



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

Juliane Machado da Silveira

Obtenção de etanol de segunda geração (E2G) utilizando células de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 imobilizadas em alginato de cálcio

Florianópolis
2021

Juliane Machado da Silveira

**Obtenção de etanol de segunda geração (E2G) utilizando células de *Spathaspora
passalidarum* NRRL Y-27907 imobilizadas em alginato de cálcio**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em
Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em
Engenharia de Alimentos
Orientador: Prof^º. Dr^º. Jaciane Lutz Ienczak
Coorientador: Dr. Luiz Eduardo Biazzi

Florianópolis

2021

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

Silveira, Juliane Machado da
Obtenção de etanol de segunda geração (E2G) utilizando
células de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907
imobilizadas em alginato de cálcio / Juliane Machado da
Silveira ; orientadora, Jaciane Lutz Ienczak,
coorientador, Luiz Eduardo Biazi, 2021.
87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Etanol de segunda
geração. 3. Imobilização de células. 4. *Spathaspora*
passalidarum. I. Ienczak, Jaciane Lutz. II. Biazi, Luiz
Eduardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Juliane Machado da Silveira

Obtenção de etanol de segunda geração (E2G) utilizando células de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 imobilizadas em alginato de cálcio

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

Prof.(a) Jaciane Lutz Ienczak, Dr.(a)

Instituição UFSC

Prof.(a) Débora de Oliveira, Dr.(a)

Instituição UFSC

Prof.(a) Aline Costa, Dr.(a)

Instituição UNICAMP

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

Prof.(a) Sandra Regina Salvador Ferreira, Dr.(a)

Coordenador(a) do Programa

Prof.(a) Jaciane Lutz Ienczak, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2021

Este trabalho é dedicado aos meus maiores incentivadores, meus pais Maristela e Joel Fernando.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo aos meus pais, Maristela e Joel Fernando da Silveira. Todo o apoio e sacrifício de vocês nestes anos da minha vida foram imprescindíveis para eu chegar até aqui. Obrigado por me incentivarem sempre e por me ajudarem a nunca desistir, eu não conseguiria sem vocês. Amo vocês.

Agradeço à Prof.^a Jaciane Ienczak pela orientação, pela paciência e por todos os ensinamentos nesses anos. Obrigada pela compreensão e por todo o suporte durante o desenvolvimento deste trabalho, não importando a hora ou o dia da semana. Tu és uma super profissional e sei que acertei em cheio na escolha da orientação.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos (PPGEAL) pela oportunidade e apoio científico e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Luiz Eduardo Biazi pela coordenação, pelos ensinamentos e por toda a ajuda na vida laboratorial. Agradeço também aos outros integrantes do grupo Scinfer por toda a parceria, ajuda e acolhimento nesse tempo. Em especial agradeço à Lauren Bergmann por ser uma grande companheira no desenvolvimento do trabalho. Obrigada por ser minha amiga e estar disposta a me ajudar sempre, além de ouvir todos os meus problemas referentes à dissertação. Agradeço também a iniciante científica Liana Longo pelo auxílio.

Agradeço aos companheiros de laboratório, os integrantes do LiEB, por compartilharem os altos e baixos da vida de pesquisador e ficarem felizes por cada pequena vitória. Agradeço em especial à Karina Cesca, que foi um dos meus principais ombros amigo no laboratório e nunca mediu esforços para ajudar na minha pesquisa. Agradeço pela realização das análises no MEV e aproveito para agradecer ao laboratório LCME pela disponibilidade do equipamento.

Ao Eduardo Leonarski e à Hélia Alves que além de parceiros LiEB, juntamente com Mayara Kuasnei, Nathalia Horrana, Paulo Chada, Jonas Silva e Guilherme Dallarmi se tornaram parceiros de vida. Pessoas que me acolheram logo que cheguei à cidade e com as quais vivi momentos inesquecíveis. Pessoal, vocês fizeram da minha vida longe de casa uma experiência maravilhosa. Obrigada por estarem comigo sempre, por ouvirem minhas tristezas e alegrias e por me acompanharem em todas as coisas que vivi nesses últimos tempos.

Agradeço ao Prof. Bóris Stambuk pela disponibilização dos equipamentos para realização das análises do trabalho. Aos alunos do professor no laboratório LBMBL, em especial ao Eduardo pela realização das análises de HPLC.

À Prof.^a Débora de Oliveira e à Prof.^a Aline Costa pela disponibilidade da banca e por estarem dispostas a contribuir com este trabalho.

Agradeço aos meus amigos Carina Ramos, Jandler dos Santos e Matheus Amorim por todas as chamadas de vídeo, memes e conversas, que tornam minha vida mais leve. Agradeço também ao meu afilhado Benjamin Luongo que mudou a minha vida pra melhor e é uma das pessoas que mais me fazem falta no dia a dia. À minha comadre Suzane Santos que apesar da distância vai ser pra sempre minha primeira amiga.

Por último, mas definitivamente não menos importante, agradeço ao meu namorado Anderson da Silva, por me ajudar desde o início, antes mesmo de sermos nós. Obrigada por todas as dicas, ensinamentos e por ajudar no desenvolvimento deste trabalho. Tu com certeza tornaste a minha vida – pessoal e acadêmica – mais fácil e muito melhor.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma no desenvolvimento do trabalho e para manter minha saúde mental. Todas as palavras de apoio, ajuda e a confiança de todos vocês, foi essencial para que esta pesquisa acontecesse. Mais uma vez, obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

RESUMO

O etanol de segunda geração (E2G) é obtido a partir de biomassas lignocelulósicas como o bagaço de cana-de-açúcar, subproduto da produção de etanol de primeira geração (E1G). Vários obstáculos precisam ser superados para a fermentação industrial do hidrolisado hemicelulósico (HH), obtido a partir do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído como, por exemplo, o consumo de xilose e resistência aos inibidores que prejudicam o desempenho de leveduras fermentadoras de pentoses como *Spathaspora passalidarum*. A imobilização pode ser uma alternativa para conferir proteção às células e aumentar a produtividade volumétrica do sistema, além de facilitar sua reutilização durante o processo. Neste trabalho foi avaliada a imobilização de células de *S. passalidarum* em esferas de alginato de cálcio e realizada a comparação do desempenho fermentativo em relação ao sistema com células livres. Neste contexto, foram realizados três ensaios: (1) células imobilizadas com concentração inicial elevada de açúcares redutores (AR) (120 g.L^{-1}); (2) células imobilizadas com concentração inicial moderada de AR ($70 - 90 \text{ g.L}^{-1}$) e (3) células livres com concentração inicial moderada de AR ($70 - 90 \text{ g.L}^{-1}$), simulando o meio de HH com base nos tipos de AR (glicose e xilose) e suas proporções. Todos os ensaios ocorreram em *shaker*, a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e 110 rpm e foram realizadas cinco bateladas sucessivas visando o reuso de células. Para o ensaio com células imobilizadas em elevada concentração inicial de AR o máximo fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) foi alcançado na batelada B5 ($0,30 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$), e a produtividade (Q_P) máxima observada foi na B2 ($0,93 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). O ensaio com células imobilizadas em concentração moderada de AR alcançou $Y_{P/S}$ de $0,30 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em B2, similar aos valores obtidos pelas células livres, na faixa de $0,30$ a $0,33 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Entretanto, Q_P foi inferior para este ensaio, alcançando $0,81 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ em B2, enquanto para células livres a faixa foi de $1,06$ a $1,16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Uma técnica para determinação da concentração de células imobilizadas nas esferas de alginato foi desenvolvida, o que possibilitou a determinação das velocidades específicas para as fermentações realizadas. De acordo com os resultados obtidos foi possível demonstrar que *S. passalidarum* pode ser imobilizada em alginato de cálcio, no entanto, o suporte escolhido não se mostrou o mais adequado, pois devido à evolução de CO_2 observou-se, por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), a baixa resistência desta matriz, o que leva a sugerir o teste de outras matrizes para imobilização. Outra conclusão importante está na escolha do sistema de fermentação, que para o caso de *S. passalidarum* necessita de aeração para favorecer o consumo de xilose, portanto, sistemas em leito fluidizado contínuos poderiam ser uma alternativa para auxiliar na transferência deste nutriente.

Palavras-chave: produtividade volumétrica. hidrolisado hemicelulósico. bateladas sucessivas. alginato de cálcio

ABSTRACT

Second generation ethanol (E2G) is obtained from lignocellulosic biomasses such as sugarcane bagasse, a by-product of the first generation ethanol (E1G) production. Several obstacles must be overcome for the industrial fermentation of hemicellulosic hydrolyzate (HH), obtained from the pretreatment of sugarcane bagasse with diluted sulfuric acid, such as the consumption of xylose and resistance to inhibitors that harm the performance of pentose fermenting yeasts such as *Spathaspora passalidarum*. Immobilization can be an alternative to provide protection to cells and increase the volumetric productivity of the system, in addition to facilitating its reuse during the process. In this work, the immobilization of *S. passalidarum* cells in calcium alginate beads was evaluated and a comparison of the fermentative performance in relation to the system with free cells was performed. In this context, three tests were carried out: (1) immobilized cells with high initial concentration of reducing sugars (RS) (120 g.L^{-1}); (2) immobilized cells with moderate initial concentration of RS ($70 - 90 \text{ g.L}^{-1}$) and (3) free cells with moderate initial concentration of RS ($70 - 90 \text{ g.L}^{-1}$), simulating the HH medium based on the types of RS (glucose and xylose) and their proportions. All tests were carried out in a shaker, at 30°C and 110 rpm and five successive batches were performed aiming at the reuse of cells. For the assay with cells immobilized in high initial concentration of RS, the maximum substrate-to-product conversion factor ($Y_{P/S}$) achieved in the B5 batch of $0.30 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, and the maximum productivity (Q_P) observed it was in B2 ($0.93 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). The assay with cells immobilized in moderate RS concentration reached $Y_{P/S}$ of $0.30 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in B2, similar to the values obtained by free cells, in the range of 0.30 to $0.33 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. However, Q_P was lower for this test, reaching $0.81 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ in B2, while for free cells the range was 1.06 to $1.16 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. A technique for determining the concentration of cells immobilized in the alginate beads was developed, which made it possible to determine the specific rates for the fermentations performed. According to the results obtained, it was possible to demonstrate that *S. passalidarum* can be immobilized in calcium alginate, however, the support chosen was not the most appropriate, because due to the evolution of CO_2 it was observed, by means of scanning electron microscopy (SEM), the low resistance of this matrix, which suggests suggesting the testing of other matrices for immobilization. Another important conclusion is in the choice of the fermentation system, which for the case of *S. passalidarum* needs aeration to favor the consumption of xylose, therefore, continuous fluidized bed systems could be an alternative to assist in the transfer of this nutrient.

Keywords: volumetric productivity. hemicellulosic hydrolysate. successive batches. calcium alginate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção de E1G e açúcar, a partir da cana-de-açúcar, utilizando o processo <i>Melle Boinot</i>	23
Figura 2 – Biomassas lignocelulósicas	26
Figura 3 – Estrutura das biomassas lignocelulósicas.....	26
Figura 4 – Fluxograma da produção de E2G.....	28
Figura 5 – Vias metabólicas de consumo de xilose e glicose por <i>S. passalidarum</i>	30
Figura 6 – Métodos de imobilização de células	33
Figura 7 – Tipos de imobilização por envolvimento.....	34
Figura 8 – Estrutura química do alginato de sódio	36
Figura 9 – Imobilização de células de <i>S. passalidarum</i> em alginato de cálcio	42
Figura 10 – Fermentação com células (a) imobilizadas e (b) livres.....	44
Figura 11 – Metodologia de determinação da concentração de células imobilizadas.....	45
Figura 12 – Concentração de AR, células, células e etanol ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração elevada de açúcar, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas.....	51
Figura 13 – Concentração de células totais, de células imobilizadas e de células suspensas no meio ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração elevada de açúcar, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas	52
Figura 14 – Velocidades de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas	53
Figura 15 – Velocidades específicas de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas.....	54
Figura 16 – Concentração de xilitol, glicerol e ácido acético ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas	54
Figura 17 – pH ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas	55
Figura 18 – Concentração de glicose, xilose, células e etanol ao longo do tempo de fermentação com concentração moderada de AR, sendo (a) células livres e (b) células imobilizadas e B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas.....	57

Figura 19 – Concentração de células total, de células imobilizadas e de células suspensas no meio ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração moderada de açúcar, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas.....	59
Figura 20 – Concentração de xilitol, glicerol e ácido acético ao longo do tempo de fermentação em batelada sucessivas usando (a) células livres e (b) células imobilizadas, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas	63
Figura 21 – Velocidades de consumo de xilose e glicose e de formação de etanol ao longo do tempo de fermentação, sendo (a) células livres e (b) células imobilizadas e B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas.....	65
Figura 22 – Velocidades específicas de consumo de açúcares e formação de produto ao longo do tempo de fermentação com (a) células livres e (b) células imobilizadas, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas	66
Figura 23 – pH ao longo do tempo de fermentação de cada batelada com células livres e células imobilizadas, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas	67
Figura 24 – Influência da concentração inicial de açúcares redutores (AR) no (a) fator de conversão modificado ($Y'_{P/S}$), (b) na concentração de AR residual, (c) na produtividade (Q_p) e (d) na velocidade de consumo de xilose máxima da batelada (μ_{xilose}).....	69
Figura 25 – Características morfológicas das esferas de alginato de cálcio, no ensaio ARM antes das bateladas, após 3 bateladas e após 5 bateladas, sendo: (a), (b), (c) a visão total da esfera; (d), (e), (f) a superfície da esfera e (g), (h), (i) o interior da esfera	73
Figura 26 – Características morfológicas das esferas de alginato de cálcio, no ensaio ARE, antes das bateladas, após 3 bateladas e após 5 bateladas, sendo: (a), (b), (c) a visão total da esfera; (d), (e), (f) a superfície da esfera e (g), (h), (i) o interior da esfera	74
Figura 27 – Balanço de massa das bateladas do ensaio com células livres, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas	76
Figura 28 – Balanço de massa das bateladas do ensaio CI70.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição de HH obtido por pré-tratamento ácido	29
Tabela 2 – Estudos reportados na literatura para produção de E1G e E2G utilizando microrganismos imobilizados em diferentes suportes.....	39
Tabela 3 – Composição dos meios de pré-inóculo, inóculo e propagação.....	41
Tabela 4 – Composição dos meios de fermentação utilizando células imobilizadas	43
Tabela 5 – Composição dos meios de fermentação utilizando células imobilizadas e livres ..	44
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos de fermentação.....	48
Tabela 7 – Parâmetros cinéticos do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR.....	51
Tabela 8 – Parâmetros cinéticos do ensaio com células livres e imobilizadas e concentração moderada de AR.....	60
Tabela 9 – Parâmetros cinéticos dos ensaio com células imobilizadas com concentração moderada (ARM) e concentração elevada de açúcares (ARE)	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

E1G: etanol de primeira geração

E2G: etanol de segunda geração

S: substrato

X: células

P: concentração de produto [g.L⁻¹]

CO₂: dióxido de carbono

MEV: microscopia eletrônica de varredura

AR: açúcar redutor

ARM: açúcar redutor moderado

ARE: açúcar redutor elevado

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 determinação

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]

S_i: concentração inicial de substrato [g.L⁻¹]

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

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

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

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

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

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

Y'_{P/S}: fator de conversão de substrato em produto modificado [g.g⁻¹]

LISTA DE SÍMBOLOS

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

μ_{S} : velocidade específica de consumo de substrato [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]

μ_{P} : velocidade específica de formação de produto [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]

μ_{X} : velocidade específica de crescimento [h^{-1}]

μ_{xilose} : velocidade específica de consumo de xilose [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]

μ_{glicose} : velocidade específica de consumo de glicose [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]

μ_{etanol} : velocidade específica de produção de etanol [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]

η : rendimento [%]

SUMÁRIO

	DIAGRAMA CONCEITUAL	17
1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral.....	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	PRODUÇÃO DE BIOETANOL	22
2.2	BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO.....	25
2.2.1	Matérias-primas lignocelulósicas: bagaço de cana-de-açúcar como potencial biomassa para produção de E2G.....	25
2.2.2	Pré-tratamento	28
2.2.3	Fermentação do hidrolisado hemicelulósico	29
2.3	PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO LEVEDURAS IMOBILIZADAS	32
2.3.1	Métodos de imobilização	32
2.3.2	Suportes de imobilização: ênfase no alginato de cálcio em processos fermentativos	35
2.3.3	Estado da arte: produção de etanol com leveduras imobilizadas	36
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	MICROORGANISMO	41
3.2	OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CONCENTRADA DO MICROORGANISMO	41
3.3	IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CÁLCIO	42
3.4	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E RECICLOS COM AÇÚCARES SINTÉTICOS	43
3.4.1	Fermentação com concentração elevada de açúcares (ARE)	43
3.4.2	Fermentações com concentração moderada de açúcares (ARM)	44
3.5	MÉTODOS ANALÍTICOS	45
3.5.1	Determinação da concentração de células imobilizadas por espectrofotometria	45
3.5.2	Determinação da concentração de células livres por espectrofotometria	46
3.5.3	Análise morfológica das esferas de alginato de cálcio	46
3.5.4	Determinação da concentração de analitos	47
3.5.5	Determinação de pH	47

3.6	ANÁLISE DE DADOS	47
3.6.1	Parâmetros cinéticos de fermentação	47
3.6.2	Balanco de massa para fermentações em batelada.....	48
3.6.3	Análise estatística.....	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1	FERMENTAÇÃO COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCARES REDUTORES UTILIZANDO <i>S. passalidarum</i> IMOBILIZADA	50
4.2	FERMENTAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO MODERADA INICIAL DE AÇÚCARES: CÉLULAS LIVRES X CÉLULAS IMOBILIZADAS	55
4.3	COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS COM CÉLULAS IMOBILIZADAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR INICIAL.....	68
4.4	ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO.....	71
4.5	BALANÇO DE MASSA DOS ENSAIOS COM CONCENTRAÇÃO MODERADA DE AÇÚCAR: CÉLULAS LIVRES X CÉLULAS IMOBILIZADAS	74
5	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS.....	81

DIAGRAMA CONCEITUAL

O que?

- Comparação de sistemas para produção de etanol de segunda geração (E2G) utilizando células livres e células imobilizadas de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907.

Por quê?

- A produção de E2G é uma alternativa à elevada demanda energética e buscam-se formas de otimizá-la;
- Não há relatos de imobilização da levedura *S. passalidarum* para produção de E2G na literatura consultada;
- O alginato de cálcio é um dos suportes mais utilizados para a imobilização de microrganismos.

O que já existe?

- Comparação de sistemas para produção de etanol de primeira geração (E1G) utilizando células livres e células imobilizadas de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Estudos de produção de E2G utilizando células livres de leveduras não convencionais como, por exemplo, *S. passalidarum* e *S. stipitis*;
- Estudos de produção de E2G utilizando células imobilizadas de *S. stipitis*, *Candida shehathae* e *S. cerevisiae* geneticamente modificada em alginato de cálcio.

Hipóteses da pesquisa

- É possível a imobilização por envolvimento das células de *Spathaspora passalidarum* em alginato de cálcio?
- É possível o reciclo/reuso das células imobilizadas de *S. passalidarum*?
- A imobilização confere o aumento da produtividade de etanol nas fermentações em batelada, quando comparada ao sistema com células livres?

1 INTRODUÇÃO

O aumento da demanda energética mundial combinado a problemas ambientais, como o aquecimento global, impulsionou a busca por fontes alternativas ao combustível fóssil. O bioetanol é uma fonte de energia renovável e sustentável e pode ser obtido a partir de diferentes carboidratos, divididos em matérias-primas açucaradas, amiláceas e lignocelulósicas, que apresentam a fórmula geral $(CH_2O)_n$. O etanol produzido a partir das biomassas açucaradas e amiláceas, como cana-de-açúcar e milho, é chamado de etanol de primeira geração (E1G), que atualmente corresponde a 65 % da produção mundial de biocombustível. O etanol de segunda geração (E2G) refere-se àquele obtido a partir das biomassas lignocelulósicas como, por exemplo, o bagaço da cana-de-açúcar (DALENA et al., 2018; NAGHSHBANDI et al., 2019; SENATORE et al., 2019). A cana-de-açúcar tem grande importância industrial no Brasil devido à sua abundância e pela possibilidade de obtenção de diversos produtos destacando-se o açúcar e o bioetanol, e gerando o bagaço como um dos principais resíduos, o qual possui potencial de utilização na produção de E2G. A cada 1 ton de cana-de-açúcar são produzidos cerca de 140 kg de bagaço (B.S.), na qual parte é utilizada na cogeração, para produção de energia, e outra parte tem capacidade para ser utilizado na produção de E2G (SANTOS et al., 2019a, 2019b).

Devido à composição polimérica das biomassas lignocelulósicas, que consiste principalmente de celulose (40 – 50 %), hemiceluloses (25 – 30 %) e lignina (15 – 20 %) (ROCHA et al., 2011), verifica-se a necessidade de desconstrução destes polímeros para posterior uso em um processo fermentativo. A celulose é um homopolímero de glicose, as hemiceluloses são constituídas, em sua maioria, por hexoses (glicose, galactose e manose), pentoses (xilose e arabinose) e grupos acetil, enquanto a lignina é composta por monômeros fenólicos de álcool (DALENA et al., 2019; ZABED et al., 2016). O fracionamento e liberação de açúcares da biomassa pode ser realizado, por exemplo, por meio de pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído seguido de hidrólise enzimática (LIMA et al., 2021). Na primeira etapa haverá a liberação de açúcares monoméricos (majoritariamente xilose) e de grupos acetil da estrutura das hemiceluloses na forma líquida, conhecido como hidrolisado hemicelulósico (HH) (ROCHA et al., 2011) e a obtenção de um material sólido rico em celulose e lignina (celulignina). Já a etapa de hidrólise enzimática da celulignina (CANILHA et al., 2012; LIMAYEM; RICKE, 2012) será responsável pela formação de um hidrolisado rico em hexoses presentes na estrutura da celulose, o hidrolisado celulósico. Vale destacar que a etapa de pré-tratamento, além de promover a hidrólise das hemiceluloses também promove a hidrólise parcial da estrutura da lignina gerando inibidores (furfural, hidroximetilfurfural e compostos

fenólicos) que estarão presentes na composição de HH. Na sequência, estes hidrolisados podem ser fermentados a etanol por leveduras competentes, a partir da metabolização dos açúcares presentes no meio (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada industrialmente para a produção de E1G, é incapaz de fermentar pentoses e, portanto, não é ideal para ser utilizada na fermentação de HH para produção de E2G, sendo necessária a busca por outros microrganismos. Uma alternativa é a levedura *Spathaspora passalidarum*, isolada do estômago de besouros consumidores de madeira, que apresenta o metabolismo necessário para a produção de E2G a partir da xilose. Do ponto de vista industrial, embora a fermentação de hexoses seja mais fácil, pois utiliza *S. cerevisiae*, a fermentação das pentoses do HH é essencial para que a produção de bioetanol a partir de biomassas lignocelulósicas seja economicamente viável (CANILHA et al., 2011; MILESSI et al., 2015). *S. passalidarum* é uma das melhores opções de leveduras fermentadoras de xilose, entretanto o consumo de xilose ainda é lento, assim, operar em sistemas com alta densidade celular e que promovam o reuso destas células, pode aumentar a produtividade e contribuir para o aumento da velocidade de consumo de xilose (NEITZEL et al., 2020).

A imobilização é uma técnica na qual células, ou enzimas, são fixadas em uma matriz, o suporte, sendo esse procedimento capaz de aumentar sua estabilidade e possibilidade de reutilização (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020). Este processo pode ser uma alternativa para a melhora da produção de E2G por *S. passalidarum*, já que este processo é capaz de proteger as células contra inibidores, além de melhorar aspectos muitas vezes limitantes para a utilização de microrganismos como o longo tempo de operação, estabilidade, dificuldade de recuperação e reutilização dos mesmos (BEHERA; RAY, 2015; RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020).

A imobilização pode ser realizada em diversos suportes por meio de métodos variados, os quais são classificados de acordo com o princípio existente para interação entre células e superfície dos suportes (SCHMIDELL et al., 2001). Nos estudos atuais, o suporte mais utilizado é o alginato de cálcio, por apresentar uma técnica relativamente fácil e com bom custo-benefício (NEDOVIC; WILLAERT, 2004). Orrego et al. (2018) utilizaram células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio para fermentação da mucilagem de café na produção de etanol e avaliaram diferentes concentrações de alginato de cálcio (2-4 %) e tamanho de esfera (3 ou 7 mm) para a definição da melhor estrutura de imobilização. Milessi et al. (2020a) avaliaram a produção de E2G em reator de leito fixo por *S. cerevisiae* T18 imobilizada em

alginato de cálcio por dez bateladas sucessivas, utilizando HH de bagaço de cana-de-açúcar como substrato. Em ambos os estudos os autores perceberam que a imobilização das células em alginato de cálcio favoreceu a produção de bioetanol, através da comparação de parâmetros como a produtividade.

A produção de E2G apresenta diversos desafios, pois sua técnica é menos consolidada quando comparada ao E1G. Na literatura consultada foi possível observar um menor número de estudos que visam a otimização do processo de produção de E2G quando comparados à produção de E1G, sendo uma área promissora que ainda apresenta grande potencial de exploração, principalmente voltado ao uso de HH. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi comparar sistemas com células imobilizadas com diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores e sistemas com células livres de *S. passalidarum* NRRL Y-27907 para produção de E2G a partir de meios simulando o conteúdo e proporção de açúcares redutores (glicose e xilose) do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar. Este trabalho visa provar a possibilidade de imobilização de células de *S. passalidarum*, bem como o desenvolvimento de uma técnica para determinação da concentração das células imobilizada, ambas contribuições inéditas para a literatura.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Comparar sistemas com células imobilizadas e com células livres de *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 para produção de E2G a partir de meios simulando o conteúdo e proporção de açúcares redutores do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Testar método de imobilização de *S. passalidarum* em esferas de alginato de cálcio e avaliar o desempenho em fermentações sucessivas (cinco);
- Realizar fermentações em bateladas sucessivas (cinco) em meio simulando o conteúdo de açúcares redutores do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células livres de *S. passalidarum* em alta concentração celular;
- Realizar fermentações em bateladas sucessivas (cinco) em meio simulando o conteúdo de açúcares redutores do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar utilizando células imobilizadas de *S. passalidarum*;
- Comparar os sistemas com células livres e imobilizadas de *S. passalidarum* por meio dos resultados de análise cinética e balanço de massa das fermentações realizadas;
- Comparar os sistemas com células imobilizadas em concentração elevada (ARE) e moderada (ARM) de açúcares redutores.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

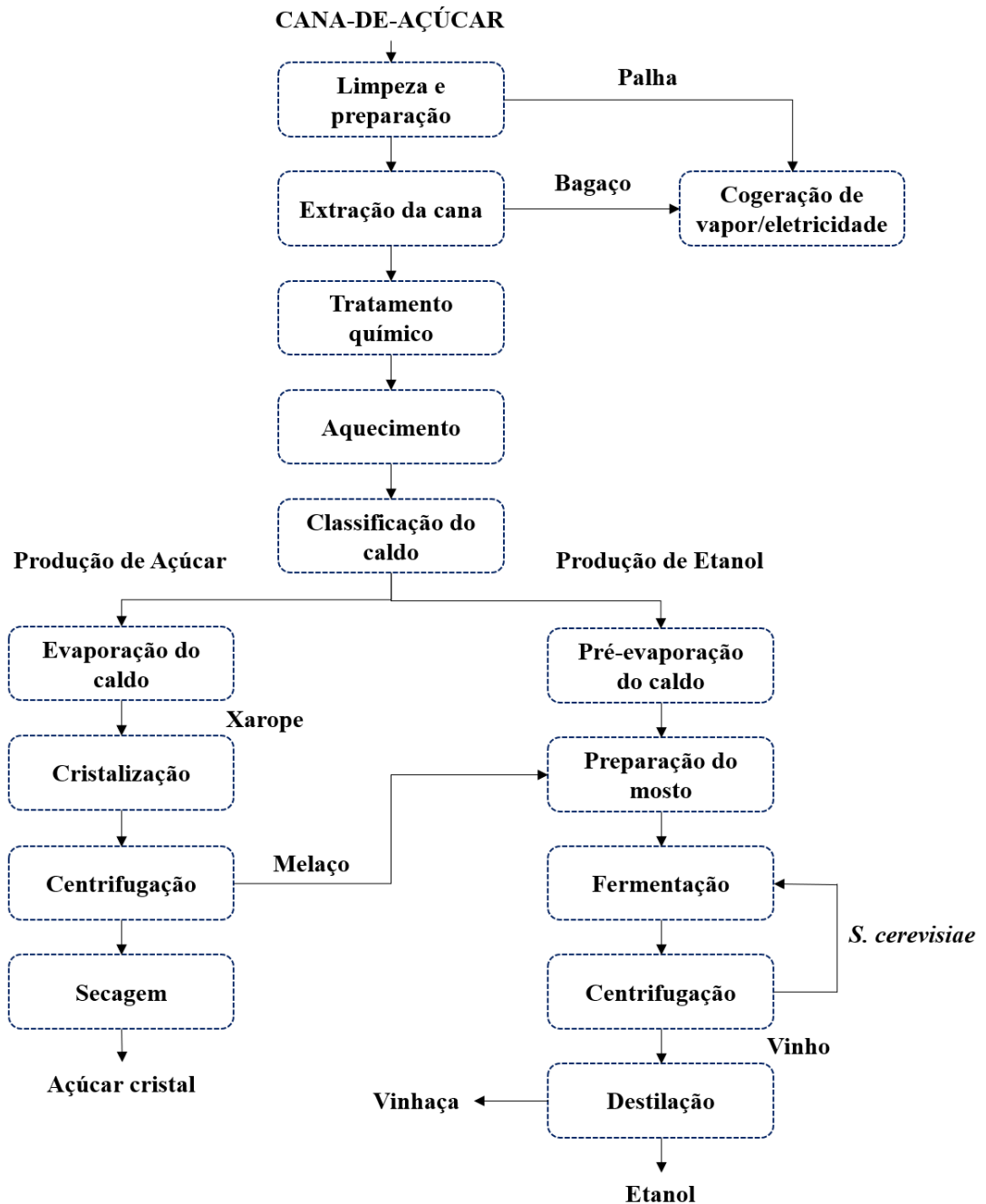
2.1 PRODUÇÃO DE BIOETANOL

Os Estados Unidos da América (EUA) e o Brasil são os maiores produtores de bioetanol de primeira geração (E1G) do mundo, produzindo juntos cerca de 83 % da produção mundial, e obtendo combustível principalmente a partir de milho e cana-de-açúcar, respectivamente. Ambas as matérias-primas são também utilizadas para alimentação, o que ocasiona preocupação em relação à competitividade entre seus possíveis destinos (DALENA et al., 2019; KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019; LIU et al., 2019). Entretanto, no Brasil, a produção a partir da cana-de-açúcar não gera competição direta com alimentação devido à vasta área de plantio existente, o que possibilita o cultivo suficiente tanto para alimentação, quanto para a obtenção de biocombustível (MOHANTY; SWAIN, 2019), além de área remanescente para outras culturas. A cana-de-açúcar é a principal matéria-prima brasileira para a obtenção de E1G, mas atualmente o milho tem ganhado muita atenção. A produção de E1G total, considerando ambas as biomassas, chegou a 35,7 bilhões de litros na safra de 2019/20, batendo o recorde quando comparado aos anos anteriores. Quando considerado apenas o processamento da cana-de-açúcar, foram produzidos 27,8 bilhões de litros de etanol (CONAB, 2020).

O processo para obtenção do etanol mais utilizado no Brasil é o *Melle-Boinot* (Figura 1), o qual é utilizado em cerca de 75 % das indústrias (NEITZEL et al., 2020). O processo fermentativo em todas as indústrias é realizado por leveduras *S cerevisiae*. Os primeiros passos do processo são colheita, lavagem e moagem da cana, em duas etapas, para quebrar e esmagar a biomassa. A parte mais fibrosa da cana, o bagaço, é separado do caldo – rico em sacarose. O bagaço de cana-de-açúcar é atualmente queimado em caldeiras para a produção de vapor e o excedente é transformado em energia e vendido para o *grid*. Cerca de 92 % do bagaço é destinado para a queima, enquanto o restante poderia ser utilizado para a produção de bioetanol (BUCKERIDGE; GRANDIS; TAVARES, 2019), além disso, as caldeiras podem ser otimizadas e parte da palha pode ser aplicada para a queima e obtenção de energia, promovendo aumento da quantidade de bagaço disponível para produção de E2G. No entanto, ainda existe um excedente de bagaço nas usinas nacionais. O caldo de cana-de-açúcar é submetido a diversos tratamentos, físicos e químicos, a fim de eliminar partículas indesejáveis e favorecer a sedimentação dos açúcares. Para obtenção de etanol, pode-se utilizar o caldo diretamente ou a mistura de caldo e melaço. O melaço é um resíduo da etapa de centrifugação, na qual o caldo

é concentrado para cristalização da sacarose, da produção de açúcar (SANTOS et al., 2019b; SENATORE et al., 2019).

Figura 1 – Produção de E1G e açúcar, a partir da cana-de-açúcar, utilizando o processo *Melle Boinot*



Fonte: Adaptado de Pereira, 2020

Para realizar a fermentação do mosto, que ocorre em batelada alimentada, inicia-se com elevada concentração celular da levedura *S. cerevisiae*, que varia entre 60 e 90 g.L⁻¹ (massa seca), uma vantagem, já que evita o consumo de açúcar para crescimento celular. O “pé-de-cuba” ou inóculo corresponde a cerca de 1/3 do volume total do biorreator. Ao final do processo, a concentração celular diminui até cerca de 30 a 40 g.L⁻¹, devido à diluição do meio (batelada alimentada). Ao fim da fermentação, que dura cerca de 6 a 10 h, quando existe o esgotamento de quase todos os açúcares – sobrando cerca de 6 g.L⁻¹ de frutose –, todo o volume passa por centrifugação para separação do vinho fermentado e das células de levedura. A recuperação das células para reutilização é uma das principais características do *Melle Boinot*. Em seguida o vinho é destilado para obtenção do E1G hidratado e da vinhaça, um dos resíduos da produção, enquanto o creme de levedura é encaminhado ao tratamento ácido (H₂SO₄ com pH 2,3 – 3,0) para diminuir a contaminação, que ocorre predominantemente por lactobacilos (NEITZEL et al., 2020; SANTOS et al., 2019b).

A produção de E1G é bastante consolidada, porém não é suficiente para suprir a demanda energética e substituir os combustíveis de origem fóssil. Assim, faz-se necessária a busca por novas formas de obtenção de biocombustíveis. Uma alternativa, sustentável, é a produção de E2G utilizando matérias-primas lignocelulósicas, as quais são obtidas geralmente a partir de resíduos de outras produções e com isso, minimizam a competição por alimentos gerada na produção de E1G (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019; LIMAYEM; RICKE, 2012).

A utilização das biomassas lignocelulósicas é vantajosa do ponto de vista da não competição com a indústria alimentícia, além da não limitação geográfica, já que são resíduos de cultivos já existentes, como os utilizados para produção de E1G. Entretanto, é necessário um elevado investimento para o seu processamento, já que essas biomassas necessitam de vários tratamentos até estarem disponíveis para a fermentação. Devido à produção de E1G as duas biomassas lignocelulósicas mais abundantes e que podem ser utilizadas para a produção de E2G são a palha de milho, nos Estados Unidos, e o bagaço de cana-de-açúcar, no Brasil. A cana-de-açúcar é composta por caule e palha, que é dividida em folhas verdes, folhas secas e ponteiro. Durante o processamento da cana para produção de açúcar ou etanol, o caule passar por moagem, para extração do caldo, resultando em um subproduto, o bagaço, que pode ser queimado para geração de energia, que é utilizada durante todo o processo, ou utilizado para a produção de mais combustível, o E2G (CANILHA et al., 2012; LIMAYEM; RICKE, 2012).

2.2 BIOETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

O E2G é o bioetanol produzido a partir da fermentação dos açúcares que compõem as biomassas lignocelulósicas. Ele é um combustível renovável e ecologicamente correto já que o gás carbônico (CO₂) liberado após sua queima é absorvido pela biomassa vegetal, não apresentando contribuição líquida para a atmosfera. O E2G apresenta a mesma composição química do E1G e pode ser utilizado para as mesmas aplicações. Embora recente, o E2G mostra-se uma alternativa promissora para aliviar a demanda energética de combustíveis fósseis. A produção de E2G pode ser anexada às unidades de produção de E1G, possibilitando a produção de mais etanol a partir do processamento da mesma quantidade de cana-de-açúcar, além de diminuir o investimento, infraestrutura, logística e energia necessários que aumentam com a necessidade de realizar o pré-tratamento das biomassas utilizadas no processo (LIMAYEM; RICKE, 2012; MILESSI et al., 2015).

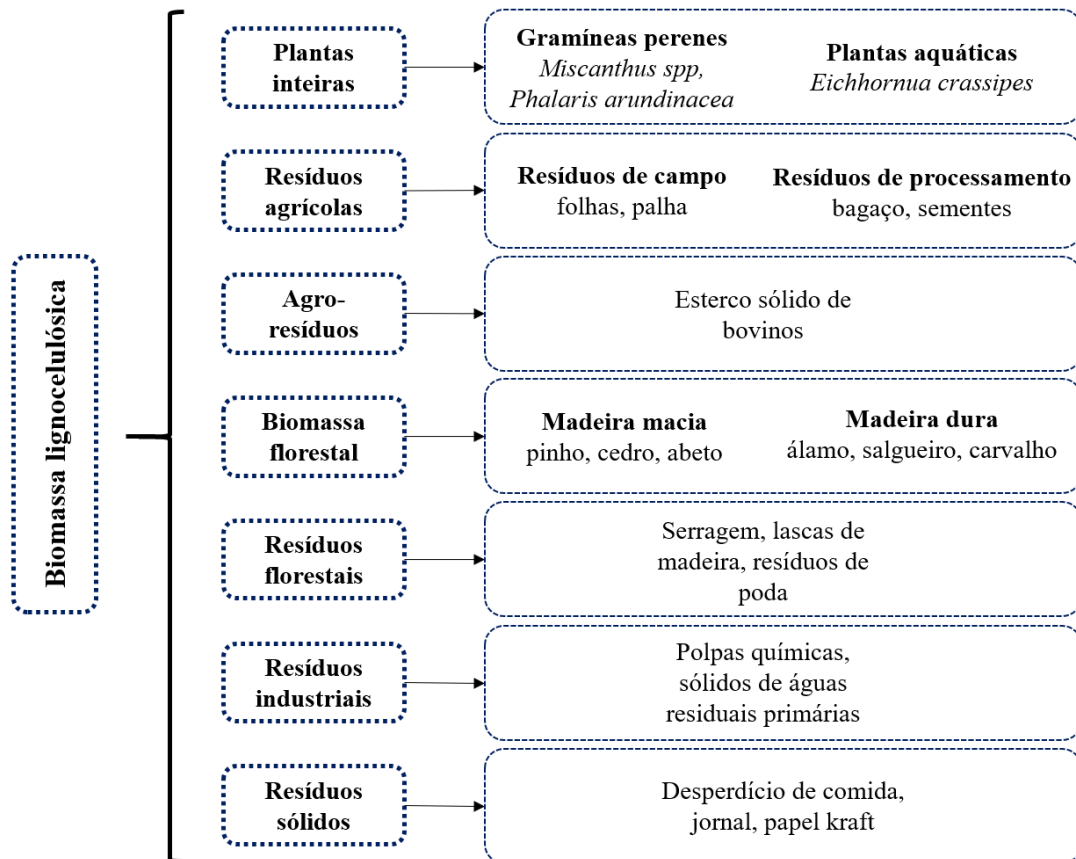
No Brasil, as principais iniciativas de produção de E2G são GranBio, Raízen e CTC. A Granbio utiliza como matéria-prima o bagaço e a palha da cana-de-açúcar, com capacidade da planta de 82 milhões de litros/ano, enquanto a Raízen utiliza apenas o bagaço, com capacidade de 40 milhões de litros/ano, porém ambas fermentam pentoses e hexoses (LORENZI; DE ANDRADE, 2019). O CTC tem a menor capacidade da planta, com 3 milhões de litros/ano, fermentando apenas hexoses provindas de bagaço ou palha. Juntas essas iniciativas possuem capacidade produtiva de E2G de 125 milhões de litros/ano. Porém, devido a dificuldades na etapa de pré-tratamento, apenas cerca de 10% da produção possível foi realizada (LORENZI; DE ANDRADE, 2019). O foco brasileiro para produção de E2G, como citado, devido à produção já consolidado de E1G, é o bagaço de cana-de-açúcar e para realizar a produção é necessário o conhecimento da composição e processamento das matérias-primas lignocelulósicas.

2.2.1 Matérias-primas lignocelulósicas: bagaço de cana-de-açúcar como potencial biomassa para produção de E2G

As biomassas lignocelulósicas são geralmente derivadas de resíduos agroindustriais, da biomassa florestal e de outros materiais herbáceos, e podem ser divididos em diferentes grupos (Figura 2). Os maiores componentes nas biomassas lignocelulósicas são celulose, hemiceluloses e lignina, polímeros organizados de acordo com a Figura 3. A celulose e as hemiceluloses correspondem a 70 % da biomassa total, sendo as porcentagens de cada um dos compostos dependente do tipo específico de matéria-prima (LIMAYEM; RICKE, 2012;

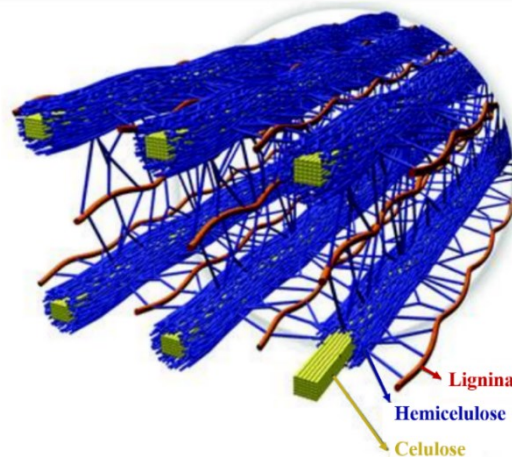
ZABED et al., 2016). Os componentes das biomassas interagem entre si de forma física e química para formar uma estrutura tridimensional complexa (PU; HALLAC; RAGAUSKAS, 2013).

Figura 2 – Biomassas lignocelulósicas



Fonte: Adaptado de Zabed et al. (2016)

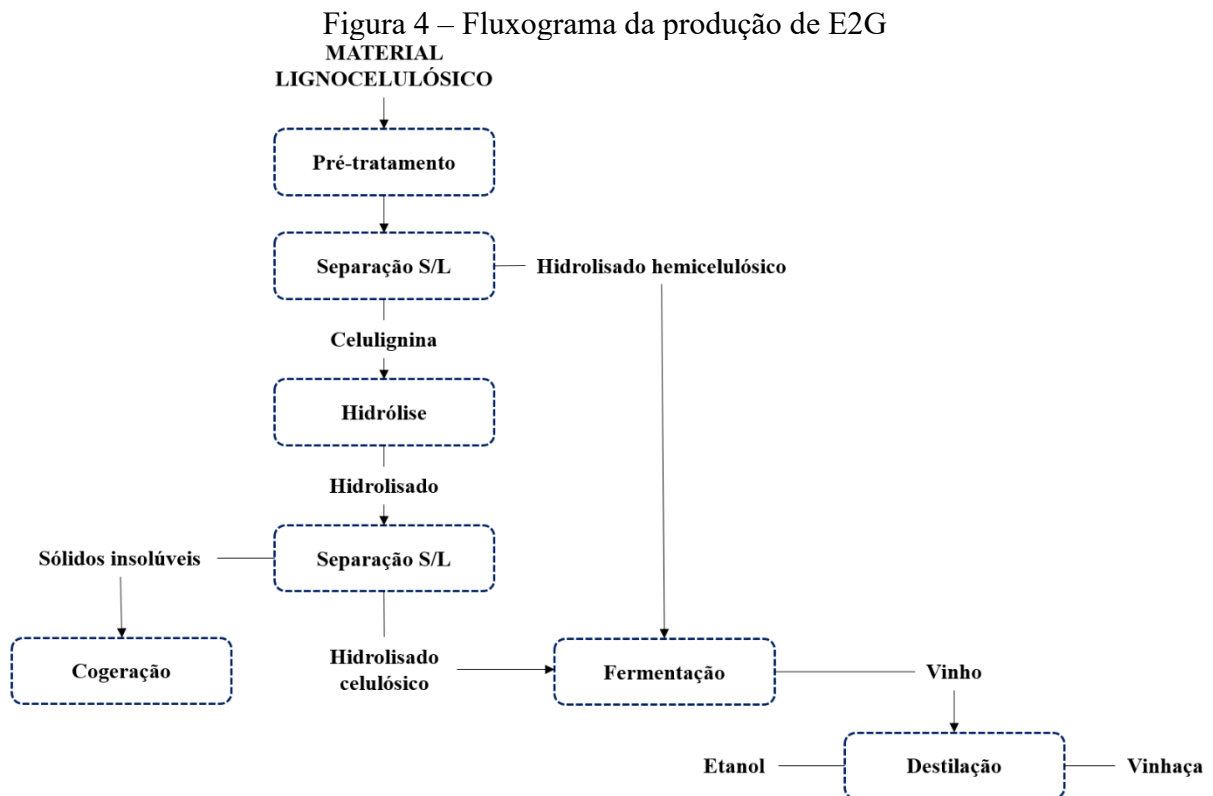
Figura 3 – Estrutura das biomassas lignocelulósicas



Fonte: Adaptado de Santos et al., (2012)

A celulose é um polímero de glicose unido por ligações glicosídicas que formam uma estrutura cristalina, forte e compacta. É o componente mais abundante das biomassas lignocelulósicas (40 – 50 %) (DALENA et al., 2019). Essa estrutura é convertida em glicose quando submetida a processos de hidrólise (CANILHA et al., 2012; KLEMM et al., 2005). As hemiceluloses são constituídas em sua maioria por hexoses (glicose, galactose, manose), grupos acetil e pentoses (xilose e arabinose), que constituem a cadeia principal, e representam cerca de 25 – 30 % da biomassa lignocelulósica. Além disso, as hemiceluloses podem conter ácidos glucurônico, galacturônicos, metilgalacturônico e os do grupo acetil (PU; HALLAC; RAGAUSKAS, 2013). A lignina é um polímero aromático e rígido que confere à parede celular da biomassa lignocelulósica alto nível de rigidez e compactação. É composta por monômeros fenólicos de álcool e compões cerca de 15 a 20 % das biomassas (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021; ZABED et al., 2016).

As características das biomassas lignocelulósicas fazem com que o processo de produção de E2G (Figura 4) seja diferente da produção de E1G, e consiste basicamente de pré-tratamento, hidrólise e fermentação. A composição das biomassas lignocelulósicas promove a formação de complexos lignina-carboidratos (CLC) que são resistentes à degradação, por isso o pré-tratamento se faz necessário para separação da celulose, das hemiceluloses e lignina, processo também conhecido como fracionamento da biomassa. Na hidrólise, os polímeros, celulose e hemicelulose, são hidrolisados em seus monômeros que são açúcares fermentescíveis, glicose e xilose. Essa etapa pode ser realizada de forma ácida ou enzimática. Tanto o pré-tratamento quanto a hidrólise são feitos de forma a otimizar a fermentação (CANILHA et al., 2012; LIMAYEM e RICKE, 2012; LIU et al., 2019; SANTOS et al., 2019a). O pré-tratamento é uma das partes mais importantes em relação ao custo do processo e determinante para a execução do processo, assim é preciso compreender mais a fundo como funciona esta etapa (SANTOS et al., 2019a).



Fonte: Adaptado de Pereira (2020)

2.2.2 Pré-tratamento

O pré-tratamento age nas biomassas lignocelulósicas liberando a celulose da estrutura formada com a lignina e hemiceluloses. A eficiência do pré-tratamento pode reduzir a quantidade de enzima necessária para hidrólise da celulignina (etapa subsequente quando se aplica um pré-tratamento com H_2SO_4 diluído, por exemplo) e também os custos de produção (SANTOS et al., 2019a).

A etapa de pré-tratamento pode ser realizada através de diversos métodos que podem ser divididos em quatro tipos: físico (mecânico); físico-químico; químico e biológico. Os métodos físicos aumentam a área superficial através da diminuição de tamanho da biomassa e é possível citar a moagem, a pirólise e o micro-ondas (CANILHA et al., 2012). Os métodos físico-químicos como explosão à vapor, explosão de fibra de amônia, explosão de CO_2 e a utilização de água quente, ocorrem em alta temperatura e pressão. Os tratamentos biológicos se caracterizam pela ação dos microrganismos nas biomassa. Os tratamentos químicos removem lignina ou degradam a hemicelulose e, conseqüentemente, abrem a estrutura da biomassa. Pré-tratamentos alcalino e ácido, deslignificação oxidativa, ozonólise, organoslov e oxidação úmida são exemplos de tratamentos químicos (CANILHA et al., 2012; SANTOS et al., 2019a)

O pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é um dos tratamentos adotados pela indústria e consiste na solubilização das hemiceluloses, garantindo elevada recuperação de pentoses na fração líquida – HH – e obter uma polpa rica em celulose e com alto conteúdo de lignina – denominada celulignina (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021). Esta fração sólida pode ser hidrolisada para a obtenção de um licor rico em glicose que é facilmente fermentada por leveduras *S. cerevisiae*, no entanto, a fermentação do HH, cuja composição de açúcares é cerca de 65-85 % de xilose e 15-35 % de glicose (ROCHA et al., 2011) é um gargalo do processo E2G. Durante o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído ocorre a formação de inibidores como furfural a partir da degradação de pentoses, e hidroximetilfurfural a partir da degradação de hexoses, e também ácidos orgânicos e alifáticos que se misturam à fração líquida resultante do processo e conseqüentemente compõem o HH. Esses compostos inibidores afetam intensamente a hidrólise e a fermentação microbiana, não sendo favoráveis à essas etapas (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021; SANTOS et al., 2019a). Lima et al. (2021) descrevem a composição geral do HH originada do pré-tratamento ácido – ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,5 % (v/v) à 140 °C por 15 min –, a qual é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição de HH obtido por pré-tratamento ácido

Composto	Concentração (g.g ⁻¹)
Celulose	61,46 ± 1,05
Arabinoxilana	6,58 ± 0,07
Grupos acetil	0,42 ± 0,08
Hemiceluloses	7,00 ± 0,07
Lignina total	31,83 ± 0,31
Cinzas	2,63 ± 0,04
Extrativos	0,00 ± 0,00

Fonte: Adaptado de Lima et al. (2021)

2.2.3 Fermentação do hidrolisado hemicelulósico

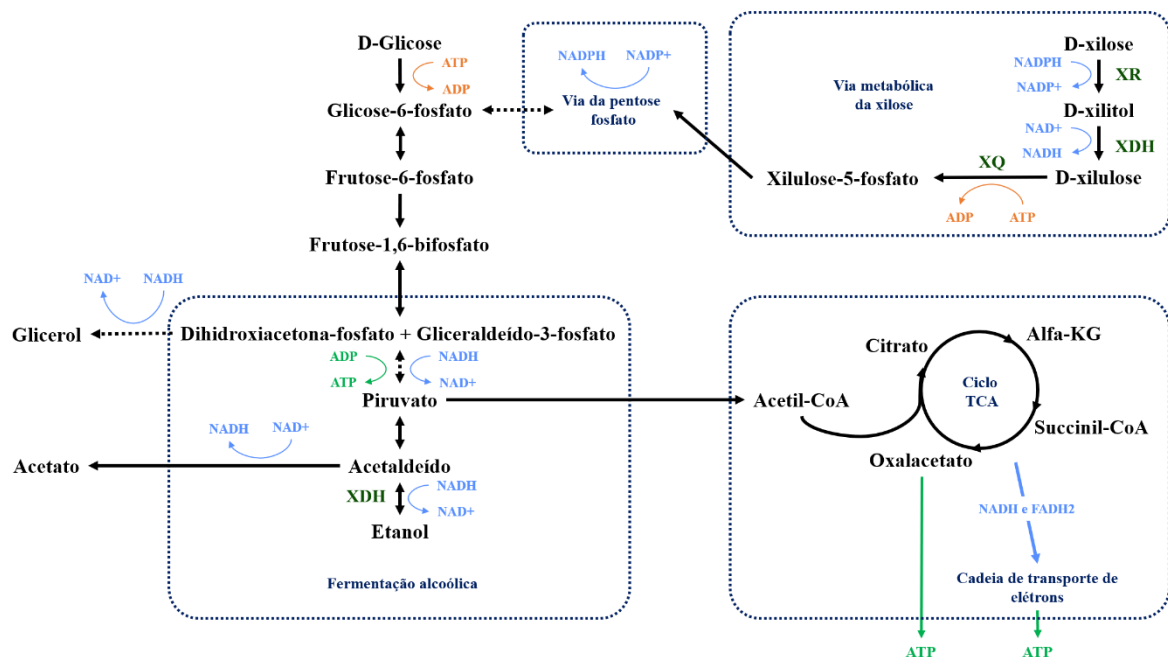
A fermentação alcoólica é a transformação de açúcares em etanol e requer a presença de algum microrganismo capaz de metabolizar os açúcares presentes. A escolha dos microrganismos para utilização em um processo depende do produto o qual se deseja obter e do metabolismo específico de cada microrganismo (SCHMIDELL et al., 2001). Para a fermentação de HH são necessários microrganismos que convertam pentoses em etanol. Esses microrganismos podem ser nativos ou geneticamente modificados e podem ser utilizados sozinhos, ou em cocultura com microrganismos consumidores de hexoses (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019).

Conforme citado anteriormente, a levedura mais utilizada na indústria para produção de E1G é *S. cerevisiae*, porém a principal limitação da sua utilização para a produção de E2G é a não metabolização de pentoses. Com base na composição dos HHs apresentadas na seção anterior verifica-se que para tornar viável a produção a partir de HH, necessitam-se microrganismos cofermentadores de glicose e xilose (LIMAYEM; RICKE, 2012; LIU et al., 2019).

S. passalidarum é uma levedura encontrada na natureza em associações simbióticas com besouros perfuradores de madeira e metabolizadora de xilose, celobiose, glicose e maltose. Devido à capacidade de fermentação de xilose, presentes nas hemiceluloses de biomassas lignocelulósicas, torna-se promissora para aplicação na produção de E2G. Essa levedura é capaz de fermentar xilose em meios com pouca ou nenhuma aeração, além de cofermentar os outros açúcares citados (RILEY et al., 2016). No entanto, já foi demonstrado que condições apropriadas de fornecimento de O_2 aumentam a conversão de xilose em etanol (BONAN et al., 2021).

A Figura 6 apresenta as vias metabólicas envolvidas no consumo de xilose e glicose pela levedura *S. passalidarum*. Além da produção de bioetanol, que é o principal alvo de estudos (BIAZI et al., 2020; HOU, 2012; LONG et al., 2012) essas vias também possibilitam a produção de células e outros subprodutos como xilitol, glicerol e acetato (BONAN et al., 2021).

Figura 5 – Vias metabólicas de consumo de xilose e glicose por *S. passalidarum*



Fonte: Adaptado de Martinez-Jimenez et al. (2021)

A produção de bioetanol por esta levedura ocorre a partir da glicose ou da xilose. A xilose é um monossacarídeo formado por cinco carbonos, uma pentose, e quando utilizada como fonte de carbono por leveduras como *S. passalidarum* é convertida a xilitol pela enzima xilose redutase (XR), a qual utiliza NADPH como cofator. O xilitol é oxidado para D-xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH), que necessita de NAD^+ como coenzima para realizar a reação. A dependência dos diferentes cofatores pela XR e XDH para realização das reações gera desequilíbrio redox e necessidade da presença de oxigênio para o metabolismo. A falta de reciclagem do NAD^+ ocasiona a interrupção da metabolização da xilose e conseqüentemente, causa o acúmulo de xilitol. A necessidade de oxigênio se dá, pois, em anaerobiose, o NADPH ainda é produzido na via das pentoses, porém o NADH não pode ser reoxidado (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). A xiluloquinase (XQ) fosforila a D-xilulose em D-xilulose-5-fosfato, que é metabolizada na via das pentoses fosfato e forma a glicose-6-fosfato. Na via Embden-Meyerhof-Parnas, a glicose-6-fosfato é convertida a piruvato, o qual em condições aeróbicas é oxidado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos e em condições anaeróbicas ou com baixa concentração de oxigênio é convertido a acetaldeído e em seguida a etanol pela enzima álcool desidrogenase (AH) e piruvato decarboxilase (PD), que promovendo a reoxidação do NADH (BONAN et al., 2020; KUHAD et al., 2011).

A utilização de *S. passalidarum* para a produção industrial de bioetanol acompanha alguns desafios como a possibilidade de contaminação por outros microrganismos, como relatado por Collograi et al. (2019) e a necessidade de nutrientes específicos durante a fermentação a fim de aumentar a produção, como o extrato de leveduras. Outra dificuldade é a necessidade de aeração durante o processo, como observado por Bonan et al. (2020) na qual a concentração de oxigênio disponível no meio de fermentação é muito importante para a produção de etanol e esse fator pode encarecer o processo (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021). Além disso, um dos maiores desafios na utilização do HH é presença de inibidores que dificultam a sua fermentação. Uma alternativa para contornar alguns desafios pode ser a imobilização das células de *S. passalidarum*, já que essa técnica é utilizada para proteção das células contra inibidores, outros microrganismos indesejáveis e condições de estresse enfrentadas durante o processo fermentativo a fim de aumentar a eficácia da fermentação e reduzir custos em bateladas sucessivas (NDUBUISI et al., 2020). Além disso, a imobilização possibilita a aplicação de densidades celulares mais elevadas, o que do ponto de vista da metabolização da xilose, pode aumentar a velocidade de consumo, que é um gargalo do processo de produção de E2G (MILESSI et al., 2020a).

2.3 PRODUÇÃO DE ETANOL UTILIZANDO LEVEDURAS IMOBILIZADAS

A imobilização de microrganismos consiste na contenção das células em um determinado material, o suporte, e é capaz de melhorar aspectos que no geral restringem a utilização de biocatalisadores como o longo tempo de operação, estabilidade, dificuldade de recuperação e reutilização dos mesmos. As células imobilizadas apresentam diversas vantagens como melhor funcionalidade em sistemas contínuos e a maior facilidade na separação do microrganismo do meio para reutilização (BEHERA; RAY, 2015; RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020).

O procedimento de imobilização facilita a recuperação das células para reciclo, além de permitir a operação com densidades celulares mais elevadas, que contribui para ao aumento da eficiência e da produtividade do processo. Os suportes criam um microambiente que pode proteger as células contra fatores externos que são prejudiciais, além de promover o aumento da atividade das células e, conseqüentemente, a conversão de substrato em produto. Além disso, pode melhorar a estabilidade em algumas faixas de temperatura e pH (MILESSI et al., 2020a; PHILLIPS, COLIN R.; POON, 1988).

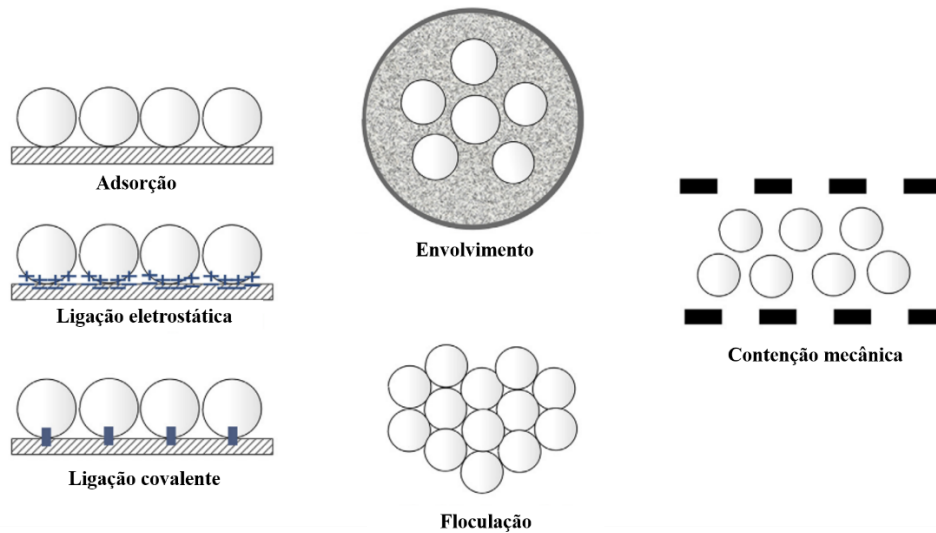
As células podem ser imobilizadas utilizando diferentes técnicas, como adsorção, envolvimento e ligações covalentes. Uma das técnicas mais utilizadas para imobilização de células inteiras é o envolvimento por alginato de cálcio, na qual as células são misturadas ao polímero, que é poroso o suficiente para permitir a difusão de substratos e produtos. A imobilização no processo de produção de E1G tem sido bastante estudada, porém para a produção de E2G a partir de HH ainda existem poucos estudos a respeito (MILESSI et al., 2020a).

2.3.1 Métodos de imobilização

A imobilização de células pode ser dividida em quatro grupos, sendo eles imobilização em suportes sólidos (adsorção, ligações covalentes e eletrostáticas), envolvimento em matrizes porosas, contenção mecânica entre barreiras e auto floculação (agregação) (Figura 7) (KARAGOZ; BILL; OZKAN, 2019). Uma das possibilidades da imobilização em suportes sólidos é a partir do contato direto das células com o suporte e da formação de ligações eletrostáticas, que são mais fracas quando comparadas às ligações covalentes. O método por ligação covalente destaca-se pelo tipo de ligação formada entre célula e suporte. Nesta técnica, a imobilização ocorre através de ligações covalentes entre grupos funcionais do suporte e dos grupos funcionais de resíduos de aminoácidos da célula e para isso, é necessário a

funcionalização dos suportes. São utilizados agentes reticulantes, como o glutaraldeído, que acabam promovendo a maior limitação do método quando deseja-se imobilizar células, já que o uso desses agentes confere elevado potencial de toxicidade ao suporte (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020; SCHMIDELL et al., 2001).

Figura 6 – Métodos de imobilização de células



Fonte: adaptado de Karagoz, Bill e Ozkan (2019)

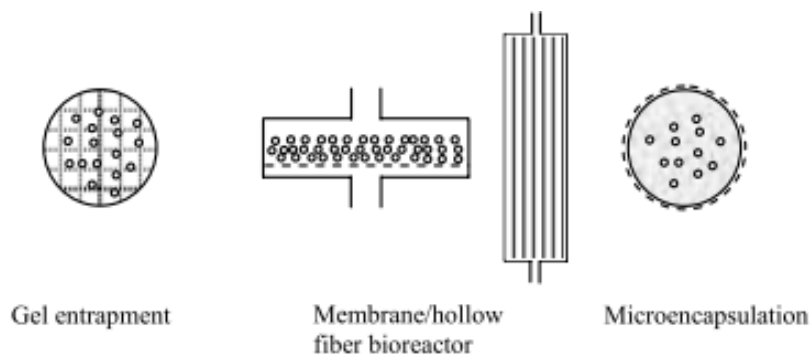
A imobilização por adsorção baseia-se na formação de diversos tipos de ligação devido às forças de interação complexas, entre a superfície da célula e do suporte, como interações eletrostáticas entre cargas opostas, ligações iônicas entre grupos amínicos e carboxílicos da parede celular e um grupo reativo do suporte, quando o grupo amínico liga-se ao grupo hidroxila ou silano do suporte, formam-se ligações covalentes parciais. A adsorção ocorre quando as células aderidas aos suportes não conseguem formar ligações covalentes por causa da não funcionalização prévia dos mesmos. A falta de ligações mais fortes faz com que a capacidade de retenção das células no suporte seja amplamente afetada pelas características celulares e do meio de cultivo utilizado, como a idade celular, concentração iônica e pH (SCHMIDELL et al., 2001). A adsorção de células ao suporte ocorre a partir de forças de van der Waals, interações iônicas e hidrofóbicas, além de pontes de hidrogênio. Para realizar a adsorção de células ao suporte realiza-se a imersão direta do material em uma suspensão celular (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020; SCHMIDELL et al., 2001).

A contenção mecânica ocorre utilizando membranas porosas, através da utilização de microcápsulas pelas quais as células são envolvidas ou na superfície de interação entre dois líquidos imiscíveis. Esse tipo de imobilização é mais utilizado quando a necessidade de transferência de compostos entre as células e o meio é menor. Já a floculação consiste em uma agregação de várias células que formam uma unidade maior e pode ser considerada um tipo de imobilização, pois as unidades formadas facilitam, e tornam possível, a utilização em biorreatores (KOURKOUTAS et al., 2004).

O método de envolvimento baseia-se no aprisionamento físico das células no interior das redes de uma matriz. A estrutura formada, quando adicionada ao meio específico, estabelece um fluxo de entrada de substrato para as células e saída dos produtos para o meio, além de oferecer proteção contra agressões externas. Essa metodologia é a mais utilizada por ser fácil e ser capaz de reter grande quantidade de células, além de apresentar baixa toxicidade para as mesmas, porém a principal limitação é a difusão de substratos e dos produtos metabólicos através do suporte, sendo necessário a otimização do tamanho da partícula, a difusividade das espécies e a concentração celular na partícula a fim de minimizar os efeitos (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020; SCHMIDELL et al., 2001).

A imobilização por envolvimento pode ser realizada de três formas distintas: retenção em membranas, microencapsulação ou envolvimento em gel (Figura 8). Na retenção em membranas, as células são presas de um lado da membrana, posicionada no reator, enquanto os nutrientes estão disponíveis do outro lado. Já a microencapsulação, consiste em uma membrana polimérica, semi-permeável, fina, esférica e forte, que envolve um núcleo líquido de aproximadamente 1 mm. Por não ser uma matriz sólida ou geleificada, a dificuldade na transferência de massa é reduzida, quando comparada à técnica de envolvimento em gel (ZHU, 2007).

Figura 7 – Tipos de imobilização por envolvimento



Fonte: Zhu (2007)

O envolvimento em gel baseia-se no aprisionamento físico das células nos poros da matriz formada, que são menores. Os materiais utilizados para realizar o envolvimento das células formando partículas de gel são os polímeros naturais, que são encontrados em grande quantidade no ambiente, além de serem biocompatíveis com as células. Alguns polissacarídeos utilizados são: celulose e derivados, ágar, alginato, k-carragena, quitosana e pectina (PHILLIPS, COLIN R.; POON, 1988; SCHMIDELL et al., 2001).

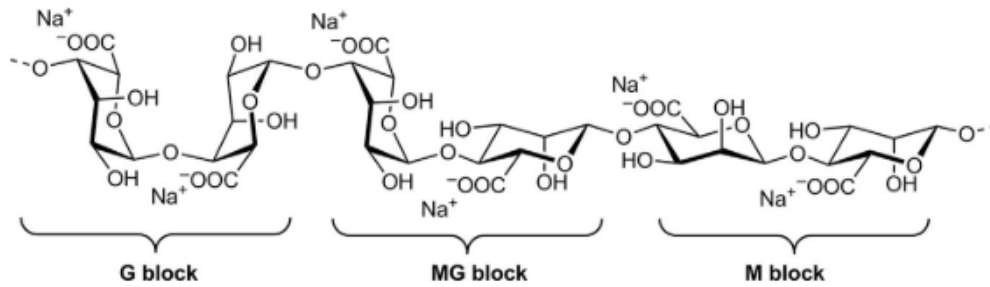
2.3.2 Suportes de imobilização: ênfase no alginato de cálcio em processos fermentativos

A imobilização de microrganismos é baseada no contato das células as quais se deseja imobilizar a um determinado material, o suporte. As características dos suportes determinam a performance do microrganismo imobilizado no processo. Um material pode ser utilizado como suporte quando apresentam alta capacidade de retenção, resistência aos ataques químicos e microbianos, estabilidade mecânica, alta difusividade de substrato e produtos e quando não apresentam toxicidade às células. Além disso, um bom suporte apresenta resistência à degradação química e microbiana, preservação da integridade física durante o processo e reciclo, presença de grupo funcional, insolubilidade e inércia em relação ao meio, coeficiente de difusão e área superficial (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020; SCHMIDELL et al., 2001).

Um cuidado necessário é em relação ao custo do suporte e materiais necessários adicionais para imobilização que em alguns casos podem limitar o uso de alguns materiais, já que é preciso que os mesmos não elevem o custo do processo (RODRÍGUEZ-RESTREPO; ORREGO, 2020). Além disso, podem ser desafios a dificuldade de prever o crescimento celular, a atividade metabólica e fisiologia e também limitação da transferência de massa por difusão, pela própria membrana celular (ESCOBAR; ÁLVAREZ; PEÑUELA, 2012; NAJAFPOUR, 2015).

Um dos suportes mais indicados para células é o alginato de cálcio, que é um dos polímeros naturais mais utilizados para imobilização por envolvimento, devido à biocompatibilidade com as populações celulares, rapidez e a simplicidade no processo de geleificação. Esse material é extraído de algas marinhas e é composto pelos ácidos D-manurônico (M) e L-gulurônico (G) (Figura 9), unidos por ligações glicosídicas, sendo sua proporção e distribuição fator determinante para as propriedades mecânicas e geleificantes do gel formado (NEDOVIC; WILLAERT, 2004).

Figura 8 – Estrutura química do alginato de sódio



Fonte: Pettignano et al. (2019)

A metodologia utilizando o alginato de cálcio é simples, apresenta bom custo-benefício e tem sido vastamente utilizada em indústrias de fermentação (BEHERA; RAY, 2015). As esferas de alginato de cálcio podem ser formadas por emulsificação ou extrusão. A emulsificação ocorre com a adição da suspensão celular com alginato de cálcio em uma solução oleosa, seguida da adição de cálcio. O procedimento de obtenção das esferas inicia-se no preparo da mistura de suspensão celular e alginato de sódio (2-4% m/v). Em seguida essa mistura é gotejada em cloreto de cálcio (20-100 mM), que é a solução gelificante. A interação entre alginato de sódio e cloreto de cálcio promove a formação das esferas (ZHU, 2007).

2.3.3 Estado da arte: produção de etanol com leveduras imobilizadas

A imobilização de células e a sua aplicação em bioprocessos tem sido estudada nos últimos 35-40 anos (BEHERA; RAY, 2015). Como o processo de produção de E1G está consolidado há bastante tempo, é natural que existam mais trabalhos na imobilização de microrganismos utilizados para esse processo. Mesmo assim, alguns estudos podem ser destacados na produção de E2G. A Tabela 2 traz um compilado de artigos que, assim como este trabalho, utilizam células imobilizadas em alginato de cálcio para obtenção de E1G ou E2G.

Lee et al. (2011) estudaram a produção de E1G por células de *S. cerevisiae* KCTC 7906 imobilizadas em alginato de cálcio, 2 % (m/v) e determinaram as condições ótimas de processo (30 °C, pH 5,0 e 10% de glicose inicial). As células imobilizadas foram utilizadas em cinco bateladas sucessivas e comparadas ao ensaio utilizando células livres. Os autores observaram que as esferas reutilizadas apresentaram melhor performance quando comparadas com as células livres e células imobilizadas não utilizadas previamente. Dentre as 5 bateladas com células imobilizadas, os melhores resultados foram os obtidos na terceira, apresentando menor tempo de fermentação (10 h) e fator de conversão de substrato em produto de 100 % em relação ao teórico estequiométrico, 1,13 vezes maior que para células livres.

Behera e Ray (2015) utilizaram células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio para produção de etanol a partir de hidrolisado de farinha de mandioca. A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyer e os valores obtidos para os parâmetros $Y_{P/S}$ (fator de conversão de substrato em etanol) e Q_P (produtividade volumétrica) foram, respectivamente, $0,473 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,328 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

Ercan et al. (2013) buscaram a otimização da produção de etanol a partir de extrato de alfarroba enriquecido a partir da utilização de células de *S. cerevisiae* imobilizadas (1×10^5 UFC mL^{-1}) em alginato de cálcio, 4 % (m/v). As condições ótimas determinadas foram alginato de cálcio 2 %, agitação 150 rpm, pH 5,5 e 5 % de células imobilizadas. Os valores de $Y_{P/S}$ e Q_P da batelada otimizada foram, $0,46 \text{ g.g}^{-1}$ e $3,19 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. As células imobilizadas, também foram utilizadas em cinco bateladas sucessivas e apresentaram diminuição no fator de conversão ao longo das bateladas.

Orrego et al. (2018) realizaram a fermentação do hidrolisado de mucilagem de café utilizando células de *S. cerevisiae* (3 g.L^{-1}) imobilizadas em alginato de cálcio com diferentes concentrações (2-4 %) e tamanho de esfera (3 ou 7 mm), sendo a melhor concentração observada de 2 % e 3 mm, na qual obtiveram-se o maior valor de $Y_{P/S}$ ($0,33 \text{ g.g}^{-1}$). Os autores observaram que a diminuição do tamanho da esfera facilita a transferência de massa dos substratos no meio de fermentação para o interior das células imobilizadas, o que acelerou o consumo de açúcar e produção de etanol. A reutilização das esferas com melhor resultado foi possível por 3 bateladas subsequentes, na qual a produção mais rápida (12 h) de etanol foi observada no terceiro ciclo.

Behera et al. (2010) utilizaram células de *S. cerevisiae* livres, imobilizadas em ágar-ágar e alginato de cálcio 4 % (m/v), sendo imobilizadas 1×10^9 células.g⁻¹ de esferas, para obtenção de E1G a partir de hidrolisado de flores de mahula. Os autores observaram que os resultados obtidos com a imobilização em alginato de cálcio foi superior à em ágar-ágar e às células livres, sendo os fatores de conversão $0,154$, $0,151$ e $0,149 \text{ g.g}^{-1}$. As células imobilizadas em alginato de cálcio foram reutilizadas por mais 3 bateladas, sendo obtidos $Y_{P/S}$ de $0,150$, $0,148$ e $0,146 \text{ g.g}^{-1}$ para os ciclos 1, 2 e 3, respectivamente.

Milessi et al. (2015) estudaram o efeito da concentração de células e agitação na produção de E2G a partir de células de *S. stipitis* imobilizadas em alginato de cálcio. As suspensões celulares utilizadas tiveram concentrações variadas (3, 6,5 e 10 g.L^{-1}) e foram adicionadas ao alginato de cálcio 2 % (m/v). A fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar ocorreu a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. A agitação dos frascos *Erlenmeyer* variou

entre 100 e 300 rpm. O ensaio que apresentou melhor resultado foi o de concentração de células de 10 g.L^{-1} e agitação de 100 rpm, na qual o $Y_{P/S}$ obtido foi de $0,33 \text{ g.g}^{-1}$ e Q_p de $0,19 \text{ g.L.h}^{-1}$. Os autores observaram que a agitação é um parâmetro muito importante para produção de etanol, principalmente porque está associada a transferência de oxigênio para experimentos em frascos agitados.

Portugal-Nunes et al. (2015) investigaram o efeito do pH da imobilização de *S. stipitis* na produção de E2G em hidrolisado de licor de sulfito gasto de madeira dura não diluído (123 g.L^{-1} xilose, $42,5 \text{ g.L}^{-1}$ manose, 39 g.L^{-1} arabinose, $22,5 \text{ g.L}^{-1}$ galactose, $11,5 \text{ g.L}^{-1}$ glicose). A imobilização em alginato de cálcio e o controle de pH (5,5) melhoraram a produção de etanol promovendo aumento de 1,3 vezes no $Y_{P/S}$ chegando a $0,26 \text{ g.g}^{-1}$.

Abbi et al. (1966) analisaram o comportamento da fermentação de hidrolisado de palha de arroz a etanol por células livres e imobilizadas (em alginato de cálcio 3,2 % (m/v)) de *C. shehatae*. Batelada alimentada e regime contínuo foram estudados. A concentração de células imobilizadas foi aproximadamente 1×10^6 UFC/esfera e de xilose 10 g.L^{-1} . Na batelada alimentada as células livres apresentaram $Y_{P/S}$ de $0,83 \text{ g.g}^{-1}$ enquanto as células imobilizadas alcançaram $0,47 \text{ g.g}^{-1}$. A produtividade foi de $0,24 \text{ g.L.h}^{-1}$. Para o ensaio em regime contínuo a produtividade foi de $0,33 \text{ g.L.h}^{-1}$.

Milessi et al. (2020a) avaliaram a produção de E2G em reator de leito fixo por *S. cerevisiae* T18 (50 g.L^{-1}) imobilizada em alginato de cálcio. Dez bateladas sucessivas foram realizadas, utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, sem perda considerável na produtividade. Para os ensaios com células imobilizadas, os valores atingidos para $Y_{P/S}$ e Q_p foram $0,386 \text{ g.g}^{-1}$ e $1,32 \text{ g.L.h}^{-1}$, respectivamente.

Singh et al. (2013) utilizou células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio 4 % (m/v) e outras matrizes. As células imobilizadas foram utilizadas em 4 ciclos consecutivos, não apresentando muitas diferenças na concentração final de etanol nos três primeiros, variando de $10,3$ a $11,8 \text{ g.L}^{-1}$. Entretanto, $Y_{P/S}$ diminuiu com o passar das bateladas. O primeiro ensaio alcançou valores de $Y_{P/S}$ e Q_p de $0,42 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,33 \text{ g.L.h}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 2 – Estudos reportados na literatura para produção de E1G e E2G utilizando microrganismos imobilizados em alginato de cálcio

Etanol	Microrganismo	Suporte	Meio de fermentação	Modo de operação	Sistema de fermentação	Fator de conversão (Y _{PS}) (g/g)	Produtividade de (Q _p) (g.L ⁻¹ .h)	Nº de ciclos	Ciclo com o melhor resultado*	Ref.
1G	<i>S. cerevisiae</i> KCTC 7906	Alginato de cálcio	Glicose sintética	Batelada	Biorreator de tanque agitado	0,51	5,11	5	3	(LEE et al., 2011)
1G	<i>S. cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Farinha de mandioca	Batelada	Frascos Erlenmeyer	0,473	0,33	-	-	(BEHERA; RAY, 2015)
1G	<i>S. cerevisiae</i> ATCC 36858	Alginato de cálcio	Extrato de alfarroba enriquecido	Batelada	Biorreator de tanque agitado	0,46	3,19	5	1	(ERCAN; IRFAN; MUSTAFA, 2013)
1G	<i>S. cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Mucilagem de café	Batelada	Frascos erlenmeyer	0,41	0,88	3	3	(ORREGO; ZAPATA-ZAPATA; KIM, 2018b)
1G	<i>S. cerevisiae</i>	Alginato de cálcio	Flores Mahula	Batelada	Frascos erlenmeyer	-	0,23	-	-	(BEHERA et al., 2010)
2G	<i>S. stipitis</i>	Alginato de cálcio	Hidrolisado de cana-de-açúcar	Batelada	Frascos erlenmeyer	0,33	0,18	-	-	(MILESSI et al., 2015)
2G	<i>S. stipitis</i>	Alginato de cálcio	Xilose sintética	Batelada	Frascos erlenmeyer	0,26	-	-	-	(PORTUGAL-NUNES et al., 2015)
2G	<i>C. shehathae</i>	Alginato de cálcio	Hidrolisado da palha de arroz	Contínuo	Biorreator de leiteo compactado	-	0,33	-	-	(ABBI; KUHAD; SINGH, 1996)
2G	<i>C. shehathae</i>	Alginato de cálcio	Hidrolisado da palha de arroz	Batelada alimentada	Frascos erlenmeyer	0,5	0,24	-	-	

Etanol	Microrganismo	Suporte	Meio de fermentação	Modo de operação	Sistema de fermentação	Fator de conversão ($Y_{p/s}$) (g/g)	Produtividade de (Q_p) ($g.L^{-1}.h$)	Nº de ciclos	Ciclo com o melhor resultado*	Ref.
2G	<i>S. cerevisiae</i> GSE16- T18	Alginato de cálcio	Hidrolisado de cana-de-açúcar	Batelada	Biorreator de leito fixo	0,38	5,7	10	-	(MILESSI et al., 2020a)
2G	<i>S. cerevisiae</i> MTCC 174	Alginato de cálcio	Hidrolisado de cana-de-açúcar	Batelada	Frascos Erlenmeyer	0,37	0,29	4	3	(SINGH et al., 2013)

*Baseado em $Y_{p/s}$ e Q_p

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

A linhagem utilizada foi a levedura nativa de *S. passalidarum* NRRL Y-27907, isolada do estômago de insetos presentes em madeira em decomposição (NGUYEN et al., 2006). O microrganismo foi mantido em freezer a -80 °C em criotubo contendo meio YPD_X (1 % extrato de levedura, 2 % peptona, 1 % dextrose e 1 % xilose, em m/v) e glicerol 50 % (1:1).

3.2 OBTENÇÃO DE SUSPENSÃO CONCENTRADA DO MICRORGANISMO

A obtenção da suspensão de *S. passalidarum* ocorreu em três etapas: pré-inóculo, inóculo e propagação.

O pré-inóculo ocorreu a partir de um criotubo, o qual foi adicionado a um *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 100 mL do meio YPD_X (Tabela 3). O pré-inóculo foi mantido sob temperatura constante de 30 °C e agitação de 150 rpm em *shaker* (Tecnal TE-424), por 24 h. Em seguida, realizou-se a etapa de inóculo, em *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 135 mL de meio conforme apresentado na Tabela 3. 15 mL do pré-inóculo foram transferidos para o inóculo (correspondente à 10 % do volume total), o qual foi incubado na temperatura de 30 °C e agitação de 150 rpm por 24 h (SANTOS et al., 2016).

Tabela 3 – Composição dos meios de pré-inóculo, inóculo e propagação

Composto	Concentração (g.L ⁻¹)		
	Pré-inóculo	Inóculo	Propagação
Extrato de levedura	10	5	3
Peptona	20	5	5
Glicose	20	1,32	30
Xilose	-	12	-
Ureia	-	2,3	5
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	-	2	2
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	-	0,3	-

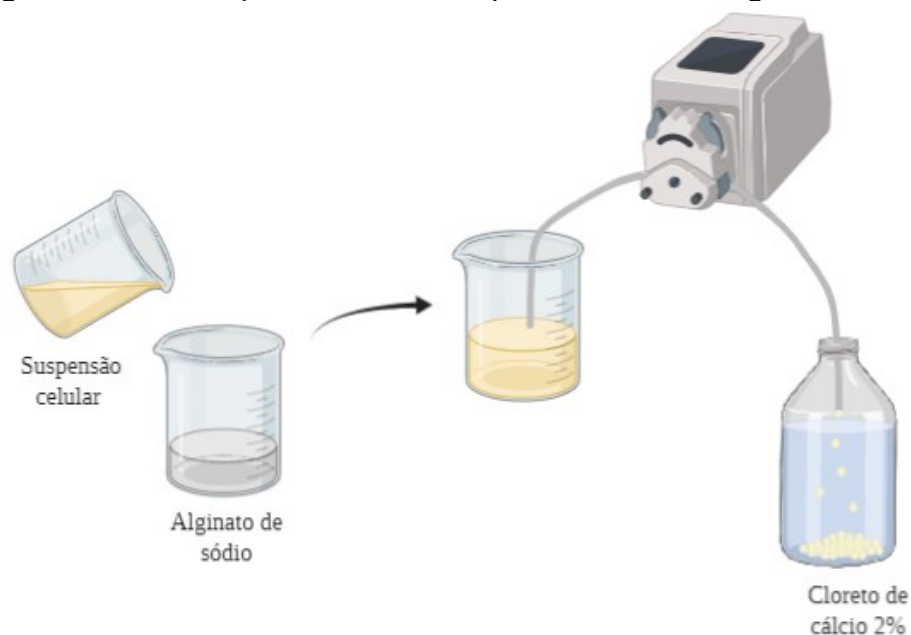
A propagação ocorreu em 10 *Erlenmeyers* de 500 mL, contendo 180 mL de meio (Tabela 3) e 20 mL de inóculo, correspondentes a 10 % do volume total. A propagação ocorreu sob agitação de 150 rpm e 30 °C e durou cerca de 40 h, com um pulso de 15 g.L⁻¹ de glicose no instante 15 h. Após a finalização, todo o volume foi centrifugado (Centrífuga Quimis Q222T) a 3000 xg por 5 min, sem temperatura controlada. O sobrenadante foi descartado e a biomassa

foi lavada duas vezes com água destilada estéril, centrifugando-a nas mesmas condições, e posteriormente foi ressuspensa em água destilada estéril e armazenada em frasco 1 L na temperatura de 7 °C até o uso nas fermentações. O procedimento de obtenção da suspensão foi repetido quantas vezes necessárias para suprir a necessidade de células para os experimentos e suas repetições.

3.3 IMOBILIZAÇÃO EM ALGINATO DE CÁLCIO

A imobilização em alginato de cálcio, apresentada na Figura 10 (criada com BioRender.com) iniciou com a adição de 35 mL da suspensão de células obtida na etapa de propagação a 25 mL da solução estéril de alginato de sódio 4,8 %, a fim de resultar em 60 mL de uma mistura com 2 % de alginato e massa total de células correspondente à 20 g.L⁻¹ de células na fermentação (LEE et al., 2011). Essa mistura foi gotejada (Vazão: 2 mL.s⁻¹), com auxílio de bomba peristáltica (Watson-Marlow 120S), em CaCl₂ 2 % para formação das esferas (LEE et al., 2011; MILESSI et al., 2020b; ORREGO; ZAPATA-ZAPATA; KIM, 2018b). As esferas foram mantidas na solução de CaCl₂ 2 % por 16 h, para a cura (MISHRA et al., 2016). Em seguida, as esferas foram lavadas com água destilada estéril e utilizadas na fermentação e estudo do reciclo.

Figura 9 – Imobilização de células de *S. passalidarum* em alginato de cálcio



3.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA E RECICLO COM AÇÚCARES SINTÉTICOS

3.4.1 Fermentação com concentração elevada de açúcares (ARE)

As fermentações foram conduzidas em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL (em triplicata), com 200 mL de volume útil utilizando células imobilizadas. A concentração de células no meio de fermentação foi definida em 20 g.L⁻¹ e a composição do meio é descrita na Tabela 4, na qual a concentração de açúcares totais foi 120 g.L⁻¹, adaptada de acordo com Nikolic et al. (2010), simulando a proporção de açúcares presentes no HH. Para a composição do sistema com células imobilizadas, considerou-se a proporção, definida por Mishra et al. (2016), de 30 % de esferas, ou seja 60 mL do volume útil de 200 mL.

Tabela 4 – Composição dos meios de fermentação utilizando células imobilizadas

Composto	Composição (g.L ⁻¹)
Extrato de levedura	3
Glicose	25
Xilose	95
Ureia	2,4
Cloreto de cálcio (CaCl ₂)	0,1
Sulfato de magnésio (MgSO ₄ .7H ₂ O)	1

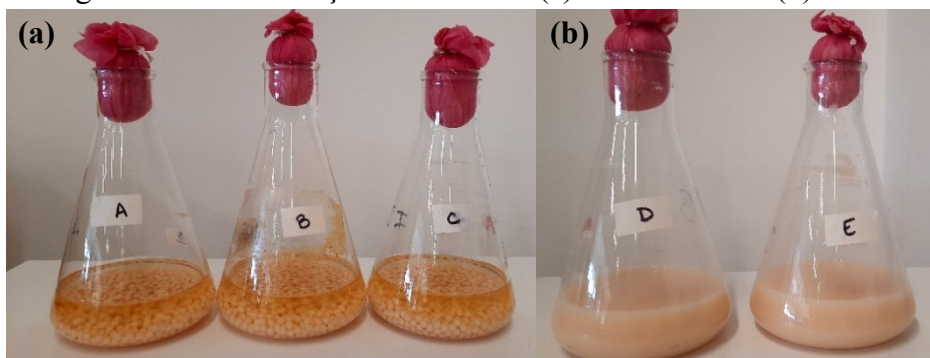
Cinco bateladas sucessivas foram realizadas, cada uma com 24 h de duração baseado em Neitzel et al. (2020), e conduzidas em *shaker* (Tecnal TE-424) a 30 °C e agitação de 110 rpm, de acordo com Su, Willis e Jeffries (2015). Ao término de cada batelada as células foram separadas com auxílio de peneira e lavadas com água destilada, para retirada de possível resquícios do meio de fermentação anterior, e em seguida adicionadas em um novo meio para iniciar a batelada seguinte.

A cada fermentação foram coletadas amostras nos tempos 0, 12, 18 e 24 h para determinações analíticas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de pH. A concentração de células imobilizadas foi determinada a cada início de batelada e, além disso, no tempo 0 h da batelada 1 e no tempo 24 h das bateladas 3 e 5 foram amostradas esferas de alginato de cálcio para análise morfológica em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

3.4.2 Fermentações com concentração moderada de açúcares (ARM)

As fermentações foram conduzidas em frascos *Erlenmeyers* de 500 mL, com 200 mL de volume útil. A fermentação utilizando células imobilizadas ocorreu em triplicata, enquanto a com células livres ocorreu em duplicata (Figura 11).

Figura 10 – Fermentação com células (a) imobilizadas e (b) livres



A concentração de células no meio, para ambas as condições foi definida em 20 g.L^{-1} e a composição do meio (Tabela 5) em 90 g.L^{-1} de concentração inicial de açúcares redutores (glicose + xilose) de acordo com Neitzel et al. (2020), visando simular a proporção de açúcares presentes no HH. Para composição dos meios com células imobilizadas, considerou-se a proporção, definida por Mishra et al. (2016), de 30 % de esferas, ou seja 60 mL do volume útil de 200 mL.

Tabela 5 – Composição dos meios de fermentação utilizando células imobilizadas e livres

Composto	Composição (g.L^{-1})
Extrato de levedura	3
Glicose	27
Xilose	63
Ureia	2,4
Cloreto de cálcio (CaCl_2)	0,1
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1

Fonte: Neitzel et al. (2020)

Cinco bateladas sucessivas foram realizadas para ambas as condições (células livres e imobilizadas). Cada fermentação teve 24 h de duração baseado em Neitzel et al. (2020). As fermentações foram conduzidas em *shaker* (Tecnal TE-424) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ e agitação de 110 rpm, de acordo com Su, Willis e Jeffries (2015).

Ao término de cada batelada as células livres e imobilizadas foram separadas do meio, como já citado no tópico anterior, e reutilizadas para a nova batelada. As células livres foram centrifugadas (Centrífuga Quimis Q222T) a 3000 xg por 5 min, e lavadas com água destilada

estéril e centrifugadas novamente. Em seguida, foram ressuspensas em 60 mL de água destilada estéril e adicionadas ao novo *Erlenmeyer* contendo novo meio de fermentação.

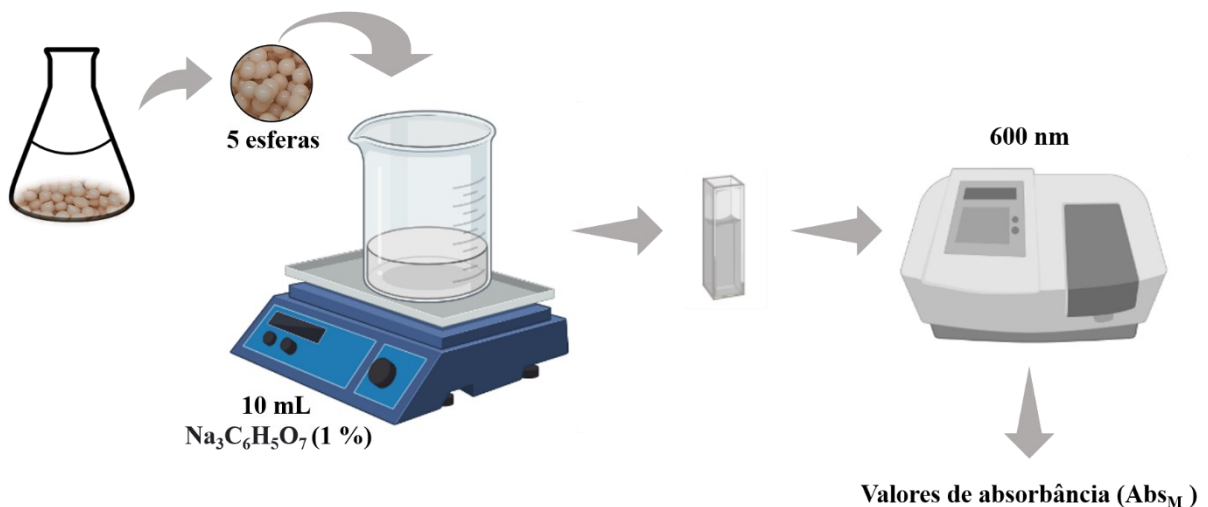
A cada fermentação com células imobilizadas foram coletadas amostras nos tempos 0, 6, 12, 18 e 24 h para determinações analíticas em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de pH. Já para as fermentações com células livres a amostragem ocorreu em 0, 12, 18, 24 h. Além disso, no tempo 0 h da batelada 1 e no tempo 24 h das bateladas 3 e 5 foram amostradas esferas de alginato de cálcio para análise morfológica em Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV).

3.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.5.1 Determinação da concentração de células imobilizadas por espectrofotometria

Para realizar a determinação da concentração de células imobilizadas nas esferas de alginato, nos pontos inicial e final de cada batelada, foi desenvolvida uma nova metodologia (Figura 11), a qual consiste na dissolução de 5 esferas, amostradas nos tempos correspondentes, em 10 mL de citrato de sódio 1% – composto utilizado por Puligundla et al. (2011) que mostrou sua capacidade de dissolver as esferas – com auxílio de agitador magnético (5000 rpm). A absorbância das misturas foi lida em espectrofotômetro (Hitachi U-2900) no comprimento de onda de 600 nm. A partir desse dado foi possível obter a massa de células contida nas 5 esferas amostradas, utilizando-se a Eq. 1:

Figura 11 – Metodologia de determinação da concentração de células imobilizadas



$$m_5 = [((abs_M \times FD) - abs_B) \times 0,2305] \times V_M \quad (1)$$

Onde m_5 é a massa de células em 5 esferas, Abs_M é a absorvância da mistura, FD é o fator de diluição, Abs_B é a absorvância do branco, V_M é o volume da mistura (0,01 L) e 0,2305 é o coeficiente angular da curva padrão (ANEXO 1).

Para calcular a concentração de células das amostras coletadas durante a fermentação utilizou-se a Eq. 2:

$$C_{\text{células}_{\text{fermentação}}} = \frac{m_5 \times \frac{n^\circ \text{ esferas total}}{n^\circ \text{ esferas amostradas}}}{V_F} \quad (2)$$

Onde m_5 é a massa de células em 5 esferas, n° esferas total é 940, n° esferas amostradas é 5 e V_F é o volume total da fermentação (0,02 L).

3.5.2 Determinação da concentração de células livres por espectrofotometria

A concentração de células livres no meio foi determinada nos ensaios com células livres, na qual a totalidade celular encontrava-se misturada ao meio, e nos ensaios com células imobilizadas, para averiguar a existência de liberação de células do interior das esferas para o meio de fermentação. A determinação ocorreu a partir da leitura da absorvância das amostras, coletadas nos tempos já citados, em espectrofotômetro (Hitachi U-2900) no comprimento de onda 600 nm. As absorvâncias foram convertidas a concentração de biomassa utilizando-se curva-padrão, construída a partir de da leitura em espectrofotômetro (600 nm) de suspensões da levedura cuja concentração era conhecida. Diluições foram realizadas conforme necessário e os resultados foram multiplicados pelo valor do fator de diluição.

3.5.3 Análise morfológica das esferas de alginato de cálcio

A morfologia das esferas de alginato de cálcio contendo as células da levedura foi analisada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A preparação das esferas consistiu na submersão em glutaraldeído 2,5% por 2 h para fixação das células. Após, foram mergulhadas em solução de etanol com concentrações crescentes (10, 20, 30, 50, 70%) por 20 min cada (PULIGUNDLA et al., 2011).

As esferas foram secas no ponto crítico e recobertas com uma fina camada de ouro para evitar o acúmulo de carga elétrica do feixe primário e melhorar o nível de emissão de elétrons secundários durante o processo de obtenção das micrografias. Os ensaios foram realizados em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca Jeol, modelo JSM – 6390 LV

do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina. A avaliação das esferas foi realizada utilizando micrografias com ampliações entre 25 e 5000 vezes e feixe de elétrons com energia 10 kV.

3.5.4 Determinação da concentração de analitos

As concentrações de xilose, glicose, etanol, ácido acético, xilitol e glicerol foram determinadas através de CLAE por índice de refração. Para tal, as amostras do meio de fermentação foram centrifugadas a 8000 xg por 10 min e o sobrenadante foi separado e filtrado em filtros (membrana PVDF) de 0,22 μm para análise no Cromatógrafo Líquido (LC-20A Shimadzu). A técnica foi realizada utilizando coluna Aminex HPX-87H (300 mm x 1,00 μm , 7,8 mm x 9 μm , Bio-rad), com fluxo de 0,6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e com temperatura de detector e coluna igual a 50 $^{\circ}\text{C}$ e solução 5 mM de ácido sulfúrico como fase móvel.

3.5.5 Determinação de pH

O acompanhamento do pH do meio de fermentação foi feito com pHmetro (Kasvi K39-1420A).

3.6 ANÁLISE DE DADOS

3.6.1 Parâmetros cinéticos de fermentação

A análise dos dados obtidos foi realizada com o cálculo dos parâmetros cinéticos por meio das equações apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos de fermentação

Parâmetro	Equação	Unidade	Número da equação
Velocidade específica máxima de crescimento	$\ln\left(\frac{X_f}{X_i}\right) = \mu_{X_{\max}} \cdot t$	h^{-1}	(3)
Velocidade específica de crescimento	$\mu_X = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$	h^{-1}	(4)
Velocidade específica de consumo de substrato	$\mu_S = \frac{1}{X} \left(-\frac{dS}{dt}\right)$	$g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	(5)
Velocidade específica de formação de produto	$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$	$g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$	(6)
Fator de conversão de substrato em células	$Y_{X/S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f}$	$g \cdot g^{-1}$	(7)
Fator de conversão de substrato em produto	$Y_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f}$	$g \cdot g^{-1}$	(8)
Fator de conversão modificado de substrato em produto	$Y'_{P/S} = \frac{P_f - P_i}{S_i}$	$g \cdot g^{-1}$	(9)
Rendimento	$n = \frac{Y_{P/S}}{Y_{P/S_{\text{estq}}}} \times 100$	%	(10)
Produtividade volumétrica global	$Q_P = \frac{P_f - P_i}{t}$	$g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	(11)

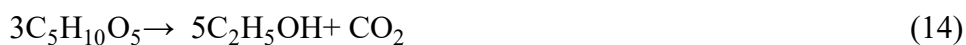
Onde: $\frac{dX}{dt}$ = velocidade instantânea de crescimento celular ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$); X = biomassa celular ($g \cdot L^{-1}$); P_f e P_i = concentração final e inicial de produto ($g \cdot L^{-1}$), respectivamente; S_f e S_i = Concentração final e inicial de substrato ($g \cdot L^{-1}$), respectivamente; t = tempo (h); $Y_{P/S_{\text{estq}}}$ = Fator de conversão estequiométrico de substrato em produto com valor de $0,511 \text{ g}_P \text{ g}_S^{-1}$.

3.6.2 Balanço de massa para fermentações em batelada

O balanço de massa para crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol das fermentações e estudo do reciclo foi realizado com equações obtidas a partir do balanço global (Eq. 11).

$$\text{Variação global} = \text{Entrada-Saída} \pm (\text{Geração/Consumo}) \quad (11)$$

O fechamento dos balanços depende, além da concentração de açúcares, produtos e subprodutos e da quantidade de gás carbônico gerado durante a fermentação. A determinação desses valores foi realizada através da estequiometria da reação de conversão de xilose em etanol (Eq. 14).



A partir dessa equação, consideraram-se os seguintes fatores teóricos de conversão: a) $Y_{\text{etanol/xilose}} = 0,511 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$; b) $Y_{CO_2/xilose} = 0,488 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Foram considerados os rendimentos obtidos

em cada fermentação para corrigir a massa de CO₂ gerada. Para isso, foi realizada proporção entre os fatores de conversão teóricos para etanol e CO₂ e o real obtido para etanol, a fim de obter-se o valor correspondente para CO₂.

3.6.3 Análise estatística

A análise dos resultados e verificação da existência de diferença significativa foram realizadas no software Statistica[®] 12.5. Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido de um teste de comparação entre médias (Tukey) a um nível de significância de 0,05.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 FERMENTAÇÃO COM ELEVADA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCARES REDUTORES UTILIZANDO *S. passalidarum* IMOBILIZADA

Com o objetivo de verificar a possibilidade de imobilizar células de *S. passalidarum* para a produção de E2G a partir de um meio rico em xilose, simulando o hidrolisado hemicelulósico obtido por meio de pré-tratamento ácido diluído, cinco bateladas sucessivas (B1, B2, B3, B4, B5) em triplicata biológica foram realizadas com concentração elevada de AR inicial (ARE) de aproximadamente 120 g.L⁻¹, baseado em Nikolic et al. (2010). A levedura *S. passalidarum* é geralmente utilizada em fermentações com concentrações iniciais de AR em torno de 90 g.L⁻¹ (BIAZI et al., 2020; BONAN et al., 2020; NEITZEL et al., 2020), entretanto, a imobilização de microrganismos é conhecida por promover diversas vantagens, como a proteção das células contra condições ambientais extremas (MILESSI et al., 2020a; PHILLIPS, COLIN R.; POON, 1988), desta forma, alta concentração de AR foi testada (ARE).

A Figura 12 apresenta o perfil de etanol, células, xilose e glicose para as cinco bateladas sucessivas utilizando células imobilizadas. A concentração de células está apresentada como células totais presentes na fermentação que corresponde à soma das células imobilizadas no interior das esferas de alginato de cálcio (vide item 3.5.1) e das células livres no meio (vide item 3.5.2). É possível verificar que a glicose foi 100 % consumida em todas as bateladas, como mostra a Figura 12, porém na B5 o açúcar foi consumido em sua totalidade após 18 h, enquanto que para as quatro primeiras bateladas, o consumo se deu antes de 18 h. As 24 h de fermentação não foram suficientes para o consumo total da xilose, sendo a máxima porcentagem de consumo de AR nas bateladas iniciais (B1 e B2) na faixa de 70,01 – 65,69 %, como apresentado na Tabela 7. O consumo total de AR diminuiu nas bateladas seguintes alcançando apenas 43,07 ± 4,74 % em B5. A diminuição do consumo de xilose pode ter ocorrido devido à saturação do suporte devido aos componentes do meio e produtos, que foram sendo acumulados ao longo da reutilização das esferas, dificultando a difusão. Outra hipótese é a saturação do sistema pelas leveduras que perderam atividade (morte celular) conforme a reutilização, não permitindo sua renovação devido à ocupação do espaço físico no suporte.

Além das sugestões já citadas, o baixo consumo de xilose ocorreu, possivelmente, devido à inibição por substrato ocasionada pela elevada concentração de xilose no meio de fermentação. A elevada concentração de açúcares pode ocasionar choque osmótico nas células da levedura e diminuir a transferência de calor e massa, algo já dificultado pela imobilização

(NIKOLIĆ et al., 2010). Biazi et al. (2020) também verificaram que a concentração de substrato inibiu o crescimento celular, na qual a glicose ocasionou repressão do consumo de xilose para geração de células, em todas as condições testadas (26, 27, 28, 30 e 32 °C). Assim, uma alternativa para contornar esse efeito pode ser a diminuição da concentração inicial de substrato, cujos resultados são apresentados no tópico seguinte.

Figura 12 – Concentração de AR, células, células e etanol ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração elevada de açúcar, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas

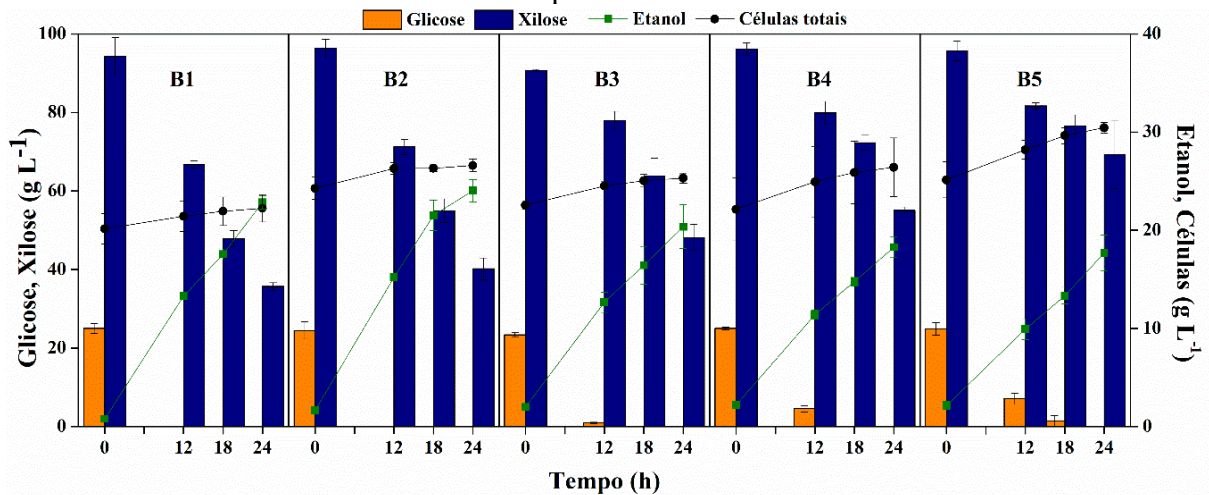


Tabela 7 – Parâmetros cinéticos do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR

Parâmetros/bateladas	1	2	3	4	5
AR consumido (%)	70,01 ± 2,10 ^a	65,69 ± 2,13 ^a	57,77 ± 3,22 ^b	54,60 ± 0,64 ^b	43,07 ± 4,74 ^c
Etanol produzido (g.L ⁻¹)	22,04 ± 0,77 ^a	22,39 ± 1,05 ^a	18,36 ± 2,31 ^{ab}	16,10 ± 0,74 ^b	15,59 ± 1,61 ^b
Y _{P/S} (g _p g _s ⁻¹ h ⁻¹)**	0,26 ± 0,03 ^a	0,29 ± 0,05 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,24 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,05 ^a
Q _p (g _p L ⁻¹ h ⁻¹) **	0,92 ± 0,03 ^{ab}	0,93 ± 0,04 ^a	0,76 ± 0,10 ^{bc}	0,67 ± 0,03 ^c	0,65 ± 0,07 ^c
Rendimento (%)	52,03 ± 5,98 ^a	57,54 ± 9,11 ^a	54,70 ± 6,70 ^a	47,72 ± 2,94 ^a	59,20 ± 10,49 ^a

* Letras minúsculas diferentes na linha diferenciam estatisticamente as bateladas do ensaio pelo teste de Tukey (p < 0,05).

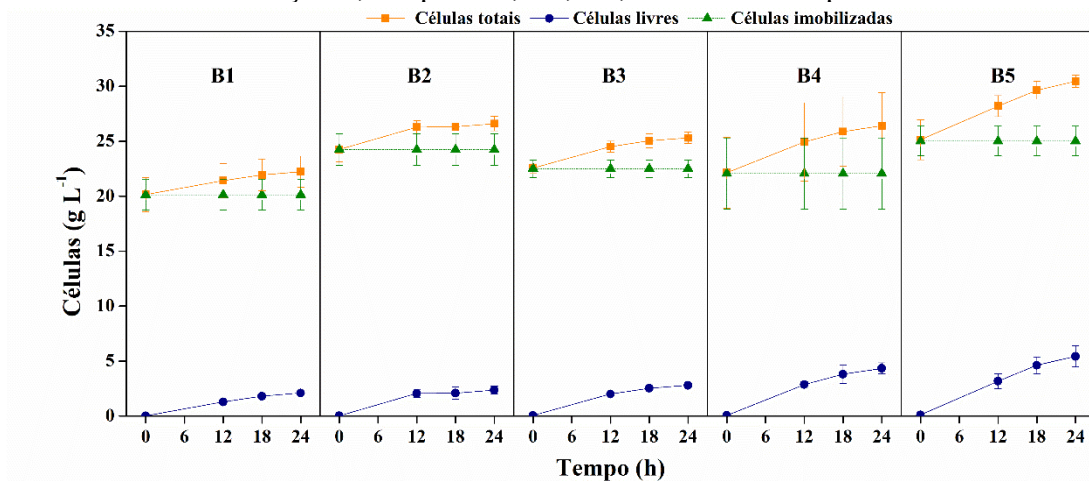
** Y_{P/S} é o fator de conversão de substrato em produto e Q_p a produtividade volumétrica

A concentração máxima de etanol obtida (Figura 12) na B1, B2 e B3 não apresentou diferença significativa entre si, variando entre 20,35 ± 2,23 e 22,39 ± 0,69 g.L⁻¹, assim como B3, B4 e B5 também não diferiram, ficando a faixa de 15,59 – 18,36 g.L⁻¹. Nikolic et al. (2010) avaliaram o efeito da imobilização na produção de bioetanol a partir de hidrolisado de milho com a cepa *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* e relataram que a imobilização em alginato de cálcio aumentou a tolerância das células à elevada concentração de açúcar, ocasionada pela difusão

nas esferas que permite a transferência de menor concentração no seu interior. As células imobilizadas toleraram até a faixa de 200 g.L^{-1} enquanto as células livres foram inibidas a partir de 176 g.L^{-1} (NIKOLIĆ et al., 2010).

A concentração de células totais (Figura 13) aumentou ao longo de todas as bateladas e atingiu valor máximo na B5, sendo $30,46 \pm 0,55 \text{ g.L}^{-1}$, no entanto, não se determinou a atividade (com a coloração em azul de metileno) destas leveduras livres e fixadas ao suporte para se diferenciar vivas, mortas. A Figura 13 mostra as células totais, células imobilizadas e células livres presentes em cada uma das bateladas do experimento, monitoradas conforme metodologia previamente descrita. É possível observar que a liberação de células livres para o meio de fermentação aumenta com a reutilização dos suportes, atingindo a maior concentração na B5 ($5,40 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$). Esse aumento da concentração de células livres pode ser resultado da saturação dos suportes, que aumentou com as várias reutilizações dos mesmos. Uma alternativa viável para melhorar os parâmetros ao longo das bateladas seria a substituição de uma porcentagem dos suportes antigos (purga do sistema) por suportes novos, compostos pelas células liberadas na batelada anterior.

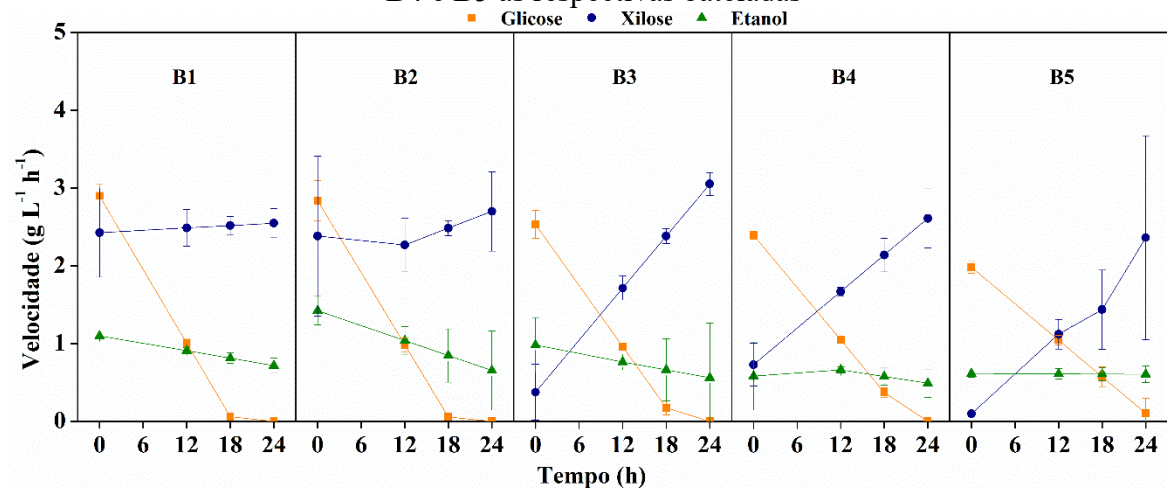
Figura 13 – Concentração de células totais, de células imobilizadas e de células suspensas no meio ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração elevada de açúcar, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas



Os fatores de conversão dos açúcares (glicose + xilose) em etanol, como observado na Tabela 7, não apresentaram diferença significativa entre as bateladas, variando de $0,24 \pm 0,01$ a $0,30 \pm 0,05 \text{ g.g}^{-1}$. As maiores produtividades foram obtidas na B1 e na B2 ($0,92 \pm 0,03 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,93 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$), as quais também apresentaram os maiores valores para AR consumido e fator de conversão.

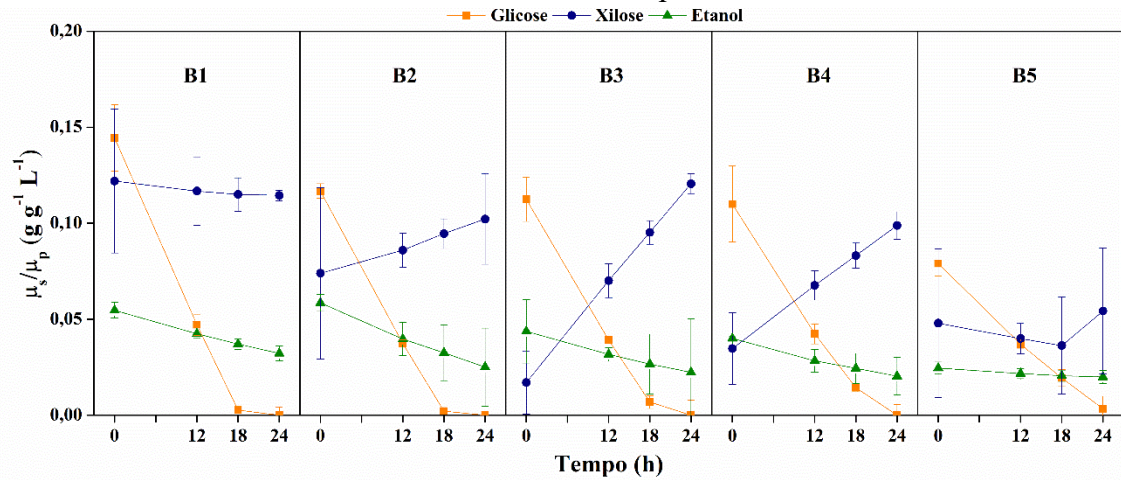
As velocidades de consumo de substrato (glicose e xilose) e formação de produto do ensaio ARE são apresentadas na Figura 14. A velocidade de consumo da glicose diminui ao longo da fermentação devido a disponibilidade deste carboidrato. A velocidade de produção de etanol manteve-se constante ou com pouca variação por todo o tempo de fermentação, sendo a maior velocidade encontrada na B2 ($1,42 \pm 0,18 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). A velocidade de consumo da xilose nas duas primeiras bateladas foi de aproximadamente $2,40 \pm 0,60 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no tempo 0 h, não apresentado grande variação no decorrer do tempo. Entretanto, a partir de B3 as velocidades iniciaram em valores menores, demonstrando dificuldade no consumo deste carboidrato.

Figura 14 – Velocidades de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



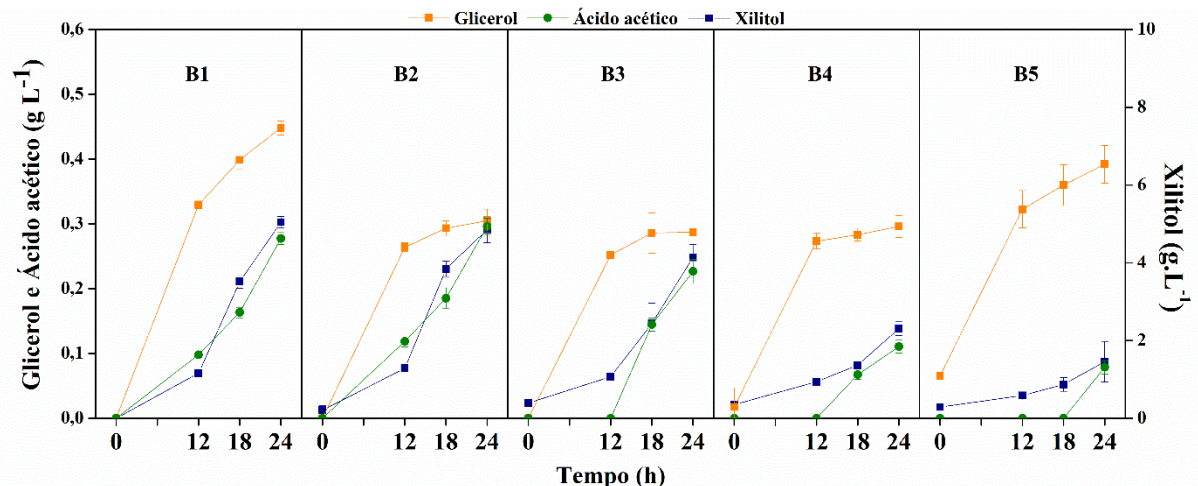
As velocidades específicas (Figura 15) apresentaram os mesmos comportamentos da velocidade instantânea. μ_{glicose} diminuiu ao longo da fermentação, devido a disponibilidade deste carboidrato. O valor de μ_{etanol} manteve-se constante ou com pouca variação por todo o tempo de fermentação, sendo o maior valor alcançado na B2 ($0,06 \pm 0,00 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Os maiores valores iniciais de μ_{xilose} foram observados na B1 e na B2, sendo $0,12 \pm 0,04$ e $0,07 \pm 0,04 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Nas bateladas em que se observou o menor consumo de xilose (a partir de B3, vide Figura 12), também foi observada mudança no perfil de μ_{xilose} , na qual os valores iniciais foram menores que B1 e B2, sendo no máximo $0,05 \pm 0,03 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e embora tenha sido observado um aumento ao longo do tempo, os valores finais foram iguais ou menores que os valores finais para B1 e B2.

Figura 15 – Velocidades específicas de consumo de glicose e xilose e de produção de etanol ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



A concentração de xilitol (Figura 16) foi maior quanto maior o consumo de xilose. Assim, as maiores concentrações alcançadas foram de $5,04 \pm 0,15$, $4,85 \pm 0,33$ e $4,14 \pm 0,34$ g.L⁻¹, para as fermentações B1, B2 e B3, respectivamente. Na B5 a concentração após 24 h foi de apenas $1,45 \pm 0,52$ g.L⁻¹. A concentração de glicerol e ácido acético foram baixas, variando de 0,28 a 0,44 g.L⁻¹.

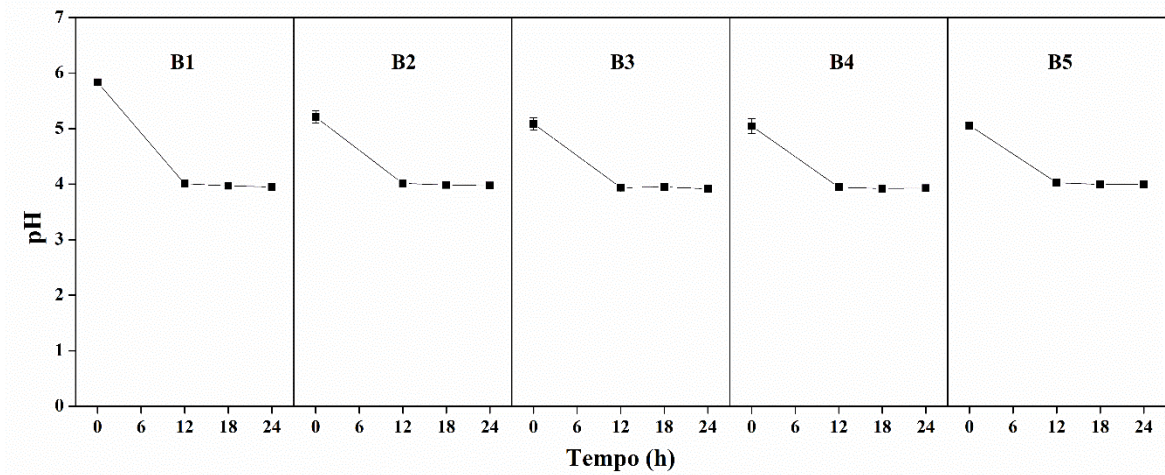
Figura 16 – Concentração de xilitol, glicerol e ácido acético ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



Os valores de pH para a fermentação com *S. passalidarum* imobilizada com ARE (Figura 17) iniciaram na faixa de 5 – 6. O maior valor obtido foi na B1 no tempo 0 h ($5,83 \pm 0,06$), diminuindo antes das 12 h e seguindo praticamente constante até o fim das 24 h de fermentação. As demais bateladas foram semelhantes entre si, apresentando decaimento da

faixa de 5 – 6 até 4 – 5. O pH não foi corrigido ao longo das fermentações, somente monitorado. Vale ressaltar que o pH praticado industrialmente para E1G é entre 4,5 e 5,5 (valor ótimo também para a levedura *S passalidarum* (Bonan et al., 2021)) e que o controle do pH é muito difícil devido aos grandes volumes dos tanques industriais.

Figura 17 – pH ao longo do tempo do ensaio com células imobilizadas e elevada concentração de AR, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



4.2 FERMENTAÇÃO COM CONCENTRAÇÃO MODERADA INICIAL DE AÇÚCARES: CÉLULAS LIVRES X CÉLULAS IMOBILIZADAS

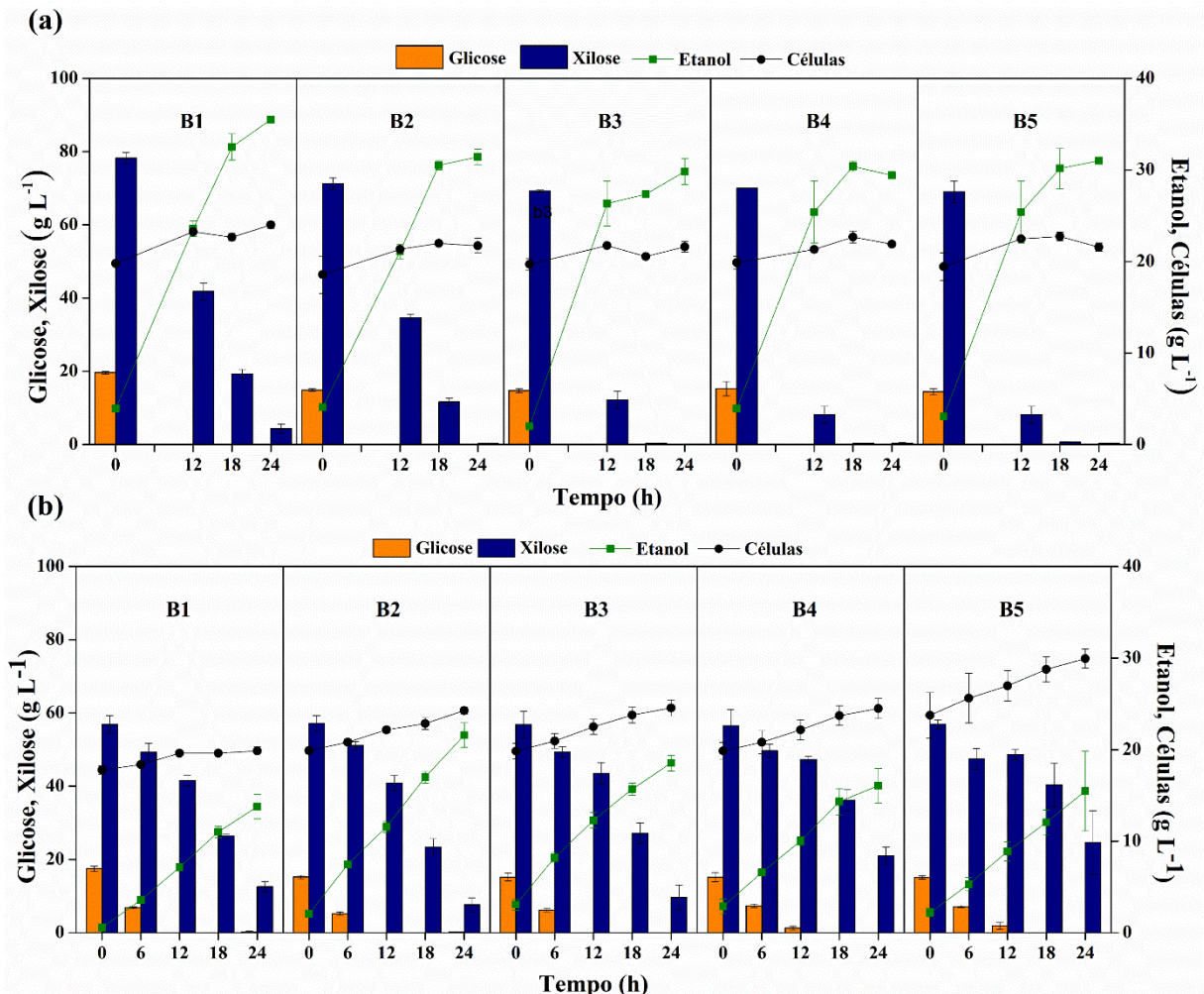
Com o intuito de verificar a possibilidade de imobilizar células de *S. passalidarum* para a produção de E2G a partir de um meio rico em xilose, simulando o hidrolisado hemicelulósico obtido por meio de pré-tratamento ácido diluído (vide Tabela 1), cinco bateladas sucessivas (B1, B2, B3, B4, B5) em triplicata biológica foram realizadas para comparação da produção de E2G em um sistema de células livres e outro com células imobilizadas, ambos com concentração de açúcares redutores moderada (ARM) inicial entre 70 – 90 g.L⁻¹ (NEITZEL et al., 2020).

A Figura 18 apresenta os perfis de concentração de glicose, xilose, células e etanol para as fermentações em bateladas sucessivas com células livres (Figura 18a) e imobilizadas (Figura 18b). A concentração de células está novamente apresentada como células totais presentes nas fermentações, que, para as células imobilizadas, corresponde à soma das células imobilizadas no interior das esferas de alginato de cálcio (vide item 3.5.1) e das células suspensas no meio (vide item 3.5.2). É possível observar que o consumo de glicose foi completo em ambas as condições e em todas as suas respectivas bateladas. O consumo simultâneo de xilose e glicose foi observado para as fermentações com células imobilizadas (Figura 18b) entre

os instantes 0 e 5 h de fermentação. Vale ressaltar que este comportamento foi observado somente com células imobilizadas devido ao maior número de amostras coletadas, possibilitando esta visualização, o que não descarta a possibilidade do mesmo comportamento ter ocorrido para as fermentações com células livres. O mesmo comportamento no consumo de AR foi relatado por Long et al. (2012) e Hou (2012), que utilizaram células livres de *S. passalidarum* na concentração inicial de $1,23 \text{ g.L}^{-1}$. No entanto, o efeito de repressão catabólica, caracterizado pelo consumo sequencial de glicose seguido de xilose é reportado na literatura para esse microrganismo (BIAZI et al., 2020; BONAN et al., 2020; NAKANISHI et al., 2017), e tem sido amplamente discutida para fermentações com *S. passalidarum* em que se utilizam glicose e xilose como principais fontes de carbono (BONAN et al., 2021). A repressão catabólica é observada no metabolismo da maioria dos microrganismos e é o fenômeno que ocorre quando o consumo da glicose presente no meio impede a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para metabolização de outros açúcares (FARIAS; MAUGERI-FILHO, 2021). Isso é uma questão que deve ser resolvida para melhorar o processo de produção de E2G e os resultados obtidos para células imobilizadas são promissores para este fim.

Na Figura 18 ainda é possível observar que o consumo de xilose foi praticamente completo para as fermentações com células livres, sendo o máximo valor para AR residual de $4,33 \pm 0,25 \text{ g.L}^{-1}$ na B1 (Figura 18a). Em contrapartida, as 24 h de fermentação não foram suficientes para o consumo completo da xilose para as fermentações com células imobilizadas, apresentando açúcar residual máximo de $29,54 \pm 2,50 \text{ g.L}^{-1}$ na B5 (Figura 18b). Para o ensaio com as células livres, a reutilização das células parece ter melhorado o consumo de xilose, já que na B1 houve xilose residual e na B2 o açúcar foi consumido após 18 h, enquanto a partir de B3 o consumo completo de xilose ocorreu antes das 18 h de fermentação. Esse comportamento não foi observado para o ensaio com células imobilizadas, na qual a reutilização das células dificultou a absorção de xilose, fazendo com que esse AR fosse acumulando com o decorrer das bateladas. Isso sugere que a imobilização dificultou o consumo de açúcar pelas células.

Figura 18 – Concentração de glicose, xilose, células e etanol ao longo do tempo de fermentação com concentração moderada de AR, sendo (a) células livres e (b) células imobilizadas e B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



A concentração final de etanol obtida (Figura 18) ao final das bateladas sucessivas foi maior para o ensaio com células livres, quando comparada às células imobilizadas e alcançando seu valor máximo na B1 ($35,5 \pm 0,00 \text{ g L}^{-1}$). Nas demais bateladas a concentração foi um pouco inferior, mas se manteve aproximadamente constante, variando de $29,82$ a $31,43 \text{ g L}^{-1}$. Para o ensaio com células imobilizadas, a maior concentração obtida foi na B2 ($21,60 \pm 1,34 \text{ g L}^{-1}$), com sutil diminuição nas bateladas subsequentes. É possível observar que, para as células livres, o perfil de produção de etanol muda quando o consumo de açúcar muda de glicose para xilose, o que não acontece com as células imobilizadas, que permanece com a mesma taxa de produção (inclinação).

De acordo com Ndubuisi et al. (2020), embora a imobilização em alginato de cálcio confira vantagens ao processo fermentativo, como a facilidade de reutilização e a proteção

celular contra inibidores e condições ambientais estressantes, o suporte pode apresentar resistência à transferência de massa, dificultando a utilização por muitas bateladas seguidas, o que explica a diferença existente entre o consumo de açúcares entre o ensaio com células livres e com células imobilizadas, bem como a dificuldade na metabolização de xilose para as fermentações com células imobilizadas, destacando as bateladas finais (B4 e B5). A transferência de massa sendo dificultada pela imobilização em alginato, prejudica o transporte tanto dos substratos quanto do oxigênio para o interior das células, que é um parâmetro importante para o metabolismo de xilose em *S. passalidarum*. Este mesmo comportamento foi demonstrado no trabalho de Bonan et al. (2020) que estudaram a influência da concentração de O₂ presente no meio de fermentação, testando diferentes coeficientes volumétricos de transferência de oxigênio (K_{LA}). Os autores testaram K_{LA}'s de 0 (anaerobiose), 4,9, 8 e 45 h⁻¹, sendo a maior Q_p obtida (1,12 g.L⁻¹.h⁻¹) foi com o maior K_{LA}. Além disso, a elevada aeração reduziu o tempo de fermentação e aumentou a velocidade específica de consumo de xilose (BONAN et al., 2020).

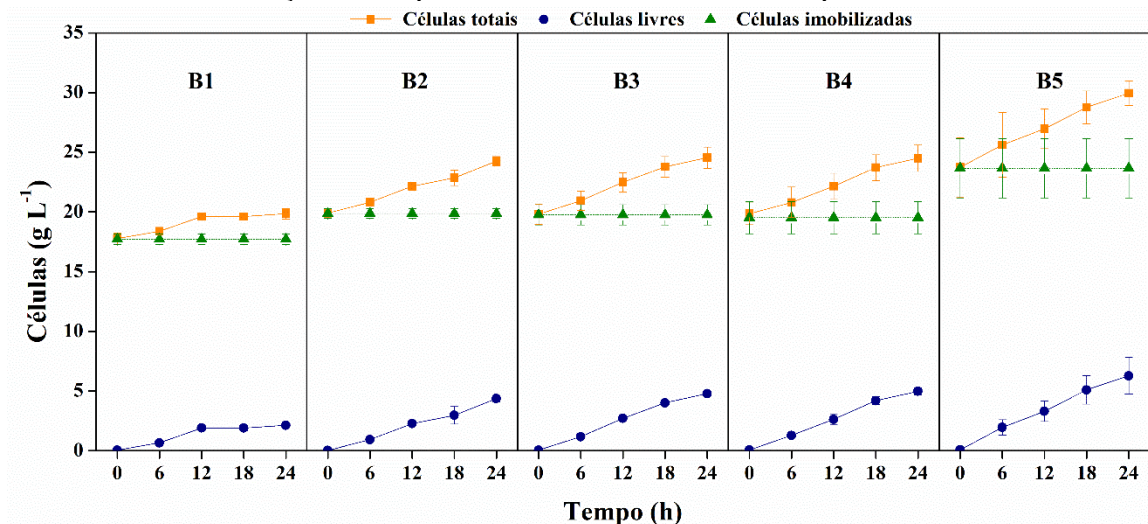
Microrganismos que apresentam o efeito *Crabtree* produzem etanol quando as concentrações de açúcar são elevadas, mesmo em aerobiose. A levedura *S. passalidarum* é *Crabtree* negativa, na qual uma das características é o aumento da produção de células com o aumento da aeração e a escolha de produzir etanol ou células depende da concentração de O₂ disponível para as células (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008; BONAN et al., 2020). No caso do ensaio com células imobilizadas no sistema utilizado neste trabalho (*shaker*), a transferência de oxigênio foi prejudicada, dificultando o consumo de xilose e, conseqüentemente, a produção de etanol. Portugal-Nunes et al. (2015) na investigação do efeito da imobilização de *S. stipitis*, relataram que o suporte de alginato de cálcio limitou a transferência de massa baseado na diferença de velocidade de consumo de glicose entre o ensaio com células livres e células imobilizadas. A velocidade de consumo de glicose foi 1,5 vezes maior para células livres, sendo obtido 0,34 e 0,23 g.L⁻¹.h⁻¹ para células livres e imobilizadas, respectivamente. Neste trabalho também foram observados valores de velocidade de consumo de substrato mais elevadas para células livres, quando comparadas às células imobilizadas (Figuras 21 e 22).

Nos ensaios com células livres, a concentração de células (Figura 18a) no meio de cultivo iniciou em aproximadamente 20 g.L⁻¹ na B1, sendo a concentração máxima obtida de 23,99 ± 0,36 g.L⁻¹ na B1. Baixo crescimento celular nas cinco bateladas do ensaio com células livres foi observado e todas apresentaram constância na concentração celular inicial

(aproximadamente 20 g.L^{-1}), mesmo sem utilizar o processo de purga. Biazi et al. (2020) também observaram baixo crescimento celular durante as 24 h de fermentação de hidrolisado de cana-de-açúcar por *S. passalidarum*, cuja concentração iniciou em 20 g.L^{-1} , assim como neste trabalho.

A concentração de células totais nos ensaios com leveduras imobilizadas (Figura 19) ficou na faixa de $18 - 25 \text{ g.L}^{-1}$ em todas as bateladas. Como já citado, as células totais são compostas pelas células no interior das esferas de alginato (vide item 3.5.1) e as células livres solubilizadas no meio de fermentação (vide item 3.5.2). A Figura 19 mostra que houve aumento das células livres ao longo das bateladas sucessivas. Uma possibilidade para pequeno aumento da concentração de células pode ser devido a características *Crabtree* negativa de *S. passalidarum*, na qual pouca disponibilidade de oxigênio no meio resulta em baixo crescimento celular (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008; SOARES et al., 2020). Neste sentido é possível inferir que fermentações em sistemas com adequado fornecimento de O_2 (biorreatores agitados e aerados, por exemplo) poderiam levar a melhores resultados de crescimento (renovação) celular e consumo de xilose.

Figura 19 – Concentração de células total, de células imobilizadas e de células suspensas no meio ao longo do tempo de fermentação do ensaio com células imobilizadas e concentração moderada de açúcar, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas



A Tabela 8 apresenta os parâmetros cinéticos do ensaio com células livres e com células imobilizadas. É possível observar que no ensaio com células livres não houve diferença significativa no consumo percentual de AR entre fermentações em batelada sucessivas realizadas com células livres. Para as fermentações com células imobilizadas é possível

observar que as três primeiras bateladas não apresentaram diferenças significativas entre si, mas B4 e B5 foram diferentes, quando comparadas às primeiras e entre si em relação ao consumo de AR. Ainda para estas fermentações é possível notar a diminuição no consumo percentual de AR com o aumento do número de bateladas.

Tabela 8 – Parâmetros cinéticos do ensaio com células livres e imobilizadas e concentração moderada de AR

Células livres					
Parâmetros/bateladas	1	2	3	4	5
AR consumido (%)	95,59 ± 1,19 ^{Ab}	99,67 ± 0,01 ^{Aa}	99,76 ± 0,03 ^{Aa}	99,60 ± 0,26 ^{Aa}	98,33 ± 1,68 ^{Ab}
Etanol produzido (g.L ⁻¹)	27,97 ± 5,19 ^{Aa}	27,36 ± 0,60 ^{Aa}	26,78 ± 1,53 ^{Aa}	25,46 ± 0,51 ^{Aa}	27,34 ± 0,78 ^{Aa}
Y _{P/S} (g.g ⁻¹ h ⁻¹)	0,30 ± 0,06 ^{Aa}	0,32 ± 0,00 ^{Aa}	0,32 ± 0,02 ^{Aa}	0,30 ± 0,02 ^{Aa}	0,33 ± 0,02 ^{Aa}
Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,16 ± 0,22 ^{Aa}	1,14 ± 0,02 ^{Aa}	1,12 ± 0,06 ^{Aa}	1,06 ± 0,02 ^{Aa}	1,14 ± 0,03 ^{Aa}
Rendimento (%)	58,65 ± 11,30 ^{Aa}	62,49 ± 0,02 ^{Aa}	62,72 ± 4,34 ^{Aa}	58,07 ± 3,70 ^{Aa}	65,40 ± 3,68 ^{Aa}
Células imobilizadas					
Parâmetros/bateladas	1	2	3	4	5
AR consumido (%)	82,77 ± 2,87 ^{Ba}	89,34 ± 2,32 ^{Ba}	86,71 ± 3,60 ^{Ba}	70,78 ± 1,29 ^{Bb}	58,95 ± 3,27 ^{Bc}
Etanol produzido (g.L ⁻¹)	13,19 ± 1,37 ^{Bb}	19,53 ± 0,98 ^{Ba}	15,46 ± 1,40 ^{Bab}	13,19 ± 1,34 ^{Bb}	13,28 ± 4,55 ^{Bab}
Y _{P/S} (g.g ⁻¹ h ⁻¹)**	0,22 ± 0,04 ^{Ab}	0,30 ± 0,02 ^{Aa}	0,25 ± 0,02 ^{Bab}	0,26 ± 0,02 ^{Ab}	0,27 ± 0,04 ^{Aab}
Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)**	0,55 ± 0,06 ^{Bb}	0,81 ± 0,04 ^{Ba}	0,64 ± 0,06 ^{Bab}	0,55 ± 0,06 ^{Bb}	0,55 ± 0,19 ^{Bab}
Rendimento (%)	42,31 ± 7,18 ^{Ab}	59,28 ± 4,21 ^{Aa}	48,57 ± 3,30 ^{Bab}	50,98 ± 3,26 ^{Aab}	53,94 ± 7,63 ^{Aab}

* Letras maiúsculas diferentes para o mesmo parâmetro na coluna diferenciam estatisticamente os ensaios com células livres e células imobilizadas.

Letras minúsculas diferentes na linha diferenciam estatisticamente as bateladas de um mesmo ensaio.

A diferenciação estatística foi realizada através do teste de Tukey (p < 0,05).

** Y_{P/S} é o fator de conversão de substrato em produto e Q_P a produtividade volumétrica

A concentração de etanol produzida (Tabela 8) para as fermentações em batelada sucessivas com células livres não apresentou diferença significativa entre si. Já para os resultados de produção de etanol nas fermentações em bateladas sucessivas para células imobilizadas nota-se o aumento da concentração de produto de B1 para B2 (13,19 ± 1,37 g.L⁻¹ e 19,53 ± 0,98 g.L⁻¹, respectivamente), no entanto, a concentração atingiu patamares próximos à B1 para as fermentações B3, B4 e B5. Assim, os melhores resultados foram observados no ensaio com células que já passaram por pelo menos uma reutilização nas bateladas, similar ao relatado por Lee et al. (2011), que estudaram a produção de E1G por células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio 2 % (m/v). O mesmo comportamento também foi relatado por relatado por Neitzel et al. (2020) no reciclo de células livres de *S. passalidarum*. Lee et al. (2011) estudaram a produção de E1G por células de *S. cerevisiae* KCTC 7906 imobilizadas em alginato de cálcio, 2 % (m/v). Os autores reutilizaram as células imobilizadas por cinco

bateladas sucessivas e compararam ao ensaio utilizando células livres. Os autores observaram dentre as cinco bateladas com células imobilizadas, os melhores resultados foram os obtidos na terceira repetição, apresentando menor tempo de fermentação (10 h) e fator de conversão de substrato em produto de 100 % em relação ao teórico estequiométrico, 1,13 vezes maior que para células livres.

Ainda analisando os resultados apresentados na Tabela 8 nota-se que $Y_{P/S}$ e Q_p para as fermentações com células livres não apresentaram diferença significativa entre as bateladas, variando de $0,30 \pm 0,06$ a $0,33 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$ e $1,06 \pm 0,02$ a $1,16 \pm 0,22 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, respectivamente. Os rendimentos também não demonstraram diferença significativa e mantiveram-se na faixa de $58,07 \pm 3,70$ a $65,40 \pm 3,68 \%$ para estas fermentações. Neitzel et al. (2020) realizaram fermentações em batelada alimentada sucessivas com células livres (concentração inicial de 90 g.L^{-1}) de *S. passalidarum* em meio simulando hidrolisado hemicelulósico e observaram diferença significativas nos parâmetros cinéticos quando comparadas as cinco bateladas e, os cinco valores para cada um dos parâmetros ficaram nas faixas de $0,39$ a $0,46 \text{ g.g}^{-1}.\text{L}^{-1}$ e de $1,29$ a $1,79 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, para fator de conversão e produtividade, respectivamente (NEITZEL et al., 2020). Para as fermentações com células imobilizadas o maior fator de conversão e produtividade foram observados na B2, de $0,30 \pm 0,02 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,81 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, sendo diferente significativamente dos valores obtidos nas demais bateladas (Tabela 8). Em relação ao rendimento, B2 também apresentou o valor máximo do parâmetro, de $59,28 \pm 4,21 \%$ e diferente significativamente das demais. Na fermentação de hidrolisado de mucilagem de café por células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio, Orrego et al. (2018), utilizando 50 g.L^{-1} de ART inicial, obtiveram $Y_{P/S}$ igual a $0,33 \pm 0,01 \text{ g.g}^{-1}$ e $0,94 \pm 0,07 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ para fator de conversão e produtividade, respectivamente, valores similares aos observados neste trabalho.

Os polímeros utilizados para imobilização de células podem dificultar a transferência de massa dos açúcares e do etanol entre o meio e as células, e vice versa, criando microambientes. Esse comportamento limita a atividade metabólica da levedura e diminui a produção do produto de interesse e o $Y_{P/S}$, quando comparados aos sistemas com células livres (NORDMEIER; CHIDAMBARAM, 2018). A concentração utilizada dos polímeros para imobilização de células também influencia no consumo de açúcares como observado por Lee et al. (2011), que estudou a imobilização de *S. cerevisiae* em alginato de cálcio em concentrações de 2 e 2,5 %. Ercan et al. (2013) avaliaram a imobilização de *S. cerevisiae* também em alginato de cálcio nas concentrações de 2, 2,5 e 3 %. Ambos os autores relataram

que os melhores resultados foram obtidos quando foi empregada a concentração de 2 % de alginato, a mesma concentração utilizada neste trabalho. Neste sentido, o método de imobilização em superfície (adsorção ou ligação covalente ao suporte) se apresenta como uma alternativa à imobilização com alginato de cálcio (método de envolvimento/encapsulamento) para produção de E2G por *S. passalidarum*.

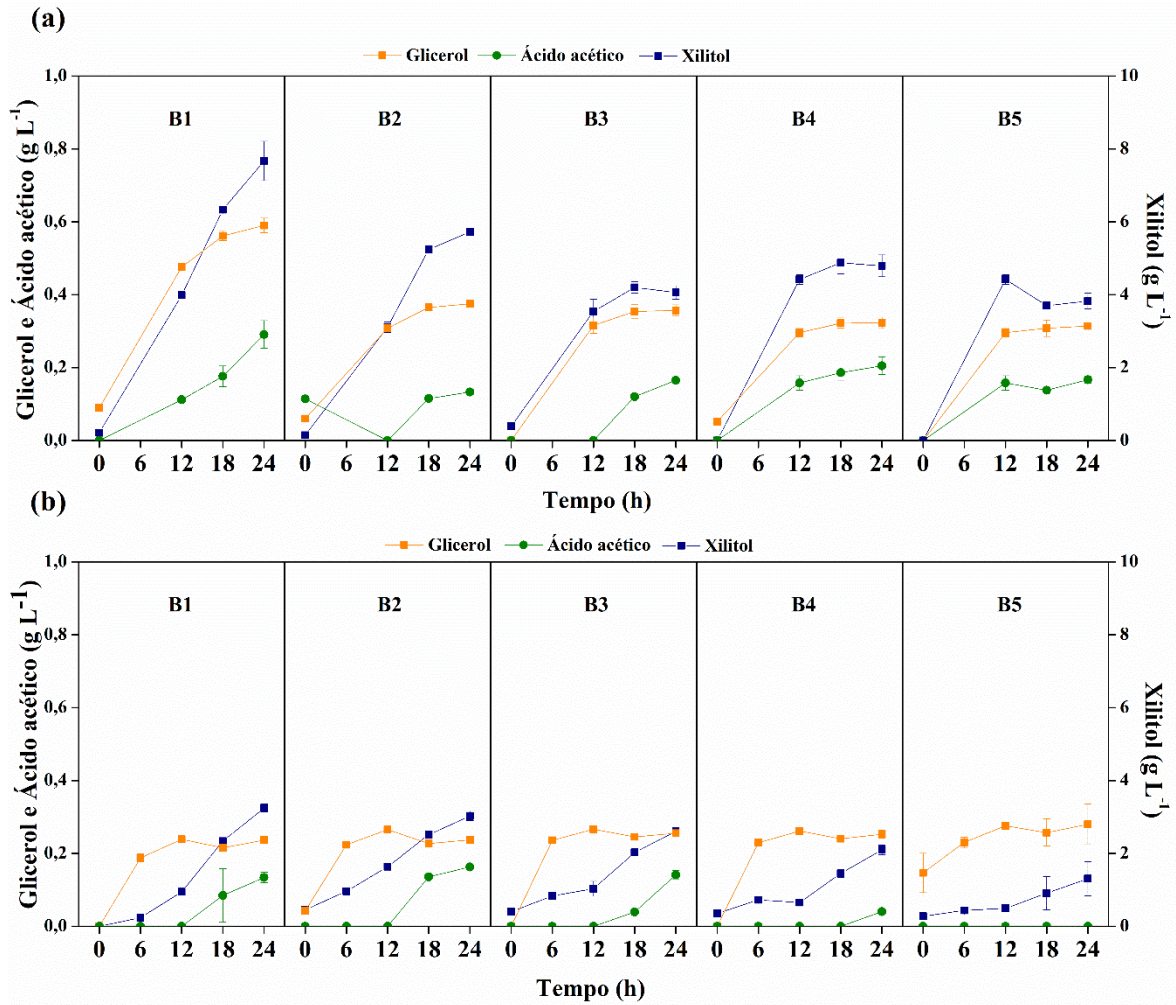
Gajula et al. (2011) utilizaram células de *S. stipitis* imobilizadas em talos de sorgo para produção de bioetanol a partir de hidrolisado de casca de amendoim. Quando comparados os ensaios com células livres e imobilizadas, os melhores resultados para $Y_{P/S}$, Q_p e título de etanol foram obtidos para as células imobilizadas, sendo $0,47 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, $0,243 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e $20,45 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Além disso, Gajula et al. (2011) não observaram variação significativa nos valores dos parâmetros até a quinta batelada, na qual as células foram reutilizadas. Singh et al. (2013), ao compararem o desempenho de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio e bagaço de cana-de-açúcar observou resultados melhores, em relação a $Y_{P/S}$ ($0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), Q_p ($0,42 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e título de etanol ($15,4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) – para a imobilização em bagaço. O bagaço permitiu a utilização das células por até dez ciclos, sem grande perda nos parâmetros, enquanto as esferas de alginato puderam ser recicladas por até quatro.

Embora o tipo de suporte seja capaz de influenciar no comportamento da levedura, vale ressaltar que os ensaios foram realizados em um meio considerado ideal para o metabolismo do microrganismo, um meio com açúcares sintéticos e sem a presença de compostos inibidores, como furfural, hidroximetilfurfural, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, diferente do que aconteceria se o HH obtido a partir de pré-tratamento com H_2SO_4 diluído fosse utilizado como meio de fermentação, já que esses compostos estão presente e quantidades consideráveis. Mesmo em um ambiente ideal e considerando as dificuldade de transferência de massa ocasionadas pelo suporte de alginato de cálcio, o desempenho das células imobilizadas, embora não tenham sido superiores ao das células livres, ainda apresentaram bom desempenho. A superioridade dos parâmetros da células imobilizadas, quando comparados aos das células livres, pode se tornar mais evidente em um ambiente menos ideal, sendo assim, seria de extrema importância realizar a fermentação em HH para avaliação.

A produção de xilitol para as fermentações com células livres (Figura 20) foi observada atingindo valor máximo na B1 ($7,67 \pm 0,54 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). A produção desse co-produto decresceu conforme a reutilização das células na bateladas subsequentes (Figura 20a). Esse mesmo comportamento foi observado para as fermentações com células imobilizadas, porém

atingindo concentrações de xilitol ainda menores, sendo o valor máximo na B1 ($3,24 \pm 0,11$ g.L⁻¹).

Figura 20 – Concentração de xilitol, glicerol e ácido acético ao longo do tempo de fermentação em batelada sucessivas usando (a) células livres e (b) células imobilizadas, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas

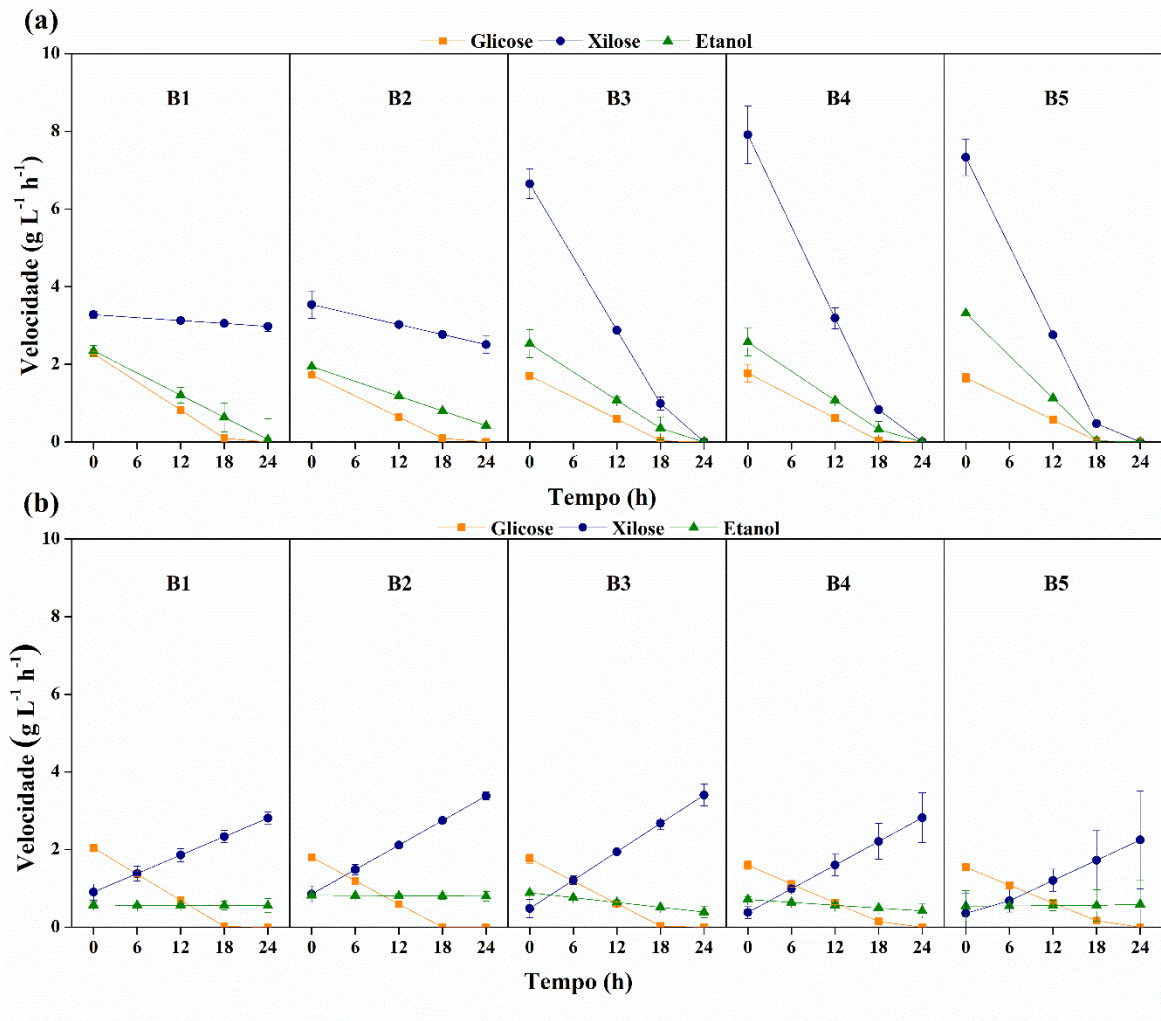


Além de etanol e xilitol, outros subprodutos são obtidos no processo fermentativo. A concentração tanto de glicerol quanto ácido acético (Figura 20) obtidas foram baixas para ambas as condições estudadas. A concentração final de glicerol obtida nas fermentações com células imobilizadas foi aproximadamente constante para as bateladas, variando de $0,24 \pm 0,01$ a $0,28 \pm 0,05$ g.L⁻¹. A concentração de ácido acético para as fermentações com células livres alcançou seu valor máximo na B1 ($0,29 \pm 0,04$ g.L⁻¹). O glicerol é um dos subprodutos produzidos na metabolização de glicose e xilose por *S. passalidarum* e é muito importante para obtenção de diversos produtos na indústria de cosméticos, fármacos, alimentos, entre outras.

As leveduras produzem glicerol a partir da redução de fosfato de dihidroxiacetona para glicerol-3-fosfato com auxílio da enzima glicerol-3-fosfatase (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021). A produção de glicerol associada a produção de etanol foi baixa, quando comparado aos trabalhos da literatura (CADETE et al., 2012; NAKANISHI et al., 2017). Nakanishi et al. (2017) também observaram produção de glicerol mais elevada no primeiro ciclo e diminuição da concentração nos demais ciclos, entretanto, diferente deste trabalho, as concentrações chegaram a zero. Cadete et al. (2012) na fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar obtiveram concentrações máximas de glicerol de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,6 g.L⁻¹ para as cepas de *S. passalidarum* estudadas (UFMG-HMD-1.1; UFMG-HMD-14.1; UFMG-XMD-16.2 e UFMG-XDM-23.2).

As velocidades de consumo de substrato e formação de produto para ambas as condições estudadas estão apresentadas na Figura 21. É possível notar que a velocidade de consumo de glicose diminuiu com o tempo para ambas as condições estudadas. A velocidade de consumo da xilose apresentou marcada variação para as fermentações utilizando células livres. Na B1 a velocidade de consumo de xilose iniciou em $2,27 \pm 0,09$ g.L⁻¹.h⁻¹, finalizando as 24 h em $2,98 \pm 0,13$ g.L⁻¹.h⁻¹. A partir da B3, em 0 h a velocidade de consumo de xilose foi de cerca de $6,65 \pm 0,38$ g.L⁻¹.h⁻¹, chegando a zero no tempo 24 h. A velocidade de produção de etanol também iniciou as primeiras bateladas com valores mais baixos que as demais, sendo $2,38 \pm 0,13$ e $1,94 \pm 0,034$ g.L⁻¹ na B1 e na B2, respectivamente. Na B5 a velocidade chegou a $3,13 \pm 0,00$ g.L⁻¹, respectivamente. Sabe-se que o acúmulo de etanol no meio de cultivo contribuiu para inibição do metabolismo da levedura o que prejudica a conversão de açúcar a etanol e conseqüentemente, diminuiu as velocidades de consumo e produção (SCHMIDELL et al., 2001). As velocidades de consumo de glicose não apresentaram grandes diferenças entre as bateladas ou entre os ensaios.

Figura 21 – Velocidades de consumo de xilose e glicose e de formação de etanol ao longo do tempo de fermentação, sendo (a) células livres e (b) células imobilizadas e B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas

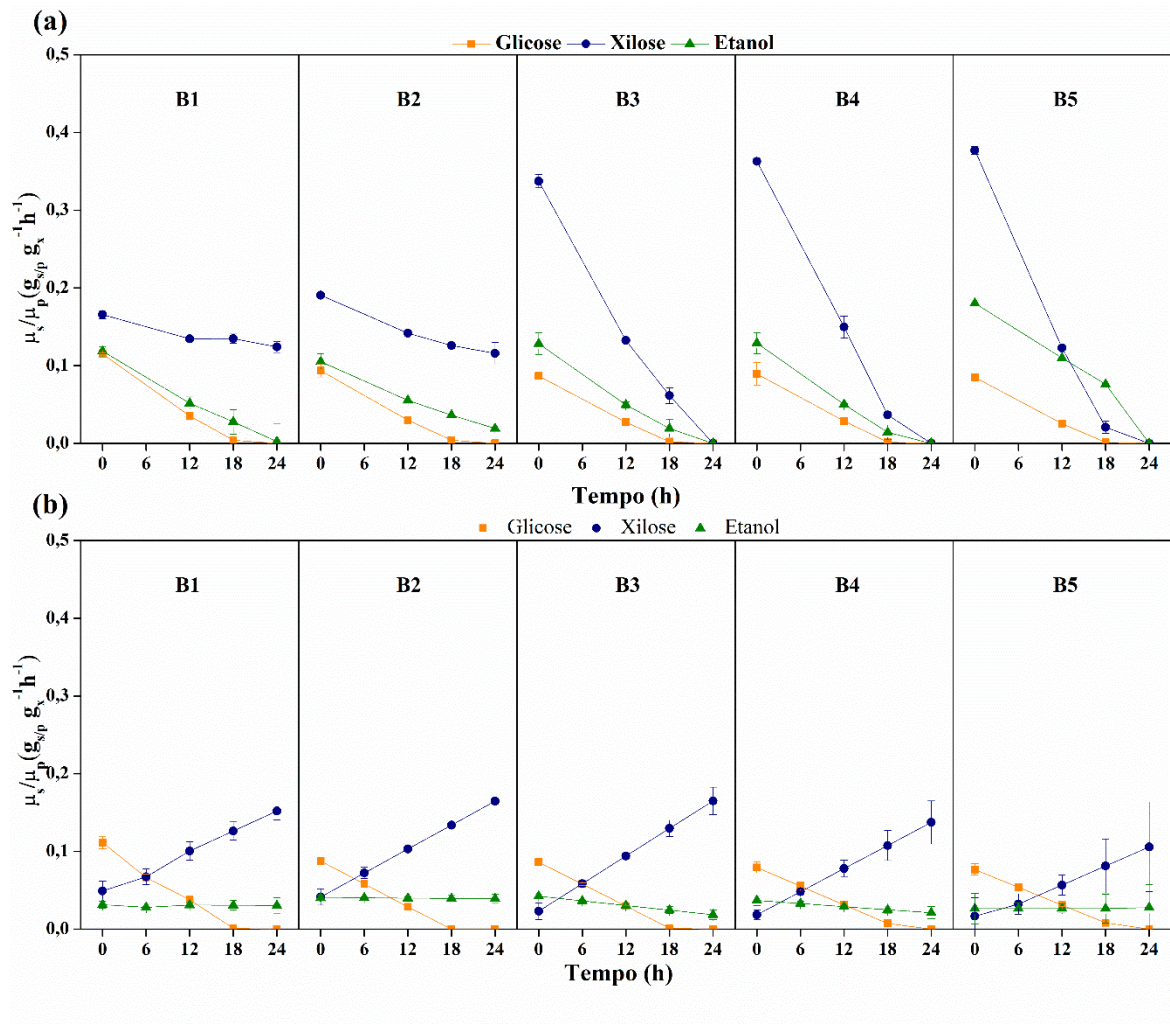


As velocidades específicas de consumo de substrato e formação de etanol estão apresentadas na Figura 22. Comportamentos semelhantes às velocidades discutidas foram observadas quando comparados os parâmetros de cada ensaio individualmente. Para células livres o comportamento, decrescente em relação ao tempo e crescente em relação às bateladas e os valores máximos obtidos para taxa específica de consumo de xilose, de glicose e de produção de etanol foram, $0,37 \pm 0,05$, $0,11 \pm 0,01$ e $0,18 \pm 0,01$ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente. O comportamento decrescente em relação ao tempo de fermentação também foi observado por Neitzel et al. (2020). Entretanto, os valores máximos obtidos para taxa específica de consumo de xilose, de glicose e de produção de etanol foram, aproximadamente, 0,16, 0,90 e 0,11 $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, respectivamente.

Em relação às células imobilizadas, são poucos os artigos que discutem as velocidades específicas já que a quantificação das células contidas no suporte de imobilização é extremamente

difícil. Entretanto, neste trabalho foi desenvolvida uma técnica para quantificação – descrita no tópico 3.5.1 – da concentração de células no interior das esferas de alginato de cálcio utilizando espectrofotometria. Com isso, é possível observar o comportamento de μ_{xilose} , μ_{glicose} e μ_{etanol} (Figura 22b).

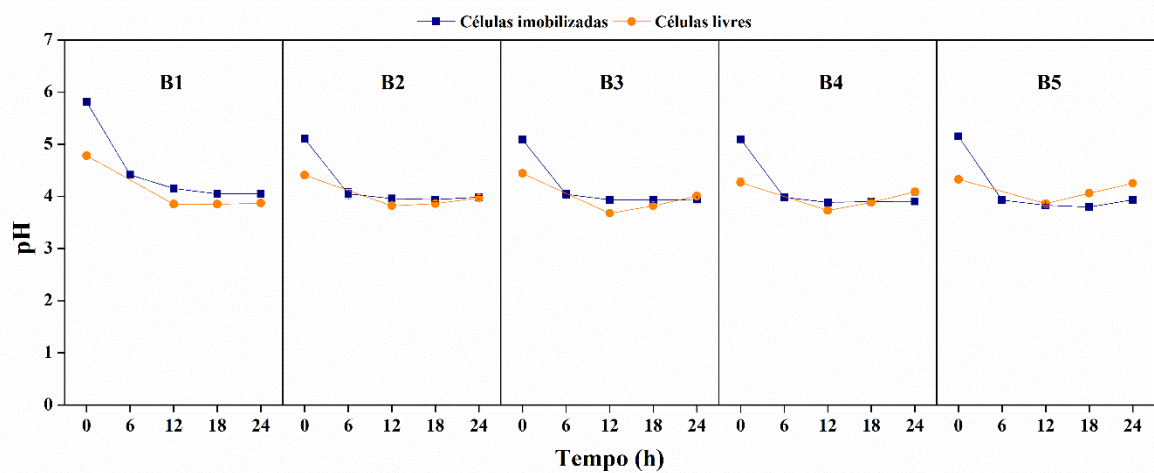
Figura 22 – Velocidades específicas de consumo de açúcares e formação de produto ao longo do tempo de fermentação com (a) células livres e (b) células imobilizadas, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



Em relação aos valores de pH, nos ensaios com células livres é possível notar a constância do comportamento do pH nas cinco bateladas, apresentadas na Figura 23. Em todas o maior pH foi obtido no ponto inicial, seguido de queda significativa nas primeiras 12 h e constância ou leve aumento nas horas seguintes. O valor máximo de pH entre as 5 bateladas foi na B1 com $4,78 \pm 0,03$ no tempo inicial, chegando a $3,87 \pm 0,01$ em 24 h. O comportamento decrescente de pH também foi observado nos ensaios com células imobilizadas, sendo o maior

pH também na B1. Diferente do ensaio com células livres, neste, o pH iniciou-se em $5,81 \pm 0,06$ no tempo 0 h, decaindo até $4,04 \pm 0,02$ no decorrer das 24 h. Conforme citado anteriormente, fermentações alcoólicas geralmente ocorrem com pHs na faixa de 4,5 – 5,0. A diminuição do pH durante o processo ocorre devido a produção de ácidos, como ácido acético, e também etanol que alteram as características iniciais do meio de fermentação (MARTINEZ-JIMENEZ et al., 2021).

Figura 23 – pH ao longo do tempo de fermentação de cada batelada com células livres e células imobilizadas, sendo B1, B2, B3, B4 e B5 as respectivas bateladas



A diferença dos valores de pH iniciais da B1 do ensaio com células livres e com células imobilizadas pode ser explicada pela presença do alginato de cálcio, que apresenta caráter básico, componente das esferas utilizadas como suporte para imobilização das células de *S. passalidarum*. É possível que a presença de Ca^{2+} no início da fermentação tenha ocasionado a diferença inicial dos pHs. López-Menchero et al. (2021) analisaram o efeito do recobrimento de um sistema de células de fungo e levedura na fermentação de meio com elevada concentração de açúcar (25 % glicose) e mosto de uva (220 g.L^{-1} de AR). Para tal, os autores comparam o desempenho do sistema recoberto com o sistema sem recobrimento, com células imobilizadas em alginato de cálcio e com células livres. Os resultados mostraram que dos ensaios, o único que apresentou diferença na acidez foi o utilizando as esferas de alginato de cálcio e justificaram que as esferas, por serem compostas de 10 vezes mais alginato cálcio quando comparado as células apenas recobertas – 2 e 0,2 %, respectivamente –, ocasionam o acúmulo de Ca^{2+} no meio de fermentação. Do ponto de vista da fermentação de HH, quanto mais baixo o pH do

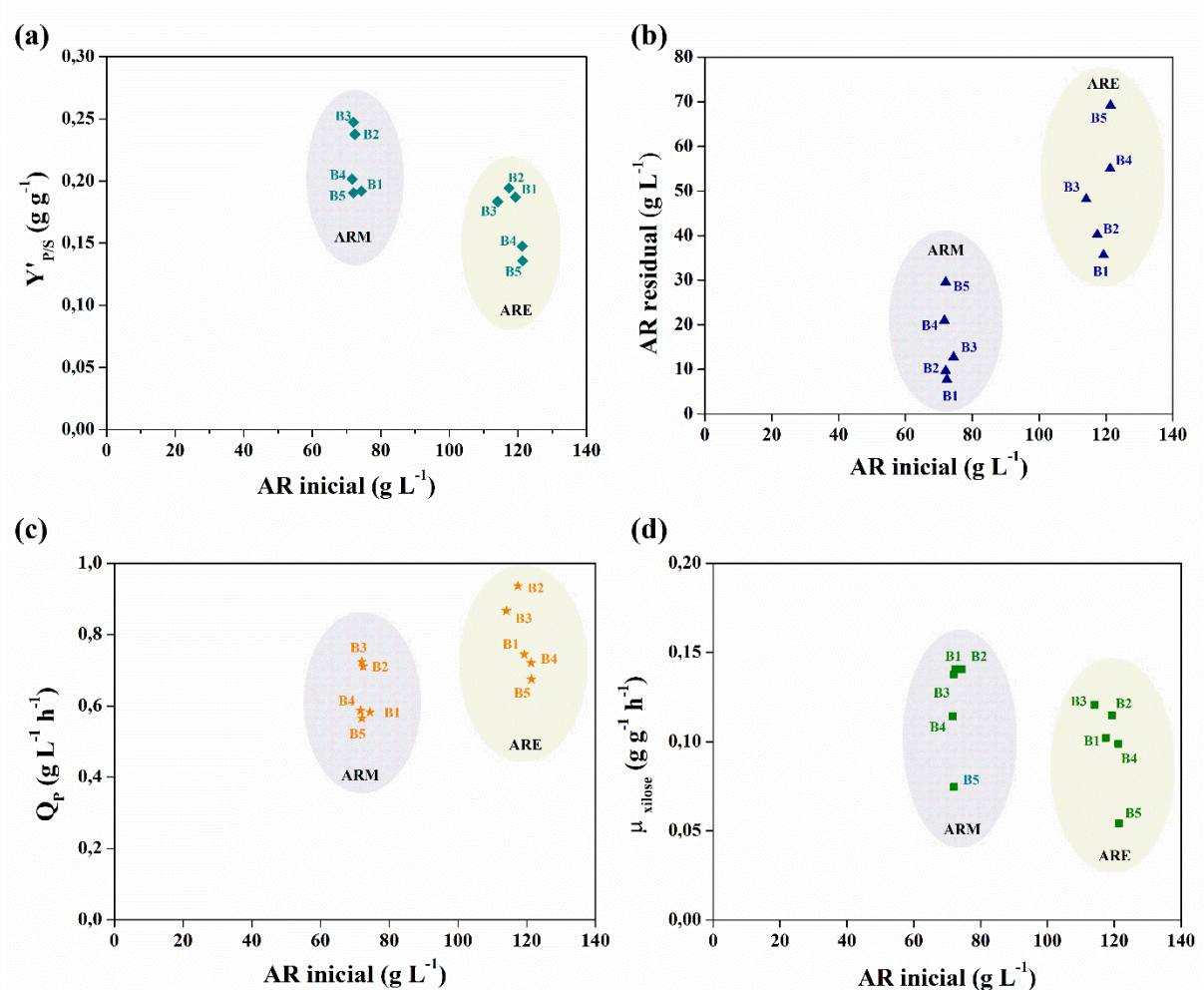
meio, mais nocivos se tornam os inibidores, assim a faixa de pH um pouco mais elevada no ensaio com células imobilizadas seria uma vantagem.

4.3 COMPARAÇÃO DOS ENSAIOS COM CÉLULAS IMOBILIZADAS EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCAR INICIAL

A comparação entre os dois ensaios com células imobilizadas (com concentração de açúcar elevada (ARE) e moderada (ARM)) foi realizada a partir da análise da influência da concentração de substrato inicial no fator de conversão modificado de substrato em produto $Y'_{P/S}$ (Figura 24a), AR residual (Figura 24b), Q_p (Figura 24c) e μ_{xilose} – na qual foram considerados os valores máximos de μ_{xilose} para cada uma das bateladas – (Figura 24d). O valor de $Y'_{P/S}$ não apresentou diferença significativa entre B1 e B5, como mostra a Tabela 9, quando comparados os dois ensaios, entretanto, para B2, B3 e B4, todos os valores alcançados foram mais elevados para ARM. Comportamento similar foi observado por LIU et al. (2009) que utilizou células imobilizadas de *S. cerevisiae* e avaliou o comportamento de $Y_{P/S}$ com diferentes concentrações de melão (90 a 200 g.L⁻¹) em um reator de leito fluidizado com fermentação contínua. Embora o parâmetro não seja calculado exatamente da mesma forma como no presente trabalho, a mesma tendência foi observada: diminuição de $Y_{P/S}$ com o aumento da concentração inicial de açúcar. Singh et al. (2013) na avaliação do alginato de cálcio como suporte de imobilização para levedura *S. cerevisiae* para a produção de E2G, também observaram diminuição nos valores dos parâmetros – $Y_{P/S}$, Q_p , título de etanol e conversão de açúcares em etanol – com o passar das bateladas, sendo possível a reutilização das células por até quatro ciclos. O $Y_{P/S}$ alcançou 0,42 g.g⁻¹ na B1 e apenas 0,33 g.g⁻¹ na B2.

Para Q_p (Figura 24c) todos os valores foram iguais ou estatisticamente superiores para ARE, quando comparadas as suas bateladas com as de ARM. Os maiores títulos de etanol foram observados (Figura 12 e 18b) para os ensaios que resultaram em maior Q_p . Nikolic et al. (2010) avaliaram a influência da concentração inicial de glicose na fermentação (98, 125, 150 e 176 g.L⁻¹), utilizando células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio e observaram que a maior concentração de bioetanol (9 % m/m) foi alcançada na maior concentração inicial de AR utilizando sistema com células livres. Em ambos os ensaios (ARM e ARE) os valores de Q_p diminuíram quando comparadas as bateladas iniciais e finais. O mesmo comportamento – diminuição da Q_p com aumento do ciclo das células imobilizadas – foi observado por Singh et al. (2013) na utilização de células de *S. cerevisiae* imobilizadas em alginato de cálcio para a produção de E2G, na qual foi obtido 0,33 g.L⁻¹.h⁻¹ na B1 e 0,27 g.L⁻¹.h⁻¹ na B4.

Figura 24 – Influência da concentração inicial de açúcares redutores (AR) no (a) fator de conversão modificado ($Y'_{P/S}$), (b) na concentração de AR residual, (c) na produtividade (Q_p) e (d) na velocidade de consumo de xilose máxima da batelada (μ_{xilose})



Em relação à concentração de AR residual (Figura 24b) em ambos os ensaios houve aumento desta concentração ao longo das bateladas, sendo os valores obtidos na B5 aproximadamente o dobro da B1. Maiores valores de AR residual foram obtidos para o ensaio com ARE, em que para todas as bateladas, os valores foram no mínimo 2,34 vezes maiores quando comparado aos valores de ARM. A maior razão entre valores foi obtida em B2 na qual a concentração de AR residual de ARE foi 5,18 vezes do que a de ARM. É provável que a maior concentração de AR residual no ensaio com ARE pode ser explicada pela inibição por substrato, que diminuiu o consumo de xilose presente no meio de fermentação, o que também contribuiu nos valores de μ_{xilose} . Os valores de μ_{xilose} máxima (Figura 24d) foram estatisticamente iguais ou superiores, quando comparadas as bateladas, para o ensaio com ARM (Tabela 9). É possível que para o ensaio com ARE mais xilose se difundiu para o interior das esferas do que as células

que estavam lá foram capazes de metabolizar, gerando certa inibição por substrato, ocasionando então a diminuição da μ_{xilose} . ARM levou a maiores velocidades específicas de consumo de xilose durante o tempo de fermentação.

Tabela 9 – Parâmetros cinéticos dos ensaio com células imobilizadas com concentração moderada (ARM) e concentração elevada de açúcares (ARE)

ARM					
Parâmetros/bateladas	1	2	3	4	5
AR residual (g.L ⁻¹)	12,76 ± 1,66 ^{Ac}	7,75 ± 1,85 ^{Ac}	9,68 ± 3,32 ^{Ac}	20,98 ± 2,42 ^{Ab}	29,54 ± 1,77 ^{Aa}
Y _{P/S} (g.g ⁻¹)**	0,18 ± 0,02 ^{Ab}	0,27 ± 0,02 ^{Aa}	0,21 ± 0,01 ^{Aab}	0,18 ± 0,01 ^{Ab}	0,18 ± 0,06 ^{Ab}
Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)**	0,55 ± 0,06 ^{Bb}	0,81 ± 0,04 ^{Ba}	0,64 ± 0,06 ^{Aab}	0,55 ± 0,06 ^{Bb}	0,55 ± 0,19 ^{Aab}
μ_{xilose} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)**	0,14 ± 0,01 ^{Aa}	0,14 ± 0,01 ^{Aa}	0,14 ± 0,01 ^{Aa}	0,11 ± 0,02 ^{Aab}	0,07 ± 0,04 ^{Ab}
ARE					
Parâmetros/bateladas	1	2	3	4	5
AR residual (g.L ⁻¹)	35,69 ± 0,96 ^{Bd}	40,19 ± 2,78 ^{Bcd}	48,15 ± 3,33 ^{Bbc}	55,04 ± 0,88 ^{Bb}	69,22 ± 8,61 ^{Ba}
Y _{P/S} (g.g ⁻¹)**	0,18 ± 0,02 ^{Aa}	0,19 ± 0,03 ^{Ba}	0,16 ± 0,02 ^{Bab}	0,13 ± 0,01 ^{Bb}	0,13 ± 0,02 ^{Ab}
Q _P (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)**	0,92 ± 0,03 ^{Aab}	0,93 ± 0,04 ^{Aa}	0,76 ± 0,10 ^{Abc}	0,67 ± 0,03 ^{Ac}	0,65 ± 0,07 ^{Ac}
μ_{xilose} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)**	0,11 ± 0,01 ^{Ba}	0,10 ± 0,02 ^{Ba}	0,12 ± 0,01 ^{Aa}	0,10 ± 0,01 ^{Aa}	0,05 ± 0,02 ^{Ab}

* Letras maiúsculas diferentes para o mesmo parâmetro na coluna diferenciam estatisticamente os ensaios com células livres e células imobilizadas.

Letras minúsculas diferentes na linha diferenciam estatisticamente as bateladas de um mesmo ensaio.

A diferenciação estatística foi realizada através do teste de Tukey (p < 0,05).

** Y_{P/S} é o fator de conversão de substrato em produto, Q_P a produtividade volumétrica e μ_{xilose} é a velocidade de consumo de xilose

É de comum conhecimento que diversos metabólitos podem ter ação inibitória, dependendo da sua concentração no meio (SCHMIDELL et al., 2001), incluindo as fontes de carbono utilizadas. Quando o substrato se torna inibitório, ele acaba dificultando a produção de produto e existe a tendência da diminuição da sua velocidade de consumo. Para seu ensaio com células imobilizadas de *S. cerevisiae*, Nikolic et al. (2010) avaliaram as concentrações de AR inicial de 150, 176 e 200 g.L⁻¹ e foi observada diminuição do título de etanol a obtido na concentração de 200 g.L⁻¹, ocasionado pela inibição de substrato. Ozmihci e Kargi (2007) avaliaram o efeito da concentração de substrato (variando ente 52 e 312 g.L⁻¹) na produção de bioetanol a partir de pó de soro de queijo utilizando células livres de *K. marxianus* e observaram diminuição da velocidade de consumo de açúcar em concentrações acima de 75 g.L⁻¹ devido a inibição de substrato.

As limitações encontradas para a produção de etanol nos ensaios com células imobilizadas estão provavelmente ligadas também à velocidade de transferência de substrato e produto entre meio e interior e superfície do suporte e vice versa, e à capacidade de

metabolização de açúcar pela levedura. É possível perceber que a velocidade de produção de etanol varia pouco com o tempo (vide Figuras 15 e 22b), o que possivelmente mostra que o substrato apresentou uma capacidade constante de se difundir para o interior dos suportes e entrar em contato com as células. Uma alternativa para tentar melhorar os parâmetros não dependentes do tempo é o aumento do tempo de duração da fermentação, já que foi observado AR residual em ambos os ensaios, sendo em maior concentração no ensaio ARE. Outra alternativa seria a fermentação em regime de batelada alimentada como proposto por Nikolic et al. (2010) e Ozmihci e Kargi (2007), ou ainda em leiteo fluidizado contínuo.

Com os resultados obtidos é possível verificar que ARM permitiu o melhor desempenho da levedura *S. passalidarum* imobilizada na metabolização da xilose e, conseqüentemente, na produção de etanol.

4.4 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS ESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO

As Figuras 25 e 26 apresentam a morfologia da parte externa e interna das esferas de alginato de cálcio utilizadas nos ensaios com células imobilizadas com concentração de açúcar moderada (Figura 25) e elevada (Figura 26) obtidas a partir da análise de MEV, respectivamente. Para a produção das esferas, foi utilizada uma concentração de 2 % de alginato de cálcio baseado em Ercan et al. (2013). De acordo com estes autores, a concentração de 2 %, mais baixa por eles estudada, apresentou melhor equilíbrio entre porosidade e força.

O controle, nos ensaios ARM e ARE correspondem à esfera de alginato de cálcio contendo as células de *S. passalidarum*, não utilizadas em nenhuma batelada. Em ambos os controles (Figura 25d, Figura 26d) nota-se uma camada de gel na superfície da esfera que une as células de levedura, formando uma estrutura densa e com poucos poros, assim como observado por Malik et al. (2021). O corte interno referente aos controles (Figura 25g, Figura 26g) mostra que a imobilização de células foi bem-sucedida no suporte, sendo possível observar as células envolvidas por ele ao longo da esfera.

Após três bateladas (Figura 25e, Figura 26e) sucessivas e após cinco bateladas (Figura 25f e Figura 26f) foi possível observar o aumento da porosidade do material em ambas as condições estudadas. É plausível afirmar que visivelmente ARE não influenciou um comportamento diferente no desgaste das esferas, já que visivelmente em ambos os casos ocorreu o aumento de porosidade de forma semelhante. O desgaste das esferas pode explicar o aumento da concentração de células livres no meio de fermentação, mostrado na Figura 21, já que as células, que são naturalmente capazes de transitar entre os poros do suporte (MALIK et

al., 2021), com o aumento da porosidade, têm mais caminhos para seguirem para fora do material. Entretanto, a quantidade de células no interior das esferas (Figuras 25h,i e Figuras 26h,i) não apresentou grande diferença visual.

A ocorrência do desgaste e aumento da porosidade observados talvez possa ser explicada pela evolução de CO_2 durante o processo. Quanto maior a produção de etanol, consequentemente, maior é a produção de CO_2 pelo metabolismo celular e este precisa ser eliminado, assim a passagem pelo suporte pode ter contribuído para aumento da porosidade. Aparentemente, o aumento da porosidade não facilitou a transferência de massa já que não foi observada interferência direta entre o aumento de porosidade e o padrão de consumo de açúcares e produção de etanol. Quando comparados os dois ensaios (ARM e ARE) não houve variação visível entre o comportamento da porosidade e o aumento da concentração de AR, em ambos os casos o desgaste foi similar com ao longo das bateladas. Além disso, embora seja possível notar o desgaste das esferas quando analisadas as figuras com maior aproximação, o formato das esferas não foi comprometido com a sua utilização nas 5 bateladas quando comparadas ao controle. O tamanho a esfera, que era de aproximadamente 3 mm de diâmetro, permaneceu o mesmo durante todos os experimentos.

Figura 25 – Características morfológicas das esferas de alginato de cálcio, no ensaio ARM antes das bateladas, após 3 bateladas e após 5 bateladas, sendo: (a), (b), (c) a visão total da esfera; (d), (e), (f) a superfície da esfera e (g), (h), (i) o interior da esfera

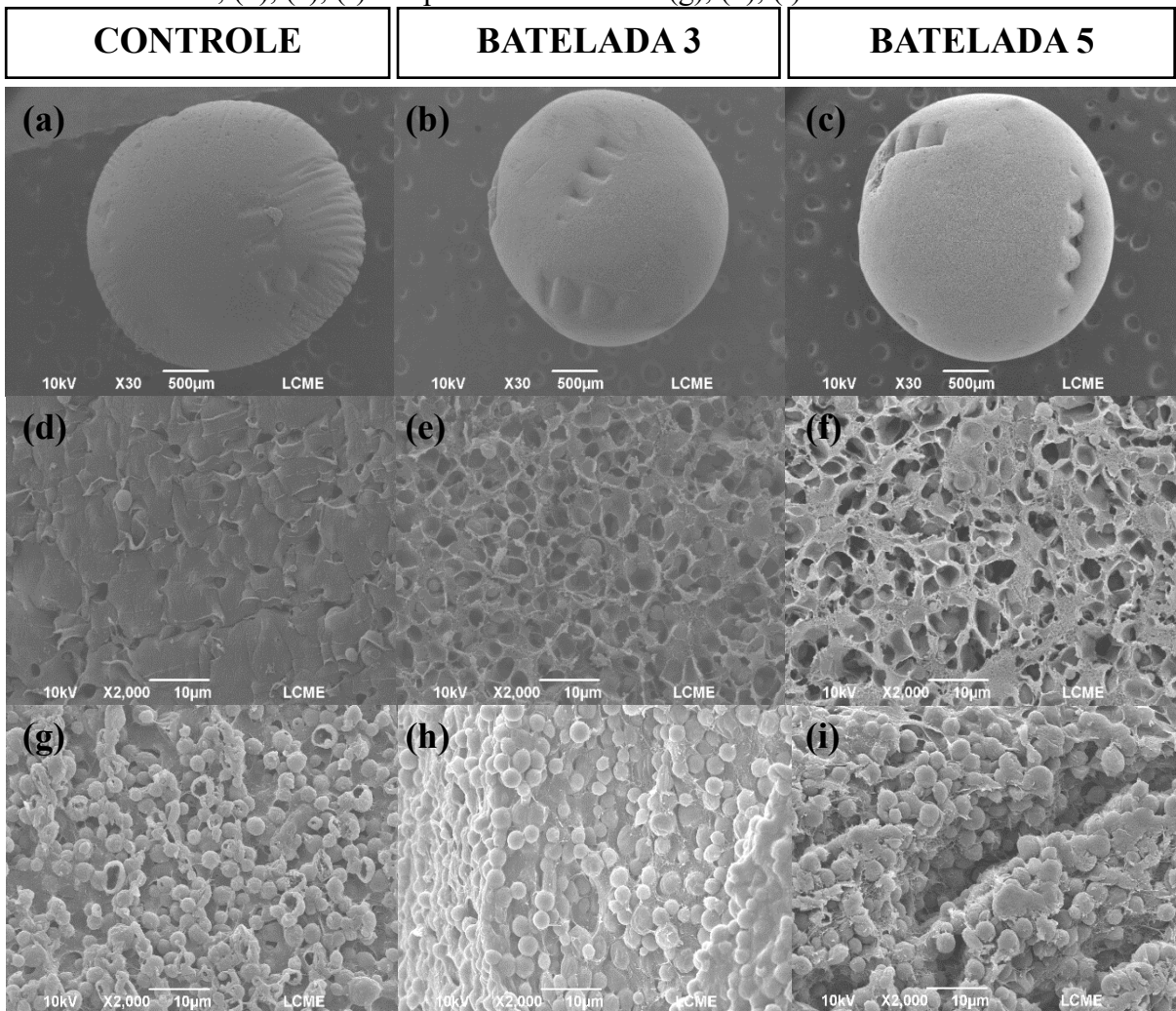
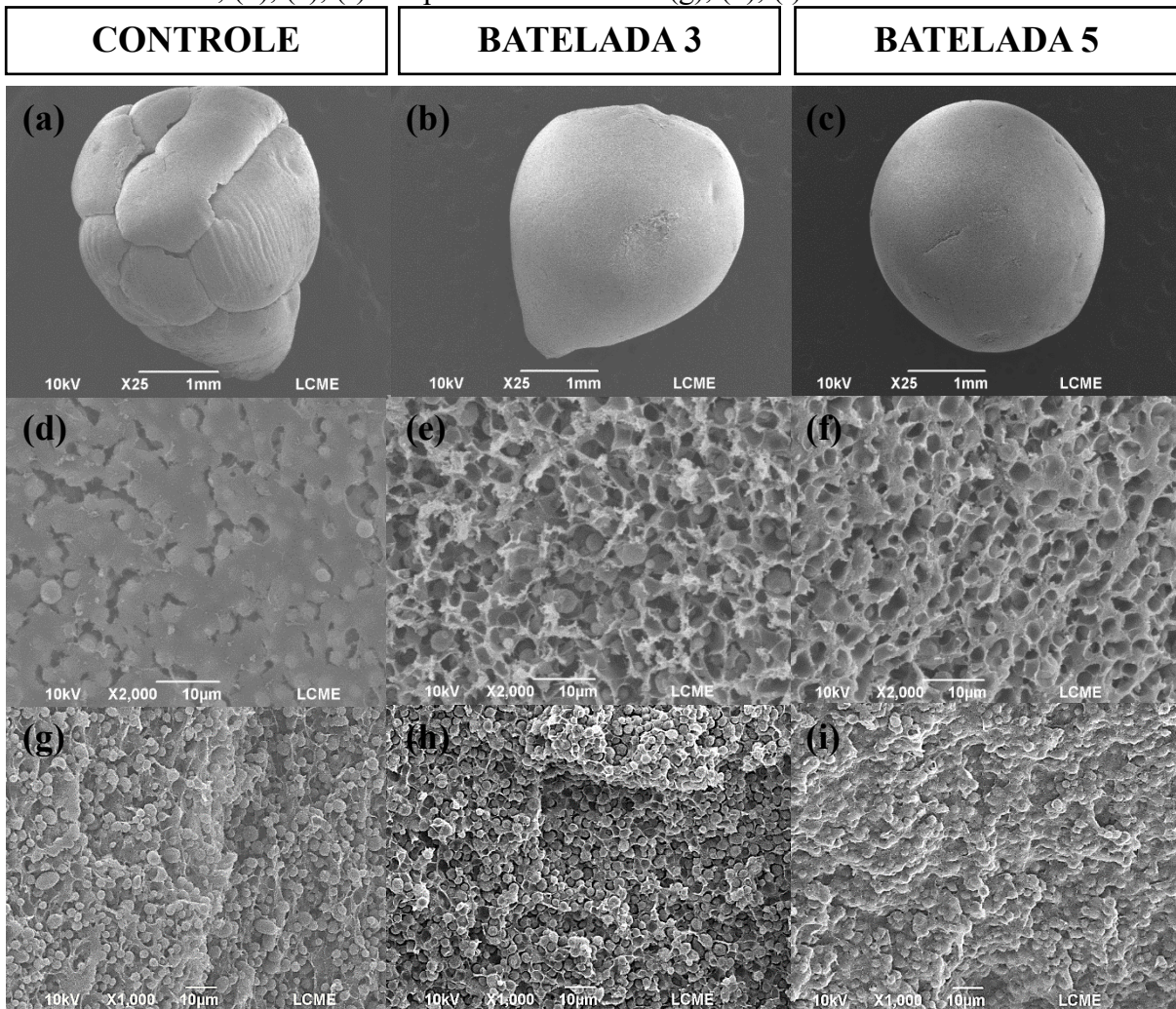


Figura 26 – Características morfológicas das esferas de alginato de cálcio, no ensaio ARE, antes das bateladas, após 3 bateladas e após 5 bateladas, sendo: (a), (b), (c) a visão total da esfera; (d), (e), (f) a superfície da esfera e (g), (h), (i) o interior da esfera



4.5 BALANÇO DE MASSA DOS ENSAIOS COM CONCENTRAÇÃO MODERADA DE AÇÚCAR: CÉLULAS LIVRES X CÉLULAS IMOBILIZADAS

Os balanços de massa foram realizados para os ensaios com células livres (Figura 27) e células imobilizadas (Figura 28) utilizando 1 kg de AR na entrada como base de cálculo. A determinação da quantidade de CO₂ gerado durante o processo, necessária para fechamento dos balanços, foi feita por meio da estequiometria de reação levando em consideração o rendimento obtido para cada fermentação, como descrito na metodologia. Vale ressaltar que não foram encontrados estudos que descrevem o balanço de massa para células imobilizadas. Ambos os ensaios iniciaram com aproximadamente a mesma proporção de glicose e xilose (vide Figura 18). Em todas as bateladas, para ambos os ensaios, a glicose foi completamente consumida e foi observada a formação de etanol como produto principal, além de subprodutos em menor

quantidade, xilitol, ácido acético e glicerol, assim como relatado por Bonan et al. (2021) nos balanços de massa dos ensaios com diferentes proporções de xilose e glicose, utilizando células livres de *S. passalidarum*.

No ensaio com células livres foi possível observar que embora exista xilose residual ao final das bateladas, os valores são baixos, sendo no máximo $0,044 \pm 0,012$ kg. Para células imobilizadas os valores de xilose residual foram mais elevados, alcançando $0,411 \pm 0,033$ kg em B5. A maior produção de etanol foi para as células imobilizadas que, realizando a conversão para litros, a partir da densidade ($0,7915 \text{ kg.L}^{-1}$), obteve na faixa de 0,36 a 0,42 L de etanol a partir de 1 kg de AR. O ensaio com células imobilizadas alcançou a faixa de 0,22 a 0,34 L de etanol nas bateladas. Nakanishi et al. (2017) realizaram o balanço de massa da fermentação utilizando HH e células livres de *S. passalidarum* e obtiveram uma produção de 382,08 L de etanol a partir de 1000 kg de açúcar. Realizando a conversão é possível afirmar que foram obtidos 0,31 L de etanol a partir de 1 kg de açúcares, valor que se encaixa na faixa obtida nos ensaios com células livres. Quando somadas as quantidades de etanol produzidos em todas as cinco bateladas realizadas para cada uma das condições é possível realizar uma comparação global entre os ensaios. As quantidades totais obtidas são de $1,55 \pm 0,08$ kg de etanol para o ensaio com células livres e $1,03 \pm 0,08$ kg de etanol para o ensaio com células imobilizadas.

Figura 27 – Balanço de massa das bateladas do ensaio com células livres, na qual B1, B2, B3, B4 e B5 correspondem às bateladas

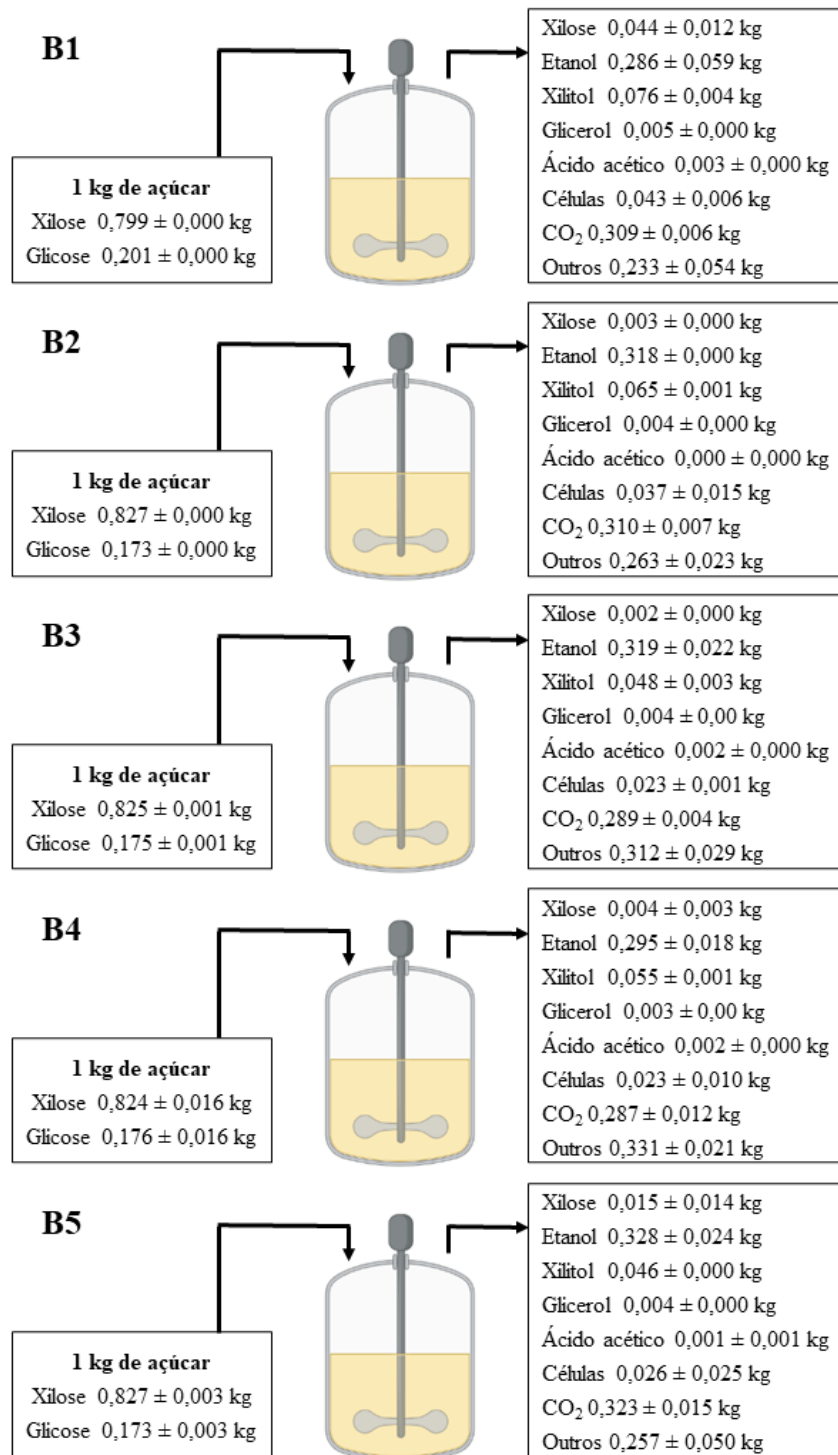
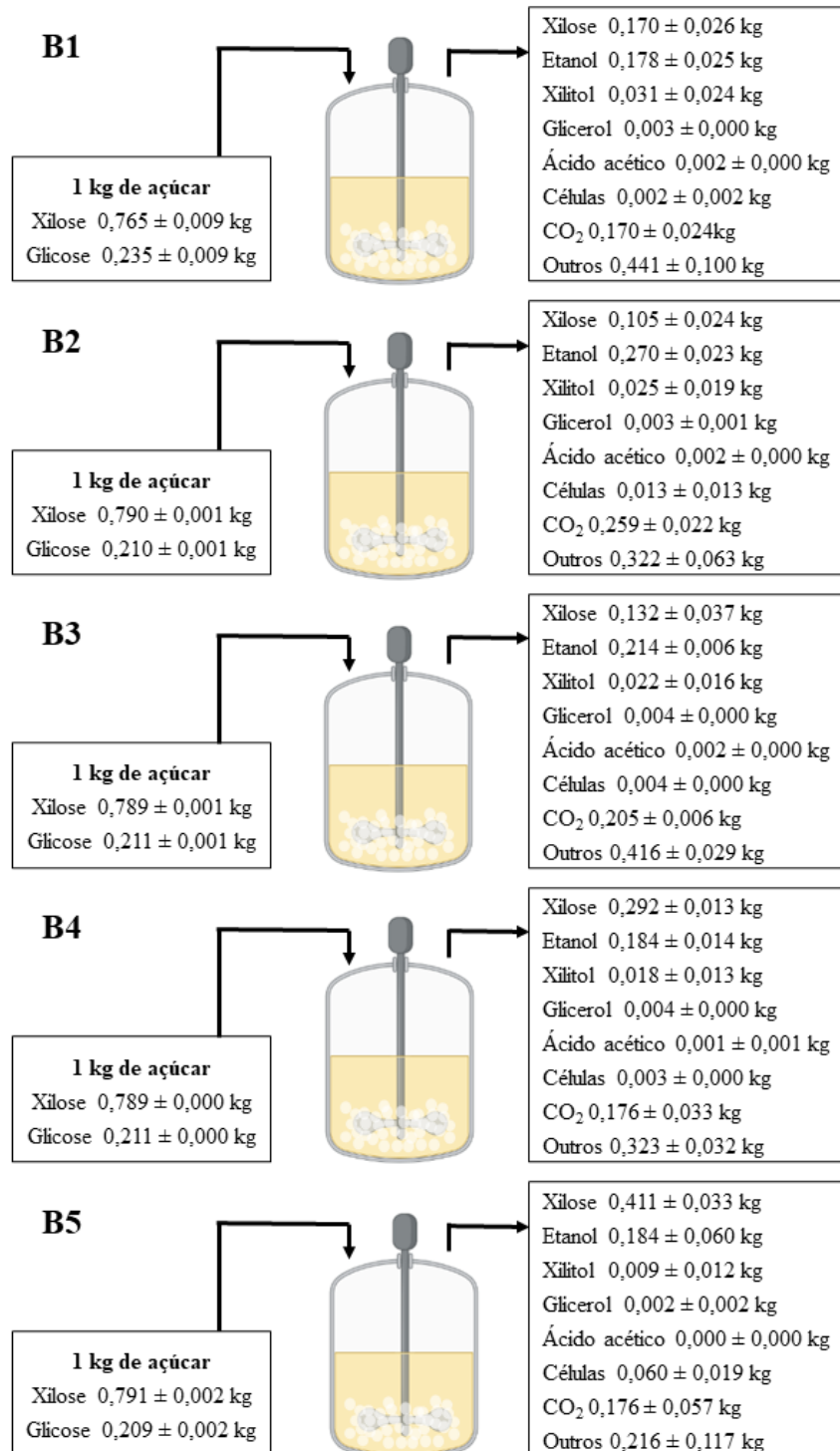


Figura 28 – Balanço de massa das bateladas do ensaio CI70



5 CONCLUSÕES

A levedura *S. passalidarum* foi imobilizada em alginato de cálcio para sua aplicação nas fermentações com concentração de AR elevada e moderada. O método de imobilização por envolvimento em alginato de cálcio apresentou fácil execução, bom custo-benefício e viabilidade para utilização em células da levedura estudada, gerando uma resposta inédita já que não são descritos estudos de imobilização para *S. passalidarum* na literatura.

O ensaio em ARE provou a possibilidade de utilização de células da levedura imobilizadas para obtenção de bioetanol, entretanto a porcentagem de AR consumido foi baixa, alcançando apenas $70,01 \pm 2,10$ % na melhor batelada (B1). Um aumento da concentração de células livres foi observado, demonstrando a perda de células do suporte para o meio de fermentação.

A comparação do sistema de células imobilizadas com o sistema de células livres foi possível para a concentração moderada de AR. O $Y_{P/S}$ foi similar para ambos os ensaios chegando a cerca de 0,30 e 0,33 $g.g^{-1}$ para células imobilizadas e livres, respectivamente. A Q_p foi mais elevada para células livres (1,16 $g.g^{-1}.L^{-1}$) do que para células imobilizadas (0,81 $g.g^{-1}.L^{-1}$). Na comparação foi possível observar que a transferência de massa foi fator determinante para a piora dos parâmetros de fermentação e tornou-se notório a necessidade de um ambiente com oxigênio para a metabolização eficiente da xilose por *S. passalidarum*, sendo essa uma levedura *Crabtree* negativa.

Quando comparados os ensaios com células imobilizadas (ARM e ARE), três dos quatro parâmetros ($Y'_{P/S}$, AR residual, Q_p e μ_{xilose}) analisados apresentaram resultados mais positivos para ARM. O ensaio ARM alcançou valores máximos de $Y'_{P/S}$ de $0,27 \pm 0,02$ $g.g^{-1}$, de μ_{xilose} de $0,14 \pm 0,01$ $g.g^{-1}.h^{-1}$, ambos valores maiores ou iguais aos obtidos em ARE. Para AR residual, ARM alcançou valor máximo de $29,54 \pm 1,77$ $g.L^{-1}$, contra $69,22 \pm 8,61$ $g.L^{-1}$ alcançados em ARE. O único parâmetro na qual os valores foram melhores para ARE foi a Q_p no qual o maior valor foi de $0,93 \pm 0,04$ $g.L^{-1}.h^{-1}$. Assim, a concentração moderada de substrato se mostrou mais promissora para produção de bioetanol por células imobilizadas de *S. passalidarum*, entretanto o sistema ainda não foi tão satisfatório quando comparado ao sistema com células livres.

A análise morfológica das esferas de alginato de cálcio foi possível através de MEV, que possibilitou a visualização das células imobilizadas na sua superfície e em seu interior. O desgaste das esferas ao longo das bateladas foi perceptível e houve aumento da porosidade do suporte. O aumento da concentração de células livres foi observado com o aumento da

porosidade, portanto uma alternativa poderia ser a modificação do suporte de alginato de cálcio com o recobrimento de outra substância ou a troca do suporte por outro que promova a melhora da transferência de massa.

O balanço de massa foi realizado para os ensaios com células livres e imobilizada em concentração moderada de AR. O balanço para células imobilizadas não foi encontrado em estudos da literatura sendo uma inovação deste trabalho. Com os balanços ficou claro o aumento da concentração de açúcares residuais ao final de cada batelada, sendo esta cerca de 10 vezes maior para as células imobilizadas.

A utilização de *S. passalidarum* imobilizada para produção de E2G é promissora, entretanto é necessário estudo mais aprofundado da difusão de massa através das esferas de alginato de cálcio, a fim de garantir a difusão ideal de substrato e O₂ para favorecer o metabolismo da levedura, o que seria o principal problema encontrado. É interessante a busca por novos suportes que garantam as condições de fermentação, principalmente a concentração de O₂, extremamente necessária para o consumo de xilose pela levedura. Outra alternativa para esta questão é a utilização de outras técnicas de imobilização. A imobilização na superfície do suporte, seja por adsorção, ligações covalentes ou ligações eletrostáticas, tem potencial para facilitar a transferência de massa entre as células e o meio enquanto possibilitam o reciclo das mesmas. Um possibilidade de suporte é o bagaço de cana-de-açúcar, na qual a técnica de imobilização utilizada é a adsorção, que facilitaria a transferência de massa, e, além disso ele é a principal matéria-prima do processo de produção de E2G. É extremamente importante compor um sistema para a realização da fermentação que promova a adequada transferência de O₂ e que contorne a questão inibitória do substrato, como um sistema em batelada alimentada ou contínuo em leito fluidizado que permita a utilização de concentrações elevadas de substrato sem inibir a levedura. Também, poder-se-ia testar a regeneração dos suportes ou substituição parcial para melhorar o desempenho da levedura e aumentar a produtividade e evitar a saturação do suporte.

Além das questões já citadas, outra sugestão para trabalhos futuros é a aplicação das esferas de alginato em meio com hidrolisado celulósico, que seria interessante para comparação do comportamento das células (imobilizadas e livres) em um sistema menos ideal, na qual existem inibidores que comprometem o desempenho das células livres. O meio sintético utilizado neste trabalho, não proporciona nenhuma dificuldade de crescimento celular e produção de etanol para as células livres, enquanto o metabolismo das células imobilizadas, quando comparado ao das células imobilizadas, acaba sendo comprometido devido à

dificuldade da transferência de massa imposta pelo suporte. Um meio contendo inibidores promove um ambiente não ideal tanto para células imobilizadas quanto para livres, e nesse caso é possível que o suporte, por mais que ainda limite a transferência de massa, proteja as células do inibidores existentes no hidrolisado hemicelulósico e promova melhores resultados que as células livres.

REFERÊNCIAS

- ABBI, M.; KUHAD, R. C.; SINGH, A. Bioconversion of pentose sugars to ethanol by free and immobilized cells of *Candida shehatae* (NCL-3501): Fermentation behaviour. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 6, p. 555–560, 1996.
- AGBOGBO, F. K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515–1524, 2008.
- BEHERA, S. et al. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Calcium alginate matrices. **Applied Energy**, v. 87, n. 1, p. 96–100, 2010.
- BEHERA, S.; RAY, R. C. Batch ethanol production from cassava (*Manihot esculenta* Crantz.) flour using *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in calcium alginate. p. 779–783, 2015.
- BIAZI, L. E. et al. A differential evolution approach to estimate parameters in a temperature-dependent kinetic model for second generation ethanol production under high cell density with *Spathaspora passalidarum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 161, n. September 2019, p. 107586, 2020.
- BONAN, C. I. D. G. et al. Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited-oxygen conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1509–1519, 2020.
- BONAN, C. I. D. G. et al. Biorefinery Platform for *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in the Production of Ethanol, Xylitol, and Single Cell Protein from Sugarcane Bagasse. **BioEnergy Research**, 2021.
- BUCKERIDGE, M. S.; GRANDIS, A.; TAVARES, E. Q. P. **Disassembling the Glycomic Code of Sugarcane Cell Walls to Improve Second-Generation Bioethanol Production**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.
- CADETE, R. M. et al. Diversity and physiological characterization of D-xylose-fermenting yeasts isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43135, 2012.
- CANILHA, L. et al. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1467–1475, 2011.
- CANILHA, L. et al. Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: An overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification, and ethanol fermentation. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–15, 2012.
- COLLOGRAI, K. C.; DA COSTA, A. C.; IENCZAK, J. L. Effect of contamination with *Lactobacillus fermentum* I2 on ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 12, p. 5039–5050, 2019.

CONAB. País confirma recorde na produção de etanol: 35,6 bilhões de litros na safra 2019/20. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20%0A%0A>>.

DALENA, F. et al. **Ethanol from biomass: Future and perspectives**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

DALENA, F. et al. **From sugars to ethanol-from agricultural wastes to algal sources: An overview**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

ERCAN, Y.; IRFAN, T.; MUSTAFA, K. Optimization of ethanol production from carob pod extract using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells in a stirred tank bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 365–371, 2013.

ESCOBAR, L. M. A.; ÁLVAREZ, U. S.; PEÑUELA, M. Yeast immobilization in lignocellulosic wastes for ethanol production in packed bed bioreactor. **Revista Facultad de Ingeniería**, n. 62, p. 66–76, 2012.

FARIAS, D.; MAUGERI-FILHO, F. Sequential fed batch extractive fermentation for enhanced bioethanol production using recycled *Spathaspora passalidarum* and mixed sugar composition. **Fuel**, v. 288, n. October 2020, p. 119673, 2021.

GAJULA, C. et al. Fermentation of groundnut shell enzymatic hydrolysate for fuel ethanol production by free and sorghum stalks immobilized cells of *Pichia stipitis* NCIM 3498. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 9, p. 1–17, 2011.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933–943, 1994.

HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 205–214, 2012.

KARAGOZ, P.; BILL, R. M.; OZKAN, M. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, v. 143, p. 741–752, 2019.

KLEMM, D. et al. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358–3393, 2005.

KOURKOUTAS, Y. et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 377–397, 2004.

KUHAD, R. C. et al. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 9, p. 4950–4962, 2011.

LEE, K. H. et al. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 17, p. 8191–8198, 2011.

LIMA, C. S. et al. Effect of the Sugarcane Bagasse Deacetylation in the Pentoses Fermentation Process. **Bioenergy Research**, 2021.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449–467, 2012.

LIU, C.-G. et al. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 491–504, 2019.

LIU, C. Z.; WANG, F.; OU-YANG, F. Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in magnetic particles. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 878–882, 2009.

LONG, T. M. 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.

LÓPEZ-MENCHERO, J. R. et al. Effect of calcium alginate coating on the cell retention and fermentation of a fungus-yeast immobilization system. **Lwt**, v. 144, n. March, 2021.

LORENZI, B. R.; DE ANDRADE, T. H. N. Second generation ethanol in Brazil: Policies and socio-technical networks. **Revista Brasileira de Ciências Sociais**, v. 34, n. 100, 2019.

MALIK, K. et al. Co-fermentation of immobilized yeasts boosted bioethanol production from pretreated cotton stalk lignocellulosic biomass: Long-term investigation. **Industrial Crops and Products**, v. 159, n. October 2020, p. 113122, 2021.

MARTINEZ-JIMENEZ, F. D. et al. Exploiting the Non-conventional Yeast *Spathaspora passalidarum* as a Platform for Hemicellulosic Hydrolysate Conversion into Bioproducts: a Mini Review. **Bioenergy Research**, 2021.

MILESSI, T. S. et al. Repeated batches as a strategy for high 2G ethanol production from undetoxified hemicellulose hydrolysate using immobilized cells of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in a fixed-bed reactor. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2020a.

MILESSI, T. S. et al. Continuous 2G ethanol production from xylose in a fixed-bed reactor by native *Saccharomyces cerevisiae* strain through simultaneous isomerization and fermentation. **Cellulose**, v. 27, n. 8, p. 4429–4442, 2020b.

MILESSI, T. S. S. et al. Hemicellulosic ethanol production by immobilized cells of *Scheffersomyces stipitis*: Effect of cell concentration and stirring. **Bioengineered Bugs**, v. 6, n. 1, p. 26–32, 2015.

MISHRA, A. et al. Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor. **Renewable Energy**, v. 98, p. 57–63, 2016.

MOHANTY, S. K.; SWAIN, M. R. **Bioethanol Production From Corn and Wheat: Food, Fuel, and Future**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

NAGHSHBANDI, M. P. et al. Progress toward improving ethanol production through decreased glycerol generation in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic and genetic

engineering approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 115, n. March, p. 109353, 2019.

NAJAFPOUR, G. D. **Immobilization of Microbial Cells for the Production of Organic Acid and Ethanol**. [s.l: s.n.].

NAKANISHI, S. C. 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.

NDUBUISI, I. A. et al. Effects of various inhibitory substances and immobilization on ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2020.

NEDOVIC, V.; WILLAERT, R. **Fundamentals of Cell Immobilization Biothechnology**. [s.l: s.n.].

NEITZEL, T. et al. Impact of the Melle-Boinot process on the enhancement of second-generation ethanol production by *Spathaspora passalidarum*. **Renewable Energy**, v. 160, p. 1206–1216, 2020.

NGUYEN, N. H. et al. 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, 1 out. 2006.

NIKOLIĆ, S. et al. Production of bioethanol from corn meal hydrolyzates by free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 10, p. 1449–1456, 2010.

NORDMEIER, A.; CHIDAMBARAM, D. Use of *Zymomonas mobilis* immobilized in doped calcium alginate threads for ethanol production. **Energy**, v. 165, p. 603–609, 2018.

ORREGO, D.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; KIM, D. Ethanol production from coffee mucilage fermentation by *S. cerevisiae* immobilized in calcium-alginate beads. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, n. July, p. 200–204, 2018a.

ORREGO, D.; ZAPATA-ZAPATA, A. D.; KIM, D. Ethanol production from coffee mucilage fermentation by *S. cerevisiae* immobilized in calcium-alginate beads. **Bioresource Technology Reports**, v. 3, n. August, p. 200–204, 2018b.

OZMIHCI, S.; KARGI, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 2978–2984, 2007.

PEREIRA, I. O. **APROVEITAMENTO DA XILOSE PRESENTE NA FRAÇÃO HEMICELULÓSICA DO BAGAÇO DE CANA DE AÇÚCAR PARA ESTABELECEER UMA ESTRATÉGIA DE PRODUÇÃO DE ETANOL**. [s.l: s.n.].

PETTIGNANO, A. et al. Alginate: A Versatile Biopolymer for Functional Advanced Materials for Catalysis. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 178, p. 357–375, 2019.

PHILLIPS, COLIN R.; POON, Y. C. **Immobilization of Cells**. [s.l.: s.n.]. v. 5

PORTUGAL-NUNES, D. et al. Effect of cell immobilization and PH on *Scheffersomyces stipitis* growth and fermentation capacity in rich and inhibitory media. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 2, n. 1, p. 1–9, 2015.

PU, Y.; HALLAC, B.; RAGAUSKAS, A. J. Plant Biomass Characterization: Application of Solution- and Solid-State NMR Spectroscopy. **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**, p. 369–390, 2013.

PULIGUNDLA, P. et al. Repeated batch ethanolic fermentation of very high gravity medium by immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 863–869, 2011.

RILEY, R. et al. Comparative genomics of biotechnologically important yeasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 35, p. 9882–9887, 2016.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 1, p. 663–670, 2011.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y. A.; ORREGO, C. E. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 787–806, 2020.

SANTOS, F. et al. **Production of second-generation ethanol from sugarcane**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019a.

SANTOS, F. et al. **By-products of the sugarcane industry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019b.

SANTOS, F. A. et al. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 1004–1010, 2012.

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.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blucher LTDA, 2001. v. 2

SENATORE, A. et al. **First-generation feedstock for bioenergy production**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

SINGH, A. et al. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. **Renewable Energy**, v. 50, p. 488–493, 2013.

SOARES, L. B. et al. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. **Biomass and Bioenergy**, v. 137, n. February, p. 105549, 2020.

SU, Y.; WILLIS, L. B.; JEFFRIES, T. W. Effects of Aeration on Growth , Ethanol and Polyol

Accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. v. 112, n. 3, p. 457–469, 2015.

ZABED, H. et al. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 751–774, 2016.

ZHU, Y. Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels. **Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources**, p. 373–396, 2007.

ANEXOS

ANEXO 1 – CURVA-PADRÃO DE *S. passalidarum*

Figura A1 – Curva-padrão

