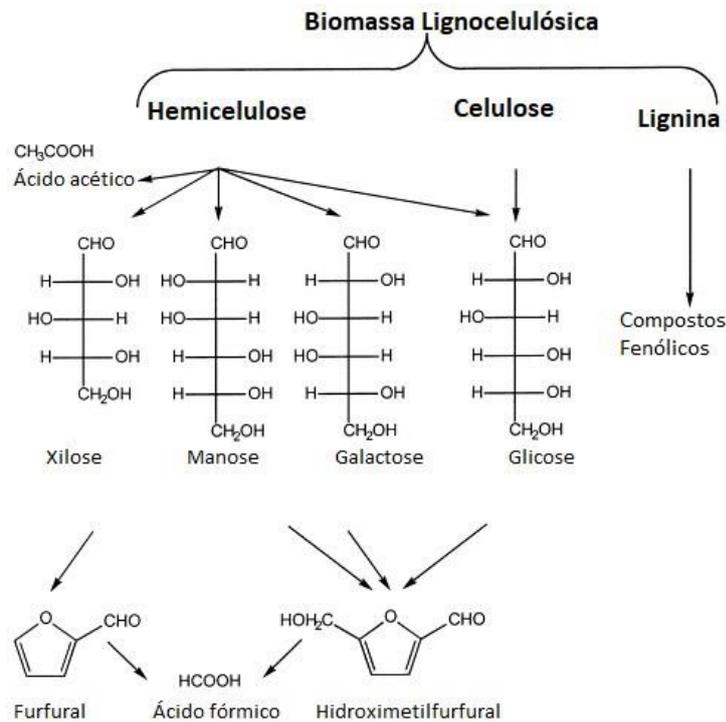


Figura 4: Formação de compostos inibitórios durante o processo de pré-tratamento.
 Fonte: adaptado de Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

Diferentes modos de operação para a produção de E2G têm sido estudados nos últimos anos. Dentre estes se destacam: i) inversão da xilose por meio de xilose isomerase anterior a fermentação; ii) BPC - bioprocessamento consolidado; iii) HSF – hidrólise e fermentação separada (*SHF separated hydrolysis and fermentation*); iv) SFS – sacarificação e fermentação simultâneas (*SSF simultaneous saccharification and fermentation*); e em alguns casos a etapa de fermentação poderá ser integrada à primeira geração (Devarapalli; Atiyeh, 2007).

Pode-se fazer a separação das correntes sólido/líquido após a etapa de pré-tratamento, conhecido como separação de corrente ou, então, a opção da não separação das correntes após a etapa de pré-tratamento, conhecido como lama. Na divisão de corrente (Figura 5) observa-se a separação das correntes líquidas e sólidas, as quais poderão ser hidrolisadas e fermentadas, sendo que a fermentação poderá ocorrer separadamente para as frações de pentose e hexose, utilizando-se diferentes microrganismos, ou então, co-fermentadas com um único microrganismo capaz de consumir estes açúcares. Dependendo do pré-tratamento empregado, a fração de hemiceluloses poderá ser completamente desdobrada a xilose (por exemplo, pré-tratamento catalisado

por ácido diluído) ou poderá ser destinada a hidrólise enzimática ou química de xilo-oligômeros (para o caso de um pré-tratamento hidrotérmico, por exemplo). Existe ainda a possibilidade de se operar somente com a corrente de 2G (denominada usina autônoma) ou integrada com E1G (denominada usina integrada) (Lima, 2019).

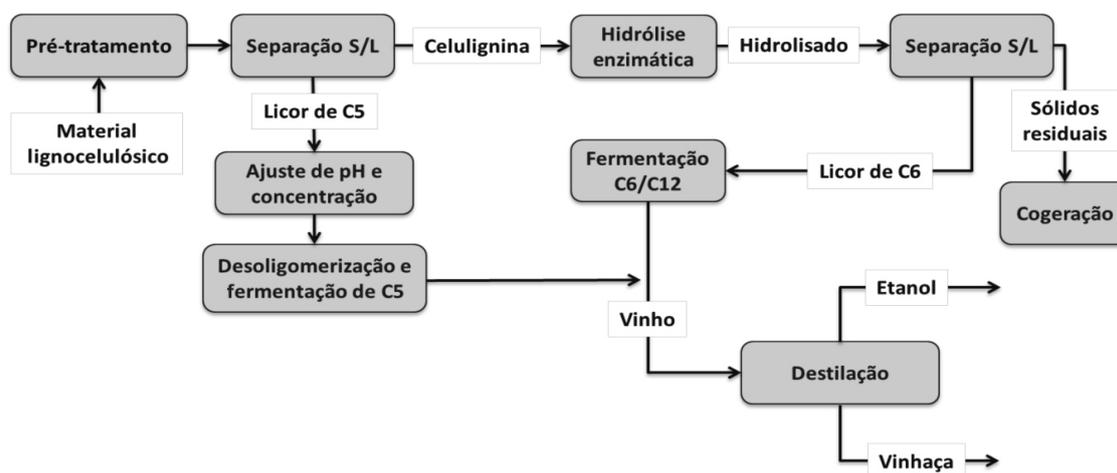


Figura 5: Fluxograma do processo com separação de correntes para produção de etanol 2G. Onde C5 equivale a fração de pentoses (xilose e arabinose), C6 de hexose (glicose) e C12 sacarose. Fonte: BNDES (2013).

2.3. Integração 1G e 2G

Diversos trabalhos de projeção de cenários envolvendo a produção de etanol de segunda geração vem sendo reportados nos últimos anos, como o de Vasconcelos (2017), que analisou a viabilidade técnica e econômica de 12 cenários de biorrefinarias de produção integrada de etanol 1G e 2G empregando pré tratamento com ácido sulfúrico diluído; e o relatório do BNDES (2013) que analisa 14 cenários mais abrangentes com diferentes estratégias de produção. Por se tratar de um processo de produção em desenvolvimento, através do *software* de Biorrefinaria Virtual de Cana (BVC), que simulam investimentos e custos de produção de instalações, são projetados diversos cenários de análise. Podem ser analisados pontos como instalação de usinas que integram processo de produção 1G e 2G ou não, estratégia de produção empregada (com separação ou não de correntes), utilização ou não da fração de pentoses gerada pela hidrólise da hemicelulose, proporção de massa de

bagaço e líquido nas etapas de pré tratamento, tempo de análise do cenário, seja a curto (2016-2020), médio (2021-2025) ou longo prazo (2026-2030).

Os dados apresentados nas projeções (Figura 6) mostram que integrando a produção 1G e 2G têm-se a maximização da produção de etanol, que poderia chegar ao patamar de um bilhão de litros em cada planta. A produção de etanol integrada é superior nos cenários de curto (1, 4 e 7), médio (2, 5 e 8) ou longo prazo (3, 6 e 9).

Os dados obtidos por Vasconcelos (2017) confirmam o cenário de produção integrada como melhor opção em termos de viabilidade econômica do processo. A Figura 7 apresenta o gráfico com o custo de produção de etanol (em R\$/L), e observa-se que em todos os cenários projetados no estudo o custo é consideravelmente menor na produção integrada.

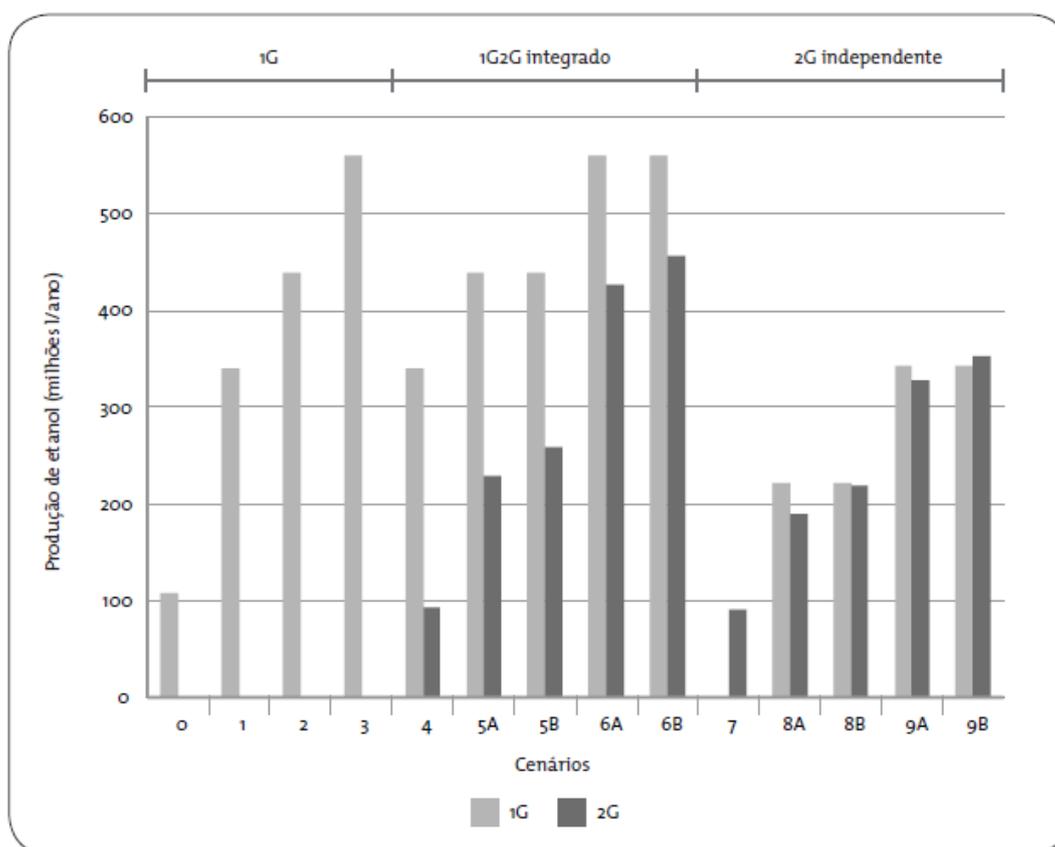


Figura 6: Produção de etanol em milhões de litros/ano em diversos cenários avaliados. Onde o 'Cenário 0' representa a média atual do setor (planta 1G anexa com tecnologia básica e sem integração energética). A Rota A refere-se a um processo de produção de E2G com fermentação separada de C5 (açúcares com cinco carbonos, xilose). A Rota B refere-se a um processo com co-fermentação dos açúcares C5 e C6 (açúcares com seis carbonos, glicose). Fonte: BNDS, 2013.

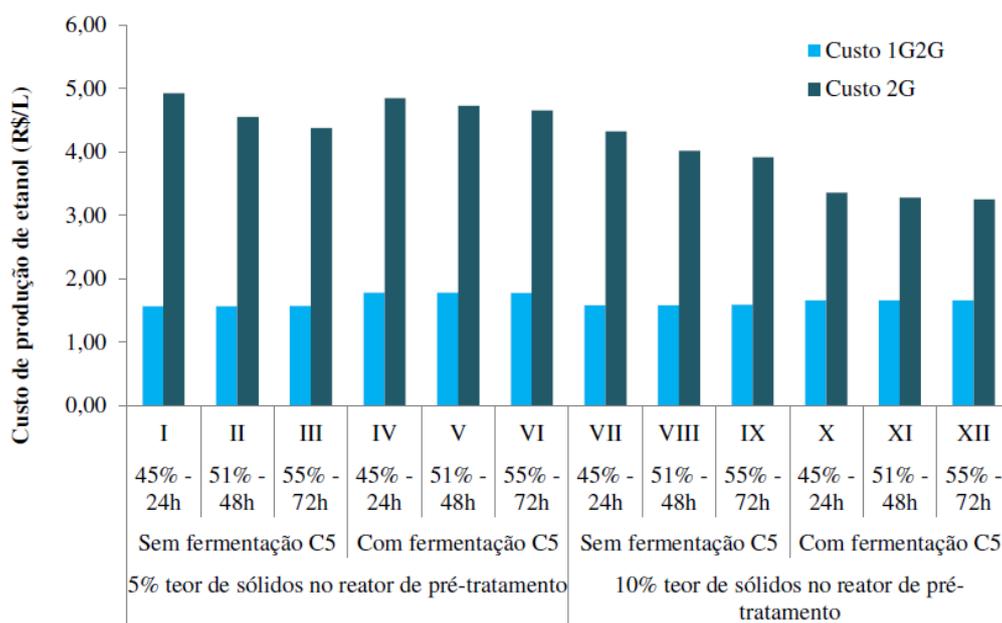


Figura 7: Custo total de produção de etanol 1G2G e 2G em diversos cenários (Vasconcelos, 2017)

Além dos dados de projeções, experiências já bem e mal sucedidas na tentativa de produção do etanol a partir de biomassa no país, comprovam a viabilidade de usinas com processo integrado. A empresa GranBio instalou uma usina *stand-alone*, ou seja, não integrada a uma usina 1G, localizada no estado de Alagoas, no nordeste do país, onde palha da cana de açúcar era usada para produzir etanol de segunda geração. A planta foi a primeira desse tipo construída no hemisfério sul. O Bioflex 1 entrou em operação em setembro de 2014, mas foi interrompido em 2016 depois que as complicações no pré-tratamento forçaram o desligamento. Já a empresa Raízen, instalada em Piracicaba/SP, possui uma usina integrada e em operação, chegando a 165 milhões de litros de etanol 2G em 2019 (Jornal da Cana, 2019; Raízen, 2019).

Além dos aspectos econômicos, a proposta de integração também é utilizada como estratégia de processo para reduzir a influência de inibidores presentes nos hidrolisados, adicionando-se xarope ou melaço provenientes da produção 1G, diluindo assim os inibidores e melhorando a fermentação do hidrolisado. Andrade (2013) e Rabelo (2010) utilizaram essa estratégia para fermentar hidrolisados de cana de açúcar (adicionando melaço) obtendo melhores resultados de fermentação.

2.4. Consumo de xilose para a produção de etanol por diferentes microrganismos

2.4.1. Vias metabólicas e transporte

A xilose é um monossacarídeo formado por cinco carbonos (pentose), sendo um dos principais constituintes da hemicelulose, como citado no item 2.2.1 desta revisão. Alguns fungos, leveduras e bactérias possuem a capacidade de utilizar este açúcar como fonte de carbono, o que se deve a um conjunto de reações mediadas por enzimas específicas. Na via metabólica encontrada principalmente em bactérias e fungos anaeróbios (Figura 8), a xilose é convertida diretamente em xilulose pela enzima xilose isomerase (XI). Após a formação da xilulose, esse monossacarídeo é substrato da enzima xilulocinase (XK), que fosforila a xilulose em xilulose-5-fosfato com o consumo de uma molécula de ATP. A xilulose-5-fosfato segue, então, pela Via das Pentoses-Fosfato onde pode ser direcionada para a formação do etanol.

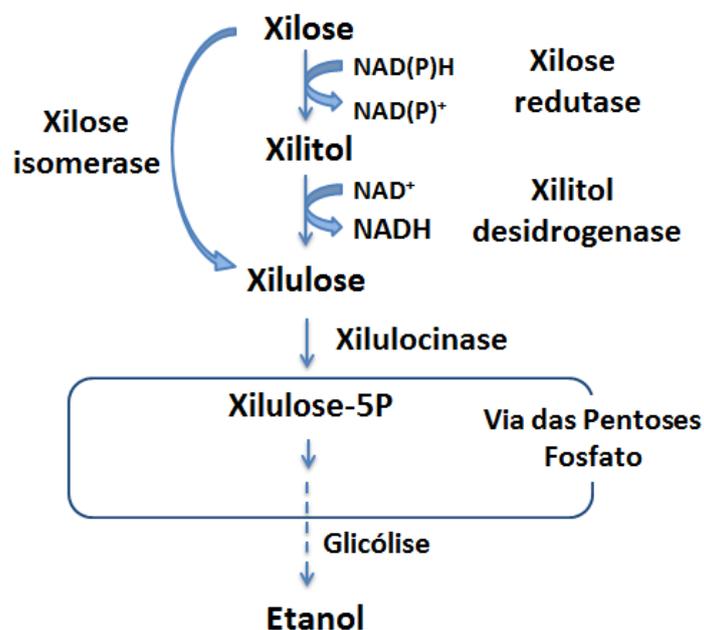


Figura 8: Vias de produção de etanol a partir de xilose. Via XR-XDH (xilose redutase e xilitol desidrogenase), encontrada em leveduras e fungos filamentosos. Via XI (xilose isomerase), encontrada principalmente em bactérias. Fonte: adaptado de Kuhad et al (2011).

As leveduras e fungos também assimilam a xilose por um mecanismo de duas etapas (Figura 8), primeiro reduzindo o açúcar ao xilitol e depois re-

oxidando-o à xilulose, que é posteriormente metabolizada através da via de pentose-fosfato (não oxidativa). Na maioria destes microrganismos, a redução da xilose é realizada por uma xilose redutase (XR) dependente de NADPH, enquanto a oxidação do xilitol em xilulose, realizada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), requer NAD^+ . Essa dependência em diferentes co-substratos gera um desequilíbrio redox, pela falta da reciclagem do NAD^+ , o que acaba por interromper a metabolização de xilose, ocasionando um acúmulo de xilitol. Esse desequilíbrio é mais afetado em anaerobiose, uma vez que, enquanto o NADPH pode ser produzido na Via das Pentoses-Fosfato, o NADH não pode ser reoxidado na ausência de oxigênio (Hahn Hångerdal et al., 1994). Quando há oxigênio disponível, o NADH pode ser reoxidado pela cadeia transportadora de elétrons (Jeffries, 2006). Neste sentido, a fermentação de xilose em condições limitadas de oxigênio pode melhorar o fluxo metabólico dessa pentose. Contudo, essa condição específica de oxigenação é difícil de ser obtida em ambientes fermentativos industriais, sobretudo na fermentação de hidrolisados lignocelulósicos (Jeffries, 2006). Uma alternativa interessante é a busca por xilose redutases com afinidade por ambos os cofatores (NADH e NADPH) ou com afinidade maior pelo NADH, o que poderia evitar ou diminuir o desbalanço de cofatores (Hahn Hångerdal et al. 1994; Jeffries, 2006). A levedura *Spathaspora passalidarum*, apresenta uma xilose redutase com preferência pelo cofator NADH (HOU et al., 2012), o que torna essa levedura de grande interesse para ter seus genes expressos em *S. cerevisiae* (Cadete et al., 2016).

Além das enzimas envolvidas no processo de metabolização de xilose, outro aspecto também relevante é o transporte dessa pentose para o interior da célula onde as reações de oxirredução irão acontecer. Algumas leveduras que possuem a capacidade de metabolizar esse açúcar exibem sistemas de transporte de alta e baixa afinidade para a captação dessa pentose, que compreendem difusão facilitada e simporte com H^+ (Stambuk et al., 2003; Leandro et al, 2009). Devido a isso, muitos pesquisadores têm trabalhado na identificação de transportadores de açúcares dessas leveduras e analisado suas propriedades de transporte de xilose, visando à expressão em células de *S. cerevisiae* recombinantes capazes de fermentar esse açúcar. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Sales et al. (2015) que expressaram

genes que codificam transportadores de *Sc. stipitis* em uma linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* já modificada e com expressão das enzimas envolvidas na metabolização de xilose (XR, XDH, XK), obtendo maior produção de etanol em fermentações em alta densidade celular utilizando xilose e co-fermentando xilose e glicose através da expressão do transportador *XUT1* de *Sc. stipitis*.

2.4.2. Leveduras geneticamente modificadas para o consumo de xilose

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é o hospedeiro mais utilizado para a construção de leveduras geneticamente modificadas para o consumo de xilose por apresentar elevados títulos e rendimentos em etanol, alta tolerância a concentração de etanol no meio (maiores que 14 % (v/v)) e também a açúcares (acima de 15 % (v/v)). Trata-se de uma levedura *Crabtree* positiva, ou seja, que na presença de oxigênio e elevadas concentrações de açúcares produz etanol, e que além disso é robusta em processos de larga escala e na competição contra inibidores e contaminantes do processo (Van Zhyl et al., 2007; Stambuk, 2019). Vários trabalhos de modificações genéticas são reportados com o objetivo de promover o consumo de xilose pela levedura desde 1993, quando dois pesquisadores independentes demonstraram que a introdução dos genes *XYL1* e *XYL2* (que codificam, respectivamente, XR e XDH) de *Sc. stipitis* em *S. cerevisiae* permitem esta última utilizar xilose como fonte de carbono (Kötter; Ciriacy, 1993; Tantirungkij et al., 1993).

A via alternativa de fermentação da xilose, na qual a xilose é convertida diretamente em xilulose pela enzima xilose isomerase (XI) (vide Figura 8), possui a vantagem de não requerer cofatores em suas reações. Contudo, em muitos casos, quando os genes que codificam xilose isomerases foram expressos em *S. cerevisiae*, não houve atividade das proteínas heterólogas resultantes (Ho et al., 1983; Amore et al, 1989; Moes et al, 1996; Gárdonyi; Hahn-Hagerdal, 2003).

Até o momento da finalização deste trabalho não foram encontrados artigos na literatura mostrando o potencial de uso de leveduras recombinantes para consumo de xilose e produção de etanol em biorreatores e processos que mimetizem o que ocorre em escala industrial. Porém, ressalta-se que existem diversas cepas desenvolvidas com patentes depositadas. Schultz et al (2011)

fez um monitoramento em base de dados para prospectar tecnologias relacionadas a processos de fermentação para obtenção de E2G. Na Base *Derwent Innovation Index* foram obtidos 187 documentos de patente, para o período de 2007-2011. Os dados mostram que os principais países foco de depósito dos pedidos foram EUA (91 documentos) e China (69). Os autores mostraram que as principais palavras encontradas no item “foco tecnológico” dos documentos de patente foram etanol, xilose, glicose, leveduras e fermentação, mostrando ainda que a principal levedura utilizada nas tecnologias desenvolvidas é a *Saccharomyces cerevisiae*. No Brasil, encontrava-se uma patente depositada até 2011 (Schultz et al, 2011) e recentemente mais três relativas ao desenvolvimento de micro-organismos e fermentação, depositadas pelo o Laboratório Nacional de Biorrenováveis (Lorenzi & Andrade, 2019).

A comercialização de organismos geneticamente modificados no Brasil é regulamentada pela Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005) e pelas normas da CTNBio (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança). Existem atualmente seis cepas de *S. cerevisiae* recombinantes liberadas para uso industrial no Brasil (expostas na Tabela 1) das quais três foram modificadas para aplicação na produção de etanol. De todas as cepas, a única cuja modificação está exposta no relatório de aprovação em consulta pública é a linhagem RN1016 (*Saccharomyces cerevisiae*) da empresa Biocelere Agroindustrial LTDA. As modificações feitas foram a introdução do gene codificador da xilose isomerase (XylA), oriundo do fungo não patogênico *Piromyces sp.*, o aumento da expressão dos genes naturais de levedura da via das pentoses-fosfato (XKS1, TAL1, TKL1, RPE1 e RKI1), e a deleção do gene GRE3 que codifica uma aldeído redutase capaz de transformar xilose em xilitol, um conhecido inibidor da XI.

Tabela 1. Microrganismos geneticamente modificados e derivados aprovados comercialmente no Brasil para uso industrial.

Produto	Características	Instituição
Y1979	Liberação comercial de <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada para produção de farneseno	Amyris do Brasil
Y5056	Liberação comercial de <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada para produção de farneseno	Amyris do Brasil
S2014	Liberação comercial de <i>Prototheca moriformis</i> para a produção de triglicerídeos e bioprodutos	Solazyme Brasil Óleos Renováveis e Bioprodutos Ltda
RN1016	Liberação comercial de <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada para produção de etanol	Bio Celere Agroindustrial Ltda
S5223	Liberação comercial de derivado do microrganismo <i>P. moriformis</i>	Solazyme Brasil Ltda
Celere-2L	Liberação comercial de micro-organismo geneticamente modificado e seus derivados da classe de risco biológico I	Bio Celere Agroindustrial Ltda
S5223	Liberação comercial de <i>P. moriformis</i> para a produção de triglicerídeos e bioproduto	Solazyme Brasil Ltda
S6697	Liberação comercial para produção de triglicerídeos e bioprodutos comercialização com microrganismo <i>P. moriformis</i>	Solazyme Brasil Ltda
Derivado	Liberação comercial para importação de protease alcalina	Du Pont Brasil
S8695	Liberação comercial do microrganismo <i>P. moriformis</i> ,	Solazyme Brasil Ltda
M10682	Liberação comercial de levedura <i>S. cerevisiae</i>	Lallemand Brasil Ltda
S8885	Liberação comercial do microrganismo <i>P. moriformis</i> ,	Solazyme Brasil Ltda
S1260	Liberação comercial de <i>S. cerevisiae</i> para produção de etanol	Novozymes Latin America Ltda
GICC03299	Liberação comercial de derivado de OGM α -amilase	Du Pont do Brasil
α -glucosidase	Liberação comercial de derivado de OGM (α -glucosidase)	Du Pont do Brasil
Hemicelulase	Liberação comercial de derivado de OGM- hemicelulase	Du Pont do Brasil
Y22021	Liberação comercial de <i>S. cerevisiae</i> geneticamente modificada e seus derivados	Amyris do Brasil
<i>B. licheniformis</i>	Liberação comercial de α -amilase de <i>Cytophaga</i> sp expressa em <i>Bacillus licheniformis</i>	Du Pont do Brasil
α -amilase	Liberação comercial de derivado de OGM: α -amilase (GICC03469)	Danisco
DM24.60	Bactéria <i>Corynebacterium glutamicum</i> geneticamente modificado e seu derivado para uso em fermentação industrial e seu derivado para alimentação animal como aditivo em ração	Evonik Degussa do Brasil
SCY011	Levedura <i>S. cerevisiae</i> para emprego na produção comercial de etanol	Novozymes Latin America Ltda

Fonte: CTNBio, 2019.

Os resultados mais relevantes foram demonstrados por Li et al (2016), em um cultivo contínuo de 333 dias, onde a levedura foi exposta a diferentes concentrações de xilose e glicose no meio de alimentação e na última semana de cultivo obteve-se um consumo de xilose de $6,62 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com meio de alimentação contendo 75 g L^{-1} de xilose. O fator de conversão de substrato em etanol foi de $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e produção de etanol de $2,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. A levedura utilizada nessa trabalho era uma linhagem industrial floculante (KF-7) de *Saccharomyces cerevisiae* com genes XYL1 (XR), XYL2 (XDH) de *Sc. stipitis*, XKS1 de *S. cerevisiae*, BG L1 (β -glucosidase) de *Aspergillus aculeatus*, e GXS1 (glicose/xilose simporter 1) de *Candida intermedia*, e o transportador HXT7 endógeno super expresso.

Entre os trabalhos utilizados para compor esta revisão de literatura observou-se que o trabalho de Cadete et al (2016) apresentou o maior fator de conversão de substrato em etanol ($0,40 \text{ g g}^{-1}$) para uma *S. cerevisiae* recombinante. A levedura devolvida neste trabalho possuía genes para a expressão das enzimas XR/XDH de *Sp. passalidarum* e as fermentações foram realizadas em modo batelada com meio contendo somente xilose.

2.4.3. Leveduras não convencionais para o consumo de xilose

Enquanto numerosos microrganismos são conhecidos pela capacidade de metabolizar hexoses em etanol (o que compreende a utilização da fração celulósica da biomassa), existe uma real necessidade da busca de microrganismos capazes de metabolizar xilose a etanol, com elevados rendimentos e títulos. Sabe-se que *S. cerevisiae* (utilizada na produção de etanol 1G) são naturalmente incapazes de fermentar a xilose devido a uma deficiência das suas enzimas envolvidas na metabolização dessa pentose (Patiño et al., 2019). Em contrapartida, existem outros organismos capazes de utilizar a xilose como fonte de carbono, entre bactérias, leveduras e fungos filamentosos. Leveduras capazes de metabolizar a xilose já foram documentadas entre os gêneros *Candida*, *Pachysolen*, *Debaryomyces*, *Scheffersomyces*, *Spathaspora*, entre outros (Kutzman & Fell, 1998; Jeffries, 1981; Nguyen, 2006; Schineider et al, 1981).

As leveduras do gênero *Spathaspora* têm a capacidade de converter xilose em etanol e/ou xilitol. Esta é uma característica importante, pois essas

leveduras podem ser usadas para produzir bioetanol da biomassa lignocelulósica ou como fonte de novos genes do metabolismo da xilose para estirpes industriais de *S. cerevisiae*. O grupo principal do gênero *Spathaspora* possui 22 espécies, sendo algumas já formalmente descritas. As espécies *Spathaspora passalidarum*, *Sp. arborariae*, *Sp. gorwiae* e *Sp. hagerdaliae* produzem principalmente etanol a partir de xilose, enquanto as demais espécies dentro do gênero podem ser considerados produtores de xilitol. Entre as espécies *Spathaspora* fermentadoras de xilose, *Sp. passalidarum* exibe altos rendimentos e produtividades de etanol quando cultivado em meios suplementados com esta pentose em condições anaeróbicas ou com oxigênio limitado. A espécie também exibe um rápido consumo de xilose e a capacidade de fermentar glicose, xilose e celobiose simultaneamente. Essas características sugerem que essa espécie é um potencial candidato para uso na fermentação de materiais lignocelulósicos (Cadete & Rosa, 2018).

De modo geral, as leveduras *Sp. passalidarum*, e *Sc. stipitis*, anteriormente denominada *Pichia stipitis* (Slininger et al., 1982; Su et al., 2015) são as linhagens nativas que mais se destacam por apresentarem rendimento e produtividade elevados em comparação aos fungos e bactérias capazes de metabolizar xilose (Barbosa et al., 2009; Cadete et al., 2009; Mouro, 2012; Nakanishi et al., 2017; Farias & Filho, 2019; Bonan et al., 2019).

Nakanishi et al. (2017) demonstrou o potencial dessas duas leveduras (*Sc. stipitis* Y-7124 e *Sp. passalidarum* Y-27907) em processos que reproduzem o que ocorre em escala industrial. Foram realizadas fermentações em biorreator, alta concentração celular, em modo batelada alimentada com reciclo de células (4 ciclos), utilizando hidrolisado de bagaço de cana de açúcar obtido por pré-tratamento com NaOH seguido de hidrólise enzimática, sem separação de correntes. Atingiu-se 0,46 g g⁻¹ de conversão de substrato em etanol, 0,81 g L⁻¹ h⁻¹ em produtividade e título de 23,3 g L⁻¹ de etanol (na quarta fermentação seguindo o reciclo com bateladas sequenciais) com a levedura *Sp. passalidarum*. Para levedura *Sc. stipitis* os resultados foram de 0,36 g L⁻¹ h⁻¹ de produtividade em etanol, fator de conversão de substrato em produto de 0,32 g g⁻¹ e título de 18,52 g L⁻¹ de etanol (na terceira fermentação).

Santos et al. (2016) também avaliaram a levedura *Sc. stipitis* Y-7124 em processos próximos ao que ocorre industrialmente. No trabalho, foram

realizados cinco ciclos em batelada com alta densidade celular, comparando o desempenho com variação de temperatura entre 30 e 26 °C (diminuindo 1 °C a cada ciclo) ou mantendo a temperatura em 30 °C durante os ciclos. Foi utilizado meio sintético contendo xilose e glicose e os resultados demonstraram aumento no rendimento de produção de etanol a cada ciclo e aumento significativo do consumo de xilose, principalmente quando a temperatura entre os ciclos diminuía, atingindo um rendimento máximo de 0,46 g g⁻¹, título de etanol de 31,10 g L⁻¹ e produtividade de 1,53 g L⁻¹ h⁻¹.

Outro trabalho relevante foi feito por Souza et al. (2018), com uso de hidrolisado de cana de açúcar obtido por tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino e tratamento enzimático, fermentação sem suplementação com extrato de levedura, sais, ureia ou peptona como em outros trabalhos. Utilizando a levedura *Sp. passalidarum* UFMG-HMD-14.1, obteve-se uma fator de conversão de 0,32 g g⁻¹, produtividade em etanol de 0,34 g L⁻¹ h⁻¹ e consumo de 78% do substrato em 72 h de fermentação.

2.5. Consumo de sacarose por leveduras geneticamente modificadas e não-convencionais na produção de etanol

A sacarose é um dissacarídeo formado por uma molécula de α -D-glicose e outra de β -D-frutose, ligados por meio de uma ligação glicosídica α 1-2 β . Existem duas formas de metabolizar a sacarose em *S. cerevisiae*, uma através da atuação de uma invertase extracelular e outra por meio de invertase intracelular. Quando ocorre hidrólise extracelular da sacarose pela invertase, os monômeros deste dissacarídeo (glicose e frutose) serão transportados para dentro da célula por transportadores de hexose codificados pelos genes da família HXT (HXT1-HXT17 e GAL2) e então metabolizados através da via glicolítica (Lagunas, 1993), enquanto que a invertase intracelular hidrolisa a sacarose após o transporte desta molécula íntegra para o interior da célula (Figura 9). Neste último caso, o processo ocorre através do co-transporte com prótons (simporte sacarose-H⁺) com alta afinidade pela permease codificado pelo gene AGT1, e com baixa afinidade pelos transportadores codificados pelos genes MALx1. A sacarose é então hidrolisada internamente pela maltase ou pela invertase intracelular (Badotti et al, 2006; 2008), sendo que a via

intracelular permite uma maior produção de etanol do que a hidrólise extracelular (Basso et al., 2011).

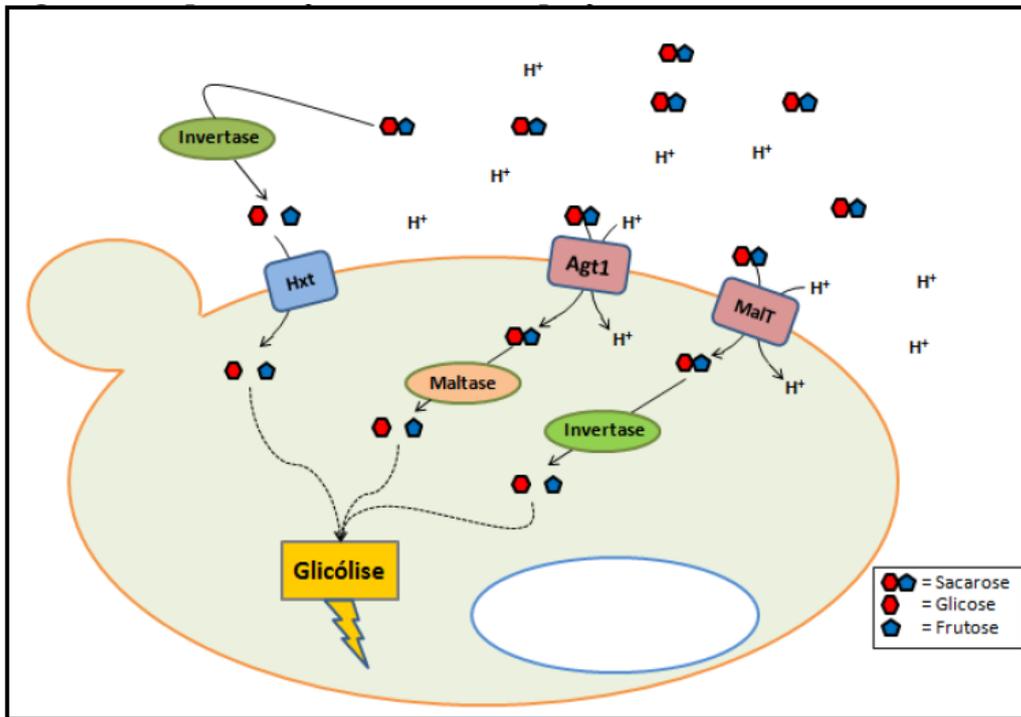


Figura 9: Representação das vias de metabolização de sacarose em *S. cerevisiae*.
Fonte: adaptado de Gonçalves (2014).

Para as cepas não convencionais já citadas nessa revisão (*Sc. stipitis* e *Sp. passalidarum*), não existem dados reportados na literatura quanto a transportadores específicos, modo de transporte e características de invertases presentes nestas espécies. Nguyen et al. (2006) avaliou a capacidade das leveduras não convencionais *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907 e *C. jeffriesii* NRRL Y-27738 de fermentar e crescer consumindo diversos substratos, incluindo sacarose. Segundo os resultados apresentados, as leveduras são capazes de assimilar e crescer, mas não de fermentar esse carboidrato. Os autores citam ainda, que a levedura *Sc. stipitis* apresenta o mesmo comportamento conforme dados de Kutzman & Fell (1998) e Barnett et al. (2000). Santos et al (2016) utilizou melão de cana de açúcar para propagação da levedura *Sc. stipitis*, confirmando o consumo de sacarose por essa levedura em condições aeradas. Cadete et al. (2013) reporta que as leveduras encontradas na floresta Amazônica, *Sp. brasiliensis*, *Sp. roraimanensis*, *Sp. suhii* e *Sp. xylofermentans*, são capazes de assimilar sacarose.

2.6. Aspectos importantes para o escalonamento de um novo processo fermentativo

Segundo Delvigne (2006), a ampliação de escala de um processo fermentativo deve manter as condições do processo uniformes para qualquer volume de operação para que este se torne viável industrialmente. Outros autores (Tong & Inloes, 1990) ressaltam que, para tornar viável essa ampliação de escala, é indispensável primeiro definir o microrganismo a ser empregado, o meio de cultivo e as condições de temperatura, agitação e aeração mais adequadas ao processo (Figura 10).

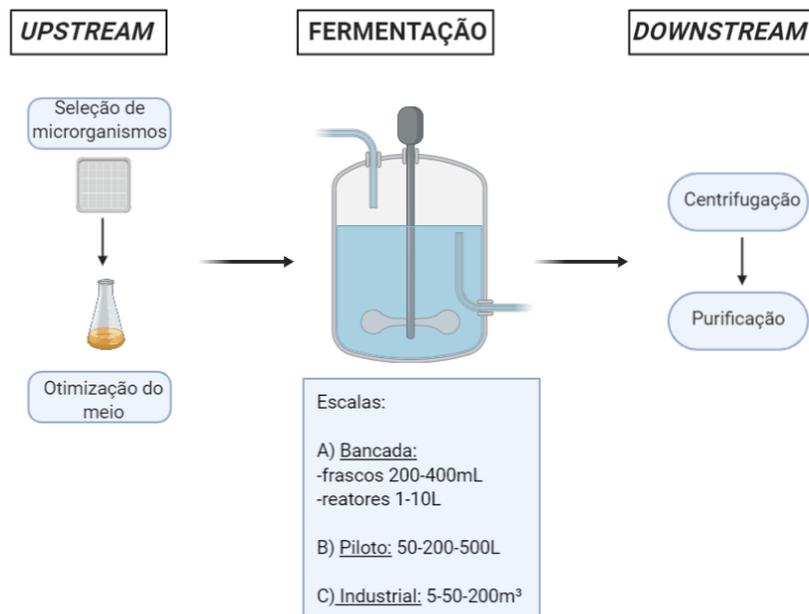


Figura 10: Resumo das etapas envolvidas em testes para desenvolvimento de um bioprocessamento. Fonte: Adaptado de Schmidell (2001).

Grandes esforços foram feitos desde o início da indústria de fermentação, visando desenvolver processos com maiores rendimentos, títulos e produtividade (Raghavendran et al., 2017). Na maioria dos processos, o desenvolvimento parte de uma escala de produção menor para uma escala

maior. A variação de escala nesse sentido é conhecida como aumento de escala ou *scale up* (Schmidell, 2001).

Em princípio, a capacidade de fermentação depende em grande parte de dois aspectos principais, a maquinaria celular (determinada pelas funções dos genes e enzimas) e o ambiente extracelular (determinado pelo fluido dinâmico no biorreator). Nesse sentido, é uma tarefa e um desafio permanente para a pesquisa biotecnológica descobrir e obter mais conhecimento da cinética celular e dinâmica dos fluidos do biorreator e interação entre essas duas partes, a fim de acelerar o processo de transição da investigação laboratorial para a aplicação industrial (Xia, 2015). É frequente encontrar autores que dizem que a tarefa de ampliar escala é uma “arte”, em virtude da necessidade de se contar com muita experiência específica relativa ao processo em desenvolvimento. Isso só é possível através da observação de resultados experimentais obtidos em escala de laboratório (Schmidell, 2001; Pastor et al, 2011).

Quando se está operando uma instalação industrial e se necessita elaborar ensaios em pequena escala, a fim de verificar certos aspectos, tem-se a chamada redução de escala ou *scale down*. O conceito de redução foi proposto pela primeira vez por Kossens e colaboradores (1985). Vários sistemas de redução de escala foram projetados para investigar efeitos de heterogeneidades como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e substrato na fisiologia de bactérias, leveduras, fungos filamentosos e células de mamíferos. O processo de produção de etanol 1G no Brasil apresenta um problema de engenharia inversa. O processo ampliado já está disponível, mas requer uma melhor compreensão da escala de laboratório (Raghavendran et al., 2017). Ao contrário do aumento de escala, onde existem numerosos exemplos de artigos e referências, poucos estudos estão disponíveis em bioprocessos reduzidos. A maioria das publicações tratam sobre mistura e transferência de massa sem dados prescritivos sobre como mimetizar um processo em grande escala em volumes menores (Schmalzriedt et al., 2003; Noorman, 2011).

É válido salientar que a importância maior de realizar experimentos em escala de bancada está também relacionada aos custos envolvidos em testes em larga escala. Assim sendo, a decisão de testes em escalas maiores (piloto e industrial) deve ser tomada somente depois de adquirido um grau de

segurança, baseado no conhecimento do processo (Shmidell, 2001). Nesse sentido, as etapas experimentais desse projeto foram pensadas de modo a fazer um *scale up* do processo integrado (E1G2G), avaliando cada uma das etapas do processo e testando possibilidades de substrato e concentrações com o objetivo de otimizar o crescimento das leveduras nas etapas iniciais e a fermentação nas etapas seguintes.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenhar um processo de produção de etanol de segunda geração, baseado no aproveitamento da fração de pentoses presente na hemicelulose.

3.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a cinética de crescimento das leveduras *Sc. stipitis* NRRL Y-7124, *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907, *S. cerevisiae* MP-C5 e MP-C5H1 recombinantes na presença de diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose e suas misturas) na etapa de pré-inóculo e selecionar a melhor levedura não-convencional e a melhor recombinante para as demais etapas através dos parâmetros de velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e concentração de células no meio;
- 2) Avaliar a cinética de crescimento das leveduras selecionadas na presença de diferentes fontes de carbono (glicose, xilose, sacarose e suas misturas) na etapa de inóculo;
- 3) Avaliar a proporção ideal para a mistura dos carboidratos xilose e sacarose, a concentração inicial destes açúcares e a cinética de fermentação das leveduras selecionadas por meio de fermentações em frascos agitados com o intuito de selecionar a levedura com melhor desempenho fermentativo;

- 4) Obter um protocolo de propagação em biorreator para obtenção de alta concentração celular da levedura selecionada;
- 5) Avaliar o desempenho da levedura e meio selecionado em fermentação em modo batelada com intuito de aumentar a produtividade volumétrica global em etanol (Q_p);
- 6) Estabelecer um processo em batelada alimentada com hidrolisado hemicelulósico de bagaço e melaço de cana de açúcar, e avaliar o desempenho fermentativo da levedura no processo integrado de primeira e segunda geração, através dos parâmetros de fator de conversão de substrato em etanol, rendimento e produtividade.

4. Material e Métodos

A Figura 11 apresenta o diagrama com o resumo das principais etapas estudadas neste trabalho, as quais serão discutidas em detalhes a seguir.

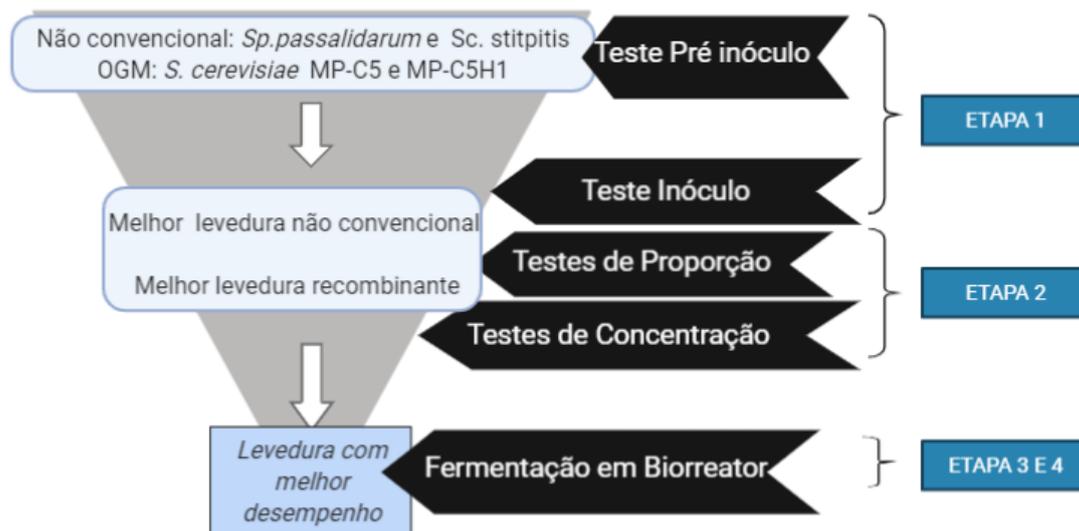


Figura 11: Diagrama com o resumo de todas as etapas do projeto.

4.1. Microrganismos

As linhagens utilizadas neste estudo foram as leveduras não convencionais *Sc. stipitis* NRRL Y-7124 e *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907 isoladas de estômago de insetos vivendo em madeira em decomposição (Nguyen et al., 2006). Também foram utilizadas leveduras industriais recombinantes de *S. cerevisiae* (Tabela 2), as linhagens MP-C5 (Gonçalves, 2014) e MP-C5H1. Trata-se da linhagem industrial CAT-1 de *S. cerevisiae* (Basso et al., 2008; Babrzadeh et al., 2012) modificadas de forma a sobre-expressar os genes *XYL1* (XR) e *XYL2* (XDH) de *Sc. stipitis*, e o próprio gene *XKS1* (XK) de *S. cerevisiae*, envolvidos no metabolismo de xilose. Além dessa modificação, na cepa MP-C5H1 foi inserido um promotor forte e constitutivo (promotor *ADH1*) na região promotora do gene *HXT1*, de forma a sobre-expressar uma forma truncada do transportador *HXT1* sem os primeiros 59 aminoácidos da proteína, garantindo sua estabilidade na membrana (Roy et al., 2014). Ambas as cepas geneticamente modificadas foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia Molecular e Biotecnologia de Leveduras do

Departamento de Bioquímica da UFSC sob a coordenação do Prof. Dr. Boris U. Stambuk.

As cepas foram mantidas em freezer a -80°C em criotubo contendo meio YPDX (1% extrato de levedura, 2% peptona, 1% dextrose e 1% xilose, em m/v) e glicerol 50 % (1:1). Para utilização nos experimentos, retirava-se um criotubo do freezer e era feito um repique em placas contendo YPDX ágar (adição de 1,5% ágar) para reativação (estufa a 30°C por 48 h) e posterior inoculação da colônia nos meios de cultivo.

Tabela 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas

Cepa	Genótipo ou descrição	Fonte
CAT1	Linhagem diplóide para produção de etanol combustível – Isolada na usina VO Catanduva, São Paulo/SP, em 1998/1999.	Basso et al., 2008.
MP-C5	Isogênica a CAT1, mas AUR1::pAUR-XKXDHXR ^a	Gonçalves, 2014
MP-C5H1	Isogênica a MP-C5, mas com o gene HXT1 truncado sobre-expresso	Ângela A. dos Santos ^b

^aEste plasmídeo contém sequências que codificam para o promotor e terminador da enzima fosfofrutocinase (PFK) para a sobre-expressão dos genes XYL1 e XYL2 de *Sc. stiptis*, e sobre-expressão do gene XKS1 de *S. cerevisiae*. O plasmídeo possui a habilidade de integrar-se cromossomicamente no locus AUR1 de *S. cerevisiae*, conferindo desta forma resistência ao antibiótico Aurobasidin A. ^bDoutoranda no PPG em Bioquímica da UFSC.

4.2. ETAPA 1: Perfil de crescimento e consumo de açúcares

4.2.1. Teste de pré inóculo com diferentes substratos e leveduras

Com o objetivo de avaliar o crescimento das cepas (*Sc. stiptis*, *Sp. passalidarum*, *S. cerevisiae* recombinante MP-C5 e MP-C5H1) em diferentes fontes de carbono, foram feitos testes de crescimento em *shaker* utilizando quatro diferentes composições de substrato. O objetivo para esta primeira etapa foi o de verificar a adaptação do microrganismo e o crescimento nos meios testados. Com base nos resultados foi possível selecionar o melhor meio para esta etapa do processo para todas as leveduras testadas.

Um criotubo de cada levedura foi retirado do banco de leveduras (mantido a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) e inoculado (por estrias) em placas de Petri contendo meio YPDX ágar e incubado em estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Após o crescimento em placa, uma colônia de cada levedura era inoculada em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL dos meios. Os meios testados foram *Yeast Peptone* (YP, 10 g L^{-1} de extrato de levedura e 20 g L^{-1} de peptona) contendo 20 g L^{-1} de dextrose (YPD); 10 g L^{-1} de dextrose e 10 g L^{-1} de xilose (YPDX); 20 g L^{-1} de xilose (YPX); e 10 g L^{-1} de sacarose e 10 g L^{-1} de xilose (YPSX). Ressalta-se que todos os meios citados acima tinham pH corrigido para 5,0 com HCl 1 mol.L^{-1} e foram esterilizados em autoclave a 121°C durante 20 min. Os frascos foram incubados, em duplicata, em *shaker* (Tecnal TE-424) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e rotação de 200 RPM por 24 h, e as amostras foram coletadas a cada 2 h para leitura de absorbância em espectrofotômetro (item 4.6.2) e quantificação de massa seca (item 4.6.1).

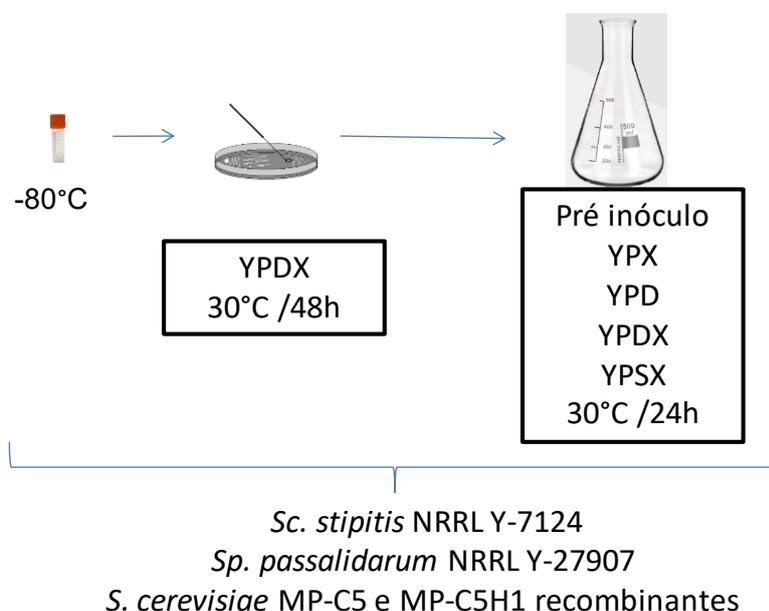


Figura 12. Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de pré inóculo.

4.2.2. Teste de Inóculo com diferentes substratos e leveduras

Após estabelecer as condições de crescimento de pré inóculo para todas as leveduras e meios estudados, foram feitos testes de crescimento na segunda etapa de crescimento (inóculo) visando o escalonamento do processo. O objetivo nesta fase foi o de selecionar a melhor levedura recombinante e

não-convencional, além do meio de cultura, com base nos resultados de cinética. Para isso, um criotubo retirado do banco de leveduras (mantido a -80 °C) foi inoculado em placas de Petri contendo meio YPDX ágar e incubado em estufa a 30 °C por 48 h para reativação. Após o crescimento em placa, uma colônia de cada levedura (*Sp. passalidarum*, *S. cerevisiae* recombinante MP-C5H1) era inoculada em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL meio de pré inóculo selecionado de acordo com 4.2.1. Após 12 h a 30 °C, pH 5 e 200 RPM, transferiu-se 10 % do volume para um frasco *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 90 mL dos meios de teste YPD, YPDX, YPX e YPSX (Figura 13), conforme descrito em 2.4.1 adicionados de 2,3 g L⁻¹ de uréia e 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O (Silva et al, 2012). Todos os frascos foram incubados, em duplicata, em *shaker* a 30 °C, pH 5, 200 RPM por 24 h, e as amostras foram coletadas a cada 2 h para leitura de absorbância (item 4.6.2), quantificação de massa seca (item 4.6.1) e coleta de sobrenadante para determinação da concentração de analitos por CLAE (item 4.6.3).

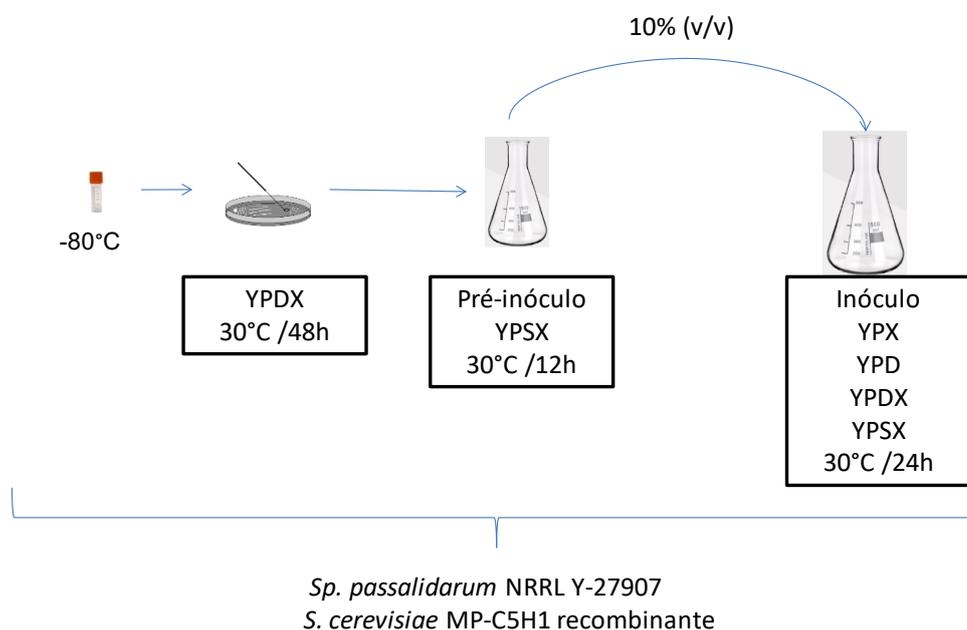


Figura 13. Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de inóculo.

4.3. ETAPA 2: Determinação da composição do meio de fermentação

Após a seleção da melhor levedura recombinante e não-convencional, tempo e meio de pré-inóculo e inóculo partiu-se para a investigação da

composição ideal para o meio de fermentação. Com a intenção de determinar a proporção entre os açúcares selecionados para compor o meio, a concentração inicial de substrato e a levedura que apresentasse o melhor desempenho dentre as 2 selecionadas na etapa anterior, realizaram-se os testes descritos a seguir.

4.3.1. Determinação da proporção de xilose e sacarose

Com o objetivo de avaliar as proporções de sacarose e xilose no meio de fermentação, foram testadas cinco diferentes condições: 100 % de xilose, 100 % de sacarose, 50 % de cada uma dos substratos, 30 % de xilose e 70 % de sacarose, 70 % xilose e 30 % de sacarose, com base no trabalho de Veras et al (2017). Os testes foram feitos com as cepas selecionadas na etapa anterior, em duplicata, em *shaker* (Tecnal TE-424) a 30 °C, pH 5 e 150 RPM em frascos *Erlenmeyer* de 500mL contendo 225 mL do meio de fermentação contendo 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de uréia, 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. A concentração inicial de açúcares redutores totais foi igual a 90 g L⁻¹, baseado no trabalho de Nakanishi et al (2017). Para inocular os frascos de fermentação, foram realizadas as etapas de pré-inóculo e inóculo previamente estabelecidas, sempre transferindo 10% (v/v) de uma etapa para outra (Figura 14). Foram retiradas alíquotas a cada 2 h nas 12 h iniciais de teste e com 24, 48 e 72 h e fermentação para leitura de absorbância em espectrofotômetro (item 4.6.2), quantificação de massa seca (item 4.6.1) e coleta de sobrenadante para determinação da concentração de analitos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (item 4.6.3).

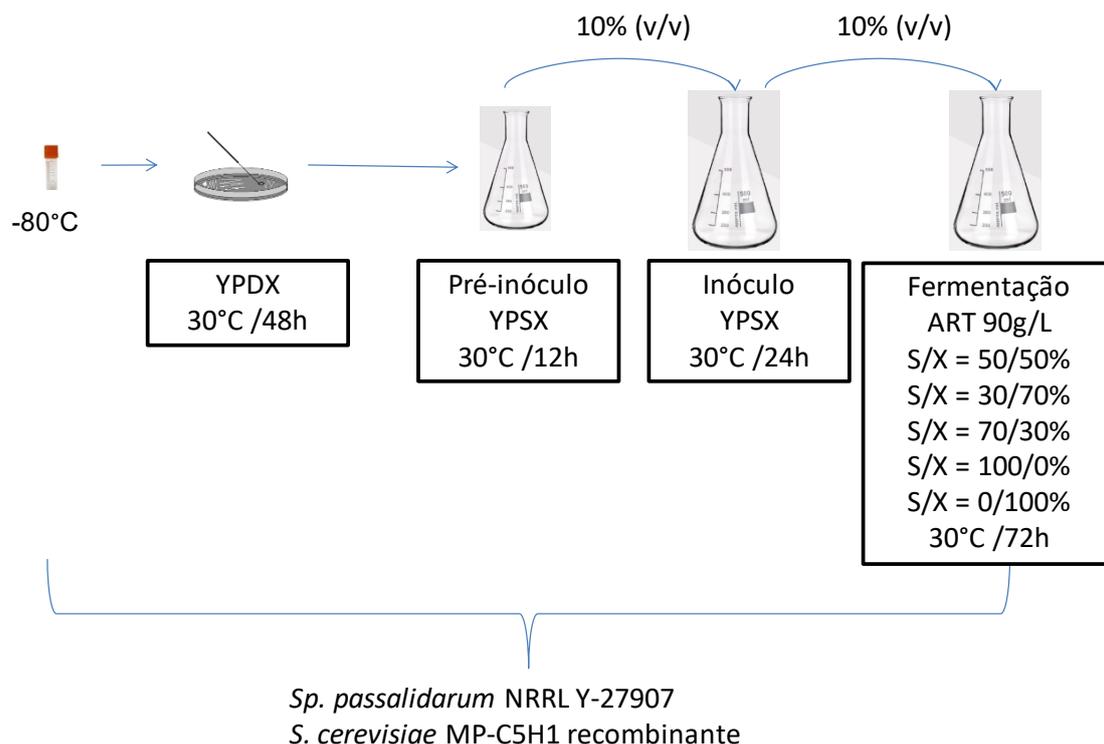


Figura 14. Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de fermentação em frasco variando a proporção entre os substratos xilose e sacarose.

4.3.2. Determinação da concentração inicial de substrato

Após a seleção da melhor proporção dos açúcares previamente definidos (sacarose e xilose) na etapa anterior (4.3.1) foram avaliadas as concentrações iniciais de açúcares redutores totais (ART) nas fermentações. As concentrações de ART de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 g L⁻¹ foram avaliadas na mistura. Os testes foram feitos com as cepas previamente selecionadas, em *shaker* a 30 °C, pH 5,0 e 150 RPM em frascos *Erlenmeyer* de 500mL contendo 225 mL do meio de fermentação com 3 g L de extrato de levedura, 2,3 g L de uréia, 1 g L de MgSO₄.7H₂O e 90 g L de açúcares totais (Nakanishi, 2017). Previamente à etapa de fermentação, fez-se as duas etapas de crescimento testadas anteriormente (pré inóculo e inóculo no meio selecionado) transferindo 10 % (v/v) do pré-inóculo para o inóculo (Figura 15). Foram retiradas alíquotas a cada 2 h nas 12 h iniciais de teste e com 24, 48 e 72 h de fermentação para leitura de absorbância em espectrofotômetro (item 4.6.2), quantificação de massa seca (item 4.6.1) e coleta de sobrenadante para determinação da concentração de açúcares por CLAE (item 4.6.3).

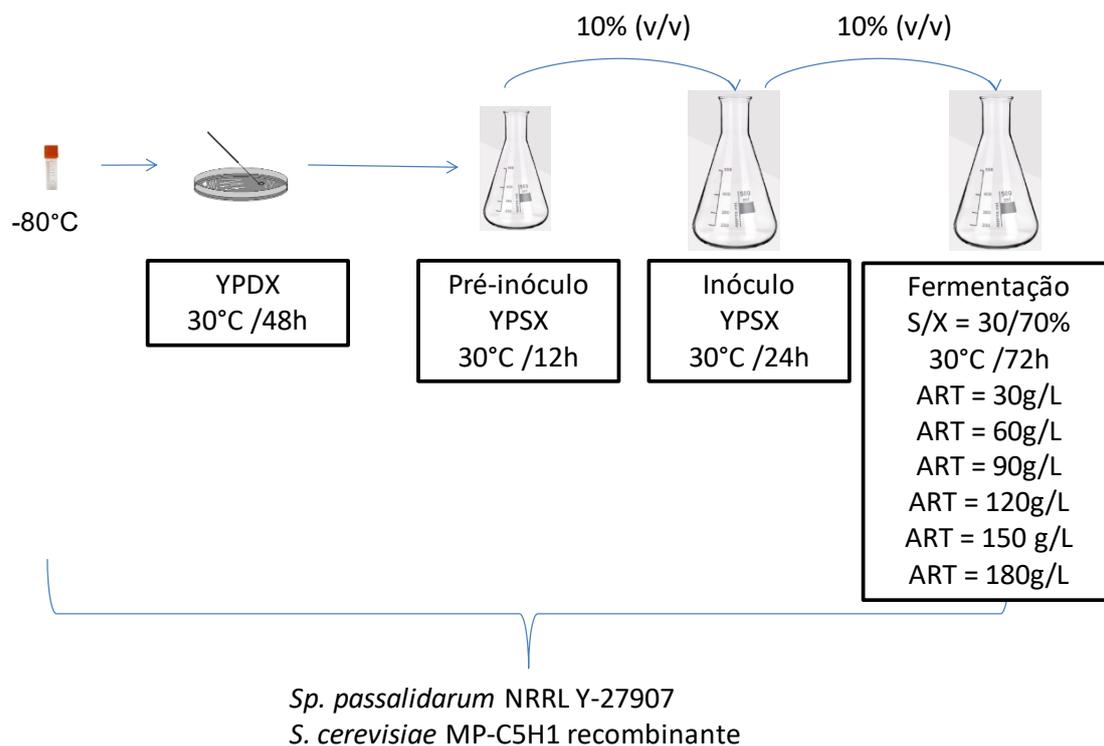


Figura 15. Resumo das etapas, leveduras e meios envolvidos no teste de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato.

4.4. ETAPA 3: Fermentações em biorreator

Após a seleção da melhor levedura e da definição das condições de pré-inóculo, inóculo, concentração inicial da fonte de carbono e da melhor proporção dos açúcares selecionados (xilose e sacarose) nas etapas 1 e 2 deste trabalho, realizou-se a etapa de intensificação do processo de fermentação. Como a proposta de escalonamento de processo foi a de intensificar a etapa de fermentação e trabalhar em alta densidade celular (visando o aumento de produtividade), foi necessário estabelecer um protocolo de propagação da levedura.

4.4.1. Propagação

Para a inoculação do biorreator foram realizadas as etapas de pré-inóculo e inóculo previamente estabelecidas em meio YPSX. As células obtidas no inóculo foram centrifugadas a 3000 xg por 20 min (Centrífuga Beckman coulter Avanti JE), lavadas duas vezes com água estéril, ressuspensas em água estéril com volume equivalente a 10 % do volume total de reação no

biorreator, de modo a obter uma concentração inicial de células em torno de 1 g L⁻¹.

O biorreator foi operado a 30 °C, sem controle de pH (pH 6,0 inicial), com aeração inicial de 0,1 vvm e controle de agitação para que a concentração de oxigênio dissolvido permanecesse superior a 50 % em todas as propagações, em relação à saturação em ar atmosférico (Figura 16). Em todos os experimentos foram retiradas alíquotas para determinação da concentração de células, absorbância e CLAE. A fonte de carbono selecionada para esta etapa foi glicose.

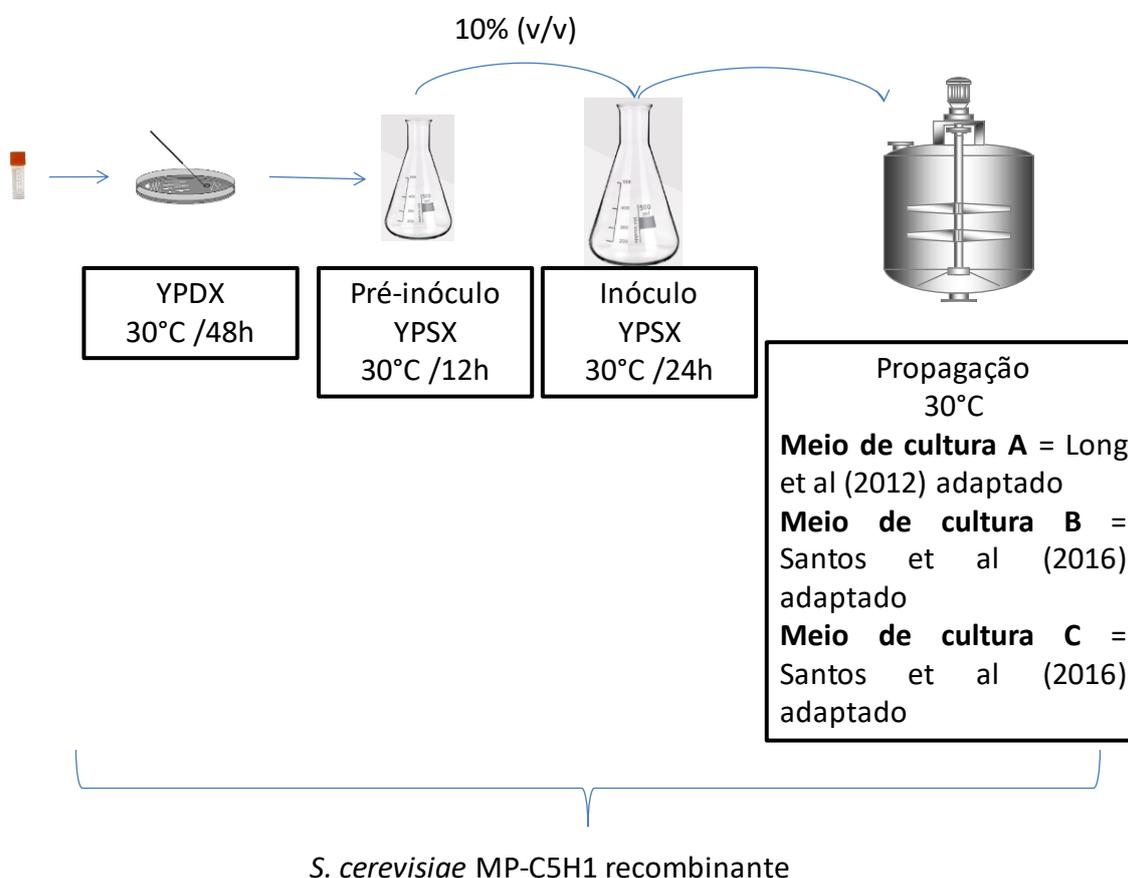


Figura 16. Resumo das etapas, condições experimentais e meios envolvidos na etapa de obtenção do protocolo de propagação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em biorreator.

A Tabela 3 apresenta os três meios de propagação estudados neste trabalho. Os protocolos de propagação testados (A, B e C) foram baseados no

utilizado por Santos et al (2016), onde foram estabelecidas duas etapas de propagação. A primeira é uma batelada onde se espera que a levedura tenha crescimento exponencial ($\mu_{m\acute{a}x}$) e, a segunda, uma fase em batelada alimentada com alimentação contínua da fonte de carbono com o intuito de estabelecer crescimento linear.

A primeira propagação (A) foi feita em biorreatores (New Brunswick BioFlo 115) de 1,5L com meio descrito por Long et al (2012) adaptado (Tabela 3). Para esta propagação, a primeira etapa (batelada) teve duração de 10 h, quando foi realizado um pulso de $2 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ e $5,0 \text{ g L}^{-1}$ ureia e iniciou-se a alimentação da fonte de carbono por 14 h de modo a obter $2 \text{ g ART L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Na segunda propagação (B), mudou-se a composição dos meios inserindo extrato de levedura e peptona (baseado em Santos et al, 2016), com intuito de melhorar o crescimento da levedura. Conforme descrito na Tabela 3, a primeira etapa teve 10 h de duração quando foi realizado um pulso de $2 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ e $2,4 \text{ g L}^{-1}$ ureia e iniciou-se a alimentação da fonte de carbono por 14 h, como na propagação anterior. Foi realizada em biorreator (New Brunswick BioFlo 110) de 5L.

Na terceira propagação (C), utilizou-se o mesmo meio descrito por Santos et al (2016) adaptado, porém houve uma mudança no protocolo: a fase de batelada durou 8h e a alimentação 16 h (Tabela 3). Esta propagação também foi realizada em biorreator (New Brunswick BioFlo 110) de 5 L.

Ao fim das propagações, o meio foi centrifugado a 3000 xg por 20 min (Centrifuga Beckman coulter Avanti JE), em seguida, as células foram lavadas em água estéril e novamente centrifugadas nas mesmas condições. O creme de leveduras obtido foi armazenado sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) em frasco estéril até sua utilização.

Tabela 3. Protocolos e meios testados na etapa de propagação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em reator.

Protocolo	Batelada		Composição (g L ⁻¹) e tempo de cultivo para ministrar o pulso	Batelada Alimentada		Fonte
	Composição do Meio (g L ⁻¹)	Volume* / Tempo da etapa		Composição do Meio (g L ⁻¹)	Volume / Tempo da etapa	
A	30 glicose; 2,4 ureia; 3 KH ₂ PO ₄ ; 0,5 MgSO ₄ .7H ₂ O	0,49 L / 10 h	2 KH ₂ PO ₄ ; 5 ureia 10 h	200 glicose	0,21 L / 14 h	Long et al (2012) adaptado
B	30 glicose; 2,4 ureia; 3 extrato de levedura, 5 peptona, 2 KH ₂ PO ₄ , 1 MgSO ₄ .7H ₂ O	2,8 L / 10 h	2 KH ₂ PO ₄ ; 2,4 ureia 10 h	127 glicose, 3 extrato de levedura	1,2 L / 14 h	Santos et al (2016) adaptado
C	30 glicose; 2,4 uréia; 3 extrato de levedura; 5 peptona; 2 KH ₂ PO ₄ ; 1 MgSO ₄ .7H ₂ O	2,8 L / 8 h	2 KH ₂ PO ₄ ; 2,4 ureia 8 h	127 glicose, 3 extrato de levedura	1,2 L / 16 h	Santos et al (2016) adaptado

*Trata-se do volume total de reação na etapa de batelada, sendo necessário descontar os 10% de inóculo para obter o volume de meio utilizado.

4.4.2. Reativação das células

Antes de iniciar as fermentações foi realizada uma etapa de reativação das leveduras (creme de leveduras produzido de acordo com 4.4.1) armazenadas sob refrigeração. O objetivo dessa etapa é obter um creme de leveduras viáveis para iniciar a fermentação, por isso, uma medida de viabilidade das leveduras (item 4.6.4) foi realizada antes e após a etapa de reativação esperando viabilidade final entre 95 e 100 %. Para reativação das leveduras foi realizado o protocolo estabelecido por Nakasu et al., (2016) modificado. O creme de leveduras foi incubado em *shaker* a 30 °C e 200 RPM por 30 min, em frasco *Erlenmeyer* de 1L contendo 400 mL de solução 5 g L⁻¹ de glicose. Após o tempo de incubação, o meio foi centrifugado a 3000 RPM por 20 min e as células foram suspensas em água destilada estéril, no volume necessário para fermentação.

4.4.3. Fermentação em modo batelada

Três fermentações em batelada foram realizadas no biorreator de 1,5 L (New Brunswick, BioFlo 115), com um volume total de reação de 0,7 L. O meio de fermentação utilizado foi o descrito por Nakanishi et al (2017) adaptado aos açúcares testados neste projeto, contendo 3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 2,3 g L⁻¹ de ureia, 1 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O e 63 g L⁻¹ de xilose e 27 g L⁻¹ de sacarose. As três fermentações (B1, B2 e B3) variaram de acordo com a concentração inicial de leveduras no meio (Figura 17). O inóculo, composto pelo creme de leveduras reativado, representou 10 % do volume total de fermentação (Figura 17). O biorreator foi operado a 30 °C, 150 RPM, pH 5,0, com monitoramento de pH e temperatura, com amostras retiradas para análise de crescimento (item 4.6.1 e 4.6.2), viabilidade (4.6.4) e concentração de substratos e produtos por CLAE (item 4.6.3).

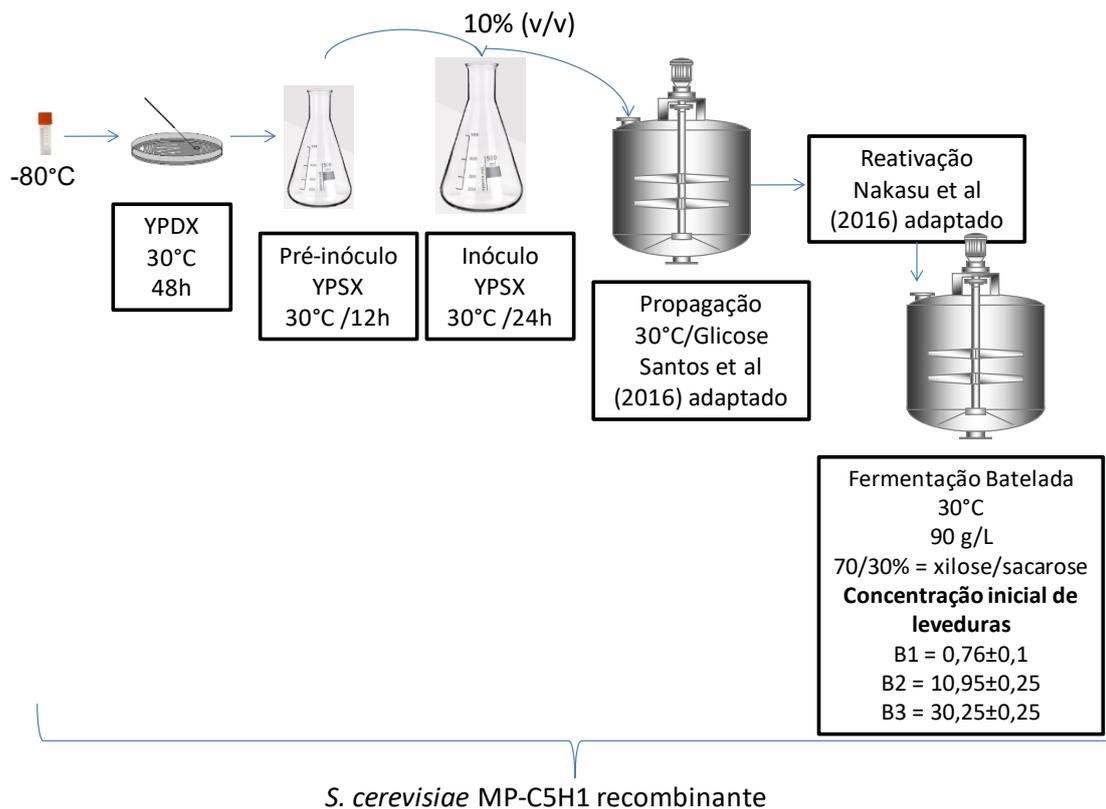


Figura 17. Resumo das etapas, condições experimentais e meios envolvidos na etapa de fermentação em reator em meio rico com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, variando a concentração inicial de células.

4.5. ETAPA 4: Fermentação com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar

Com a definição da melhor levedura, condições de pré-inóculo, inóculo, protocolo de propagação, concentração inicial de leveduras para a fermentação e as definições acerca do substrato (tipo de carboidratos selecionados, concentração inicial e proporções dos carboidratos no meio) foi possível desenhar o processo de fermentação para o meio de hidrolisado hemicelulósico (rico em xilose, previamente selecionada) e melaço de cana de açúcar (rico em sacarose, previamente selecionada). A mistura destes carboidratos advindos do bagaço de cana de açúcar e da extração do caldo de cana de açúcar, respectivamente, se caracteriza como um processo de integração 1G2G.

4.5.1. Matérias primas

4.5.1.1. Melaço de cana de açúcar

O melaço utilizado foi disponibilizado pela empresa TEREOS Açúcar & Energia Brasil. A caracterização dos açúcares presentes foi feita por cromatografia líquida de alta precisão (item 4.7.3), sendo composto por 67,2 g L⁻¹ de frutose, 58,8 g L⁻¹ de glicose e 383,6 g L⁻¹ de sacarose. Também foi feita a determinação de sólidos solúveis em refratômetro tendo como resultado 80° Brix. O melaço foi então diluído para 40 °Brix e o pH ajustado para 5,0. Para uso no meio de fermentação foi feita a esterilização em autoclave (121 °C por 20 minutos).

4.5.1.2 Hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico foi cedido pelo grupo de pesquisa da professora Sarita Rabelo da UNESP de Botucatu/SP. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido na planta piloto do Laboratório nacional de Biorrenováveis (LNBr) por hidrólise de bagaço de cana com ácido diluído conforme previamente descrito por Roque et al. (2019). A Figura 18 mostra o fluxograma com todas as etapas realizadas para obtenção do hidrolisado. Primeiro, o bagaço foi submetido a um pré tratamento com ácido sulfúrico 0,5 % (v/v), contendo 10 % (m/m) de sólidos, a 140 °C por 15 min, em um reator de aço-liga de 350 L (Pope Scientific Inc., Saukville, USA). Foram utilizados 15,286 kg de bagaço (base seca) para um volume reacional de 200 L. Após o tratamento, fez-se a separação dos sólidos (celulignina) e do líquido (hidrolisado) através de um filtro Nutche (Pope Scientific Inc., Saukville, USA). A seguir, realizou-se uma etapa de concentração em evaporador a vácuo. O hidrolisado concentrado foi então detoxificado utilizando a metodologia descrita por Marton (2006), também para redução dos inibidores presentes.

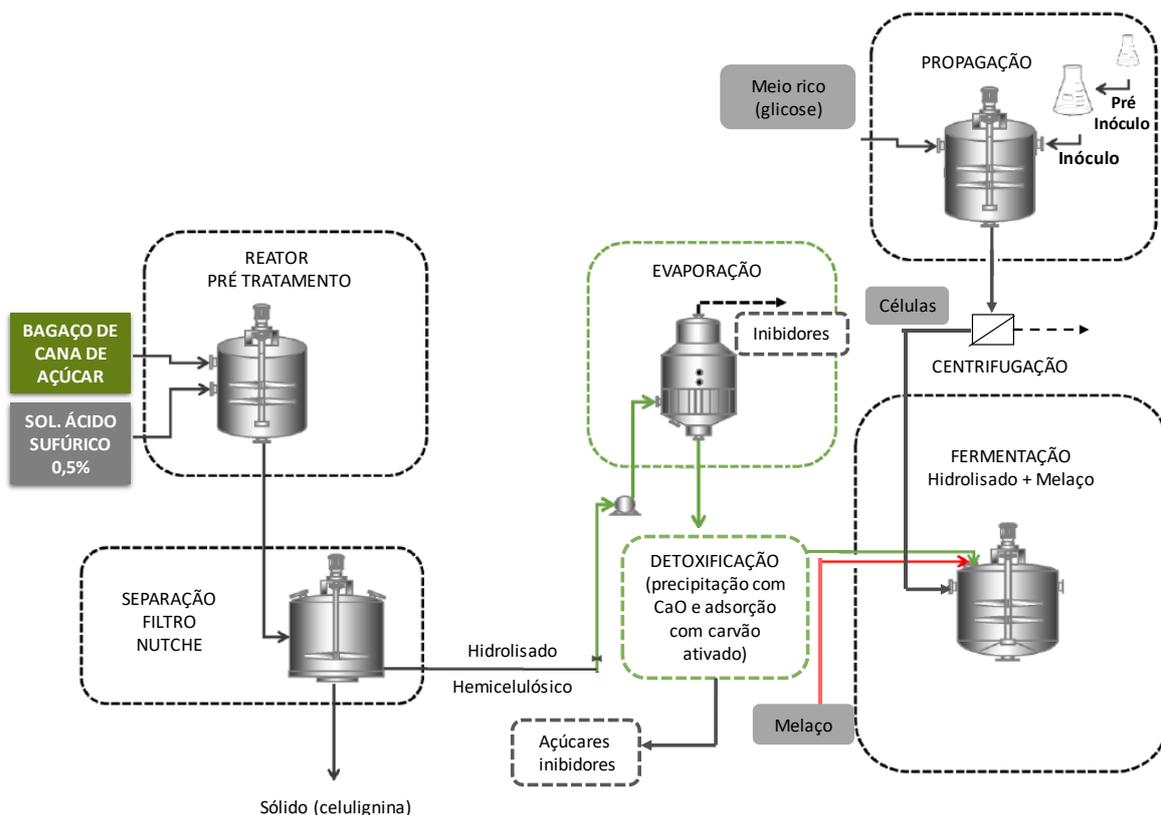


Figura 18. Fluxograma com as etapas de obtenção, tratamento e fermentação do hidrolisado hemicelulósico. As etapas de pré tratamento e evaporação foi realizada no LNBr e a detoxificação, propagação e fermentação no Lieb/UFSC. Fonte: Este trabalho.

4.5.2. Fermentação em modo batelada alimentada

As fermentações em modo batelada alimentada foram realizadas no biorreator (New Brunswick BioFlo 115) de 1,5 L com volume inicial de 0,25 L. O meio de fermentação e a estratégia utilizadas foram previamente descritas por Nakanishi (2017) adaptado aos açúcares (tipo, proporção e concentração) testados neste projeto, contendo 3 g L^{-1} de extrato de levedura, $2,3 \text{ g L}^{-1}$ de ureia, 1 g L^{-1} de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 98 g L^{-1} de xilose proveniente do hidrolisado hemicelulósico e 42 g L^{-1} de glicose/sacarose/frutose provenientes tanto do melaço quanto do hidrolisado hemicelulósico. O biorreator contendo água foi esterilizado a 121° C durante 20 min. Após a esterilização, toda água foi drenada por meio de bomba peristáltica. Na sequência, o creme de leveduras previamente obtido e reativado foi transferido de forma asséptica ao biorreator para compor um meio com concentração inicial de 90 g L^{-1} de leveduras, com o objetivo de atingir cerca de 30 g L^{-1} com o biorreator cheio. O creme de

leveduras representou aproximadamente 1/3 (em volume) do volume total da reação. Em seguida, a alimentação foi estabelecida em 30 mL h⁻¹ de meio (hidrolisado hemicelulósico + melaço) durante 12 h e a fermentação estendida até 32 h. As condições de temperatura e agitação foram mantidas em 30 °C e 150 RPM durante todo o processo. As amostragens foram pré estabelecidas para análise de crescimento (item 4.6.1 e 4.6.2), viabilidade (4.6.4) e concentração de substratos e produtos por CLAE (item 4.6.3).

4.6 Métodos analíticos

4.6.1. Determinação de crescimento por gravimetria

A determinação direta de crescimento foi realizada por meio de análise gravimétrica, coletando 1 mL de amostra e centrifugando a 10.000 RPM (HsiangTai CN2160) por 5 min em microtubos de 1,5 mL. O precipitado obtido foi lavado com 1 mL água destilada, ressuspenso, e centrifugado novamente. O procedimento de lavagem foi repetido por duas vezes e então o microtubo foi levado à estufa a 105 °C por 24 h (ou até peso constante), resfriado em dessecador e, em seguida, pesado em balança analítica (Norris, Et Ribbons, 1969).

4.6.2. Determinação de crescimento por densidade óptica

Para determinação indireta do crescimento durante os experimentos foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Bioespectro SP-220) a 600 nm. As amostras coletas eram diluídas quando necessário para que a leitura estivesse na faixa de 0,2 a 0,8.

4.6.3. Determinação da concentração de analitos

As amostras de fermentação foram centrifugadas e o sobrenadante filtrado em filtros (membrana PVDF, marca Analittica) de 0,22 µm para análise no Cromatógrafo Líquido (LC-20A Shimadzu). As determinações de xilose, glicose, frutose, etanol, xilitol, glicerol e ácido acético foram feitas por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (CLAE) por índice de refração, usando uma coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 1,00 UM, 7,8 mm x 9 um, Bio-rad), com fluxo de 0,6mL/minuto e com temperatura de detector e

coluna igual a 50 °C e solução 5mM de ácido sulfúrico como fase móvel. Para determinação de sacarose, foi utilizada a coluna Aminex HPX-87P (300 mm x 1,00 UM, 7,8 mm x 9 um, Bio-rad) com fluxo de 0,6mL/minuto e com temperatura de detector e coluna a 80 °C utilizando água milliQ como fase móvel (Sluitter, 2016).

4.6.4. Viabilidade das células

A determinação da viabilidade das leveduras foi feita utilizando a metodologia de coloração com azul de metileno. Após diluição em água destilada estéril, fez-se uma mistura 1:1 de suspensão de células e solução de azul de metileno 0,025%. A suspensão foi colocada em um câmara de *Neugbauer* onde realizou-se a contagem de células vivas (sem coloração) e mortas (coloração azul), em microscópio na objetiva de aumento de 40x. A viabilidade é expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao total de células contadas (Norris & Et Ribbons, 1969).

4.6.5. Determinação de fenólicos e inibidores no hidrolisado

A determinação de fenólicos foi feita através da medida de absorbância em espectrofotômetro a 280 nm. Para total solubilização dos fenólicos é necessária a correção do pH da amostra para 12 utilizando NaOH 6,5M. Foi feita a diluição necessária seguindo a Lei de Lambert-Beer, anotando-se o fator de diluição (fd). A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV-vis a 280nm (Sluitter, 2016). O resultado é obtido através da equação 1, em g L⁻¹.

A determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural foi feita através de análise de Cromatografia Líquida de Alta Precisão (Agilent), utilizando uma coluna de fase reversa Thermo Acclain C-18, com fase móvel composta por uma solução de acetonitrila-água 1:8 contendo 1% de ácido acético, utilizando um detector UV-vis (274 nm) a 25 °C. Uma alíquota das amostras foi filtrada em filtro de seringa (membrana PVDF, marca Analittica) de 0,22 µm antes do procedimento analítico (Sluitter, 2016).

$$C_{\text{fenolicos}} = \frac{[A_{280} \times fd] - 0,031}{\epsilon} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde A₂₈₀ é absorbância medida a 280 nm e ε é a absortividade dos compostos nesse comprimento de onda (23,7 L g⁻¹ cm⁻¹).

4.7. Cálculos e modelos utilizados para análise dos dados

4.7.2. Parâmetros cinéticos de fermentação

Para avaliar os resultados obtidos, os parâmetros cinéticos foram calculados através das equações descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Fórmulas utilizadas para análise dos resultados

Número da equação	Parâmetro	Fórmula	Unidade
(2)	Velocidade específica máxima de crescimento	$\ln(X/X_0) = \mu_{X_{max}} \cdot t$ $\ln(abs/abs_0) = \mu_{X_{max}} \cdot t$	h^{-1}
(3)	Velocidade específica de crescimento	$\mu_X = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$	h^{-1}
(4)	Velocidade específica de consumo de substrato	$\mu_s = \frac{1}{X} \cdot \left(-\frac{dS}{dt} \right)$	$gS \ gX^{-1} \ h^{-1}$
(5)	Velocidade específica de formação de produto	$\mu_P = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X}$	$gP \ gX^{-1} \ h^{-1}$
(6)	Fator de conversão de substrato em produto	$Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$	$gP \ gS^{-1}$
(7)	Fator de conversão de substrato em célula	$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$	$gX \ gS^{-1}$
(8)	Fator de conversão de substrato em produto*	$Y'_{\frac{P}{S}} = \frac{P_f - P_i}{S_i}$	$gP \ gS^{-1}$
(9)	Rendimento*	$n' = \frac{Y'_{\frac{P}{S}}}{Y_{\frac{P}{S}}_{ESTQ}} \times 100$	%
(10)	Rendimento	$n = \frac{Y_{\frac{P}{S}}}{Y_{\frac{P}{S}}_{ESTQ}} \times 100$	%
(11)	Produtividade volumétrica global	$Q_P = \frac{P_f - P_i}{t}$	$gP \ L^{-1} \ h^{-1}$

Em que: dX/dt = velocidade instantânea de crescimento celular ($g \ L^{-1} \ h^{-1}$); X = biomassa celular ($g \ L^{-1}$); P_f e P_i = Concentração final e inicial de produto ($g \ L^{-1}$), respectivamente; S_f e S_i = Concentração final e inicial de substrato ($g \ L^{-1}$), respectivamente; t = tempo (h); $Y_{P/S \ ESTQ}$ = Fator de conversão estequiométrico de substrato em produto com valor de $0,511 \ gP \ gS^{-1}$.

*Considera a quantidade inicial de substrato e não a diferença entre concentrações finais e iniciais de substrato.

4.7.3. Balanço de massa para processo em batelada e batelada alimentada

Os balanços de massa para crescimento celular (X), consumo de carboidratos (S) e produção de etanol (P) das fermentações em biorreator (batelada e batelada alimentada) foram realizados conforme descrito na sessão Apêndice A dessa dissertação. A determinação da quantidade de gás carbônico gerado durante o processo, necessária para fechamento dos balanços, foi feita através da estequiometria de reação (Eq. 12 e 13) . Foram considerados os rendimentos obtidos em cada fermentação para corrigir a massa de CO₂ gerada. Abaixo estão descritas todas as reações e cálculos de fatores de conversão.

Reação estequiométrica de formação de etanol e CO₂ a partir de xilose:



Reação estequiométrica formação de etanol e CO₂ a partir de sacarose:



Com isso, observam-se os seguintes fatores estequiométricos de conversão:

$$Y_{\text{etanol/sacarose esteq}} = 0,511 \text{ g.g}^{-1}$$

$$Y_{\text{etanol/xilose esteq}} = 0,511 \text{ g.g}^{-1}$$

$$Y_{\text{CO}_2/\text{sacarose esteq}} = 0,488 \text{ g.g}^{-1}$$

$$Y_{\text{CO}_2/\text{xilose esteq}} = 0,488 \text{ g.g}^{-1}$$

4.7.4. Análise Estatística

Para análise dos resultados obtidos e verificação de diferença estatística significativa foram feitas análises utilizando a função de Análise de dados do Excel. A análise estatística foi feita com testes Anova com fator duplo para identificar se havia diferença entre um grupo de amostras com $0,05 \leq p \leq 0,15$. Em caso de diferença identificada, foi feito Teste T para identificar quais valores diferiam entre si, com $0,05 \leq p \leq 0,15$.

5. Resultados e Discussões

5.1. ETAPA 1: Perfil de crescimento e consumo de açúcares

5.1.1. Teste de pré inóculo em diferentes substratos

Os perfis cinéticos foram construídos para as leveduras *Sc. stipitis*, *Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* recombinantes em todos os meios testados (YPD, YPX, YPDX, YPSX, Figura 19). Em todos os meios testados e para as quatro leveduras, observou-se uma fase *lag* ou de adaptação (etapas apresentadas no Apêndice B). As leveduras *S. cerevisiae* MP-C5 e MP-C5H1 recombinantes não apresentaram crescimento esperado no meio contendo somente xilose em 24 h (Figura 19 A e B). Muitos autores reportam o mesmo tipo de comportamento em leveduras recombinantes (Gonçalves et al. 2014) e Papapetridis et al. (2018) apresentaram a possibilidade de adaptação de cepas por longos períodos de incubação em xilose, a qual exerce uma pressão de seleção para aumentar a velocidade de consumo da pentose.

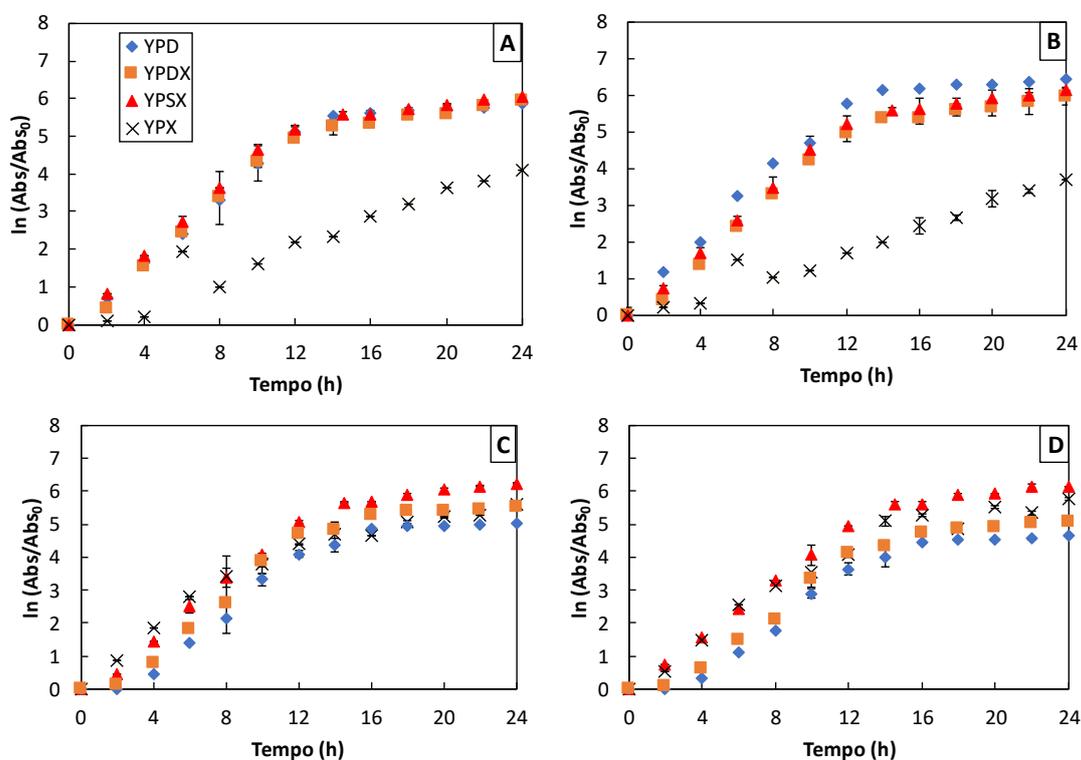


Figura 19. Perfil de $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$ versus o tempo para as leveduras na etapa de pré inóculo em meios contendo diferentes substratos. A) MP-C5; B) MP-C5H1; C) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907; D) *Sc. stipitis* NRRL Y-7124.

Como mencionado na sessão de material e métodos, espera-se como resultado desta etapa verificar a adaptação das leveduras aos meios de cultivo testados e definir o melhor meio para esta etapa. A partir dos dados das cinéticas foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) por meio do coeficiente linear da reta observada nos dados de $\ln(X/X_0)$ versus o tempo. Todos os valores estão expostos na Tabela 5.

Tabela 5. Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e X_f (concentração final de massa de células seca) obtidos na avaliação do crescimento das leveduras *Sc. stipitis*, *Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* MPC5 e MPC5 H1 recombinantes durante o pré inóculo em diferentes substratos

Levedura		Meio	μ_{\max} (h ⁻¹)*	X_f (g L ⁻¹)*
OGM	MP-C5	YPD	0,24 ^a	3,95 ^a
		YPDX	0,23 ^a	4,25 ^a
		YPX	0,07 ^b	0,8 ^b
		YPSX	0,26 ^c	5,0 ^a
	MP-C5H1	YPD	0,25 ^a	4,5 ^a
		YPDX	0,24 ^a	4,25 ^a
		YPX	0,09 ^b	0,45 ^c
		YPSX	0,28 ^d	5,1 ^a
Não convencionais	<i>Sp. passalidarum</i>	YPD	0,47 ^a	7,8 ^a
		YPDX	0,31 ^b	6,1 ^a
		YPX	0,22 ^c	6,05 ^a
		YPSX	0,49 ^a	7,8 ^a
	<i>Sc. stipitis</i>	YPD	0,21 ^c	5,6 ^b
		YPDX	0,15 ^d	5,9 ^b
		YPX	0,17 ^{cd}	4,9 ^b
		YPSX	0,37 ^e	5,2 ^b

* Análise estatística feita com testes Anova com fator duplo para identificar se havia diferença entre as amostras meios e entre as leveduras e Teste T para identificar quais diferiam entre si, com $p = 0,15$. As letras iguais identificam valores iguais estatisticamente com 85% de significância, comparando as leveduras de um mesmo grupo somente (OGM ou não convencional) e dentro de um mesmo parâmetro (X_f ou μ_{\max}).

Por meio da Tabela 5 é possível observar que todas as leveduras apresentaram maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ no meio YPSX. A concentração final de célula (X_f) também foi maior no meio YPSX para todas as leveduras, com exceção de *Sc. stipitis* em YPDX.

Analisando o melhor desempenho dentre as recombinantes, a levedura MP-C5H1 apresentou $\mu_{\text{máx}}$ superior ($0,28 \text{ h}^{-1}$ em YPSX) e, dentre as não convencionais, *Sp. passalidarum* se destacou (com valores superiores de $\mu_{\text{máx}}$ $0,49 \text{ h}^{-1}$ e X_f $7,8 \text{ g L}^{-1}$ em YPSX), sendo essas duas leveduras escolhidas para continuar os testes de escalonamento deste projeto. Como não foram encontrados dados na literatura para estas linhagens em meio de cultura contendo sacarose e xilose não foi possível realizar uma comparação.

Outro fator de destaque é que o tempo de 12 h de incubação foi selecionado para o pré-inóculo, pois, com exceção do meio YPX para recombinantes, as leveduras estavam na fase exponencial de crescimento em todos os meios testados (vide Figura 19). Portanto, após a análise dos parâmetros μ_{max} e X_f e das curvas de crescimento duas leveduras foram selecionadas para as próximas etapas e o protocolo de pré inóculo foi estabelecido em meio YPSX e incubação por 12 h.

5.1.2. Teste de inóculo em diferentes substratos

A partir dos dados obtidos no experimento de teste de inóculo, foram construídas curvas de crescimento para as cepas selecionadas na etapa anterior (*Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* MP-C5H1) em todos os meios testados (YPD, YPX, YPDX, YPSX). A Figura 20 apresenta o $\log(X/X_0)$ com o tempo. É possível notar (Figura 20) que houve diferença no perfil cinético conforme a fonte de carbono é variada, expondo a importância de avaliar os substratos e perfil cinético gerado para estabelecer o melhor protocolo de crescimento. Ressalta-se que não houve crescimento esperado em 24h para cepa *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio contendo somente xilose (Figura 20 A) e que as duas cepas (*S. cerevisiae* MP-C5H1 e *Sp. passalidarum*) atingiram maior concentração de biomassa após 24h em meio YPSX. Não foi verificada fase *lag* ou de adaptação em todas as cinéticas para ambas as leveduras, com exceção do meio YPX para levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 (Apêndice B).

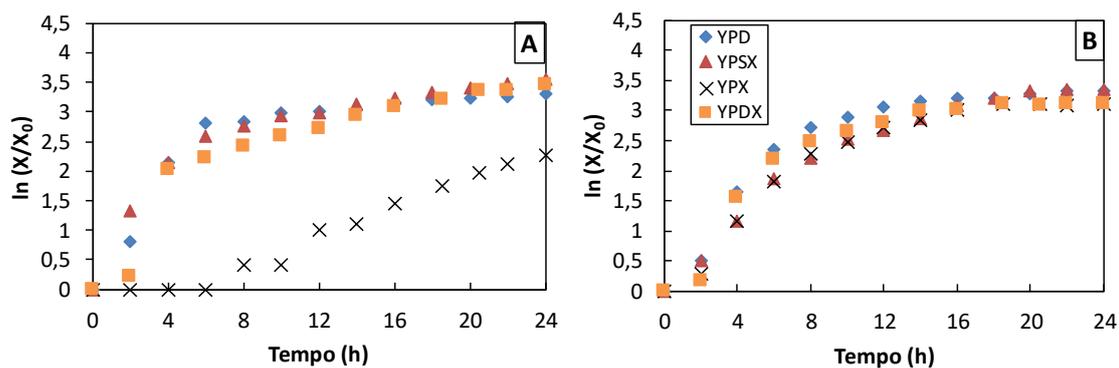


Figura 20. Cinéticas de crescimento das leveduras na etapa de inóculo para os meios YPD, YPX, YPDX, YPSX. A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante B) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907.

Além dos dados das curvas de crescimento, obteve-se também, a partir dos resultados das análises gravimétricas com a espectrofotométricas, curvas de ajuste que relacionam a concentração de células com a absorbância, possibilitando assim uma medida indireta da concentração celular a qualquer momento do experimento. Os ajustes lineares obtidos estão expostos na sessão de apêndice (Apêndice B) desse trabalho juntamente com os coeficientes de correlação.

Baseado nos parâmetros de concentração final de biomassa (X_{final}) e velocidade específica máxima de crescimento apresentados na Tabela 6, verificou-se que o meio YPSX apresentou os melhores resultados para esta etapa ($8,6 \text{ g L}^{-1}$ e 7 g L^{-1} ; μ_{max} $0,34 \text{ h}^{-1}$ e $0,32 \text{ h}^{-1}$ para *Sp. passalidarum* e MP-C5H1, respectivamente) e, por esse motivo, foi selecionado como melhor meio para etapa de inóculo para ambas as cepas testadas.

Também foram calculados os parâmetros de cinética de consumo de substrato na etapa de inóculo (cinéticas apresentadas na Figura 21 e 22) para ambas as leveduras. Para levedura não convencional *Sp. passalidarum*, foi observado repressão catabólica no meio contendo glicose e xilose (Figura 22D), uma vez que a xilose só começa a ser consumida após o esgotamento de glicose no meio de cultivo. Isso acontece porque em concentrações elevadas de glicose ocorre a inibição do transportador de pentoses da célula (FARWICK et al., 2014). Os resultados de velocidade de consumo máxima de xilose (Figura 23B) corroboram com essa repressão observada, visto que é

maior no meio contendo somente xilose (2,5 gS h⁻¹ em YPX *versus* 1,49 e 1,25 gS h⁻¹ em YPSX e YPDX, respectivamente).

Quanto ao consumo de açúcares pela levedura recombinante MP-C5H1 (Figura 21C), destaca-se o baixo consumo de xilose no meio contendo somente esse carboidrato. Os resultados de velocidade de consumo de xilose obtidos para esta levedura indicam que a presença de glicose e sacarose no meio aumentou esta velocidade de consumo de xilose (Figura 23A), sendo a maior verificada no meio YPSX ($r_{s_{max}}$ 0,79 gS h⁻¹), um valor aproximadamente 30 % maior que com meio contendo glicose (YPDX, $r_{s_{max}}$ 0,55 gS h⁻¹). A possível justificativa para esse aumento pode estar no fato da levedura não possuir um transportador específico para xilose (Gonçalves et al., 2014) e a pentose ser transportada por transportadores de hexose (HXT), havendo assim competição entre os substratos. Como no meio que contém sacarose, YPSX, a concentração de glicose (4 g L⁻¹ proveniente da inversão da sacarose) é menor que no meio YPDX (9 g L⁻¹), vê-se esse aumento na velocidade de consumo da pentose.

Tabela 6. Velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}) e X_{final} (massa seca) obtidos na avaliação do crescimento das leveduras *Sp. passalidarum* e *S. cerevisiae* MP-C5 H1 recombinante durante o inóculo em diferentes substratos

Levedura	Meio	μ_{max} (h ⁻¹)*	X_{final} (g L ⁻¹)*
MP-C5H1	YPD	0,28 ^a	5,5 ^a
	YPDX	0,21 ^b	6,4 ^b
	YPX	0,09 ^c	1,9 ^c
	YPSX	0,32 ^a	7,0 ^d
<i>Sp. passalidarum</i>	YPD	0,27 ^a	8,4 ^a
	YPDX	0,24 ^b	6,8 ^b
	YPX	0,33 ^c	6,5 ^b
	YPSX	0,34 ^c	8,6 ^a

* Análise estatística feita com testes Anova com fator duplo para identificar se havia diferença entre as amostras meios e entre as leveduras e Teste T para identificar quais diferiam entre si, com p 0,15. As letras iguais identificam amostras iguais estatisticamente com 85% de significância, comparando cada parâmetro (X ou μ_{max}) para cada levedura.

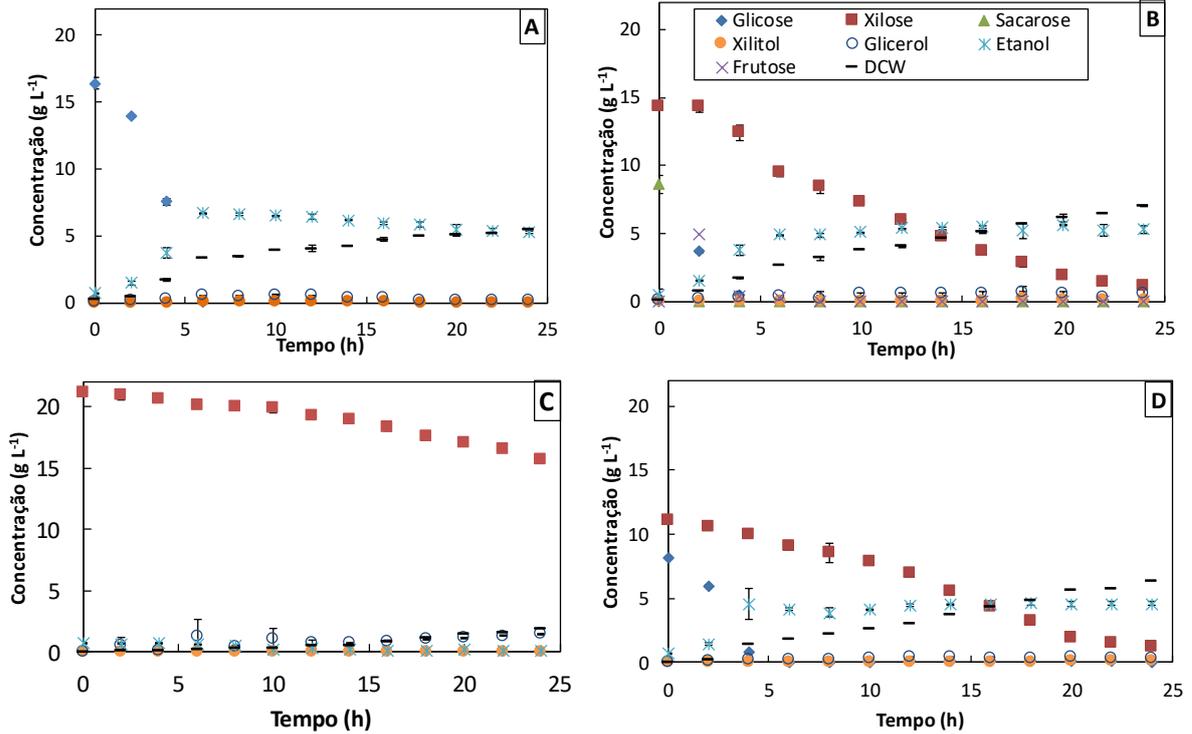


Figura 21. Cinéticas de consumo de substratos e formação de produtos durante o teste de inóculo realizado em meio (A) YPD (B) YPSX (C) YPX e (D) YPDX com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1.

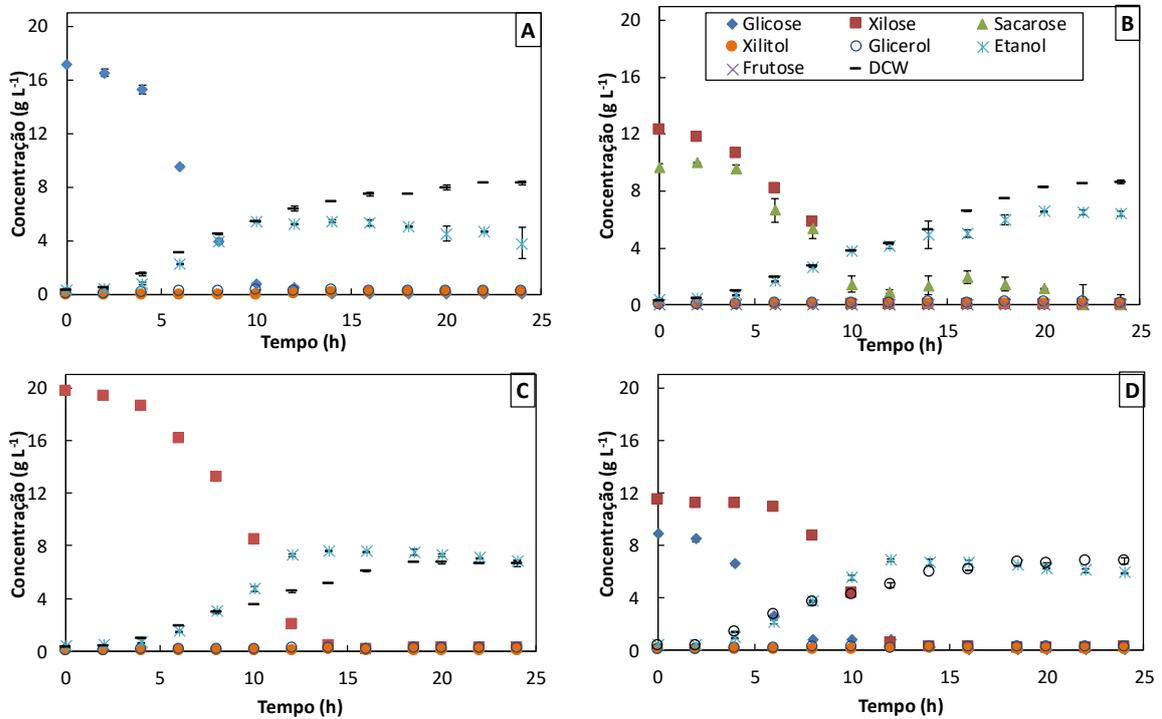


Figura 22. Cinéticas de consumo de substratos e formação de produtos durante o teste de inóculo realizado em meio (A) YPD (B) YPSX (C) YPX e (D) YPDX com a levedura *Sp. passalidarum*.

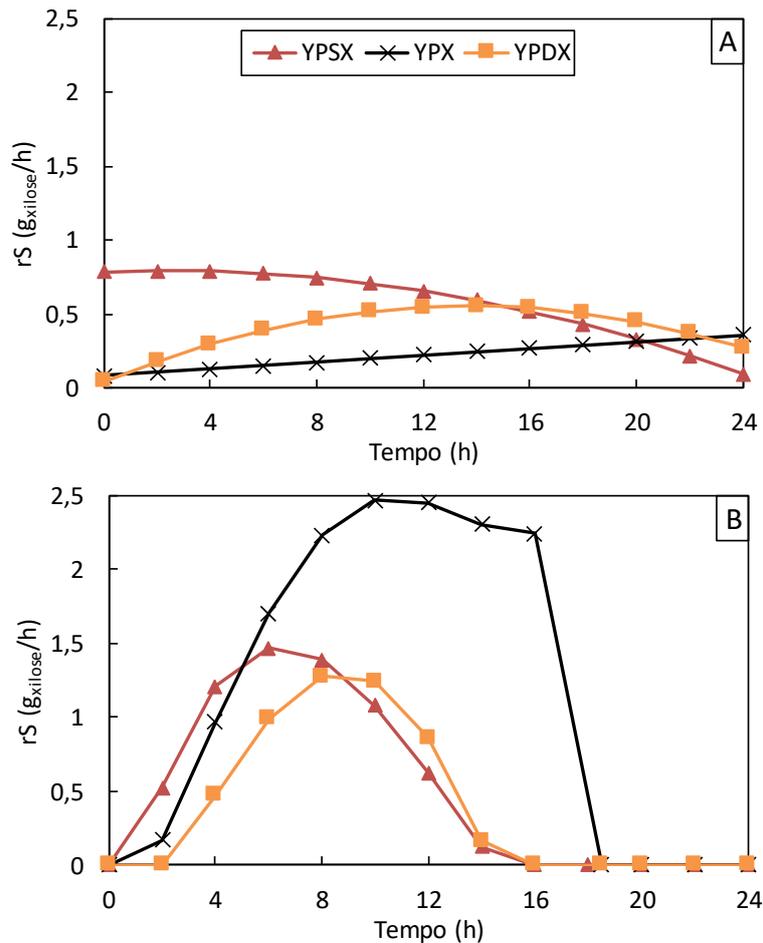


Figura 23. Velocidade de consumo de xilose pelas leveduras (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 e (B) *Sp. passalidarum* durante a etapa de inóculo em diferentes meios.

Novy et al. (2017) também encontraram dados semelhantes com leveduras *S. cerevisiae* recombinantes consumidores de xilose. A dependência do consumo específica de xilose (q_{Xilose}) pela concentração de glicose foi encontrada para a cepa progenitora de BP10001 (modificada com XR de *Candida tenuis*, XDH *Galactocandida mastotermis* e uma cópia adicional da xilulose-quinase endógena, e evoluída em laboratório por 61 gerações após engenharia evolutiva em meios contendo xilose). O resultado mostrou um aumento na velocidade de consumo específico de xilose de $0,15 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (sem glicose) para $0,30 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em concentrações de glicose abaixo de $0,3 \text{ g L}^{-1}$. Em concentrações de glicose acima de 1 g L^{-1} , no entanto, a captação de xilose diminuiu rapidamente e cessou completamente em concentrações maiores que 5 g L^{-1} . Os autores constataram ainda que a inibição por glicose em q_{Xilose} foi mais forte em meios complexos do que em fermentações

realizadas em hidrolisado (palha de trigo). A interpretação do efeito é difícil, no entanto, o resultado apoia a noção de que velocidades específicas de conversão de açúcar são manifestações complexas da fisiologia das células e fortemente dependente das condições de fermentação. Os baixos valores de transporte e consumo de xilose em *S. cerevisiae* recombinantes em meio contendo somente xilose também foi verificado por outros trabalhos (Santos, 2017; Gonçalves et al., 2014; Nijland et al., 2015). Alguns autores relatam que o fato pode estar relacionado à ubiquitinação de algumas proteínas de membrana regulada pela presença ou ausência de glicose no meio fermentativo. É sabido que, em leveduras, diversas proteínas de membrana, incluindo transportadores de açúcares, podem ser removidas da superfície celular em resposta ao excesso ou a escassez de substrato, e que, em leveduras, esse mecanismo é realizado por ubiquitinação (Finley et al., 2012). De fato, estudos recentes demonstram que o transportador Hxt1 de *S. cerevisiae*, bem como o transportador evoluído Hxt36, são retirados da membrana celular e degradados quando os níveis de glicose do meio são baixos (O'Donnell et al., 2015; Nijland et al., 2016).

5.2. ETAPA 2: Determinação da composição do meio de fermentação

5.2.1. Determinação da proporção de xilose e sacarose

Nessa etapa do trabalho, foram testadas as proporções dos açúcares sacarose e xilose selecionados como melhores fontes de carbono para as leveduras *Sp.passalidarum* e *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante que apresentaram melhor desempenho no pré-inóculo e inóculo. As proporções testadas foram 50% xilose e 50% sacarose; 70% xilose e 30% sacarose; 30% xilose e 70% sacarose; 100% xilose e 100% sacarose.

Os resultados dos parâmetros cinéticos fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$, gP gS⁻¹), consumo de substrato (%) e produtividade volumétrica de produção de etanol (Q_P , gP L⁻¹ h⁻¹) utilizados para avaliar os testes estão expostos na Tabela 7. Também foram calculados fatores de conversão de substrato em célula, porém devido ao baixo crescimento apresentado pelas leveduras nos meios de cultura, os valores não foram

decisivos para escolha de uma proporção a ser empregada no meio de fermentação nas etapas seguintes. Os gráficos com a cinética de consumo dos substratos e formação de produtos para todas as fermentações com diferentes proporções de xilose e sacarose estão todas expostas na sessão Apêndice C.

Tabela 7. Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), consumo de substrato e produtividade volumétrica de etanol (Q_p) para as leveduras *S. cerevisiae* MP-C5H1 e *Sp. passalidarum* testando diferentes proporções de substrato.

Teste*	$Y_{P/S}$ (gP gS ⁻¹)		Consumo substrato (%)		Q_p (gP L ⁻¹ h ⁻¹)	
	MP-C5H1	<i>Sp. passalidarum</i>	MP-C5H1	<i>Sp. passalidarum</i>	MP-C5H1	<i>Sp. passalidarum</i>
1	0,272±0,007	0,269±0,00	100±0,0	61,0±3,4	0,37±0,02	0,23±0,00
2	0,336±0,038	0,171±0,00	85,8±5,5	74,0±0,2	0,40±0,01	0,47±0,00
3	0,366±0,005	0,155±0,002	100±0,0	47,6±0,0	0,64±0,08	0,31±0,00
4	0,00	0,167±0,020	18,5±2,3	90,9±9,1	0,00	0,38±0,00
5	0,389±0,008	0,011±0,001	100±0,0	36,3±0,8	1,49±0,06	0,23±0,00

*Onde: (1) 50% xilose e 50% sacarose; (2) 70% xilose e 30% sacarose; (3) 30% xilose e 70% sacarose; (4) 100% xilose; (5) 100% sacarose. Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

No experimento 4 onde utilizou-se somente xilose (Tabela 7) a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante não apresentou um bom desempenho para os parâmetros analisados. Porém, nos experimentos onde xilose estava misturada com sacarose (1, 2 e 3) houve uma melhora no desempenho, provavelmente por ser um substrato facilmente assimilado por essa levedura. Já para a levedura não convencional, *Sp. passalidarum*, por consumir naturalmente xilose os testes contendo este açúcar em maior proporção (1, 2 e 4) refletem maior consumo de substrato e melhor desempenho fermentativo se comparado ao teste contendo somente sacarose (5), onde a levedura não apresentou um bom desempenho para os parâmetros analisados.

Para ambas as leveduras a proporção de 70 % de xilose e 30 % de sacarose foi escolhida para as próximas etapas. Para a levedura *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907, a escolha foi feita por apresentar maior produtividade nessa composição, além de maior consumo de substrato (em porcentagem) nos testes de integração dos açúcares (1, 2 e 3). Já a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante apresentou valores superiores de fator de conversão de substrato em etanol e produtividade em testes com composição contendo maior teor de sacarose, o que era esperado visto que o substrato é facilmente assimilado pela levedura e tradicionalmente utilizado em fermentações com essa espécie. Para manter a proposta de produção de E2G, analisamos os melhores resultados encontrados nos testes 1 e 2. Assim, no teste 2 (com 70% de xilose e 30% de sacarose), obteve-se os melhores resultados de fator de conversão e de produtividade global de etanol.

Um resultado relevante, encontrado nos testes de fermentação em frasco, foi o consumo de sacarose pela levedura não convencional *Sp. passalidarum* no processo fermentativo. Como mencionado na revisão dessa dissertação, não existem dados reportados até o momento sobre as características específicas de transporte e da invertase dessa levedura em condições de fermentação, somente para o processo de propagação (Bonan, 2018), em que *Sp. passalidarum* foi capaz de consumir sacarose na presença de excesso de oxigênio dissolvido no meio e utilizá-la para crescimento celular. O consumo de sacarose na fermentação em frascos foi baixo por esta levedura (consumo máximo de 36% em relação à concentração inicial no meio no teste contendo somente sacarose), se comparado ao consumo de xilose (com consumo variando de 90% a 100%). Na Figura 24 é possível observar os dados de consumo de sacarose pelas duas leveduras (não-convencional e recombinante) para todos os testes de proporção realizados. Como vemos no gráfico de cinética das fermentações (Figura 24 A), a levedura recombinante apresentou inversão da sacarose nos momento iniciais da fermentação, característica peculiar de leveduras *S. cerevisiae* CAT-1 que possuem atividade de invertase predominantemente extracelular (Basso et al. 2011; Marques et al., 2017) e clivam a molécula de sacarose em monômeros (glicose e frutose). Já para a levedura não convencional (Figura 24 B) observa-se que o consumo da sacarose foi lento e houve sacarose residual nas fermentações.

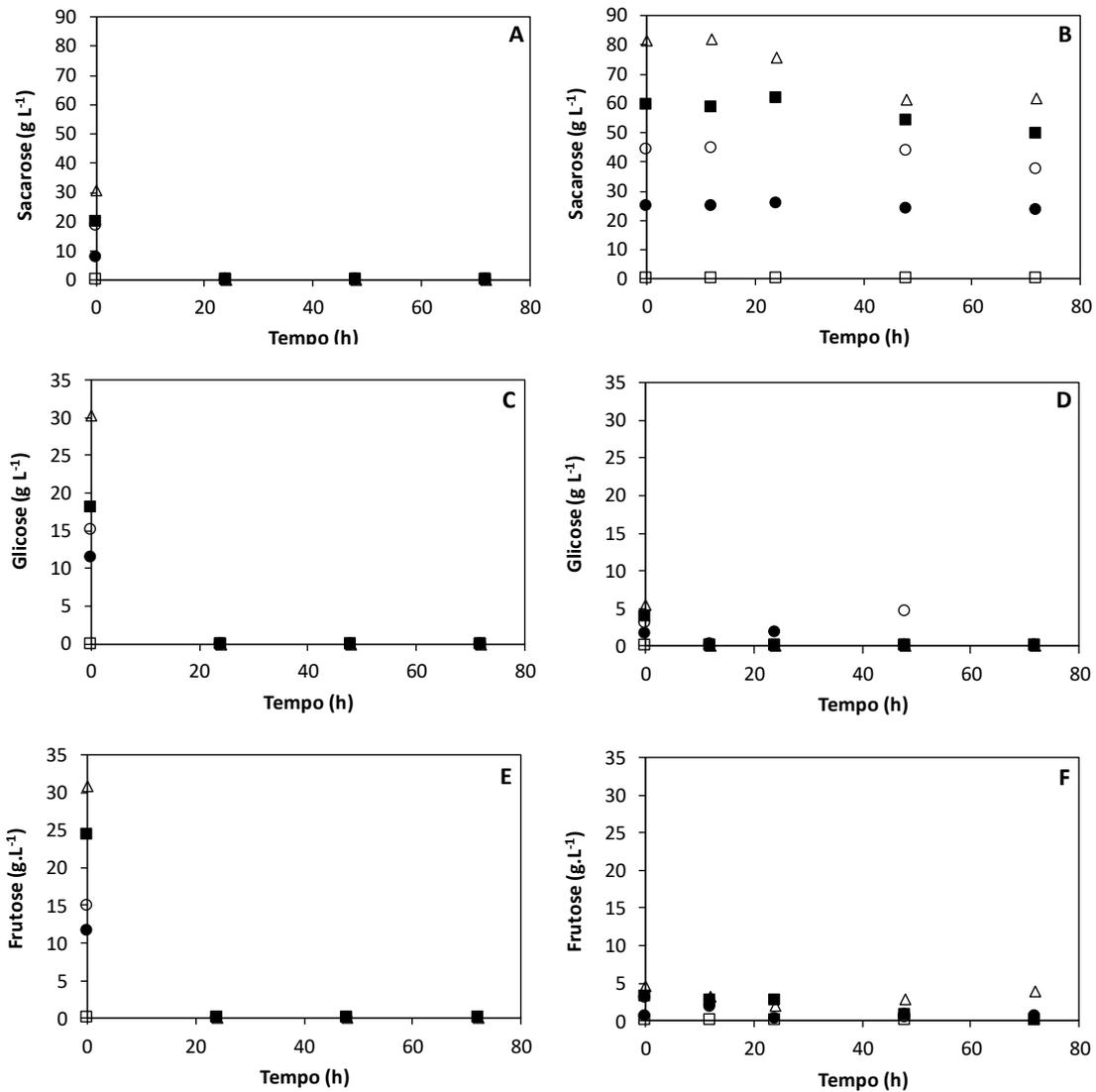


Figura 24. Dados de concentração de sacarose, frutose e glicose ao longo do tempo nas fermentações em frasco com (A, C e E) *S. cerevisiae* MP-C5H1 e (B, D e F) *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907. Teste 1 (○), 2 (●), 3 (■), 4 (□), 5 (△), onde: (1) 50% xilose e 50% sacarose; (2) 70% xilose e 30% sacarose; (3) 30% xilose e 70% sacarose; (4) 100% xilose; (5) 100% sacarose.

O baixo consumo de sacarose pela levedura não-convencional durante a fermentação pode estar relacionado ao balanço energético da célula em condições de anaerobiose ou microaerofilia. O perfil de consumo de sacarose obtido neste estudo durante a etapa de inóculo (exposto na Figura 22B) corrobora com essa afirmação, visto que toda a sacarose contida no meio YPSX (10 g L⁻¹) foi consumida em 24 h, sob condições de rotação maior e, portanto, maior aeração. Isso pode se justificar pelo transporte ativo da

molécula de sacarose pela membrana. Dados de literatura reportam esse tipo de transporte em algumas espécies de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa* (Basso et al., 2011), através do mecanismo próton simporter, onde a molécula de sacarose atravessa a membrana juntamente com um próton H^+ . Para que não haja acidificação do citoplasma, a célula expulsa o próton pela ação da ATPase de membrana, gastando assim 1 ATP (Stambuk et al., 2000).

Os dados obtidos também demonstram (Figura 25 B) que essa levedura não convencional assimila a sacarose preferencialmente para crescimento e, conforme se aumenta o teor de sacarose no meio, os fatores de conversão de substrato em célula e de velocidade específica máxima de crescimento também aumentam. Estes resultados corroboram com trabalhos de literatura que utilizam xarope de cana de açúcar para propagação dessa levedura como Nakanishi et al. (2017), Bonan (2018) e Soares (2018). Para levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 (Figura 25 A) vemos que não há variação no fator de conversão de substrato em células, porém vê-se um aumento na velocidade específica de crescimento conforme se aumenta a concentração de sacarose no meio.

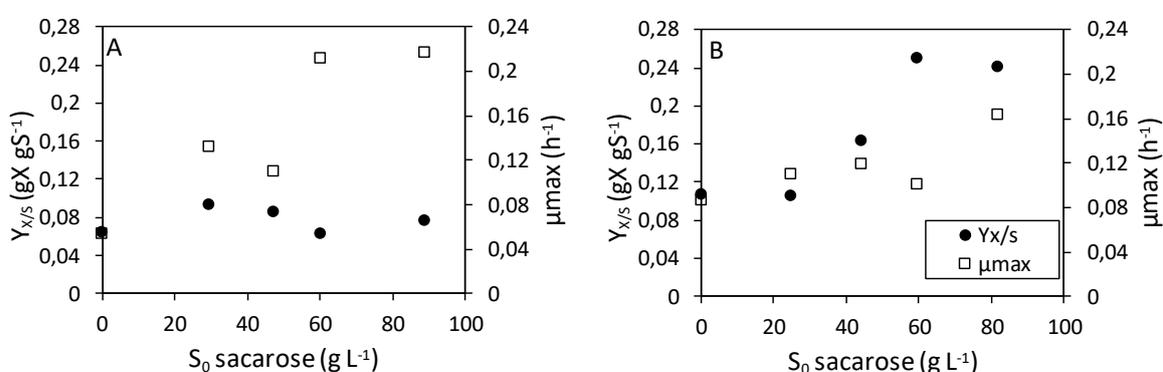


Figura 25. Relação entre a concentração inicial de sacarose e o fator de conversão de substrato em células $Y_{x/s}$ (●) e os valores de $\mu_{máx}$ (□), obtidos na fermentações em frasco variando a proporção entre xilose e sacarose no meio, com (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907.

5.2.2. Determinação de concentração inicial de substrato

Com a definição da proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose estabelecida no experimento anterior, foram realizados testes de fermentação

em frascos agitados variando a concentração inicial de substrato (S_0) em 30, 60, 90, 120, 150 e 180g L⁻¹ como foi descrito no item 4.3.2. Os resultados dos parâmetros calculados em cada fermentação para as leveduras recombinante e não convencional estão expostos nas Tabela 8 e 9, respectivamente. Todas as cinéticas de fermentação estão expostas na sessão Apêndice D.

Tabela 8. Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), título de etanol, rendimento global (η'), consumo de substrato, produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e velocidade máxima de formação de etanol (dP/dt) para levedura MP-C5H1 testando diferentes concentrações iniciais de substrato.

Teste*	$Y_{P/S}$ (gP gS ⁻¹)**	Título de etanol (g L ⁻¹)	Consumo substrato (%)	η' (%)	Q_p *** (gP L ⁻¹ h ⁻¹)	dP/dt maximo (gP h ⁻¹)
6	0,145±0,051	7,35±0,01	100	28,1±9,8	0,09±0,04	0,23
7	0,238±0,025	17,49±0,31	100	46,11±4,9	0,22±0,02	0,78
8	0,336±0,038	28,47±0,49	85,9	56,6±1,9	0,40±0,01	0,99
9	0,304±0,013	30,12±2,59	71,5	41,9±4,8	0,41±0,04	1,50
10	0,340±0,052	29,86±1,86	52,5	34,3±3,7	0,41±0,04	2,31
11	0,262±0,068	31,62±0,302	54,6	29,3±1,5	0,66±0,03	2,27

*Onde: (6) 30 g L⁻¹; (7) 60 g L⁻¹; (8) 90 g L⁻¹; (9) 120 g L⁻¹; (10) 150 g L⁻¹; (11) 180 g L⁻¹.

Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

**Calculado nos tempos onde se esgotava os substratos, e de 8 a 11 no tempo final pois existe uma concentração residual de açúcar.

***Calculado no ponto de máximo título de etanol

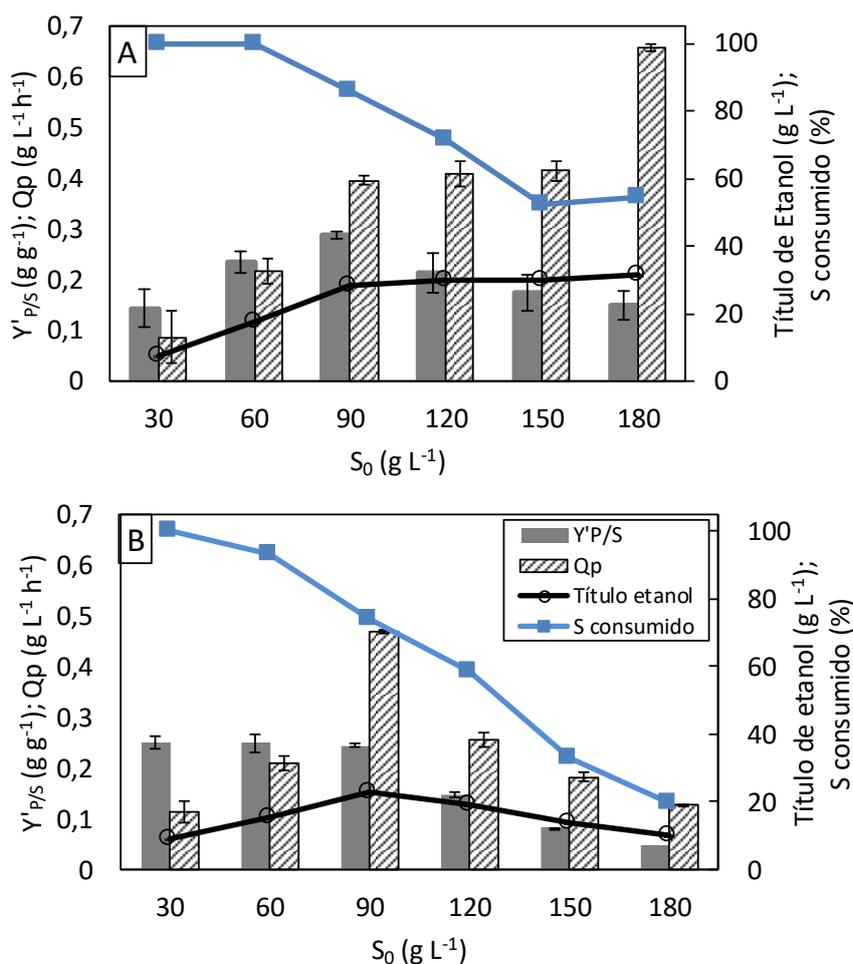


Figura 26. Dados de $Y'_{P/S}$, Q_p , título de etanol e consumo de substrato em todas fermentações com diferentes concentrações iniciais de substrato. (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante; (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y27907.

Avaliando o desempenho fermentativo da levedura recombinante *S. cerevisiae* MP-C5H1 (Tabela 8 e Figura 26A), podemos constatar que a concentração inicial de 90 g L⁻¹ apresentou os melhores resultados para os parâmetros $Y_{P/S}$ e η' (%). Já para o parâmetro consumo de substratos as concentrações iniciais de 30 e 60 g L⁻¹ (6 e 7, Tabela 8) apresentaram os melhores resultados. Para o parâmetro Q_p , a concentração de 180 g L⁻¹ apresentou os melhores resultados, uma vez que esta fermentação possuía a maior concentração de substrato inicial. Como o intuito da fermentação é a produção de etanol, os parâmetros η' e Q_p têm grande influência na avaliação do processo. Nesse sentido, a concentração substrato inicial de 90 g L⁻¹ foi selecionada para a composição do meio de fermentação nas próximas etapas por apresentar maior rendimento (56,6 %) e maior valor de $Y'_{P/S}$ (0,336 g g⁻¹)

além de valores de consumo de substrato (85,9 %) e produtividade em etanol elevados. A Figura 26 A demonstra graficamente esses resultados.

Para levedura *Sp. passalidarum* (resultados apresentados na Tabela 9 e Figura 26B), o maior valor de fator de conversão de substrato em etanol e rendimento foi obtido na concentração de 30 g L⁻¹ (Tabela 9) onde também se obteve o maior consumo de substrato (100 %). Os parâmetros demonstram que na concentração de 90 g L⁻¹ (Tabela 9) obteve-se maior produtividade em etanol (0,47 g L⁻¹ h⁻¹), maior título de etanol (22 g L⁻¹), além de rendimento entre os maiores obtidos e consumo de substrato elevado. Na figura 26B fica clara a escolha da concentração de 90 g L⁻¹ para essa levedura.

Tabela 9. Dados de fatores de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), título de etanol, rendimento global (η'), consumo de substrato, produtividade volumétrica de etanol (Q_p) e velocidade máxima de formação de etanol (dP/dt) para levedura *Sp. passalidarum* NRRL -Y27907 testando diferentes concentrações iniciais de substrato.

Teste*	$Y_{P/S}^{**}$	Título	Consumo	η' (%)	Q_p^{***}	dP/dt
	(gP gS ⁻¹)	etanol (g L ⁻¹)	substrato (%)		(gP L ⁻¹ h ⁻¹)	Maximo (gP L ⁻¹ h ⁻¹)
6	0,305±0,014	8,88±0,51	100	48,8±2,7	0,14±0,02	0,73
7	0,267±0,021	15,61±0,51	92,9	48,6±3,5	0,21±0,01	0,87
8	0,171±0,001	22,75±0,04	74,0	47,6±0,7	0,47±0,00	0,63
9	0,250±0,014	18,97±0,71	58,3	28,6±0,7	0,26±0,01	0,52
10	0,244±0,005	13,73±0,52	33,2	15,9±0,9	0,18±0,01	0,41
11	0,233±0,041	9,94±0,07	19,9	9,2±0,2	0,13±0,00	0,40

*Onde: (6) 30 g L⁻¹; (7) 60 g L⁻¹; (8) 90 g L⁻¹; (9) 120 g L⁻¹; (10) 150 g L⁻¹; (11) 180 g L⁻¹.

Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

**Calculado nos tempos onde se esgotava o substrato, e de 7 a 11 no tempo final pois existe uma concentração residual de açúcar.

***Calculado no ponto de máximo título de etanol

Os valores de fator de conversão de substrato em célula (dados não apresentados) confirmam as diferenças das leveduras quanto ao Efeito *Crabtree*. Para *Sp. passalidarum*, uma levedura *Crabtree* negativa, não se verificou variação considerável nos valores de $Y_{X/S}$ (mínimo de 0,11 e máximo

de 0,27 g g⁻¹ nas concentrações de 90 e 30 g L⁻¹ respectivamente), uma vez que a concentração inicial de substrato parece não induzir repressão em seu metabolismo oxidativo e na produção de células. Já a levedura *S. cerevisiae* é Crabtree positiva e sofre repressão por altas concentrações de substrato e isso refletiu na diminuição dos valores de Y_{X/S} conforme se aumenta a concentração inicial de substrato (máximo de 0,22 g g⁻¹ na concentração de 30 g L⁻¹, e mínimo de 0,03 g g⁻¹ na concentração de 180 g L⁻¹). Para uma melhor compreensão destas características é possível verificar as curvas de crescimento expostas na sessão Apêndice D, Figura D3.

A levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante apresentou melhores resultados de rendimento na concentração de 90 g L⁻¹ e proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose, selecionada para ambas as leveduras como a composição ideal de substrato (Figura 27) e, portanto foi a levedura selecionada para continuar o escalonamento nas próximas etapas em biorreator. Além disso, como o intuito de um escalonamento é chegar em escalas maiores e processos industriais, é válido salientar que, em concentrações acima de 90 g L⁻¹ (Figura 27), o desempenho fermentativo da levedura não convencional foi bastante inferior ao da recombinante em produtividade volumétrica global de etanol. Isso corrobora com a escolha da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante, visto que o processo industrial de produção de etanol é operado de forma intensificada, com elevadas concentrações de substrato sendo alimentadas no biorreator, pois o gasto energético e de operação precisa compensar os títulos obtidos ao fim do processo de fermentação (Schmidell, 2001).

Apesar do desempenho inferior de *Sp. passalidarum* nas fermentações em frascos agitados (item 5.2), é importante ressaltar o potencial desta levedura para o consumo de xilose. Isso porque *Sp. passalidarum* apresentou produtividade maior que a levedura recombinante na concentração de 90 g L⁻¹ (Figura 27) e, também, porque o consumo de xilose por essa levedura e produção de etanol é bastante elevado como demonstra o resultado obtido no teste de proporção na condição de 100 % de xilose (cerca de 90 % de consumo de substrato e produtividade de 0,38 g L⁻¹ h⁻¹). No entanto, para o consumo de sacarose durante a fermentação essa levedura não apresentou resultados satisfatórios, porém é válido ressaltar que sejam avaliadas outras

condições de fermentação em trabalhos futuros. Com os resultados descritos até então na literatura (Bonan, 2018; Rodrussamee et al., 2018; Nakanishi et al., 2017; Long et al., 2012; Souza et al., 2018; Cadete et al., 2013) pode-se afirmar que a estratégia de co-fermentação com glicose na presença de ar seja a melhor proposta para levedura *Sp. passalidarum*.

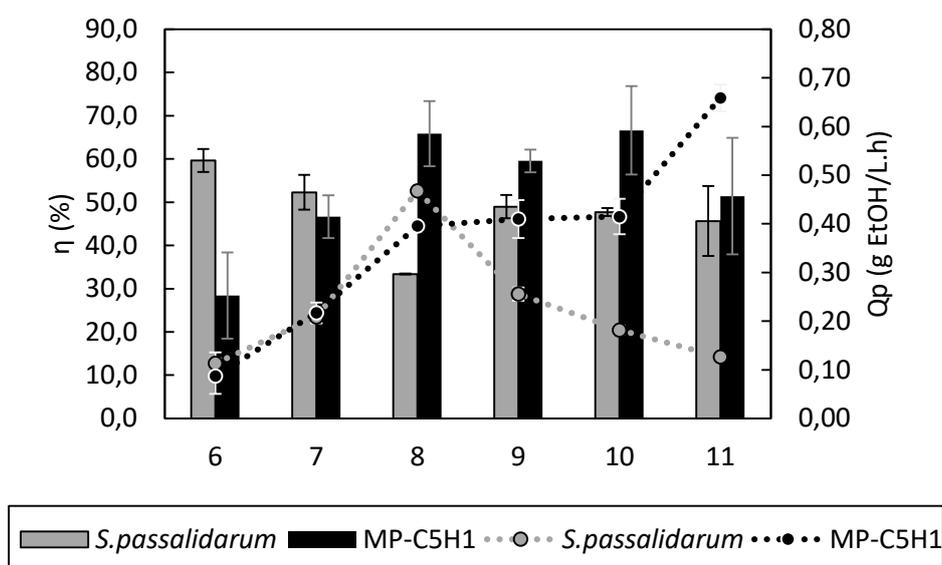


Figura 27. Dados de rendimento (barras) e produtividade global em etanol (linha pontilhada) para testes de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato para as leveduras *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante e *Sp. passalidarum* NRRL Y27907. Onde: (6) 30 g L⁻¹; (7) 60 g L⁻¹; (8) 90 g L⁻¹; (9) 120 g L⁻¹; (10) 150 g L⁻¹; (11) 180 g L⁻¹.

*Os rendimentos foram calculados nos tempos onde se esgotava o substrato nas fermentações e no tempo final nos testes onde existe uma concentração residual de açúcar. A produtividade foi calculada no ponto de máximo título de etanol.

Os resultados obtidos nos testes de proporção (item 5.2.1, Tabela 7) também demonstram que, em todos parâmetros calculados, o desempenho da levedura recombinante nas misturas de xilose e sacarose é bastante superior ao desempenho da levedura não convencional na fermentação com xilose como único substrato. Isso reforça a conclusão de que nesta proposta de integração a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 possui melhor desempenho.

5.3. ETAPA 3: Fermentação em biorreator

5.3.1. Propagação

Como descrito na sessão de materiais a métodos, o crescimento da levedura selecionada foi estudado por meio de uma estratégia com duas fases: uma fase inicial do crescimento em glicose, seguida de uma segunda fase em que se alimentou glicose de forma contínua para estabelecer o crescimento linear da levedura e ter um maior controle sobre o metabolismo respiratório. Ambas as fases foram conduzidas sob condições de aeração.

Para análise e comparação dos resultados obtidos em cada cultivo foram calculados parâmetro como velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$, Equação 2), consumo de substrato e produção de massa de células, além do fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e produtividade volumétrica global em células (Q_x). Os resultados estão expostos na Tabela 10 e as cinéticas de consumo e produção de célula são apresentadas na Figura 28.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos das propagações com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em biorreator com meio contendo glicose como substrato

Experimento	$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	Glicose consumida (g)	Biomassa produzida (g)	$Y_{X/S}$ (gX gS ⁻¹)	Q_x (g L ⁻¹ h ⁻¹)
A	0,23	55,61	8,80±1,15	0,14±0,002	0,58±0,00
B	0,32	324,98	51,61±0,19	0,16±0,01	0,56±0,00
C	0,46	227,74	89,38±0,55	0,39±0,00	1,01±0,00

Observando os parâmetros apresentados, vemos que foi possível obter um protocolo otimizado, visto que no cultivo (C) temos valores superiores de $\mu_{\text{máx}}$ (aumento de 0,23 para 0,46 h⁻¹), biomassa produzida (de 8,80 para 89,38 g L⁻¹), $Y_{X/S}$ (0,14 para 0,39 g g⁻¹) e Q_x (de 0,58 para 1,01 g L⁻¹ h⁻¹).

Nas cinéticas (Figura 28), podemos verificar que em todos os cultivos houve produção de etanol. Postma et al. (1988) afirmaram que *S. cerevisiae* pode fermentar glicose ou etanol sobre condições anaeróbias, onde estas são

as únicas fontes possíveis de energia. Já sobre condições aeróbias, ocorre preferencialmente a respiração podendo, no entanto, ocorrer fermentação alcoólica mesmo diante da presença de oxigênio (aerobiose). Originalmente, este desvio no metabolismo para a via fermentativa em condições aeróbias é promovido pela repressão por glicose, pois, diante da presença de elevadas concentrações residuais de glicose ocorre uma diminuição progressiva na velocidade específica de consumo de O_2 (Q_{O_2}), acompanhado pela degradação dos componentes da via respiratória e repressão das diversas enzimas que atuam no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

Observando a Figura 28A, podemos verificar que a concentração final de biomassa seca da levedura foi de $14,05 \text{ g L}^{-1}$. Na Figura 28A ainda é possível observar ao final do cultivo a presença de 20 g L^{-1} de etanol, o que não foi observado nas demais propagações (ausente no cultivo B e $3,2 \text{ g L}^{-1}$ no cultivo C). Baixos valores de $\mu_{\text{máx}}$ foram obtidos na estratégia de propagação A ($0,23 \text{ h}^{-1}$, Tabela 10) comparado as demais propagações ($0,32$ e $0,46 \text{ h}^{-1}$ para as estratégias de propagação B e C, respectivamente) provavelmente devido a falta de nutrientes uma vez que este meio não continha extrato de levedura. De acordo com a Figura 28A ainda é possível verificar que a concentração de células no início da alimentação é aproximadamente metade da concentração de células dos outros dois cultivos, Figuras 28B e C, nesse mesmo momento, e pode-se supor que, como a velocidade de alimentação de açúcar foi igual para todos os cultivos, nesse gerou um desvio no metabolismo para a via fermentativa em condições aeróbias, promovido pela repressão por glicose e falta de nitrogênio.

Para o cultivo (B) corrigimos o meio utilizado tanto na etapa de batelada quanto o meio de alimentação, porém os resultados obtidos na produção de célula não foram satisfatórios com o esperado ($X_f 13,5 \text{ g L}^{-1}$). Isso porque houve esgotamento da glicose com 4h de batelada, como consequência da melhora da composição meio, inclusive obtendo maiores valores de $\mu_{\text{máx}}$ ($0,32 \text{ h}^{-1}$, Tabela 10) e de $Y_{X/S}$ ($0,16 \text{ g g}^{-1}$, Tabela 10). Como consequência desse esgotamento e do início da alimentação somente com 10h de cultivo (segundo protocolo e resultado do cultivo anterior) não se verificou crescimento significativo na etapa de alimentação como esperado, com aumento da concentração em somente 1 g L^{-1} .

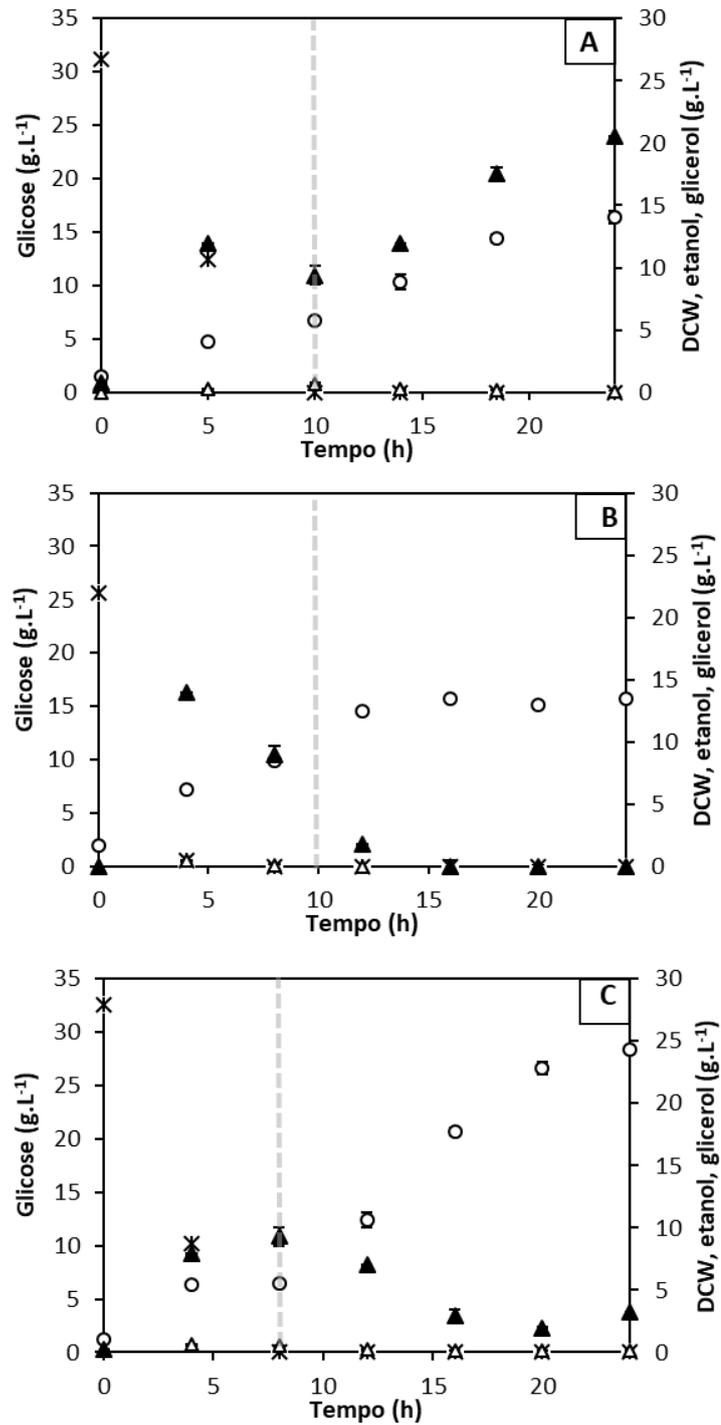


Figura 28. Cinéticas de crescimento, consumo de glicose e formação de produto durante as propagações com protocolos A, B e C realizadas com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, onde os triângulos preenchidos representam etanol, círculos vazados DCW (*Dry cell weight*, massa seca), triângulos vazados glicerol, e (x) representa glicose. A linha tracejada indica o momento do início da alimentação contínua de glicose.

O protocolo foi então corrigido e a batelada reduzida para 8h, com pulso de ureia e KH_2PO_4 e início da fase de alimentação que durou 16h. Com isso, obteve-se um protocolo otimizado, com um aumento no valor de $Y_{X/S}$ de 0,14 para $0,39 \text{ g g}^{-1}$, dez vezes mais células produzidas (8,80 para 89 g de célula aproximadamente) e quase dobrando a produtividade em células ($0,56$ para $1,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Miguel (2006) obteve produtividade celular (Q_x) no cultivo de *S. cerevisiae* utilizando melaço de cana de açúcar em processo descontínuo de $0,31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ enquanto que a obtida para processo descontínuo-alimentado foi de $2,33 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, implicando num aumento considerável da concentração de biomassa resultante graças à redução de prováveis efeitos inibitórios que estariam presentes durante o cultivo descontínuo. Encontramos um resultado intermediário de produtividade em célula ($1,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) utilizando um protocolo com uma fase batelada e outra com alimentação de substrato.

Santos et al. (2016) obtiveram fator de conversão de substrato em célula de $0,52 \text{ g g}^{-1}$ e produtividade em célula de $1,91 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ utilizando xarope de cana para crescimento de *Sc. stipitis* utilizando o protocolo que usamos como referência. O resultado é superior aos encontrados para propagação da levedura MP-C5H1 nesse trabalho utilizando protocolo (C) otimizado (fato de conversão de $0,39 \text{ g g}^{-1}$ e produtividade em célula $1,01 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Vale salientar que eram esperados resultados inferiores de crescimento para levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante se comparados às cepas não convencionais, devido aos resultados obtidos nas cinéticas de pré inóculo e inóculo desse trabalho. Além disso, por ser uma levedura respiro-fermentativa e *Crabtree* positivo, sempre haverá formação de etanol mesmo em cultivos aerados e isso implica em rendimentos em produção de célula inferiores aos encontrados para levedura, além de ocorrer variação metabólica conforme se varia a concentração inicial de açúcar (como demonstram os dados obtidos no item 5.2.2 onde dobrou o valor de $Y_{P/S}$ e reduziu pela metade $Y_{X/S}$ quando S_0 foi de 30 para 60 g L^{-1}).

Nesse sentido, é necessário observar-se que este tipo de cultivo necessita de uma análise prévia do microrganismo, do que é necessário para o seu crescimento e conhecer sua fisiologia. Também é necessário conhecer a técnica de operação para definição e desenvolvimento do processo. Nesse

sentido, o presente trabalho é o primeiro a propor um método de propagação intenso para a *S. cerevisiae* recombinante em biorreatores usando um processo simples e rápido em batelada seguido pelo processo em batelada alimentada (24 h resultou em 89,4 g de peso seco de célula) em uma tentativa para atingir concentrações elevadas de biomassa de levedura.

5.3.2. Fermentações em batelada

Após estabelecer o protocolo de crescimento na etapa de pré inóculo, inóculo, propagação, e também estabelecer a composição em carboidratos do meio de fermentação (proporção e concentração inicial do açúcares selecionados) e selecionar a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante (Figura 29) partiu-se para o aumento de escala no processo fermentativo.

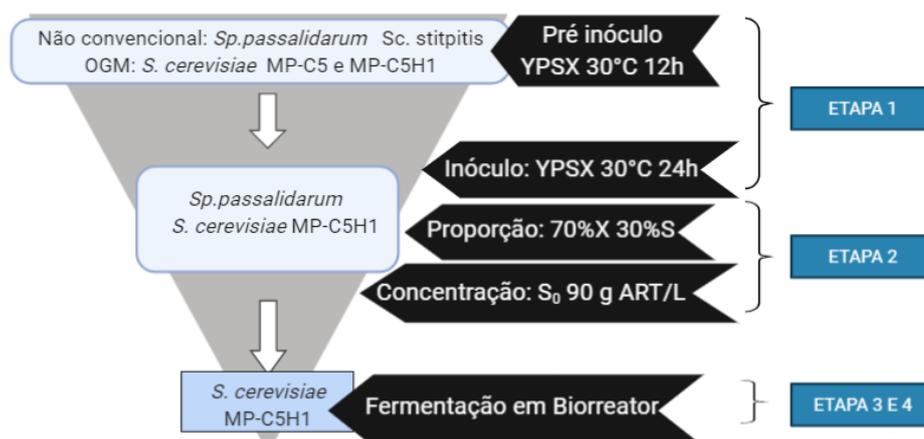


Figura 29. Resumo das etapas e resultados obtidos antes da etapa de fermentação em reator.

Foram feitas três fermentações em duplicata em modo batelada com diferentes concentrações iniciais de célula: 0,76; 10,95 e 30,25 g L⁻¹. Os resultados dos parâmetros obtidos estão expostos na Tabela 11 e as cinéticas de consumo de substrato e formação de produto estão expostas na Figura 30.

Outro importante parâmetro monitorado em todas as amostragens foi a porcentagem de células viáveis. As viabilidades mínimas encontradas nos experimentos foram de 93% para fermentação B1, 94% para B2 e 98% em B3.

Na Tabela 11 é possível verificar um aumento no consumo de xilose concomitante ao aumento da concentração inicial de células, justificado pelo

aumento da quantidade de células nos cultivos em maior densidade celular. Além disso, o título de etanol e a produtividade também aumentaram significativamente (de 18,2 para 53,7 g L⁻¹ e de 0,75 para 2,24 g L⁻¹ h⁻¹ respectivamente), atingindo valores próximos ao reportado em bateladas de E1G. Sonogo (2016) obteve produtividade de 2,66 g L⁻¹ h⁻¹ de etanol fermentando sacarose com *S. cerevisiae* Y-904 em produção extrativa de etanol, por exemplo.

Tabela 11. Parâmetros de consumo de xilose, título, produtividade global e rendimento em etanol, fatores de conversão de substrato em produto (etanol, xilitol e glicerol), obtidos na fermentações em reator com *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante em meio rico com diferentes concentrações iniciais de biomassa (X_0)

Experimento*	Consumo de xilose (g L ⁻¹ h ⁻¹)	Título etanol (g L ⁻¹)	η (%)	$Y_{\text{etanol/S}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{xilitol/S}}$ (g g ⁻¹)	$Y_{\text{glicerol/S}}$ (g g ⁻¹)	Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)
B1	1,29±0,02	18,2±0,0	43±0	0,23±0,00	0,07±0,00	0,09±0,01	0,75±0,00
B2	2,61±0,02	49,5±0,4	85±2	0,43±0,01	0,16±0,00	0,10±0,00	1,71±0,00
B3	4,36±0,03	53,7±0,8	93±1	0,48±0,00	0,09±0,00	0,11±0,00	2,24±0,00

*Onde X_0 : (B1) 0,76 g L⁻¹; (B2) 10,95 g L⁻¹ e (B3) 30,25 g L⁻¹.

A estratégia de aumento da concentração de células no meio, intensificando o processo, é descrita por diversos autores. Westman e Franzén (2015) afirmaram que pode-se esperar que os processos em alta densidade celular sejam parte integrante de qualquer processo de produção bioquímico bem-sucedido, usando matérias-primas agrícolas contendo açúcar e amido, bem como matérias-primas lignocelulósicas.

Soares (2018) também utilizou a estratégia de aumento da concentração inicial de células como estratégia para uso de hidrolisados contendo inibidores. Foram avaliadas fermentações com *Sc. stipitis* e *Sp. passalidarum* em meio contendo 70% de xilose e 30% de glicose (S_0 90 g L⁻¹) e também inibidores (2,07 g L⁻¹ ácido acético, 0,06 g L⁻¹ HMF, 0,15 g L⁻¹ furfural, 0,42 g L⁻¹ vanilina) nas concentrações que simulam hidrolisados de bagaço de cana de açúcar. Ao testar as concentrações de 5, 15 e 30 g L⁻¹ de células, constatou-se que o aumento na concentração inicial de células no processo influencia

positivamente o uso de hidrolisados contendo inibidor, uma vez que os meios fermentativos considerados não fermentescíveis tornaram-se viáveis para fermentações quando foram utilizadas densidades celulares elevadas. Comparando os dados das fermentações com X_0 5 g L⁻¹ e 30 g L⁻¹, para a levedura *Sc. stipitis*, o rendimento em etanol passou de 40,7 para 56,40% e a produtividade global de etanol (Qp) de 0,05 para 0,18 g L⁻¹ h⁻¹; já para *Sp. passalidarum* o rendimento foi de 55,5 para 72,42 % e Qp de 0,13 para 0,70 g L⁻¹ h⁻¹.

Pode-se comparar os resultados e propostas dessa etapa do projeto também com o processo de produção utilizado atualmente nas usinas 1G. Como descrito na revisão bibliográfica dessa dissertação, o processo Melle-Boinot empregado em 80% das destilarias nacionais utiliza 30-40 g L⁻¹ de levedura seca, com dois ciclos por dia e 250 dias de operação, utilizando caldo e melaço de cana de açúcar como substrato e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* com viabilidade entre 90 e 80 % (Basso et al, 2011). Nesse sentido, a estratégia empregada (fermentação em alta densidade celular com X_0 30 g L⁻¹) e os resultados obtidos (viabilidade mínima de 93%) corroboram com os processos atualmente praticados pelas usinas.

Verifica-se que em todas as fermentações (Figura 30) houve formação de quantidade considerável de glicerol (8,13; 11,64; 11,75 g L⁻¹ em B1, B2 e B3 respectivamente), o que influencia diretamente nos rendimentos das fermentações em etanol. Em *S. cerevisiae*, o glicerol atua na proteção da célula contra lise em condições extracelulares com alta concentração osmótica (Guo et al., 2011), o que é extremamente importante e relevante em fermentações em batelada com altas concentrações de substrato. Isso justifica a formação de glicerol durante todas as bateladas.

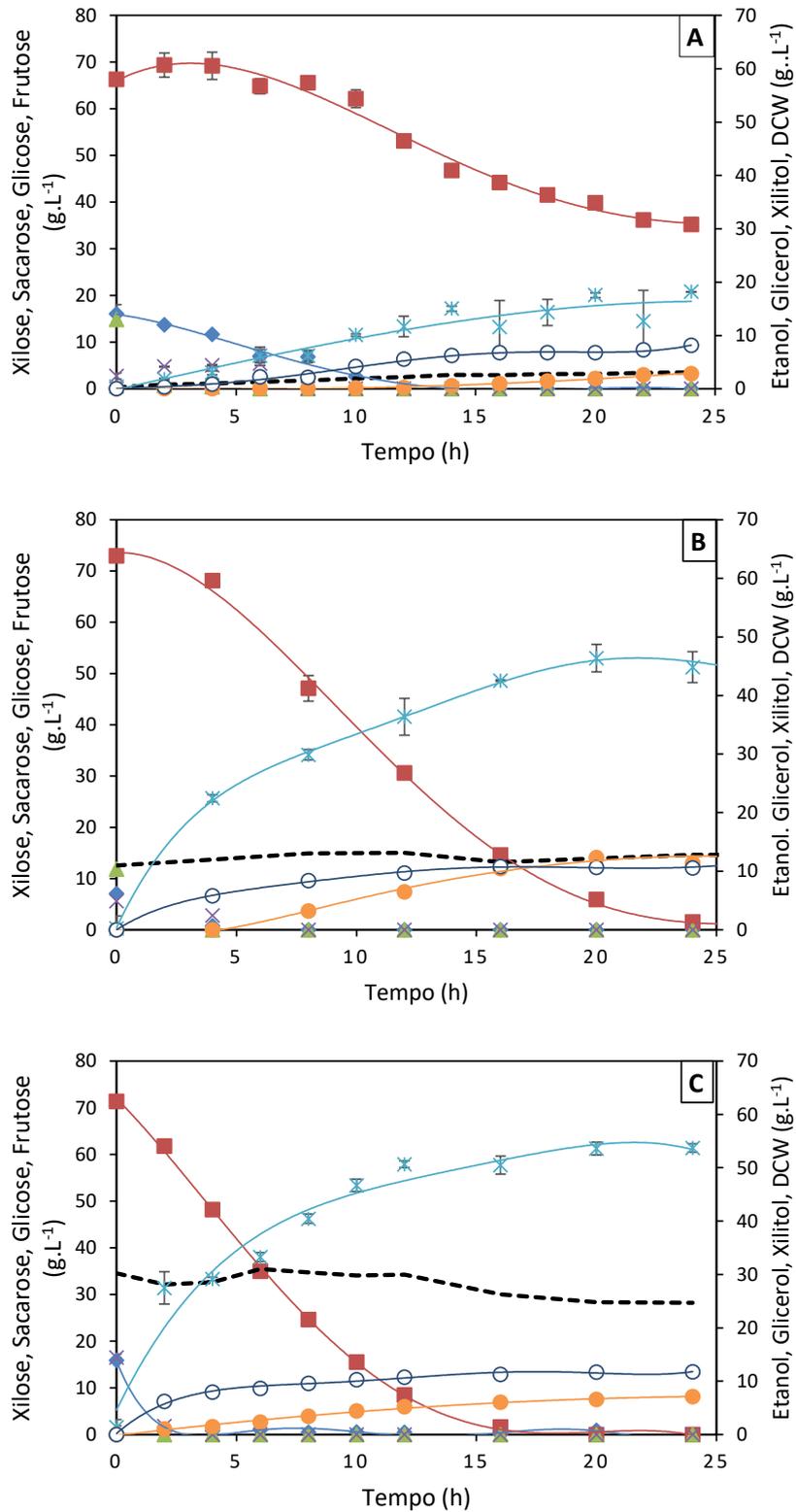


Figura 30. Cinéticas de fermentação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio rico contendo glicose e sacarose variando X_0 . (A) 0,76 g L⁻¹; (B) 10,95 g L⁻¹ e (C) 30,25 g L⁻¹. Legenda: (♦) Glicose; (■) Xilose; (▲) Sacarose; (×) Frutose, (✱) Etanol, (●) Xilitol, (○) Glicerol, (---) DCW. As linhas contínuas representam ajuste polinomial para cálculo das velocidades específicas de consumo de substrato e formação dos produtos.

Verifica-se também (Figura 30) a produção de quantidade considerável de xilitol em todas as fermentações (2,79; 14,08; 7,09 g L⁻¹ em B1, B2 e B3 respectivamente). O acúmulo de xilitol é reportado como um dos principais gargalos no processo de fermentação de xilose em *S. cerevisiae* recombinante que expressam a via XR / XDH, e consequente limita o rendimento de etanol.

Ocorre que, na maioria dos fungos (incluindo a levedura *Sc. stipitis* com genes amplamente utilizados na construção de recombinantes consumidores de xilose), a redução da xilose é realizada por uma xilose redutase (XR) dependente de NADPH, enquanto a oxidação do xilitol em xilulose, realizada pela enzima xilitol desidrogenase (XDH), requer NAD⁺. Essa dependência gera um desequilíbrio redox, pela falta da reciclagem do NAD⁺, o que acaba por interromper a metabolização de xilose, ocasionando um acúmulo de xilitol (Hahn Hångerdal et al., 1994). Esse desequilíbrio é mais afetado em anaerobiose, uma vez que, enquanto o NADPH pode ser produzido na Via das Pentoses-Fosfato, o NADH não pode ser reoxidado na ausência de oxigênio. Quando há oxigênio disponível, o co-substrato NADH pode ser reoxidado pela cadeia transportadora de elétrons. Assim, a fermentação de xilose em condições limitadas de oxigênio pode melhorar o fluxo metabólico dessa pentose.

Cadete (2016) comparou duas leveduras quanto ao acúmulo de xilitol e aumento de produção de etanol. Uma *S. cerevisiae* TMB 3422 (XR de *Sc. stipitis*), e outra *S. cerevisiae* TMB 3504 (expressando XYL1.2p de *Sp. passalidarum* UFMG-CM-Y469) em fermentação anaeróbia com xilose. Como resultado, a cepa TMB 3504 foi capaz de converter eficientemente xilose em etanol com alto rendimento e produtividade e baixo acúmulo de xilitol. Comparado com *S. cerevisiae* TMB 3422, a cepa TMB 3504 exibiu aproximadamente 20 % mais de etanol (0,40 vs. 0,34 g g⁻¹), rendimento inferior a 50 % de xilitol (0,10 vs. 0,21 g g⁻¹) e 80 % maior de produtividade específica de etanol, correspondente a um título máximo de etanol de aproximadamente 18 g L⁻¹ após 72 h (de aproximadamente 50 g L⁻¹ de xilose). O rendimento em xilitol mínimo encontrado pelo autor foi semelhante à média dos rendimentos encontrados nas três bateladas desse trabalho (0,107 g g⁻¹).

Para evitar o acúmulo de xilitol, a maioria das cepas industriais fermentadoras de xilose podem ser construídas usando a via XI como a

levedura industrial citada na revisão desse documento (item 2.4.2), RN1016 (*Saccharomyces cerevisiae*) da empresa Biocelere Agroindustrial LTDA, com introdução do gene codificador da enzima XI, oriundo do fungo não patogênico *Piromyces sp.*, e a levedura utilizada por Verhoeven e colaboradores (2017) com genes oriundos do mesmo fungo (Tabela 12). Outra alternativa é a utilização de xilose redutases com afinidade por ambos os cofatores (NADH e NADPH) ou com afinidade maior pelo NADH, o que poderia evitar ou diminuir o desbalanço de cofatores (Hahn Hångerdal et al. 1994; Jeffries, 2006), estratégia utilizada por Cadete et al (2016), expressando os genes de *Sp. passalidarum* em *S. cerevisiae* como citado anteriormente.

Analisando os dados de produtividade volumétrica global de etanol obtidos nas fermentações e sua relação com a concentração inicial de célula em cada batelada (Figura 31), observamos um perfil assintótico. Por esse motivo, não se fez necessário testar concentrações de células maiores que 30 g L⁻¹, pois a partir desse comportamento vemos que o incremento no valor de produtividade provavelmente não seria significativo, e que justificasse os gastos de meio, tempo e custos envolvidos na produção de maior quantidade de biomassa celular pensando em escalas industriais.

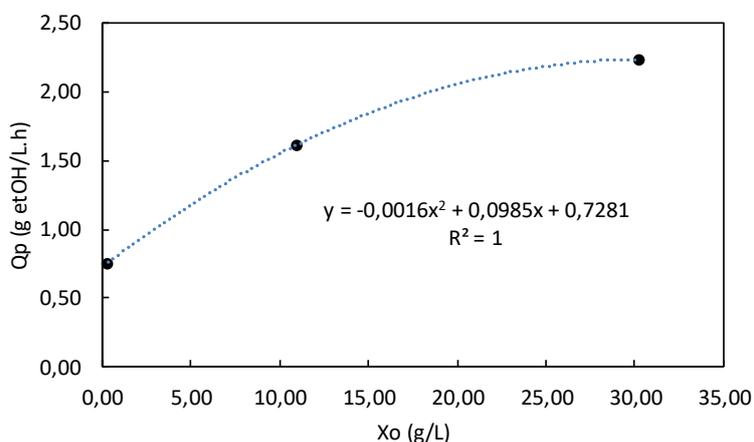


Figura 31. Relação entre a produtividade e a concentração inicial de células nas fermentações em biorreator com a levedura recombinante MP-C5H1 em batelada e meio rico. A linha pontilhada representa o ajuste polinomial dos pontos.

Foram compilados os resultados mais relevantes encontrados para fermentação de xilose por *S. cerevisiae* recombinante da literatura (Tabela 12)

e os valores de produtividade volumétrica global e título de etanol são superiores a todos reportados até então.

Tabela 12. Resumo dos principais resultados de literatura com leveduras geneticamente modificadas para produção de etanol a partir de xilose em meio sintético

Linhagem	Fermentação	Fonte de carbono	Q_p (g l ⁻¹ h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	Título (g l ⁻¹)	Referência
IMX906 (<i>Piromyces</i> XI)	Frasco	Xilose	-	0,40	7,5	Verhoeven et al. (2017)
YSX4 ^a	Frasco	Xilose	0,12	0,35	-	Li et al. (2017)
NAPX37 ^b	Frasco	Glicose + xilose	0,55	0,36	39,9	Li et al. (2016)
NAPX37 ^b	Biorreator (contínuo)	Xilose	-	0,39	~40	Li et al. (2016)
TBM 6422 (XR/XDH mutante SsXYL1, SsXYL2)	Biorreator (batelada)	Xilose	0,11	0,34	16	Cadete et al. (2016)
TMB 3504 (XR/XDH SpXYL1, SpXYL2)	Biorreator (batelada)	Xilose	0,14	0,40	20	Cadete et al. (2016)
MP-C5H1	Biorreator (batelada)	Xilose + sacarose	0,76	0,21	18,2	Este trabalho
MP-C5H1	Biorreator (batelada)	Xilose + sacarose	1,71	0,43	49,5	Este trabalho
MP-C5H1	Biorreator (batelada)	Xilose + sacarose	2,24	0,48	53,7	Este trabalho

^a XYL1 (Gene XR) e XYL2 (Gene XDH) de *Sc. stipitis* CBS6054, e XKS1 (Gene XK) de *S. cerevisiae* YS58

^bXYL1 (XR), XYL2 (XDH) from *Scheffersomyces stipitis*, XKS1 de *S. cerevisiae*, BG L1 (β -glucosidase) de *Aspergillus aculeatus*, e GXS1 (glicose/xilose symporter 1) de *Candida intermedia*. Cepa floculante industrial KF-7. HXT7 super expresso

Um dos resultados mais relevantes foram demonstrados por Li et al (2016), utilizando uma linhagem industrial floculante (KF-7) de *Saccharomyces cerevisiae* com genes XYL1 (XR), XYL2 (XDH) de *Sc. stipitis*, XKS1 de *S. cerevisiae*, BG L1 (β -glucosidase) de *Aspergillus aculeatus*, e GXS1 (glicose/xilose simpoter 1) de *Candida intermedia.*, e transportador HXT7 super expresso. Em um cultivo contínuo de 333 dias, onde a levedura foi exposta a diferentes concentrações de xilose e glicose no meio de alimentação, obteve-se um consumo de xilose de $6,62 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com meio de alimentação contendo 75 g L^{-1} de xilose na última semana de cultivo. O fator de conversão de substrato em etanol foi de $0,39 \text{ g}^{-1}$ e produção de etanol de $2,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Entre os trabalhos utilizados para compor revisão de literatura, observou-se que o trabalho de Cadete et al (2016) apresentou o maior fator de conversão de substrato em etanol ($0,40 \text{ g g}^{-1}$) para uma *S. cerevisiae* recombinante. A levedura desenvolvida neste trabalho possuía genes para a expressão das enzimas XR/XDH de *Sp. passalidarum* e as fermentações foram realizadas em modo batelada com meio contendo somente xilose.

A partir dos resultados de consumo obtidos na fermentação com 30 g L^{-1} de células, foi estabelecida a alimentação da batelada alimentada com hidrolisado que será descrita no próximo item. A levedura consumiu $4,36 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de xilose e o valor foi arredondado para $4 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para os cálculos de alimentação.

Também foram feitos os balanços de massa de todas as fermentações (Figura 32, 33 e 34) e verificou-se um aumento na quantidade de etanol produzido, conforme aumentou-se a concentração inicial de célula no reator (de $10,78 \text{ g}$ no experimento B1 para $34,05 \text{ g}$ de etanol no experimento B3). Santos et al (2016) obtiveram $260,78 \text{ kg}$ de etanol após cinco ciclos de batelada com meio rico contendo xilose e glicose a $30 \text{ }^\circ\text{C}$, utilizando a levedura *Sc. stipitis* adaptada em passos anteriores em ciclos com variação de temperatura. Esse valor é obtido extrapolando a entrada para um total de 1000 kg de ART. Fazendo esse cálculo para as bateladas a partir dos balanços apresentados nas Figuras 32 a 34, em B1 temos $156,69 \text{ kg}$ de etanol (a partir de 670 kg xilose e 330 kg de sacarose), B2 com $405,60 \text{ kg}$ de etanol (partindo de 700 kg xilose e 300 kg sacarose) e em B3 temos $471,87 \text{ kg}$ de etanol a partir de 690 kg de xilose e 310 kg de sacarose (dados não apresentados), comprovando a

eficiência fermentativa da levedura recombinante *S. cerevisiae* MP-C5H1 utilizada em comparação a dados previamente apresentados na literatura para outra levedura.

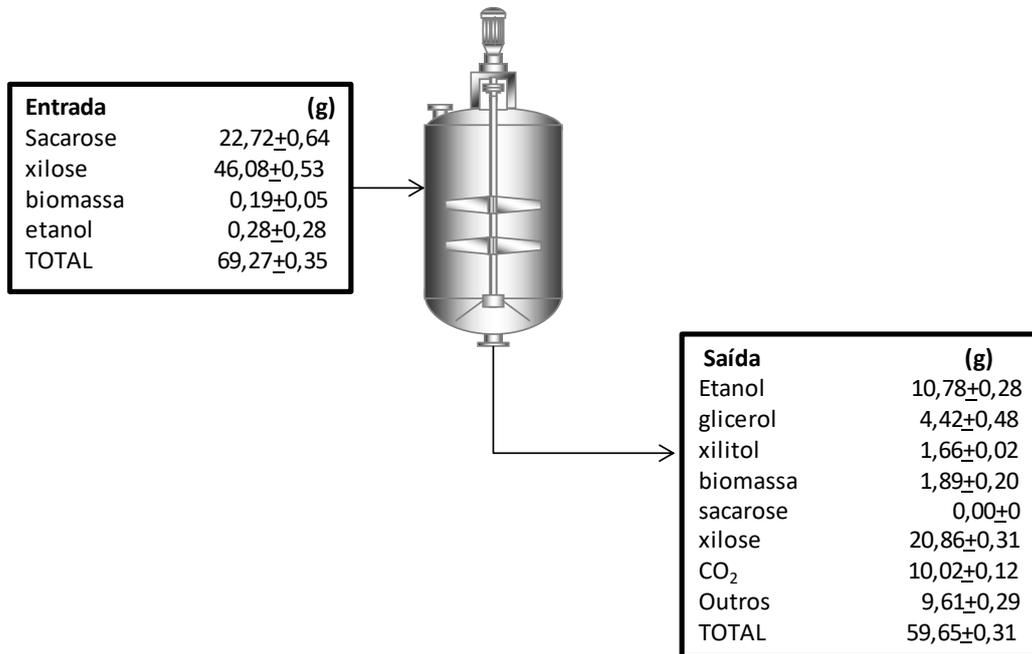


Figura 32. Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio contendo xilose e sacarose em baixa densidade celular em reator. Experimento (B1).

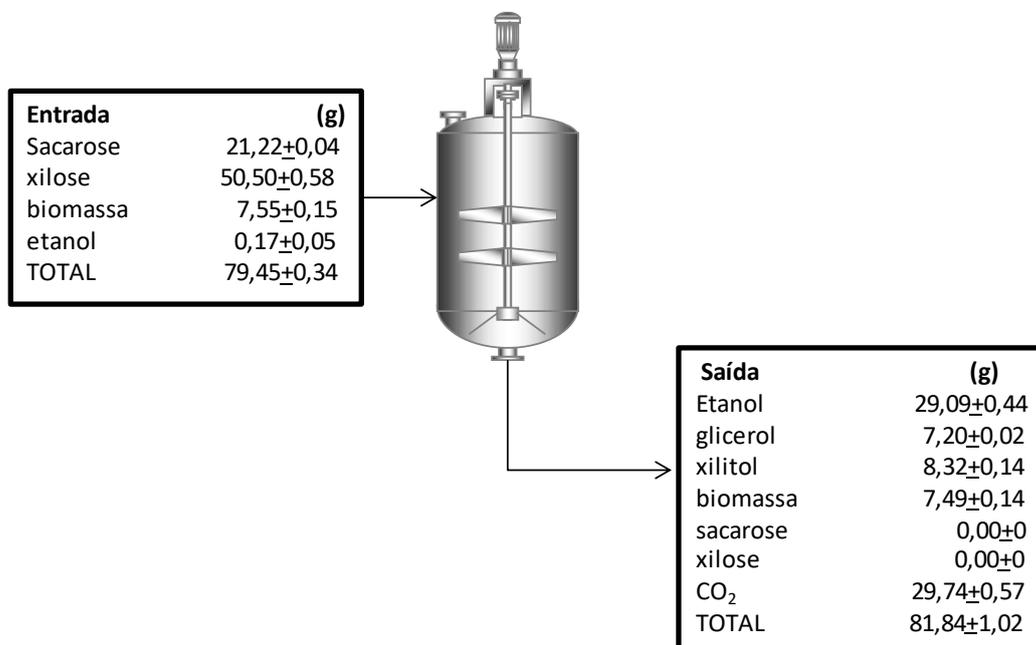


Figura 33. Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio contendo xilose e sacarose em alta densidade celular. Experimento (B2).

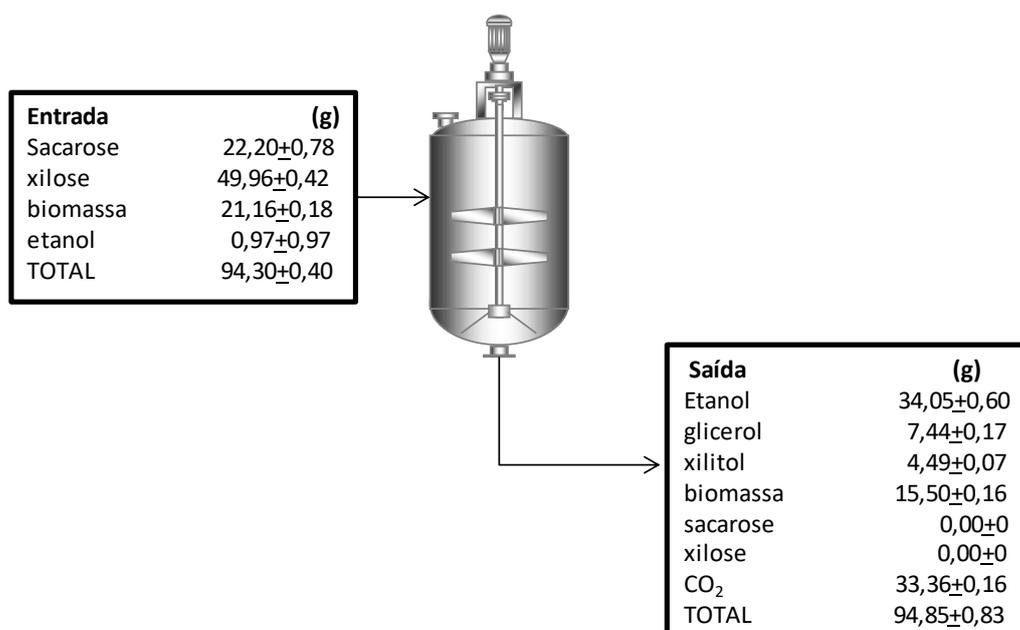


Figura 34. Balanço de massa fermentação com *S. cerevisiae* MP-C5H1 em meio contendo xilose e sacarose em alta densidade celular. Experimento (B3).

5.4. ETAPA 4: Fermentação com hidrolisado hemicelulósico e melado de cana de açúcar

5.4.1. Balanço de massa e caracterização do hidrolisado hemicelulósico

Como descrito no item 4.5, o hidrolisado hemicelulósico utilizado foi obtido com pré tratamento do bagaço de cana de açúcar com ácido sulfúrico diluído, separação da fração líquida, concentração por evaporação e detoxificação. O balanço de massa foi feito após a caracterização da composição das frações obtidas em todas as etapas do processo e está apresentado na Figura 35.

A concentração de fenólicos no hidrolisado foi calculada utilizando a Equação 1. Antes do tratamento de detoxificação, a concentração de fenólicos era de 18,56 g L⁻¹ e após 14,81 g L⁻¹, uma redução de 20,2%.

Na Tabela 13 estão expostas todas as reduções em porcentagem e a concentração de todos os compostos no hidrolisado hemicelulósico antes e após a detoxificação.

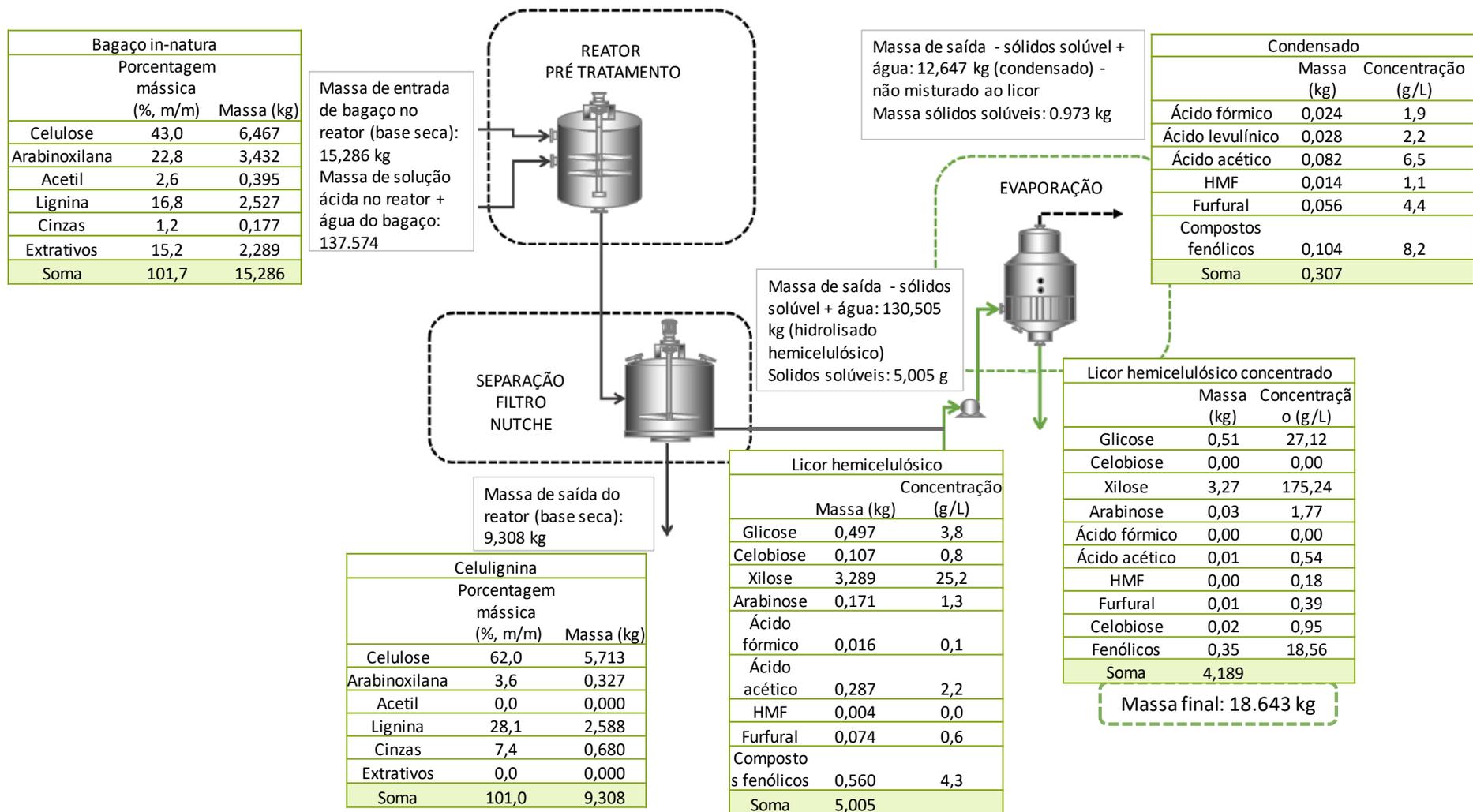


Figura 35. Balanço de massa do processo de obtenção do hidrolisado hemicelulósico concentrado.

Tabela 13. Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar concentrado e após detoxificado.

Componentes	Hidrolisado concentrado (g L⁻¹)	Hidrolisado concentrado e detoxificado (g L⁻¹)	Redução (%)
Xilose	175,24±0,25	159,48±0,92	9
Glicose	27,12±2,53	25,51±1,6	6
Arabinose	1,77±0,00	1,76±0,01	0
Celobiose	0,95±0,00	0,96±0,01	0
Ácido acético	0,54±0,05	0,55±0,01	0
HMF	0,176±0,00	0,0787±0,003	53
Furfural	0,388±0,00	0,0355±0,00	90

Além dos fenólicos, as concentrações de HMF e furfural também foram reduzidas em 53% e 90 %, respectivamente. É válido salientar que as concentrações desses compostos no hidrolisado concentrado sem detoxificar já estavam abaixo das descritas como concentração de inibição de fermentação, confirmando a qualidade do processo estabelecido para obtenção do hidrolisado testado. Segundo Soares (2018), para *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907, concentrações de 0,5 g L⁻¹ de ácido acético, 1,0 g L⁻¹ de furfural, 3,0 g L⁻¹ de HMF são os valores limites que as frações hemicelulósicas podem conter, por exemplo.

Assim, a etapa de detoxificação poderia ser desconsiderada em uma escala industrial pelos gastos com mais uma etapa e considerando que também existe uma perda de carboidratos durante a adsorção. Como descrito por Soares (2018), os processos de detoxificação elevam os custos da cadeia produtiva de bioetanol, pois aumentam a demanda de energia, de capital de investimento em equipamentos e operação, além de requererem etapa de recuperação dos agentes detoxificantes, que encarecem o custo do produto final, tornando-o ainda menos competitivo com os biocombustíveis de primeira geração e/ou combustíveis fósseis.

5.4.2. Fermentação em batelada alimentada

A fermentação alcoólica pode ser realizada em processo descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo, mas, no Brasil o processo descontínuo-alimentado com reciclo de células é um dos mais empregados (Melle-Boinot). A grande vantagem, e principal justificativa para seu emprego, está na possibilidade de controlar a velocidade de alimentação de meio, diminuindo com isso a inibição, causada pelas elevadas concentrações de substrato e/ou de produto, no metabolismo celular. Vários trabalhos mostraram um aumento na produtividade em etanol entre 10 e 14% ao alimentarem o substrato através de sistemas de adição linear decrescente ou exponencial decrescente quando comparados com cultivos em processo descontínuo (Miguel, 2006). Considerando o hidrolisado hemicelulósico, que contém compostos inibitórios ao metabolismo de leveduras, este modo de operação parece ser o mais adequado.

Nesse sentido, nessa etapa de fermentação com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar, essa estratégia foi utilizada para avaliar o desempenho da levedura MP-C5H1 em substrato industrial.

Na Figura 36 observa-se o perfil de ART, etanol, biomassa, glicerol e xilitol com o tempo durante a fermentação. A concentração máxima de HFM detectada foi de $0,0018 \text{ g L}^{-1}$ e furfural não foi identificado em nenhuma das amostras de fermentação (dados não apresentados). Já a concentração de ácido acético encontrada nas amostras de fermentação não ultrapassou $0,3 \text{ g L}^{-1}$ (dados não apresentados). A diluição do hidrolisado em melaço na composição do meio de fermentação foi relevante na diluição do ácido acético (de $0,55 \text{ g L}^{-1}$ para $0,3 \text{ g L}^{-1}$), visto que o valor mínimo para inibição de fermentação encontrado em literatura foi de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (Soares, 2018).

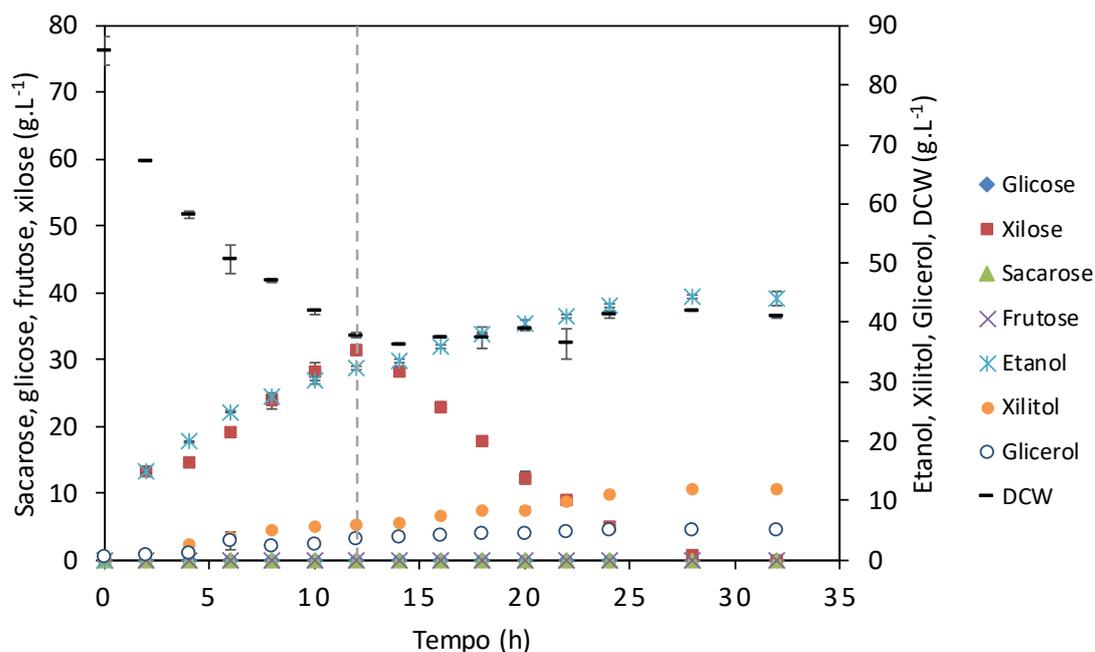


Figura 36. Cinética de fermentação da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante em hidrolisado hemicelulósico e melão de cana de açúcar em reator operado em sistema de batelada alimentada em alta densidade celular. Legenda: (◆)Glicose; (■)Xilose; (▲)Sacarose; (×)Frutose, (✱)Etanol, (●)Xilitol, (○)Glicerol, (---)X. A linha tracejada representa o fim da alimentação do reator.

A viabilidade mínima durante toda a fermentação foi de 97% e, observando-se a célula em microscópio (Figura 37), constatou-se que as células apresentavam formato de elipse (típico dessa espécie) e não alongadas. Rabelo (2010) verificou que, na fermentação em hidrolisado de cana de açúcar obtido com peróxido de hidrogênio alcalino e hidróxido de cálcio com *S. cerevisiae*, a levedura apresentou forma alongada e formação de pseudo hifas. A alteração morfológica da levedura pode ser causada devido ao *stress* relacionado à falta de nutrientes minerais no meio, principalmente fósforo, magnésio, manganês e zinco, uma vez que a concentração de inibidores no meio descrita nesse trabalho era consideravelmente baixa. Segundo Basso et al. (1996), deficiências ou concentrações elevadas de tais minerais provocam alterações metabólicas bastante significativas.

Verificou-se (Figura 36) que produção de glicerol na fermentação em regime alimentado ($4,9 \text{ g L}^{-1}$) foi inferior à encontrada em batelada com meio rico ($11,7 \text{ g L}^{-1}$) nas mesma concentração inicial de célula (Figura 30). O fator

de conversão de substrato em glicerol ($Y_{\text{glicerol/S}}$) passou de 0,15 em modo batelada para 0,04 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ no processo em modo batelada alimentada, como consequência de um menor estresse osmótico sofrido pela célula no processo alimentado.

Também houve acúmulo de xilitol, como esperado e já discutido no item 5.3.2, com valores de fator de conversão semelhantes ao encontrado na batelada em meio rico ($Y_{\text{xilitol/S}}$ 0,10 e 0,11 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, em hidrolisado e em meio rico respectivamente).

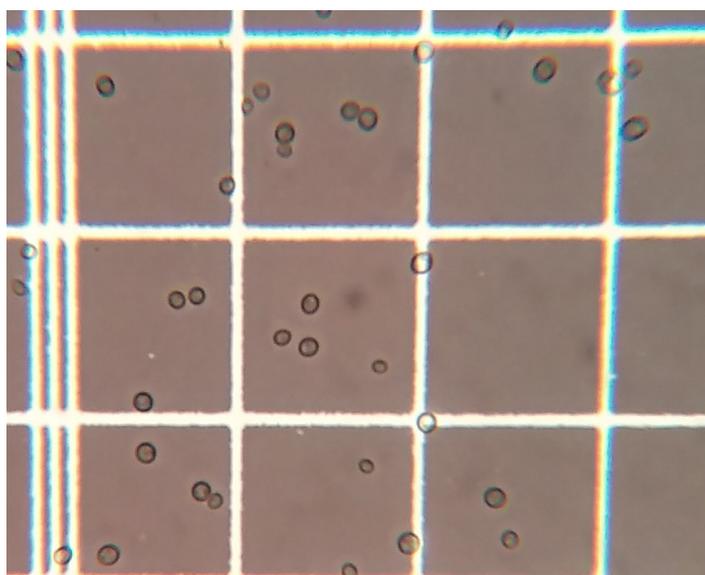


Figura 37. Imagem de microscopia obtida com objetiva de 40x em microscópio óptico de uma amostra da fermentação de levedura MP-C5H1 com hidrolisado hemicelulósico e melaço.

Não foram encontrados trabalhos na literatura que utilizaram hidrolisado de bagaço cana de açúcar para fermentação com *S. cerevisiae* geneticamente modificada para consumo de xilose. Também não existem trabalhos publicados com a proposta de integração com melaço de cana de açúcar. O trabalho de Rabelo (2010), citado na sessão de referências bibliográficas dessa dissertação com essa estratégia de integração, fermentou uma mistura de hidrolisado de cana com melaço, mas a fração de xilose não era consumida por utilizar uma cepa de *S. cerevisiae* do processo tradicional, sem modificações genéticas.

Por isso, comparamos os resultados de produtividade volumétrica global, fator de conversão de substrato em etanol e título de etanol obtidos com trabalhos que utilizaram leveduras não convencionais em hidrolisados de bagaço de cana de açúcar e uma levedura recombinante que fermentou palha de trigo em um processo SSCF (*Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation*) (Tabela 14).

Tabela 14. Resumo dos principais resultados encontrados na literatura para produção de etanol de segunda geração utilizando hidrolisados de biomassa lignocelulósica.

Linagem	Fermentação	Fonte de carbono	Q_P ($g L^{-1} h^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($g g^{-1}$)	Título ($g L^{-1}$)	Referência
<i>Sp. passalidarum</i> Y-27907	Frasco	Hidrolisado hemicelulósico de carvalho	0,60	0,34	36	Long et al, (2012)
<i>Sp. passalidarum</i> Y-27907	Biorreator batelada com reciclo de células	Hidrolisado enzimático de bagaço de cana pré-tratado NaOH	0,90	0,46	23	Nakanishi et al. (2017)
<i>Sp. passalidarum</i> UFMG-HMD-14.1	Frasco	Hidrolisado enzimático de bagaço de cana pre-tratado alcalino (peróxido)	0,34	0,32	24,14	Souza et al. (2018)
<i>S. cerevisiae</i> (<i>IBB10B05</i>)	Biorreator SSCF	Palha de trigo	0,50	0,47	69,6	Novy et al. (2017)
<i>S. cerevisiae</i> MP-C5H1	Biorreator batelada alimentada	Hidrolisado hemicelulósico de cana de açúcar, concentrado e detoxificado	1,59	0,39	44,5	Este trabalho

A produtividade volumétrica global em etanol encontrada no presente trabalho ($1,59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi superior a todos os resultados já relatados e encontrados na literatura. Provavelmente pela qualidade do hidrolisado obtido em termos de ausência de inibidores, mas também a estratégia de fermentação em alta densidade celular e em batelada alimentada. O título de etanol só não é superior ao encontrado por Novy et al (2017), porém é válido ressaltar que na fermentação com esse resultado o consumo de glicose foi de $136,5 \text{ g L}^{-1}$ e de xilose $12,2 \text{ g L}^{-1}$. Isso justifica o alto título encontrado em 120 h de processo.

Outro aspecto importante dos dados apresentados para comparação, é a suplementação dos hidrolisados para a fermentação. De todos os trabalho, somente o de Souza et al (2018) não utilizou suplementação do meio. Neste trabalho, o hidrolisado obtido com pré tratamento alcalino e hidrólise enzimática foi fermentado por *Sp. passalidarum* em frascos agitados e em alta densidade celular. O enriquecimento encarece o meio de cultivo pensando em escalas industriais e é válido propor para trabalhos futuros o teste de fermentabilidade da composição proposta nesse trabalho sem a suplementação com extrato de levedura e ureia.

É válido também salientar que, além dos resultados encontrados neste trabalho serem bastante superiores aos valores já reportados, existem estratégias de reciclo e adaptação que podem melhorar esses parâmetros fermentativos. Isso demonstra o potencial da levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 para produção de E2G utilizando as estratégias avaliadas, ou seja, integrado com melaço de cana e em alta densidade celular. No trabalho de Nakanishi et al (2017), por exemplo, a estratégia de reciclo foi utilizada e os resultados apresentados na Tabela 14 são provenientes do quarto ciclo de fermentação, sendo esse o melhor resultado encontrado durante os reciclos realizados por estes autores. Neste trabalho, a cada ciclo se reduzia $1 \text{ }^\circ\text{C}$ na temperatura de operação entre 30 a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando como substrato hidrolisado de bagaço de cana obtido por pré tratamento com NaOH e seguido de hidrólise enzimática, em fermentações em regime alimentado e com alta densidade celular. Outro resultado relevante deste trabalho é que produção de xilitol nos ciclos diminuiu de $2,4 \text{ g L}^{-1}$ na primeira fermentação para $0,8 \text{ g L}^{-1}$ na quarta, o que implicou num aumento na conversão de substrato em etanol de $0,31$ para $0,46 \text{ g g}^{-1}$.

O balanço de massa da fermentação em batelada alimentada está apresentado na Figura 38. Nesta Figura é possível notar que não houve consumo de arabinose e celobiose presentes no hidrolisado, 0,31 g e 0,33 g respectivamente. Foram produzidos 28,88 g de etanol durante a fermentação e com essa massa pode-se calcular a produção de etanol por massa de bagaço de cana de açúcar utilizando também os valores do balanço de massa do processo de obtenção do hidrolisado apresentado na Figura 35. Sabendo que obteve-se 18,643 kg de hidrolisado concentrado a partir de 15,286 kg de bagaço de cana de açúcar (base seca), tem-se, extrapolando os valores para uma tonelada de biomassa lignocelulósica, uma produção 95,5 kg de etanol por tonelada de bagaço seco.

Nakanishi et al (2017) encontraram 124 kg etanol/ton bagaço com *Sc. stitpitidis* fermentando hidrolisado obtido através de pré tratamento com NaOH e hidrólise enzimática, e 177 kg etanol/ton fermentando o mesmo hidrolisado com *Sp. passalidarum*. Ambos os resultados obtidos após quatro ciclos em batelada alimentada e alta densidade celular.

Destaca-se que o objetivo desse estudo era obter um processo para aproveitamento da fração de hemicelulose contida no bagaço de cana de açúcar e por esse motivo o hidrolisado hemicelulósico obtido com separação de corrente com tratamento com ácido diluído foi o processo escolhido. Utilizando um tratamento básico como o empregado por Nakanishi et al (2017) e Souza et al (2018), apresentados na Tabela 14, o hidrolisado obtido por posterior hidrólise com glicosil hidrolases contém a fração de C6 e C5, sendo o primeiro açúcar presente em maior concentração, o que favorece os rendimentos em etanol. Além disso, apesar do tratamento básico gerar um hidrolisado com menos inibidores pois todo conteúdo de fenólicos é retirado no licor negro no pré tratamento, o tratamento com ácido diluído é citado como viável economicamente nas projeções de produção de etanol (BNDES, 2013; Vasconcelos, 2017) e tem sido empregado nas plantas de E2G em operação.

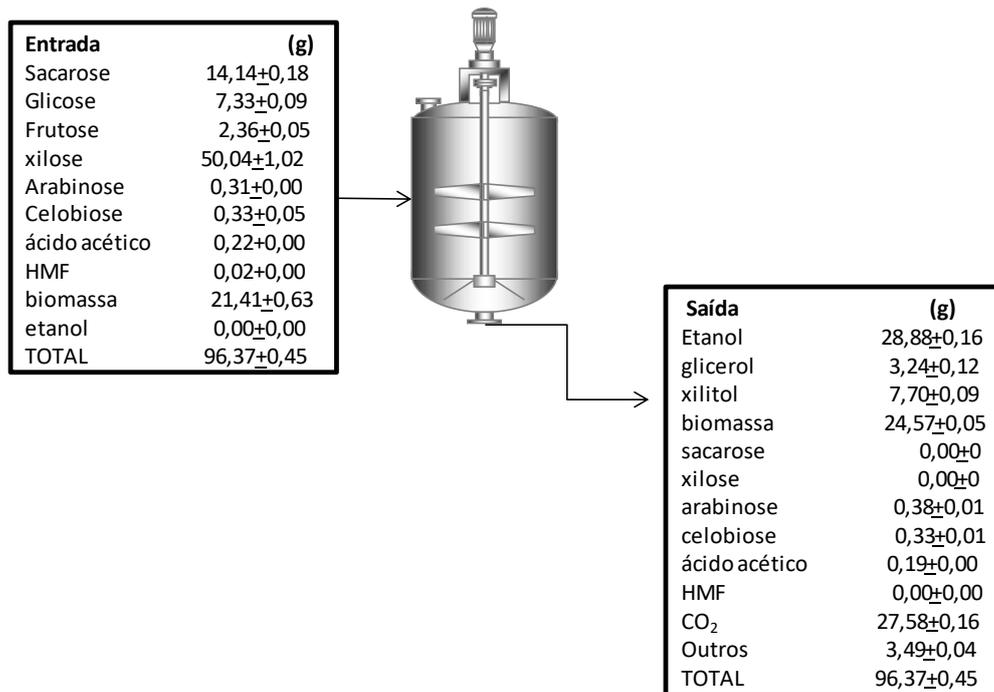


Figura 38. Balanço de massa da fermentação em biorreator com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 em regime de batelada alimentada com hidrolisado hemicelulósico e melação de cana de açúcar em alta densidade celular.

Em resumo, obteve-se uma proposta de processo de produção E1G2G, com o escalonamento resumidamente apresentado na Figura 39. Além disso, dentre as propostas já descritas, o resultado de produtividade global em etanol ($1,59 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) é o maior reportado até o momento na literatura de acordo com nosso conhecimento. O processo proposto mimetiza o que é utilizado atualmente pelas usinas E2G, porém com a proposta de integração utilizando melação. Destacando novamente o uso inédito de uma levedura industrial recombinante consumidora de xilose em processos com hidrolisado de bagaço de cana de açúcar e em maior escala de fermentação.

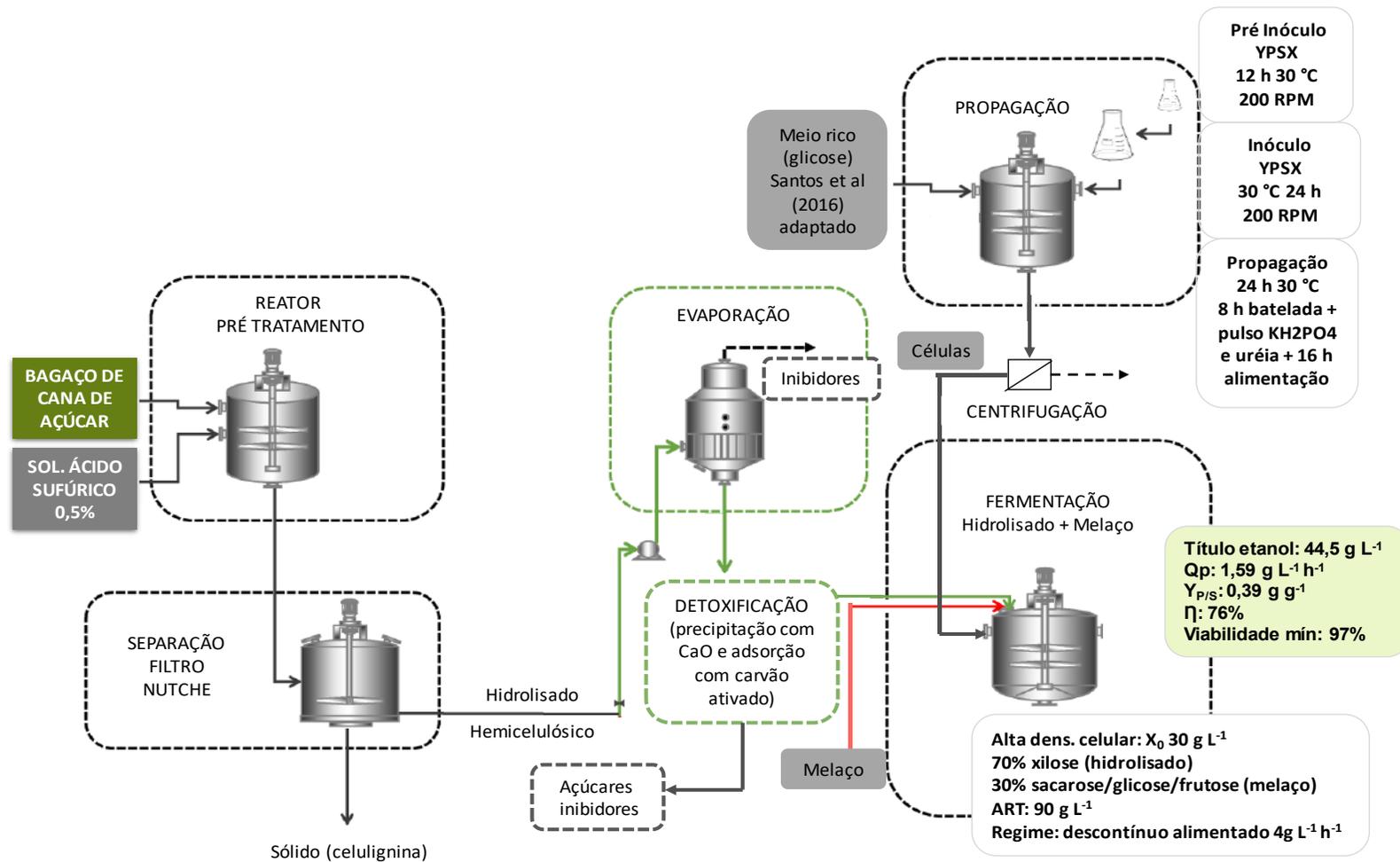


Figura 39. Resumo de todas as etapas e resultados obtidos no escalonamento de processo de fermentação obtido para aproveitamento da fração de hemicelulose contida no bagaço de cana de açúcar pela levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante.

6. Conclusões

Todas as leveduras avaliadas nesse trabalho (*Sc. stipitis* NRRL Y-7124, *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907, *S. cerevisiae* MP-C5 e MP-C5H1) se mostraram aptas ao consumo de xilose, sendo que as recombinantes assimilaram a xilose em baixas velocidades quando esse é o único carboidrato presente no meio. Os protocolos de pré inóculo e inóculo foram estabelecidos para todas as leveduras e o meio YPSX, por apresentar maiores valores de μ_{\max} e X_f , foi selecionado para o desenho do processo. A levedura *Sp. passalidarum* apresentou melhor desempenho entre as não convencionais e *S. cerevisiae* MP-C5H1 entre as recombinantes nessa etapa.

A etapa de fermentações em frascos agitados demonstrou o baixo consumo de sacarose pela levedura *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907 e, por consequência, o desempenho fermentativo da levedura recombinante *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante foi superior. Foram estabelecidas a proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose e concentração inicial de substrato de 90 g L⁻¹ para compor os meios de fermentação em reator com essa levedura.

As fermentações em biorreator com a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 apresentaram valores de produtividade volumétrica global (2,24 g L⁻¹.h⁻¹) inéditos na produção E2G na fermentação em alta densidade celular (X_0 30 g L⁻¹) e demonstram o potencial da levedura para uso industrial, pois se aproxima do praticado atualmente nas usinas de primeira geração.

Os resultados obtidos em fermentação em batelada alimentada com hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana de açúcar em alta densidade celular, confirmaram que esta é uma boa estratégia para produção de etanol lignocelulósico, com produtividade volumétrica global em etanol 1,59 g L⁻¹ h⁻¹.

Ressalta-se que alguns gargalos ainda precisam ser vencidos como o acúmulo de xilitol pela levedura recombinante, necessitando novas modificações genéticas (induzidas ou dirigidas) para aumentar o rendimento em etanol ou então a realização de reciclos (Melle-Boinot) como já observado na literatura para leveduras não convencionais.

Todos os objetivos propostos no presente trabalho foram alcançados, obtendo um escalonamento completo da levedura recombinante MP-C5H1 e

uma proposta de processo de fermentação de hidrolisado hemicelulósico e melaço de cana com o maior de valor de produtividade volumétrica global na produção de E2G reportado até o momento.

Conclui-se que além da viabilidade econômica e projeção de menor custo envolvido na produção E1G2G demonstrados em outros trabalhos, confirmamos a viabilidade tecnológica do processo. Devido à obtenção de um hidrolisado hemicelulósico com baixos teores de inibidor, uso de um resíduo da produção de açúcar (melaço) para diluir e enriquecer o meio fermentativo, além de utilizar uma cepa capaz de metabolizar eficientemente todos os açúcares majoritariamente presentes (xilose, glicose, sacarose e frutose).

E para que esse objetivo final fosse atingido, ressalta-se a importância de cada uma das etapas do projeto na obtenção de dados que asseguram o processo fermentativo encontrado.

Os resultados obtidos nesse trabalho servem de apoio para processos subsequentes com as leveduras trabalhadas, visto que estabelecemos protocolos de crescimento (pré inóculo e inóculo) e testamos uma condição inédita de co-fermentação de sacarose e xilose ainda não reportados para nenhuma das leveduras estudadas. Para a levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1, tem-se ainda dados e protocolos de propagação em biorreator definidos e perfis de fermentação em diferentes condições de densidade celular e em diferentes regimes de fermentação em biorreator (descontínuo e alimentado). Algo inédito para leveduras recombinantes fermentadoras de xilose.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Confirmar a diferença de velocidade de consumo de xilose entre as cepas recombinantes com cinéticas de consumo de substrato, para identificar a influência do transportador HXT1 super expresso em MP-C5H1.
- Continuar o escalonamento e tentativa de reproduzir o processo industrial com a levedura recombinante, com reciclo de células. Avaliar a capacidade de adaptação da levedura durante os ciclos e determinar quantas ciclagens podem ser feitas até perda de viabilidade das leveduras.
- No sentido de se aproximar do processo industrial e reduzir custos com meio de cultivo, também sugere-se testar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico sem suplemente com extrato de levedura e sais.
- Outra proposta para aumentar a produtividade e otimizar a utilização das células no processo é a imobilização. Pelo potencial apresentado pela levedura nesse trabalho, sugere-se que esse é uma outra possibilidade para obter melhores resultados.
- Pensando em aumentar rendimentos em etanol e diminuir o acúmulo de xilitol, sugere-se operar fermentações com aeração para tentar contornar o problema de desbalanço de cofator em anaerobiose, promovendo a reoxidação do cofator NADH.
- Avaliar o consumo de sacarose pela levedura não convencional *Spathaspora passalidarum* e identificar os mecanismos de transporte e características da invertase presente nessa levedura.

Referências Bibliográficas

- ALCARDE, A.R. **Processamento da cana de açúcar**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. 2007, Brasília, DF.
- ALMEIDA, J. R. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p.340-349, 2007.
- AMORE, R.; WILHELM, M.; HOLLENBERG, C.P. The fermentation of xylose - an analysis of the expression of Bacillus and Actinoplanes xylose isomerase genes in yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.30, p.351-357, 1989.
- ANDRADE, R.R.de; FILHO, F.M.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. *Bioresource Technology*, v. 130, p. 351-359, 2013.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. Dados produção de etanol anidro e hidratado, Anuário Estatístico 2018, Seção 3: Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018> Acesso em: junho/2019.
- ANP, Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis. Dados produção de etanol anidro e hidratado, Anuário Estatístico 2019, Seção 3: Biocombustíveis. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019>> Acesso em: dezembro/2019.
- AMORIM, H.V., LOPES, M.L, OLIVEIRA, J.V.C., BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**., 91, 1267-1275, 2011.
- BABRZADEH, F., et al. Whole-genome sequencing of the efficient industrial fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain CAT-1. **Molecular Genet. Genomics**. **287**: 485-494, 2012.
- BADOTTI, F.; BATISTA, A.; STAMBUK, B. U. Sucrose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Arch Biol Technol**, v. 49, p.115-123, 2006.
- BADOTTI, F., DARIO M.G., ALVES-JR, S.L., CORDIOLI, M.L.A., MILETTI, L.C., DE ARAUJO, P.S., STAMBUK, B.U. Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology Cell Fact**. v.7: 4, 2008.
- BARBOSA, A. C. et al. *Candida materiae* sp. nov., a yeast species isolated from rotting wood in the Atlantic Rain Forest. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2104-2106, 2009.

- BARNETT, J.A., PAYNE, R.W., YARROW, D., **Yeasts: Characteristics and Identification**, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 2000.
- BASSO, L.C.; ALVES, D.M.G.; AMORIM, H.V. **Fermentação alcoólica e alguns fatores que afetam o desempenho fermentativo**. In: AMORIM, H.V. Processo de produção de álcool: controle e monitoramento. 2. ed. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ, 1996. p. 46
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. **FEMS Yeast Res**, v. 8, p.1155–1163, 2008.
- BASSO, T. O.; DE KOK, S.; DARIO, M.; et al. Engineering topology and kinetics of sucrose metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* for improved ethanol yield. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 6, p. 694–703, 2011.
- BNDS, **De promessa a realidade: como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana de açúcar – uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública**. BNDES Setorial 41, p. 237-294, 2013.
- BOINOT, F. & MELLE, 1936. Process for carrying out industrial alcoholic fermentations. Patent US2230318A.
- BONAN, C. I. D. G.; **Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2018.
- BONAN, C.I.D.G., BIAZI, L.E., SANTOS, S.C., SOARES, L.B., DIONÍSIO, S.R., HOFFMAM, Z.B., COSTA, A.C., IENCZAK, J.L.; Online monitoring of the redox potential in microaerobic and anaerobic *Scheffersomyces stipitis* fermentations. **Biotechnology Letters**. v.41, p.753-761, 2019.
- CADETE, R.M. & ROSA, C.A.; The yeasts of the genus *Spathaspora*: potential candidates for second-generation biofuel production, **Yeast**; 35: 191–199. 2018.
- CADETE, R. M. et al. *Spathaspora arborariae* sp. nov., a D-xylose-fermenting yeast species isolated from rotting wood in Brazil. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 8, p. 1338-1342, 2009.
- CADETE, R. M.; DE LAS HERAS, A. M.; SANDSTRÖM, A. G.; et al. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.
- CADETE, R. M.; MELO, M. A.; ZILLI, J. E.; et al. *Spathaspora brasiliensis* sp. nov., *Spathaspora suhii* sp. nov., *Spathaspora roraimanensis* sp. nov. and *Spathaspora xylofermentans* sp. nov., four novel d-xylose-fermenting yeast species from Brazilian Amazonian forest. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General**

- and Molecular Microbiology**, v. 103, n. 2, p. 421–431, 2013.
- CARDONA, C. A., QUINTERO, J. A. & PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v.101, p.4754-4766, 2010.
- CERQUEIRA, D. A.; FILHO, G. R.; CARVALHO, R. A.; VALENTE, A. J. M. Caracterização de acetato de celulose obtido a partir do bagaço de cana de açúcar por H-RMN. X Congresso Brasileiro de Polímeros, Foz do Iguaçu, Paraná, 2009.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra brasileira 2011, Brasília, agosto 2011. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: junho/2019.
- CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Acomp. safra bras. cana, v. 5 - Safra 2018/19, n. 2 - Segundo levantamento, Brasília, p. 1-86, agosto 2019. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>> Acesso em: novembro/2019.
- CTNBio, Comissão Técnica Nacional de Biossegurança. Tabela de microrganismos aprovados para comercialização. Atualização setembro de 2019. Disponível em: <http://ctnbio.mcti.gov.br/documents/566529/1687332/Tabela+de+Microorganismos+Aprovados+para+Comercializa%C3%A7%C3%A3o/7b7a17fd-ef84-4dfd-b2b4-fe5900745be2?version=1.2&previewFileIndex=>. Acesso em: dezembro/2019.
- DELVIGNE, F., DESTAIN, J., THONART, P.; A methodology for the design of scale-down bioreactors by the use of mixing and circulation stochastic models. **Biochemistry Engineering Journal**. v.28, p.256–268, 2006.
- DEVARAPALLI, M, ATIYEH, H. K.; A review of conversions process for bioethanol production with a focus on syngas fermentation. **Biofuel Research Journal**, v.2, p. 268-280, 2015.
- FARIAS, D. & FILHO, F.M.; Co-culture strategy for improved 2G bioethanol production using a mixture of sugarcane molasses and bagasse hydrolysate as substrate. **Biochemical Engineering Journal**, v.147, p. 29–38, 2019.
- FARWICK, A.; BRUDER, S.; SCHADEWEG, V.; OREB, M.; BOLES, E. Engineering of yeast hexose transporters to transport D-xylose without inhibition by D-glucose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 111, n. 14, p. 2159-5164, 2014.
- FENGEL, D.; WEGENER, G.; Wood: Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 613 p, 1989.
- FGV, Fundação Getúlio Vargas. Energia. Boletim energético 2018. Divulgado em Agosto de 2018. Disponível em: <www.fgv.br/energia>. Acesso em: novembro/2019.
- FINLEY, D.; ULRICH, H.D.; SOMMER, T.; KAISER, P. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**. v.192, p.319-360, 2012.

- GÁRDONYI, M.; HAHN-HÄGERDAL, B. The *Streptomyces rubiginosus* xylose isomerase is misfolded when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. v.32, p. 252-259, 2003.
- GÍRIO, F.M; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F; DUARTE, L.C.; MARQUEZ, S.; BOGEL-LUKASIKI, R.; Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**. 101: 4775-4800, 2010.
- GODOY, A., AMORIM, H.V., LOPES, M.L., OLIVEIRA, A.J.; Continuous and batch fermentation processes: advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. **International Sugar Journal**, v.110,p.175–181, 2018.
- GONÇALVEZ, D.L.; **Influência dos transportadores de açúcar na fermentação de xilose por linhagens recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae***, Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.
- GONÇALVES, D. L.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B. B.; et al. Xylose and xylose/glucose co-fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing individual hexose transporters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 63, p. 13–20, 2014.
- GONÇALVES, D.; MATSUSHIKA, A.; DE SALES, B.; et al. Influence of individual HXT transporters in xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strains. **BMC Proceedings**, v. 8, n. Suppl 4, p. P209, 2014.
- GUO, Z. PENG; ZHANG, L.; DING, Z. YANG; SHI, G. YANG. Minimization of glycerol synthesis in industrial ethanol yeast without influencing its fermentation performance. **Metabolic Engineering**, v. 13, n. 1, p. 49–59, 2011. Elsevier. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2010.11.003>>. .
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOGG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. **Enzyme Microbial Technology**. v.16, p933-943, 1994.
- HEER, D.; SAUER, U. Identification of furfural as a key toxin in lignocellulosic hydrolysates and evolution of a tolerant yeast strain. **Microbial biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 497-506, 2008.
- HO, N.W.Y.; STEVIS, P.; ROSENFELD, S.; HUANG, J.J.; TSAO, G.T. Expression of the *E. coli* xylose isomerase gene by a yeast promoter. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**. v.13, p.245-250, 1983.
- HOU, X.; Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology** , v.94, p.205-214, 2012.
- IPCC, 2019: Climate Change 2019: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J].

- JEFFRIES, T.W. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**. v.3, p.213-218, 1981.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**. v.17, p.320-326. 2006.
- JORNAL DA CANA, GranBio deve retomar operações comerciais de usina de etanol 2G. Por: Redação em 24 janeiro de 2019. Disponível em: <<https://jornalcana.com.br/granbio-deve-retomar-operacoes-comerciais-de-usina-de-etanol-2g/>> Acesso em: Novembro/2019.
- KONISHI, J., FUKUDA, A., MUTAGUCHI, K. & UEMURA, T.; Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* using endogenous xylose-assimilating genes. **Biotechnology Letters**, 37, 1623–1630, 2015.
- KOSSEN, N.W.F., OOSTERHUIS, N.M.G.; Modelling and scaling-up of bioreactors. In: REHM, H.J., REED, G. **Biotechnology**, Weinheim, VHC Publishers, vol. 2, p.571-606, 1985.
- KÖTTER, P.; CIRIACY, M. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 776-783, 1993.
<https://jornalcana.com.br/demanda-por-etanol-ja-supera-a-da-gasolina/>
- KUHAD, R.C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 4950-4962, 2011.
- KURTZMAN, C.P., FELL, J.W.; **The Yeasts: A Taxonomic Study**, 4th edn. Elsevier, Amsterdam, 1998.
- LAGUNAS, R. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Rev**, v. 104, p. 1107-1112, 1993.
- LEANDRO, M. J.; FONSECA, C.; GONÇALVES, P. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. **FEMS Yeast Research**. v.9, p.511-525, 2009.
- LIMA, U. A. Processo Fermentativos e enzimáticos / organização de Urgel de Almeida Lima (Coleção biotecnologia industrial; vol. 3)– 2. ed. – São Paulo: Blucher, 2019.
- LI, Y. C., MITSUMASU, K., GOU, Z. X., GOU, M., TANG, Y. Q., LI, G. Y., WU, X. L., AKAMATSU, T., TAGUCHI, H., KIDA, K., Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.100, p.1531-1542, 2016.
- LI, Y. J., LU, Y. Y., ZHANG, Z. J., MEI, S., TAN, T. W., FAN, L. H.; Co-fermentation of Cellulose and Sucrose/Xylose by Engineered Yeasts for Bioethanol Production. **Energy and Fuels**, v.31, p.4061-4067, 2017.
- LONG, T. M.; SU, Y. K.; HEADMAN, J.; et al. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Applied and**

- Environmental Microbiology**, v. 78, n. 16, p. 5492–5500, 2012.
- LOPES, M.L., PAULILLO, S.C., GODOY, A., CHERUBIN, R.A., LORENZI, M.S., GIOMETTI, F.H.; Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Braz J Microbiol**, v.47, p.64-76, 2016.
- LORENZI, B.R., ANDRADE, T.H.N.; O etanol de segunda geração no Brasil: Políticas e redes sociotécnicas. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v.34, n.100, 2019.
- MACHADO, C. M.M.; Microrganismos na produção de biocombustíveis líquidos. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 319 p., 2013.
- MARQUES, W. L.; MANS, R.; MARELLA, E. R.; et al. Elimination of sucrose transport and hydrolysis in *Saccharomyces cerevisiae*: A platform strain for engineering sucrose metabolism. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 1, p. 1–11, 2017.
- MARTON, J.M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.9-21, 2006.
- MELO, F. A. D.; Contribuição ao estudo cinético da produção de polissacarídeos extracelulares por *Zoogleia sp* em melão de cana-de-açúcar, Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- MIGUEL, A.S.M.; **Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada através de processo descontínuo alimentado**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. Programa de Pós graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica. São Paulo, 2006.
- MOES, C.J.; PRETORIUS, I.S.; VAN ZYL, W.H. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**. v.18, p.269-274, 1996.
- MOURO, A. **Fermentação de xilose e celobiose por leveduras isoladas da biodiversidade brasileira**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Florianópolis, 2012.
- NAKANISHI, S. C.; SOARES, L. B.; BIAZI, L. E.; et al. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 10, p. 2211–2221, 2017.
- NAKASU, P. Y. S.; IENCZAK, L. J.; COSTA, A. C.; RABELO, S. C. Acid post-hydrolysis of xylooligosaccharides from hydrothermal pretreatment for pentose ethanol production. **Fuel**, v. 185, p. 73–84, 2016.

- NGUYEN, N. H.; SUH, S. O.; MARSHALL, C. J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232–1241, 2006.
- NIJLAND, J.G.; SHIN, H.Y.; DE JONG, R.M.; DE WAAL, P.P.; KLAASSEN, P.; DRIESSEN, A.J. Engineering of an endogenous hexose transporter into a specific d-xylose transporter facilitates glucose-xylose co-consumption in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.7, p.168, 2014.
- NIJLAND, J.G.; VOS, E.; SHIN, H.Y.; DE WAAL, P.P.; KLAASSEN, P.; J.; DRIESSEN, A.J.M.; Improving pentose fermentation by preventing ubiquitination of hexose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels**. v.9, p.158, 2016.
- NORRIS, J.R.; ET RIBBONS, D.W.. (eds). **Methods in Microbiology**, vol.1, Academic Press, Londres, 1969.
- NOVY, V.; WANG, R.; WESTMAN, J. O.; FRANZÉN, C. J.; NIDETZKY, B. *Saccharomyces cerevisiae* strain comparison in glucose-xylose fermentations on defined substrates and in high-gravity SSCF: Convergence in strain performance despite differences in genetic and evolutionary engineering history. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.
- O'DONNELL, A.F.; MCCARTNEY, R.R.; CHANDRASHEKARAPPA, D.G.; ZHANG, B.B.; THORNER, J.; SCHMIDT, M.; 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and α -arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. **Molecular and Cellular Biology**. v.35, p.939-955, 2015.
- OLIVEIRA, F.P.; **Avaliação da adaptação evolutiva de *Pichia stipitis* ao hidrolisado hemicelulósico de cana e hierarquização da toxicidade dos inibidores celulares**. Dissertação. Pós graduação em tecnologia de processos químicos e bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <http://www.ladebio.org.br/download/avaliacao-da-aclimatacao-de-pichia-stipitis.pdf>. Acessado em: abril de 2019
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p.25-33, 2000.
- PAPAPETRIDIS, I.; VERHOEVEN, M. D.; WIERSMA, S. J.; et al. Laboratory evolution for forced glucose-xylose co-consumption enables identification of mutations that improve mixed-sugar fermentation by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v. 18, n. 6, p. 1–17, 2018.

- PARTON, C., WILLIS, P.; Strain preservation, inoculum preparation and development. In: MCNEIL, B, HARVEY, LM. **Fermentation: a practical approach**. Oxford, Oxford University Press, p.39-64, 1990.
- PATIÑO, M.A., ORTIZ, J.P., VELÁSQUEZ M., STAMBUK B.U. D-Xylose consumption by non recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: a review. **Yeast** **36**: p.541-556, 2019.
- RABELO, S.C.; Avaliação e otimização de pré-tratamentos e hidrólise enzimática do bagaço de cana de açúcar para produção de etanol de segunda geração. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Processos Químicos da Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.
- RAGHAVENDRAN, V.; BASSO, T. P.; DA SILVA, J. B.; BASSO, L. C.; GOMBERT, A. K. A simple scaled down system to mimic the industrial production of first generation fuel ethanol in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 110, n. 7, p. 971–983, 2017. Springer International Publishing.
- RAÍZEN: Relatório anual dos resultados na safra 2018/2019. Disponível em: <<https://www.raizen.com.br/relatorioanual/1819/pt/>>. Acesso em: Agosto/2019.
- ROCHA, G.J.M; MARTIN, C; SOARES, I.B; SOUTO-MAIOR, A.M; BAUDEL, H.M.; MORAES, C.A. Diluted mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, vol. 35, p. 663–670, 2011.
- PASTOR, R.G.; TORRADO, R. P.; Elena GARRE, E.; MATALLANA, E.; Recent Advances in Yeast Biomass Production, Biomass - Detection, Production and Usage, Dr. Darko Matovic (Ed.), 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biomass-detection-production-andusage/recent-advances-in-yeast-biomass-production>.
- RODRUSSAMEE, N.; SATTAYAWAT, P.; YAMADA, M. Highly efficient conversion of xylose to ethanol without glucose repression by newly isolated thermotolerant *Spathaspora passalidarum* CMUWF1-2. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, 2018.
- ROQUE, L. R., MORGADO, G. P., NASCIMENTO, V. M., IENCZAK, J. L., RABELO, S. C.; Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v.242, p.775-787, 2019.
- ROY, A., KIM, Y-B., CHO, K.H., KIM, J-H. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter Hxt1. **Biochemistry Biophysics**. Acta v. 1840, p. 2878-2885, 2014.
- SALES, B. B.; SCHEID, B.; GONÇALVES, D. L.; et al. Cloning novel sugar transporters from *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* allowing d-xylose fermentation by

- recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 37, n. 10, p. 1973–1982, 2015.
- SANTOS, A. A.; **Desenvolvimento de linhagens recombinantes de *S. cerevisiae* como plataformas de análise de enzimas e transportadores envolvidos na metabolização de xilose**. Dissertação. Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2017.
- SANTOS, S.C. et al. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresource Technology**. v. 219, p. 319-329, 2016.
- SANTOS, S.C. et al. Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. *International Scholarly and Scientific Research & Innovation*. v. 9, n. 5, p. 496-501, 2015.
- SCHIMIDELL, W.; Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. Em: Schimidell, W., BORZANI, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E.; **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. 1ª ed., v.2, São Paulo, 2001.
- SCHNEIDER, H.; WANG, P. Y.; CHAN, Y. K.; MALESZKA, R. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology Letters**. v.3, p.89-92, 1981.
- SCHULTZ, E.L., SOUZA, D.T., MACHADO, M.I.P., SILVA, S.A., ALMEIDA, R.B., FIGUEIREDO, L.H.M.; Monitoramento tecnológico sobre etanol lignocelulósico. parte do projeto da Embrapa intitulado “O uso da informação tecnológica como ferramenta para pesquisa, desenvolvimento e inovação nas áreas de biotecnologia e nanotecnologia agropecuária” – INFOAGRO. 2011. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/936839/1/Emersonetalenapi_detanolmodeloembrapa.pdf> Acesso em: janeiro/2020.
- SILVA, C. E. V.; **Produção enzimática de frutooligossacarídeos (FOS) por leveduras a partir de melão de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2008.
- SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renewable Energy**, v. 37, p. 259-265, 2012.
- SOARES, L. B. **O efeito de inibidores do hidrolisado hemicelulósico e seu impacto no desempenho da fermentação etanólica de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907**. Dissertação. Pós graduação em Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2018.
- Sonogo, J.L.S. (2016); **Estudo da produção de etanol de sacarose por**

- fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos.
- SOUKOULIS, C.; TZIA, C.; Grape, raisin and sugarcane molasses as potential partial sucrose substitutes in chocolate ice cream: a feasibility study. **International Dairy Journal**, v.76, p.18-29, 2018.
- SOUZA, R.; DUTRA, E. D.; LEITE, F. C. B.; et al. Production of ethanol fuel from enzyme-treated sugarcane bagasse hydrolysate using d-xylose-fermenting wild yeast isolated from Brazilian biomes. **Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 0, 2018.
- SLUITER, J. B., et al, Evaluation of Brazilian sugarcane bagasse characterization: An interlaboratory comparison study, **Journal of AOAC International**, v.99, p.579-585, 2016.
- STAMBUK, B.U.; **Yeasts: The leading figures on Bioethanol production.** *In:* Ethanol as a Green Alternative Fuel: Insight and Perspectives. Treichel H, Alves-Jr SL, Fongaro G, Müller C. (eds). p. 57-91. Nova Science Publishers, INC. Hauppauge, NY, 2019.
- STAMBUK, B. U.; BATISTA, A. S.; DE ARAUJO, P. S. Kinetics of active sucrose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 2, p. 212–214, 2000.
- STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.105-108, p.255-263, 2003.
- STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BOM, E. P. S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose cofermenting yeast strains. **Journal of scientific and industrial research**. v. 67, p.918-926, 2008.
- SUN-MI, L., JELLISON, T. & ALPER, H.S. Directed evolution of xylose isomerase for improved xylose catabolism and fermentation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Environmental Microbiology**. v.78, p.5708-5716, 2012.
- Taciro (1992)
- TANTIRUNGKIJ, M.; NAKASHIMA, N.; SEKI, T.; YOSHIDA, T. Construction of xylose-assimilating *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. v.75, p.83-88, 1993.
- TONG, G.E.; INLOES, D.S. Making more. **CHEMTECH**, n.9, p.567-573, 1990.
- UDOP, União dos Produtores de Bioenergia. **Fluxograma de Produção de Açúcar e Álcool.** Disponível em: <http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=29960>>. Acesso em: dezembro/2019.

- UNICA – União da Indústria de Cana de açúcar. **Histórico da produção e moagem de cana de açúcar para a safra 2014/2015**. 2016. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4>> Acesso em: dezembro/2019.
- VAN ZHYL, W.H. et al. Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biofuels: advances in biochemical engineering/biotechnology**. 1.ed. Berlin: Springer, 2007.
- VASCONCELOS, H. V.; **Desenvolvimento e análise econômica de modelo de biorrefinaria integrada 1G2G empregando pré-tratamento ácido diluído**. Dissertação: Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Estadual de São Paulo. Lorena, 2017 .
- VAZ, P.; **Avaliação do Processo Biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Pós Graduação em Biotecnologia Industrial. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade Estadual de São Paulo. Lorena, 2011.
- VERAS, H.C.T., PARACHIN, N.S., ALMEIDA, J.R.M.; Comparative assessment of fermentative capacity of different xylose-consuming yeasts. **Microbial Cell Factories**, v.16, p.153, 2017
- VERHOEVEN, M. D.; LEE, M.; KAMOEN, L.; et al. Mutations in PMR1 stimulate xylose isomerase activity and anaerobic growth on xylose of engineered *Saccharomyces cerevisiae* by influencing manganese homeostasis. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1–11, 2017.
- WAHLBOM, C.F., VAN, Z., W.H., JONSSON, L.J., HAHN-HAGERDAL, B., OTERO, R.R.C. Generation of the improved recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* TMB 3400 by random mutagenesis and physiological comparison with *Pichia stipitis* CBS 6054. **FEMS Yeast Res.** v.3, p.319-32, 2003.
- WEI, N. et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. **Nat. Commun.**, v. 3, p.56, 2013.
- XIA, J., WANG, G., LIN, J., WANG, Y., CHU, J., ZHUANG, Y., ZHANG, S.; Advances and Practices of Bioprocess Scale-up. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v.123, p.127-141, 2015.
- YANG, B., WYMAN, C.E. Pretreatment: the key to unlocking low cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**. v.2, p.26-40, 2008.
- ZANELA, E.; **Influência de compostos furânicos em leveduras assimiladoras de pentoses**. Dissertação. Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

ZHANG, W. & GENG, A. Improved ethanol production by a xylose-fermenting recombinant yeast strain constructed through a modified genome shuffling method.

Biotechnology for Biofuels, v.5, p.46, 2012.

ZHOU, H., CHENG, J. S., WANG, B. L., FINK, G. R., STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**. v.14, p.611–622, 2012.

APÊNDICE A – Equações de Balanço de massa

Balanço de massa: Batelada

Para o cálculo do balanço de massa da fermentação em batelada foram utilizadas as equações abaixo para determinação dos balanços de células (Equação A3), substrato (Equação A6) e produto (Equação A8).

Partindo do balanço global, onde:

$$\text{Variação Global} = \text{Entrada} - \text{Saída} + (\text{geração/consumo})$$

Temos que em um sistema de batelada, o termo de entrada e saída é nulo.

Dessa forma para o balanço de células, temos:

$$\text{(Equação A1)} \quad V \cdot \frac{dX}{dt} = F_e \cdot X_e - F_s \cdot X_s + V \cdot rX$$

Onde F_e é vazão de entrada e F_s a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros, e X_e e X_s a concentração de células na corrente de entrada e saída respectivamente (g L). Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída de células do reator podemos escrever a Equação A1 como:

$$\text{(Equação A2)} \quad \frac{dX}{dt} = rX$$

Como $\mu X = rX \times (1/X)$, podemos reescrever:

$$\text{(Equação A3)} \quad \frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X$$

Para o balanço de substratos (xilose, sacarose, glicose e frutose), temos:

$$\text{(Equação A4)} \quad V \cdot \frac{dS}{dt} = F_e \cdot S_e - F_s \cdot S_s - V \cdot rS$$

Onde S_e é a concentração de substrato na corrente de alimentação e S_s na corrente de saída (g L). Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída do reator podemos escrever a Equação A4 como:

$$(Equação A5) \quad \frac{dS}{dt} = -\frac{V}{V} \cdot r_S$$

Rearranjando a equação temos:

$$(Equação A6) \quad \frac{dS}{dt} = -\left(\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x \right) \cdot X$$

E por fim, para o balanço de produto (etanol):

$$(Equação A7) \quad V \cdot \frac{dP}{dt} = F_e \cdot P_e - F_s \cdot P_s + V \cdot r_P$$

Sendo P_e e P_s a concentração de produto em g L na corrente de entrada e saída respectivamente. Como F_e e F_s são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída do reator e como $\mu_P = r_P \times (1/X)$, obtemos:

$$(Equação A8) \quad \frac{dP}{dt} = \mu_P \cdot X$$

Balanço de massa: Batelada descontínua alimentada

Para o cálculo do balanço de massa da fermentação em batelada alimentada foram utilizadas as equações abaixo para determinação dos balanços de células (Equação A10), substrato (Equação A13) e produto (Equação A15).

Partindo do balanço global, onde:

$$\text{Variação Global} = \text{Entrada} - \text{Saída} + (\text{geração/consumo})$$

Temos que em um sistema de batelada alimentada, o termo de saída é nulo.

Dessa forma para o balanço de células, temos:

(Equação A9)
$$V \cdot \frac{dX}{dt} = Fe \cdot Xe - Fs \cdot Xs + V \cdot rX$$

Onde Fe é vazão de entrada e Fs a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros. Como Xe e Xs são nulos, pois não existe fluxo de entrada nem saída de células do reator podemos escrever a Equação A9 como:

(Equação A10)
$$V \cdot \frac{dX}{dt} = V \cdot \mu X \cdot X$$

Para o balanço de substratos (xilose, sacarose, glicose e frutose):

(Equação A11)
$$V \cdot \frac{dS}{dt} = Fe \cdot Se - Fs \cdot Ss - V \cdot rS$$

Onde Fe é vazão de entrada e Fs a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros. Como o termo de saída é nulo, temos:

(Equação A12)
$$V \cdot \frac{dS}{dt} = \frac{Fe}{V} \cdot Se - \mu S \cdot X$$

(Equação A13)
$$\frac{dS}{dt} = D \cdot Se - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu_x \right) \cdot X$$

E por fim, para o balanço de produto (etanol):

(Equação A14)
$$V \cdot \frac{dP}{dt} = Fe \cdot Pe - Fs \cdot Ps + V \cdot rP$$

Onde Fe é vazão de entrada e Fs a vazão de saída em L/h e V o volume do reator em litros. Como Pe é nulo e Fs também, temos:

(Equação A15)
$$V \cdot \frac{dP}{dt} = V \cdot \mu P \cdot X$$

APÊNDICE B – Dados complementares Testes de Pré Inóculo e Inóculo

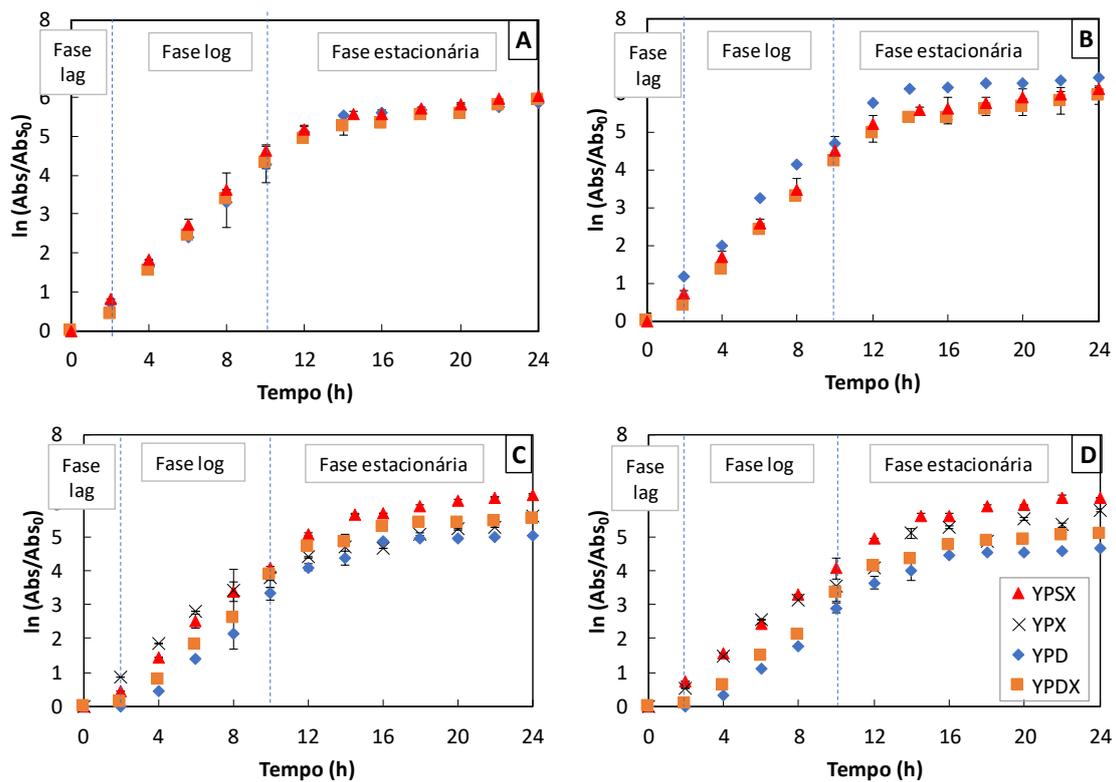


Figura B1. Cinéticas de crescimento do teste de pré inóculo com fases de crescimento identificadas para as leveduras (A) *S. cerevisiae* MP-C5 e (B) MP-C5H1, (C) *Sc. stipitis* e (D) *Sp. passalidarum*. Foram excluídos os dados em YPX para as leveduras recombinantes por não apresentarem crescimento significativo passível de identificação dessas fases de crescimento.

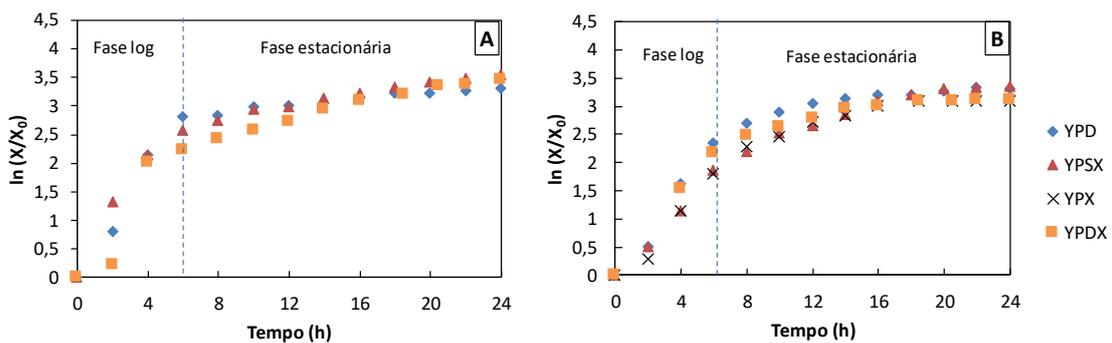


Figura B2. Cinéticas de crescimento do teste de inóculo com fases de crescimento identificadas para as leveduras (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 e (B) *Sp. passalidarum*. Foram excluídos os dados em YPX para a levedura recombinante por não apresentar crescimento significativo passível de identificação dessas fases de crescimento.

Tabela B1. Ajuste linear das curvas de concentração de células em g L⁻¹ (y) versus absorbância (x) para *S. passalidarum* e *S. cerevisiae* MP-C5H1 na etapa de inóculo em diferentes meios.

Meio de cultivo	<i>Sp. passalidarum</i>		MP-C5H1	
	Equação da reta	R ²	Equação da reta	R ²
YPD	y = 0,4322x - 0,0749	0,995	y = 0,4701x + 0,0254	0,9866
YPX	y = 0,3905x - 0,0799	0,9891	y = 0,4268x - 0,1427	0,9426
YPDX	y = 0,4022x - 0,062	0,988	y = 0,4574x - 0,0799	0,9734
YPSX	y = 0,4181x	0,9899	y = 0,4724x	0,9924

APÊNDICE C – Cinéticas do Teste de Proporção de açúcares

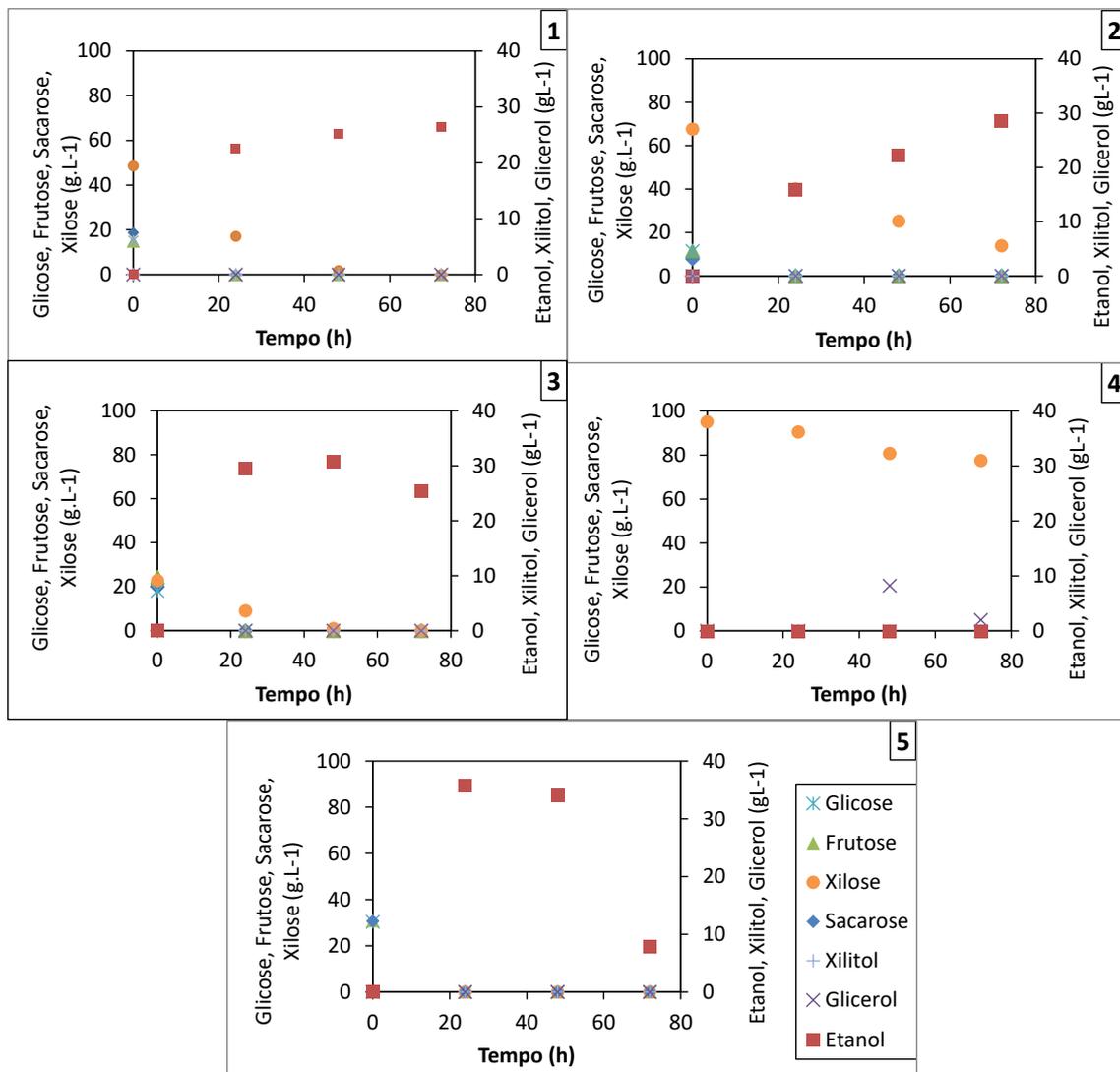


Figura C1. Cinéticas do teste de fermentação em frasco variando a proporção de sacarose e xilose para levedura *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante. Onde: (1) 50% xilose e 50% sacarose; (2) 70% xilose e 30% sacarose; (3) 30% xilose e 70% sacarose; (4) 100% xilose; (5) 100% sacarose. Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

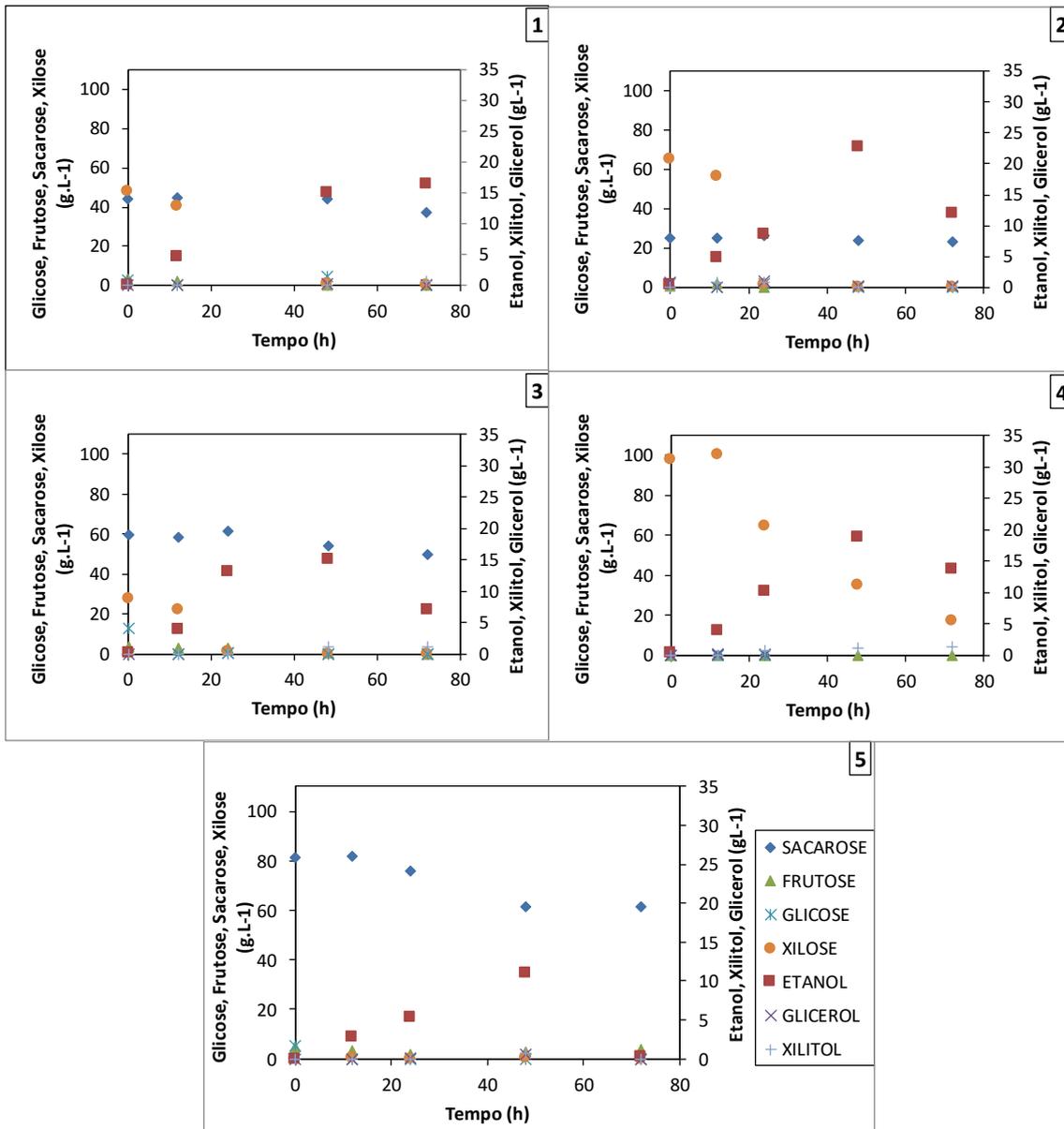


Figura C2. Cinéticas do teste de fermentação em frasco variando a proporção de sacarose e xilose para levedura *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907. Onde: (1) 50% xilose e 50% sacarose; (2) 70% xilose e 30% sacarose; (3) 30% xilose e 70% sacarose; (4) 100% xilose; (5) 100% sacarose. Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

APÊNDICE D – Cinéticas dos Teste de Concentração de açúcares

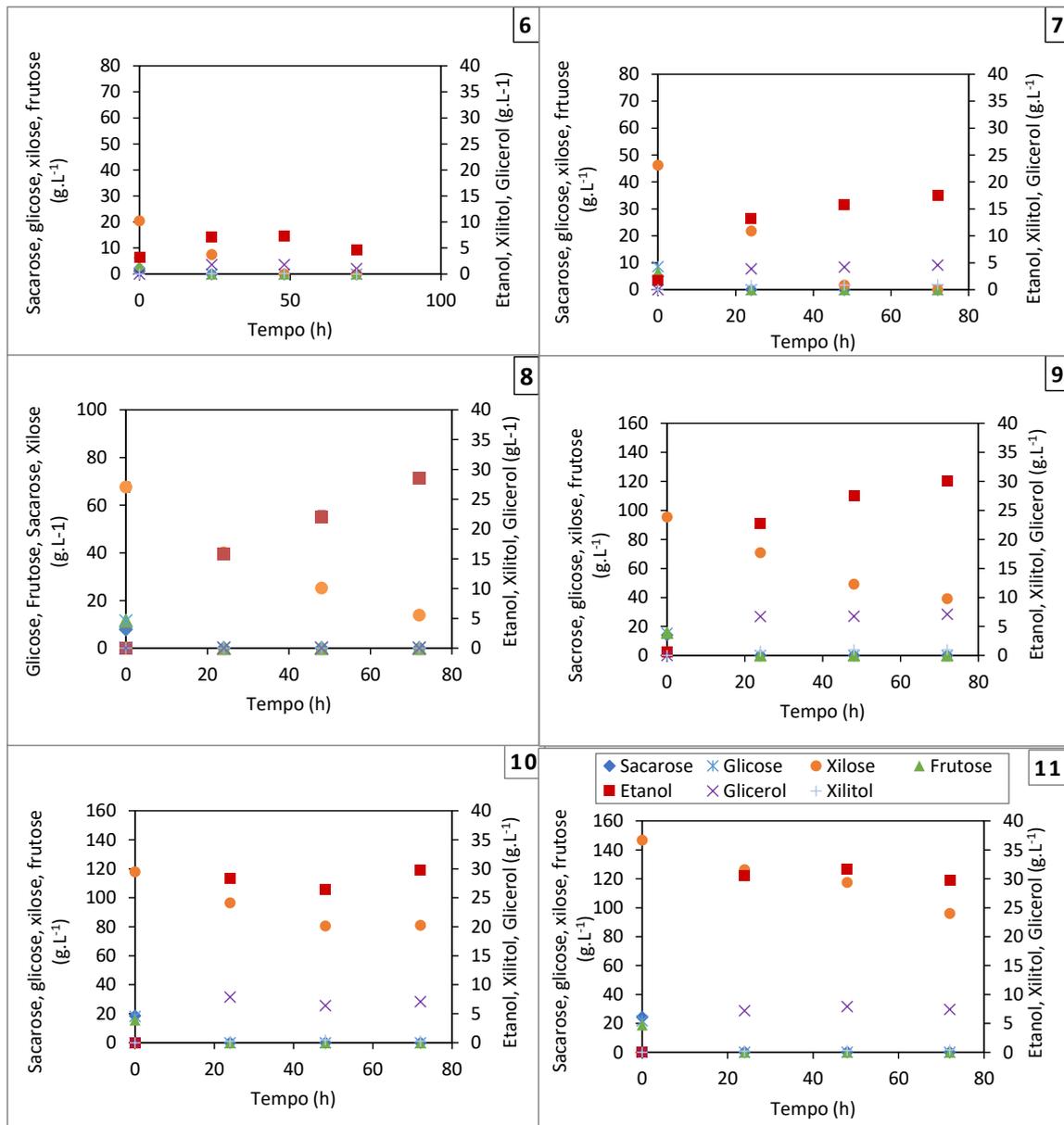


Figura D1. Cinéticas do teste de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato na proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose para levedura MP-C5H1 testando diferentes concentrações iniciais de substrato. Onde: (6) 30g L⁻¹; (7) 60g L⁻¹; (8) 90g L⁻¹; (9) 120g L⁻¹; (10) 150g L⁻¹; (11) 180g L⁻¹. Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

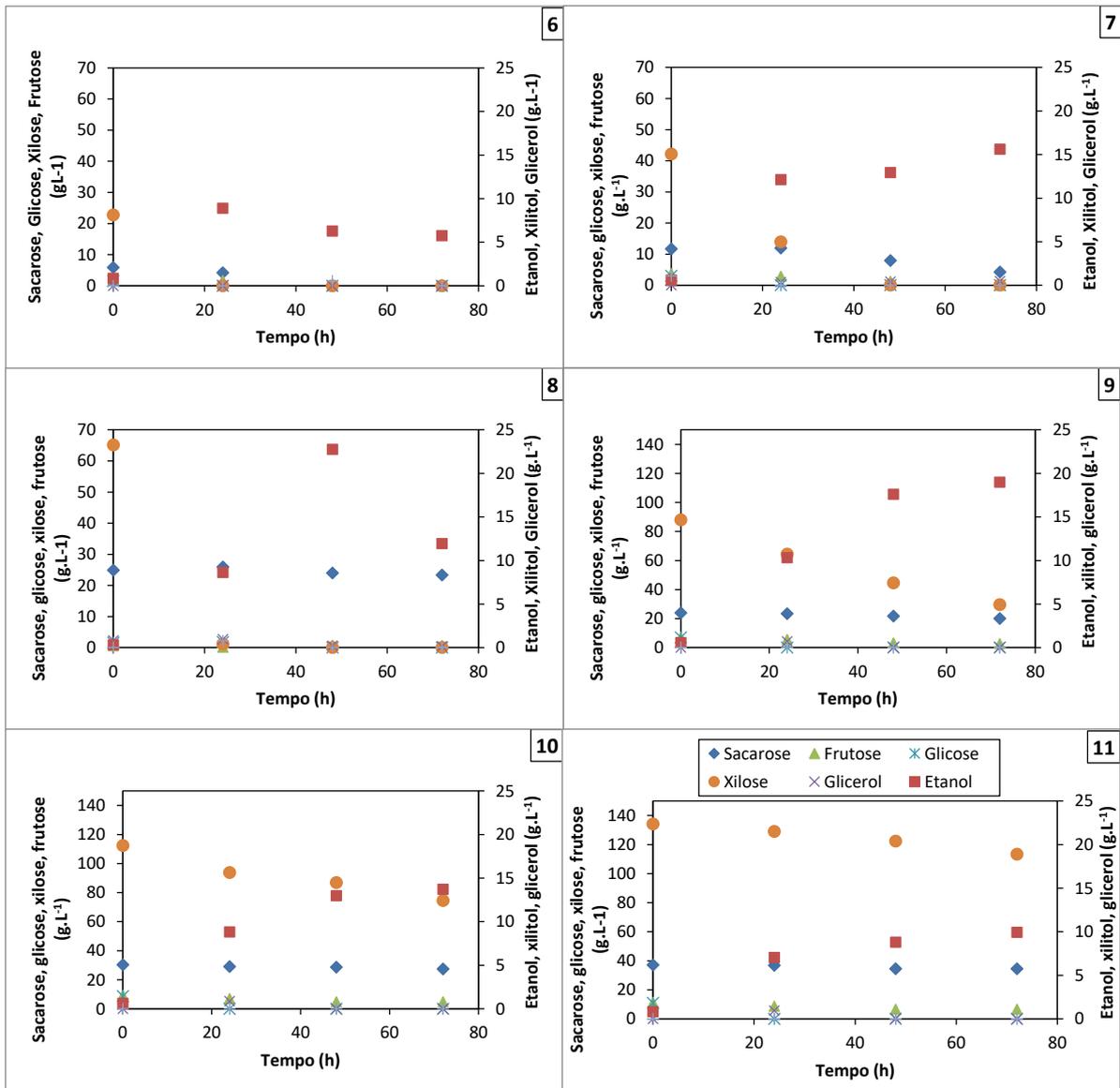


Figura D2. Cinéticas do teste de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato na proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose para levedura *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907 testando diferentes concentrações iniciais de substrato. Onde: (6) 30g L⁻¹; (7) 60g L⁻¹; (8) 90g L⁻¹; (9) 120g L⁻¹; (10) 150g L⁻¹; (11) 180g L⁻¹. Todos os valores são médias de duplicatas experimentais.

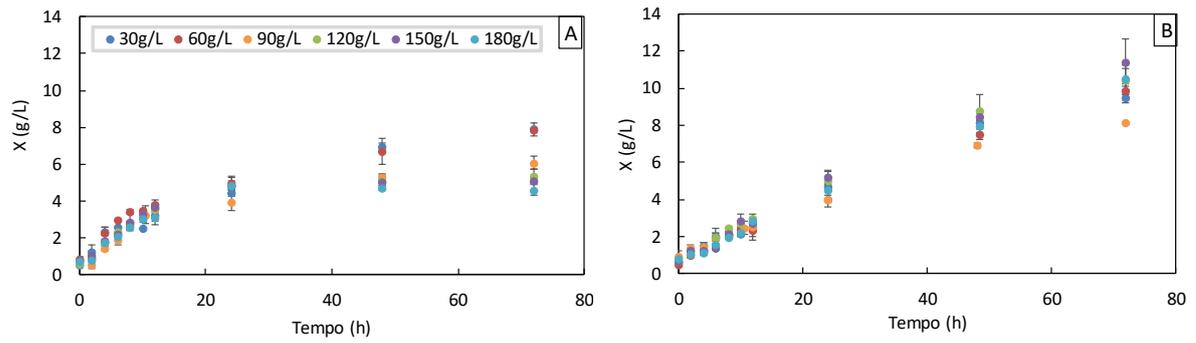


Figura D3. Cinéticas de crescimento para o teste de fermentação em frasco variando a concentração inicial de substrato na proporção de 70% de xilose e 30% de sacarose, para levedura (A) *S. cerevisiae* MP-C5H1 recombinante e (B) *Sp. passalidarum* NRRL Y-27907.