



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

LUIZ EDUARDO BIAZI

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO POR LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS AVALIADAS ATRAVÉS
DE MODELAGEM MATEMÁTICA**

**CAMPINAS, SP - BRASIL
2020**

LUIZ EDUARDO BIAZI

**ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA
GERAÇÃO POR LEVEDURAS NÃO-CONVENCIONAIS AVALIADAS ATRAVÉS
DE MODELAGEM MATEMÁTICA**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Jaciane Lutz Ienczak

Este trabalho corresponde à versão final da Tese de Doutorado defendida pelo aluno Luiz Eduardo Biazi e orientada pela Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa.

Campinas, SP - Brasil
2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

B47e Biazi, Luiz Eduardo, 1988-
Estratégias para otimização da produção de etanol de segunda geração por leveduras não-convencionais avaliadas através de modelagem matemática / Luiz Eduardo Biazi. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Aline Carvalho da Costa.
Coorientador: Jaciane Lutz Ienczak.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Etanol. 2. Xilose. 3. Fermentação. 4. Modelagem matemática. I. Costa, Aline Carvalho da, 1970-. II. Ienczak, Jaciane Lutz. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Strategies to optimize the production of second generation bioethanol by non-conventional yeasts evaluated through mathematical modeling

Palavras-chave em inglês:

Ethanol

Xylose

Fermentation

Mathematical modeling

Área de concentração: Engenharia Química

Titulação: Doutor em Engenharia Química

Banca examinadora:

Aline Carvalho da Costa [Orientador]

Rubens Maciel Filho

Anderson de Souza Sant'Ana

Cíntia Regina Sargo

Betânia Hoss Lunelli

Data de defesa: 14-02-2020

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8041-0848>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/8541427357124599>

Folha de Aprovação da Tese de Doutorado defendida por Luiz Eduardo Biazi em 14 de fevereiro de 2020, pela Comissão Examinadora constituída pelos Doutores:

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho da Costa
FEQ/UNICAMP
Presidente

Prof. Dr. Rubens Maciel Filho
FEQ/UNICAMP
Membro titular

Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana
FEA/UNICAMP
Membro titular

Dr^a. Cíntia Regina Sargo
Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR)
Membro titular

Dr^a. Betânia Hoss Lunelli
PUC Campinas
Membro titular

A Ata de Defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

*“Importante não é ver o que ninguém nunca viu,
mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou
sobre algo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me iluminar ao longo de toda a minha trajetória, não só nos anos de doutorado, mas em todos os anos da minha vida que me permitiram chegar onde estou hoje, permitindo-me finalizar mais essa importante conquista. Agradeço por me dar forças para nunca desistir e sempre me guiar para o caminho de luz em meio a tantas dúvidas.

Agradeço à minha família, em especial meus pais, por todo o amor e suporte prestado em minha vida, contornando todas as dificuldades financeiras para me proporcionar uma boa educação desde os primeiros anos de escola, sem a qual eu não conseguiria estar onde estou hoje. Obrigado por sempre acreditarem, aceitarem e confiarem nas minhas escolhas.

Também agradeço a minhas orientadoras, Aline Carvalho da Costa e Jaciane Lutz lenczak, por terem proporcionado um ambiente equilibrado ao longo dos anos de doutorado, com cobrança, mas acima de tudo muito respeito. Muito obrigado por toda orientação, compartilhamento de conhecimento e confiança depositada em mim, sempre acreditando no meu potencial e buscando extrair o melhor de mim.

Agradeço à minha noiva, Carolina Bonan, por toda a ajuda nesses anos de experimentos, fermentações, relatórios, artigos, angústias, dúvidas, ansiedades... Muito obrigado por todo o seu amor, sua paciência, por me tranquilizar nos momentos mais difíceis, por viver e participar comigo em mais essa conquista.

A todos meus amigos e colegas de laboratório que me ajudaram, e muito, na realização das minhas pesquisas, em especial Lauren, Suzane, Thiago, Fernan, Samantha, Du, Sarita, Simone, Neto, além dos demais amigos que tive o prazer de conhecer e trocar experiências no Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR).

À Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP, ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e ao Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), por disponibilizarem uma excelente estrutura para o desenvolvimento do meu projeto.

Também agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2016/14567-0 e 2017/21634-9, pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.

Muito obrigado!

RESUMO

O bagaço de cana-de-açúcar é um subproduto do processo de produção de etanol (1G) e é um substrato lignocelulósico promissor para a produção de bioetanol de segunda geração (2G). Como as hemiceluloses representam cerca de 30 % do peso seco do bagaço, a quantidade de açúcares gerados após a hidrólise deste material representa uma porção substancial para a produção de bioetanol de segunda geração. A hidrólise de hemiceluloses resulta em uma mistura de xilose, glicose e outros monossacarídeos. Sendo assim, a transformação de pentoses em bioetanol torna-se um dos desafios mais importantes a serem resolvidos no âmbito científico e tecnológico, considerando a produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica. Nesse contexto, o uso de microrganismos naturalmente capazes de fermentar pentoses se torna interessante, como as leveduras *Scheffersomyces stipitis* e *Spathaspora passalidarum*. Considerando o processo de fermentação, a temperatura é um parâmetro operacional que exerce papel fundamental na reação, com influência na produtividade de etanol, no consumo de substratos, no crescimento celular e até na viabilidade dos microrganismos. A estimação de parâmetros dependentes da temperatura é uma das principais estratégias para compreensão cinética e melhoramento de processos. Nesse contexto, foi desenvolvido um modelo matemático não-estruturado para a produção de etanol de segunda geração descrevendo o consumo de xilose e glicose, o crescimento celular e a produção de etanol em função da temperatura, a partir de fermentações em batelada realizadas sob alta densidade celular. Para a levedura *S. passalidarum*, o modelo proposto descreveu satisfatoriamente o sistema de fermentação investigado na faixa de 26 a 32 °C, com um coeficiente de correlação superior a 0,95 na condição de validação do modelo. Através da simulação do modelo, foi possível concluir que as maiores produtividades de etanol podem ser alcançadas em temperaturas entre 30 e 32 °C. Além disso, foi realizada a modelagem de diferentes estratégias para aumentar o desempenho fermentativo das leveduras não convencionais utilizadas neste estudo, com o objetivo de confirmar o potencial para serem utilizadas em escala industrial. Após ser submetida a cinco fermentações sequenciais em batelada alimentada com reciclo de células a 30 °C utilizando substrato sintético, a levedura *S. passalidarum* apresentou melhorias significativas em seus parâmetros de fermentação, atingindo um rendimento em etanol de 91 % no último ciclo de fermentação, com uma produtividade de 1,79 g/L.h. Através do desenvolvimento de um modelo matemático para representar as fermentações realizadas, foi possível compreender o efeito dos reciclos celulares na evolução dos parâmetros cinéticos. Finalmente, foi proposta uma estratégia de adaptação através de fermentações sequenciais com concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico utilizando a levedura *S. stipitis*. Modelos matemáticos foram aplicados para compreender a influência da estratégia empregada nos parâmetros cinéticos, concluindo-se que o maior impacto se deu nos parâmetros relacionados à inibição por ácido acético. Ao comparar a linhagem adaptada com a não-adaptada, a estratégia de adaptação proposta foi validada, considerando o melhor desempenho da levedura adaptada em concentrações crescentes de ácido acético.

Palavras-chave: Bioetanol de segunda geração; Fermentação de xilose; Alta densidade celular; Reciclo de células; Modelagem matemática.

ABSTRACT

Sugarcane bagasse is a byproduct obtained from ethanol production process (1G) and it is a promising lignocellulosic substrate for second-generation bioethanol (2G). As hemicelluloses represent about 30 % of bagasse dry weight, the amount of sugars generated after hydrolysis of this material represents a substantial portion for the second-generation bioethanol production. The hydrolysis of hemicelluloses results in a mixture of xylose, glucose and other monosaccharides. Thus, the transformation of pentoses in bioethanol becomes one of the most important challenges to be solved on scientific and technologic scope considering the production of bioethanol from lignocellulosic biomasses. In this context, yeasts that are naturally capable of fermenting pentoses are desired, like *Scheffersomyces stipitis* and *Spathaspora passalidarum*. Considering the fermentation process, temperature is an operational variable that plays a key role on the reaction, with influence on ethanol productivity, substrate consumption, cell growth and even on microorganism viability. Estimation of temperature-dependent parameters is one of the key strategies for kinetic comprehension and process improvement. In this context, an unstructured mathematic model for second-generation ethanol production was developed to describe xylose and glucose consumption, cell growth and ethanol production for both yeasts in function of temperature, when batch fermentations were performed under high cell density strategy. For the yeast *S. passalidarum*, the proposed model satisfactorily described the fermentation system investigated in the range between 26 and 32 °C, with a correlation coefficient higher than 0.95 for the model validation. Through model simulation, it was possible to conclude that the highest ethanol productivities can be achieved at temperatures from 30 to 32 °C. In addition, different strategies were evaluated to increase the fermentative performance of the non-conventional yeasts used in this study, with the aim to confirm their potential to be used in industrial-scale processes. After being submitted to five sequential fed-batch fermentations with cell recycle at 30 °C using a synthetic medium, the yeast *S. passalidarum* had significant improvements on its fermentation parameters, reaching an ethanol yield of 91 % at the last fermentation cycle, with a productivity of 1.79 g/L.h, besides increases on specific rates of sugar consumption and ethanol production. Through the application of a mathematical model describing the fed-batch fermentations performed, it was possible to comprehend the effect of the cell recycles on the evolution of the kinetic parameters. Finally, a strategy of adaptation was proposed through successive fermentations with increasing concentrations of a hemicellulosic hydrolysate for the yeast *S. stipitis*, with the aim to increase the tolerance of the microorganism to the inhibitory compounds present on the hydrolysates. Mathematical models were applied to elucidate the influence of the employed strategy on kinetic parameters, concluding that the greater impact was on parameters related to inhibition by acetic acid. By comparing the adapted and the non-adapted strains, the adaptation strategy was validated, considering the better performance of the adapted strain in increasing concentrations of acetic acid.

Keywords: Second generation bioethanol; Xylose fermentation; High cell density; Cell recycle; Mathematical modeling.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1.1 Composição da parede celular de biomassas lignocelulósicas (amarelo: hemiceluloses; verde: celulose; marrom: lignina)..... | 30 |
| Figura 1.2 Desconstrução da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina). | 33 |
| Figura 1.3 Vias simplificadas de conversão de xilose em etanol encontradas em procariontes e eucariontes. (a) Conversão por xilose isomerase (XI); (b) Conversão por xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR/XDH), com especificidade da XR por NADPH; (c) Conversão por xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR/XDH), com especificidade da XR por NADPH e NADH..... | 36 |
| Figura 1.4 Diferentes tipos de classificações para representações matemáticas de populações de células..... | 49 |
| Figura 2.1 Concentrações de biomassa celular, glicose, xilose e etanol observadas experimentalmente nas temperaturas estudadas para <i>S. passalidarum</i> (a) 26; (b) 27; (c) 28; (d) 30; (e) 32 °C; e para <i>S. stipitis</i> (f) 27; (g) 28; (h) 30; (i) 32 °C. | 66 |
| Figura 2.2 Velocidades específicas máximas de crescimento celular e de produção de etanol como função da equação de Arrhenius para xilose e glicose..... | 75 |
| Figura 2.3 Observações experimentais e valores previstos pelo modelo para as concentrações de biomassa celular, glicose, xilose e etanol nas temperaturas estudadas para <i>S. passalidarum</i> (a) 26 °C; (b) 27 °C; (c) 28 °C (validação); (d) 30 °C; e (e) 32 °C..... | 78 |
| Figura 2.4 RMSE para as temperaturas usadas na calibração e validação do modelo para <i>S. passalidarum</i> | 80 |
| Figura 2.5 Projeção 3D obtida através da simulação do modelo proposto, mostrando a formação de etanol em função do tempo e da temperatura. As condições iniciais foram: glicose, 30 g/L; xilose, 70 g/L; e célula, 20 g/L..... | 81 |
| Figura 3.1 Configuração da fermentação <i>Melle-Boinot</i> aplicada no presente estudo. | 85 |
| Figura 3.2 Concentrações de glicose, xilose, etanol, xilitol e células ao longo do tempo para as fermentações em batelada alimentada com reciclo de células para: (A) Temperatura fixa de 30 °C; (B) Decréscimo de temperatura de 30 a 26 °C..... | 90 |
| Figura 3.3 Valores de rendimento e produtividade volumétrica de etanol para todos os ciclos nas duas condições de temperatura investigadas - (A) Temperatura fixa de 30 °C; (B) Decréscimo de temperatura de 30 a 26 °C..... | 93 |
| Figura 3.4 Perfis para biomassa celular, etanol, glicose residual e xilose residual em g para o primeiro ciclo de fermentação a 30 °C (condição A)..... | 99 |

| | |
|--|-----|
| Figura 3.5 Perfis de concentração de células, etanol e substrato (açúcares redutores – glicose + xilose) obtidos a partir do modelo em comparação aos dados experimentais. O círculo vermelho indica o tempo em que a alimentação foi interrompida. | 104 |
| Figura 4.1 Concentrações de açúcares redutores, etanol e biomassa celular ao longo do tempo para fermentações em CRBF com: (A) 33 % e (B) 67 % de hidrolisado no substrato..... | 123 |
| Figura 4.2 Produtividade volumétrica de etanol e rendimento em etanol para os cinco ciclos de fermentação em batelada a 33 e 67 % de hidrolisado..... | 126 |
| Figura 4.3 Evolução dos parâmetros $nn_{X,GLU}$, $nn_{X,Xyl}$, $nn_{P,GLU}$, $nn_{P,Xyl}$ (referentes ao estresse por ácido acético) e $m_{X,GLU}$, e $m_{X,GLU}$ (referentes ao uso da fonte de carbono para manutenção celular), para os cinco ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado. | 131 |
| Figura 4.4 Comparação entre os perfis de concentração de células, etanol, glicose e xilose obtidos através do modelo e os dados experimentais para os cinco ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado. | 132 |
| Figura 4.5 Fermentações consecutivas com decréscimo de temperatura utilizando substrato sintético para a levedura <i>S. stipitis</i> | 134 |
| Figura 4.6 Concentrações de glicose, xilose, etanol e biomassa celular ao longo do tempo para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. | 135 |
| Figura 4.7 Concentração de ácido acético ao longo do tempo para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. | 137 |
| Figura 4.8 Evolução dos parâmetros Y_{PX} e Y_{PS} para as fermentações realizadas em substrato sintético para levedura <i>S. passalidarum</i> (Capítulo 3) e a fermentação com 100 % de hidrolisado realizada no presente estudo com <i>S. stipitis</i> (para as fases de batelada alimentada e batelada). | 140 |
| Figura 4.9 Perfis de concentração de células, açúcares redutores e etanol obtidos a partir do modelo e os dados experimentais para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado..... | 141 |
| Figura 4.10 Concentrações finais de glicose, xilose e etanol e produtividade volumétrica para as linhagens não-adaptada (A) e adaptada (B) de <i>S. stipitis</i> | 142 |
| Figura 4.11 Diagrama de Venn construído a partir da análise de proteômica apresentada no Anexo II. | 143 |
| Figura A.1 Gráficos de π em função de μ para os cinco ciclos de fermentação em batelada alimentada com <i>S. passalidarum</i> (Capítulo 3). | 171 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1 Composição química da biomassa de diferentes resíduos agrícolas..... | 31 |
| Tabela 1.2 Composição de diferentes hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar a partir de tratamento com ácido sulfúrico..... | 34 |
| Tabela 1.3 Resultados de velocidade específica de consumo de xilose (σ_{xyi}), velocidade específica de produção de etanol (π) e fator de conversão de xilose em etanol ($Y_{P/Xyl}$) obtidos por diferentes estudos com linhagens modificadas de <i>S. cerevisiae</i> | 40 |
| Tabela 1.4 Resultados obtidos por diferentes estudos com a levedura <i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124..... | 42 |
| Tabela 1.5 Resultados obtidos por diferentes estudos com a levedura <i>S. passalidarum</i> NRRL Y-27907..... | 45 |
| Tabela 1.6 Modelos cinéticos não-estruturados para fermentações com substratos simples e substratos mistos..... | 54 |
| Tabela 2.1 Composição dos meios de fermentação para produção de etanol a partir de xilose e glicose por <i>S. stipitis</i> e <i>S. passalidarum</i> (baseado em Santos <i>et al.</i> , 2015). | 60 |
| Tabela 2.2 Parâmetros obtidos experimentalmente para as fermentações com <i>S. passalidarum</i> e <i>S. stipitis</i> nas diferentes temperaturas estudadas..... | 67 |
| Tabela 2.3 Comparação do modelo desenvolvido no presente estudo com modelos da literatura..... | 72 |
| Tabela 2.4 Valores obtidos para os parâmetros não-dependentes da temperatura e para as constantes da equação de Arrhenius para os parâmetros dependentes da temperatura para a levedura <i>S. passalidarum</i> | 74 |
| Tabela 2.5 Comparação entre os valores de parâmetros obtidos no presente trabalho com trabalhos da literatura..... | 76 |
| Tabela 2.6 Coeficiente de correlação de Pearson (r^2) para as temperaturas usadas na calibração e validação do modelo para <i>S. passalidarum</i> | 79 |
| Tabela 3.1 Composição média do meio de fermentação para produção de etanol a partir de xilose e glicose por <i>S. passalidarum</i> em batelada alimentada..... | 86 |
| Tabela 3.2 Valores de rendimentos, produtividade volumétrica, consumo de glicose, consumo de xilose, título em etanol e concentrações de xilitol ao final de cada ciclo de fermentação..... | 92 |
| Tabela 3.3 Comparação entre resultados obtidos no presente trabalho e trabalhos da literatura para produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose..... | 96 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 3.4 Valores dos parâmetros do modelo obtidos para os cinco ciclos de fermentação a 30 °C, além dos valores de <i>Sm</i> utilizados. | 102 |
| Tabela 3.5 Valores de RMSE para célula, substrato e etanol para todos os ciclos a 30 °C. | 103 |
| Tabela 4.1 Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e etapa de concentração (evaporação). | 121 |
| Tabela 4.2 Valores de rendimento, produtividade volumétrica, consumo de glicose, consumo de xilose e título de etanol no tempo final de cada ciclo de fermentação para fermentações em batelada com reciclo de células a 33 e 67% de hidrolisado. | 124 |
| Tabela 4.3 Concentrações máximas de ácido acético, furfural e HMF registradas em cada ciclo de fermentação para fermentações em batelada com reciclo de células a 33 e 67% de hidrolisado. | 125 |
| Tabela 4.4 Valores dos parâmetros do modelo para os ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado na composição do substrato. | 129 |
| Tabela 4.5 Valores de RMSE para biomassa celular, glicose, xilose e etanol para todos os ciclos a 33 e 67 % de hidrolisado. | 133 |
| Tabela 4.6 Consumo de glicose, consumo de xilose, título de etanol, rendimento, produtividade volumétrica e $Y_{x/s}$ para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. | 136 |
| Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos estimados para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. | 138 |
| Tabela 4.8 Valores de RMSE para célula, substrato e etanol para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. | 141 |
| Tabela A.1 Comparação entre resultados obtidos no presente trabalho e trabalhos da literatura para produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose. | 172 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------|--|
| D | Taxa de diluição [h^{-1}] |
| F | Vazão de alimentação [L/h] |
| X | Concentração de células [$g_{células}/L$] |
| X_d | Concentração de células mortas [$g_{células}/L$] |
| X_0 | Concentração de células no tempo inicial da fermentação [$g_{células}/L$] |
| X_f | Concentração de células no tempo final da fermentação [$g_{células}/L$] |
| S_{Glu} | Concentração de glicose [$g_{glicose}/L$] |
| S_{Xyl} | Concentração de xilose [g_{xilose}/L] |
| S_{Cel} | Concentração de celobiose [$g_{celobiose}/L$] |
| S | Concentração de açúcares redutores [g_{AR}/L] |
| S_0 | Concentração de açúcares redutores no tempo inicial da fermentação [g_{AR}/L] |
| S_f | Concentração de açúcares redutores no tempo final da fermentação [g_{AR}/L] |
| P | Concentração de etanol [g_{etanol}/L] |
| P_0 | Concentração de etanol no tempo inicial da fermentação [g_{etanol}/L] |
| P_f | Concentração de etanol no tempo final da fermentação [g_{etanol}/L] |
| AC | Concentração de ácido acético [g_{ac}/L] |
| AC_{max} | Concentração de ácido acético na qual o metabolismo é interrompido [g_{ac}/L] |
| nn | Parâmetro relacionado à inibição por ácido acético [—] |
| t | Tempo [h] |
| t_0 | Tempo inicial de fermentação [h] |
| t_f | Tempo final de fermentação [h] |
| r_X | Velocidade de crescimento celular [$g_{células}/L \cdot h$] |
| r_d | Velocidade de morte celular [$g_{células}/L \cdot h$] |
| r_{Glu} | Velocidade de consumo de glicose [$g_{glicose}/L \cdot h$] |
| r_{Xyl} | Velocidade de consumo de xilose [$g_{xilose}/L \cdot h$] |
| r_S | Velocidade de consumo de açúcares redutores [$g_{AR}/L \cdot h$] |
| r_P | Velocidade de produção de etanol [$g_{etanol}/L \cdot h$] |
| K_S | Constante de saturação de substrato na velocidade específica de crescimento celular [g_{AR}/L] |

| | |
|--------------|---|
| $K_{S,Glu}$ | Constante de saturação da glicose na velocidade específica de crescimento celular [$g_{glicose}/L$] |
| $K_{S,Xyl}$ | Constante de saturação da xilose na velocidade específica de crescimento celular [g_{xilose}/L] |
| $K_{S,Cel}$ | Constante de saturação da celobiose na velocidade específica de crescimento celular [$g_{celobiose}/L$] |
| K'_S | Constante de saturação de substrato na velocidade específica de produção de etanol [g_{AR}/L] |
| $K'_{S,Glu}$ | Constante de saturação da glicose na velocidade específica de produção de etanol [$g_{glicose}/L$] |
| $K'_{S,Xyl}$ | Constante de saturação da xilose na velocidade específica de produção de etanol [g_{xilose}/L] |
| K_I | Coeficiente de inibição por substrato na velocidade específica de crescimento celular [g_{AR}/L] |
| X_{max} | Máxima concentração de células quando o crescimento celular é interrompido [$g_{células}/L$] |
| P_{max} | Máxima concentração de produto quando o crescimento celular é interrompido [g_{etanol}/L] |
| K'_I | Coeficiente de inibição por substrato na velocidade específica de produção de etanol [g_{AR}/L] |
| P'_{max} | Termo de inibição de produção de etanol por produto [g_{etanol}/L] |
| n | Parâmetro de repressão por glicose no crescimento celular [-] |
| n' | Parâmetro de repressão por glicose na produção de etanol [-] |
| n'' | Parâmetro de repressão por glicose no consumo de xilose [-] |
| n_p | Número de pontos experimentais [-] |
| R | Coeficiente de repressão por glicose para a velocidade específica de crescimento celular [-] |
| R' | Coeficiente de repressão por glicose para a velocidade específica de produção de etanol [-] |
| R'' | Coeficiente de repressão por glicose para a velocidade específica de consumo de xilose [-] |
| $Y_{P/X}$ | Fator de conversão de células em etanol [$g_{etanol}/g_{células}$] |
| $Y_{P/S}$ | Fator de conversão de açúcares redutores em etanol [g_{etanol}/g_{AR}] |
| $Y_{P/Glu}$ | Fator de conversão de glicose em etanol [$g_{etanol}/g_{glicose}$] |
| $Y_{P/Xyl}$ | Fator de conversão de xilose em etanol [g_{etanol}/g_{xilose}] |
| $Y_{X/S}$ | Fator de conversão de açúcares redutores em células [$g_{células}/g_{AR}$] |
| $Y_{X/Glu}$ | Fator de conversão de glicose em células [$g_{células}/g_{glicose}$] |
| $Y_{X/Xyl}$ | Fator de conversão de xilose em células [$g_{células}/g_{xilose}$] |

| | |
|-------|---|
| m_p | Constante de Luedeking-Piret não associada ao crescimento [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| m_x | Coeficiente de manutenção celular [h^{-1}] |
| Q_p | Produtividade volumétrica de etanol [$g_{etanol}/L \cdot h$] |
| T | Temperatura [$^{\circ}C$] |
| S_m | Concentração de açúcares redutores na corrente de alimentação [g_{AR}/L] |

LISTA DE SÍMBOLOS GREGOS

| | |
|-----------------|---|
| μ | Velocidade específica de crescimento celular [h^{-1}] |
| μ_{Glu} | Velocidade específica de crescimento celular em glicose [h^{-1}] |
| μ_{Xyl} | Velocidade específica de crescimento celular em xilose [h^{-1}] |
| μ_{Cel} | Velocidade específica de crescimento celular em celobiose [h^{-1}] |
| μ_{Mix} | Velocidade específica de crescimento celular em substrato misto [h^{-1}] |
| μ_{max} | Velocidade específica máxima de crescimento celular [h^{-1}] |
| $\mu_{Glu,max}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular em glicose [h^{-1}] |
| $\mu_{Xyl,max}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular em xilose [h^{-1}] |
| $\mu_{Cel,max}$ | Velocidade específica máxima de crescimento celular em celobiose [h^{-1}] |
| π | Velocidade específica de produção de etanol [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| π_{Glu} | Velocidade específica de produção de etanol em glicose [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| π_{Xyl} | Velocidade específica de produção de etanol em xilose [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| π_{Mix} | Velocidade específica de produção de etanol em substrato misto [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| π_{max} | Velocidade específica máxima de produção de etanol [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| $\pi_{Glu,max}$ | Velocidade específica máxima de produção de etanol em glicose [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| $\pi_{Xyl,max}$ | Velocidade específica máxima de produção de etanol em xilose [$g_{etanol}/g_{células} \cdot h$] |
| σ | Velocidade específica de consumo de açúcares redutores [$g_{AR}/g_{células} \cdot h$] |
| σ_{Glu} | Velocidade específica de consumo de glicose [$g_{glicose}/g_{células} \cdot h$] |
| σ_{Xyl} | Velocidade específica de consumo de xilose [$g_{xilose}/g_{células} \cdot h$] |
| α | Parâmetro descrevendo inibição por produto no crescimento celular [–] |
| β | Parâmetro descrevendo inibição por células no crescimento celular [–] |
| α' | Parâmetro descrevendo inibição por produto na produção de etanol [–] |
| η | Rendimento em etanol considerando o substrato consumido [%] |
| η' | Rendimento em etanol considerando o substrato alimentado [%] |

LISTA DE ABREVIACES

| | |
|-----------------------|--|
| <i>k_La</i> | Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida |
| NAD | Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| XI | Xilose-isomerase |
| XR | Xilose-redutase |
| XDH | Xilitol-desidrogenase |
| XK | Xiluloquinase |
| PPP | Via das pentoses-fosfato |
| C5 | Açúcares de cinco carbonos |
| C6 | Açúcares de seis carbonos |
| AR | Açúcares redutores |
| 1G | Primeira gerao |
| 2G | Segunda gerao |
| rpm | Rotaes por minuto |
| ORP | Potencial de oxirreduo |
| OD | Oxigênio dissolvido |
| O₂ | Oxigênio |
| H₂ | Hidrognio |
| CO₂ | Diido de carbono |
| H₂O | gua |
| CO | Monido de carbono |
| OTR | Taxa de transferência de oxigênio |
| OUR | Taxa de consumo de oxigênio |
| DO | Densidade tica |
| vvm | Volume de ar por volume de meio |
| xg | Unidade de força gravitacional |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta performance |
| UPLC | Cromatografia líquida de ultra performance |
| MS | Espectrometria de massa |
| CRBF | Fermentao em batelada com reciclo de células |
| PVDF | Fluoreto de polivinilideno |
| HMF | Hidroximetilfurfural |

| | |
|-------------|--|
| ODE | Equações diferenciais ordinárias |
| DE | Evolução diferencial |
| ton | Toneladas |
| min | Minutos |
| RSD | Desvio padrão residual |
| RMSE | Raiz do erro quadrático médio |
| MCP | Morte celular programada |
| ERO | Espécies reativas do oxigênio |
| Zn | Zinco |
| Cu | Cobre |
| Mn | Manganês |
| SOD | Superóxido dismutase |
| CoA | Coenzima A |
| AE | Evolução adaptativa |
| SSCF | Sacarificação e co-fermentação simultâneas |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO | 22 |
| OBJETIVOS DO TRABALHO | 26 |
| ESTRUTURA DO TRABALHO | 27 |
| 1. CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA..... | 30 |
| 1.1 A ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA | 30 |
| 1.1.1 Hemiceluloses como potencial matéria-prima | 32 |
| 1.1.2 Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica: obtenção de hidrolisados hemicelulósicos ricos em pentoses | 33 |
| 1.2 POTENCIAIS MICRORGANISMOS PARA CONVERSÃO DE PENTOSSES EM BIOPRODUTOS..... | 35 |
| 1.2.1 Bactérias..... | 37 |
| 1.2.2 Fungos filamentosos..... | 37 |
| 1.2.3 Leveduras | 38 |
| 1.3 ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO – ALTA DENSIDADE CELULAR, RECICLO DE CÉLULAS E BATELADA ALIMENTADA | 45 |
| 1.4 CINÉTICA E MODELAGEM MATEMÁTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS..... | 47 |
| 1.4.1 Abordagem conceitual para modelos cinéticos..... | 47 |
| 1.4.2 Modelos matemáticos não-estruturados | 49 |
| 2. CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE MODELO MATEMÁTICO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SUBSTRATO MISTO DE XILOSE E GLICOSE SOB ALTA DENSIDADE CELULAR PARA AS LEVEDURAS <i>S. stipitis</i> E <i>S. passalidarum</i> | 55 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 56 |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 58 |
| 2.2.1 Microrganismos, pré-inóculo e inóculo..... | 58 |
| 2.2.2 Propagação celular | 58 |
| 2.2.3 Fermentações em batelada em diferentes temperaturas..... | 59 |
| 2.2.4 Metodologia analítica | 60 |
| 2.2.5 Cálculo de parâmetros de fermentação | 61 |
| 2.2.6 Análise estatística | 62 |
| 2.2.7 Modelagem matemática e estimação dos parâmetros..... | 62 |
| 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 2.3.1 Perfis de concentrações de glicose, xilose, etanol e biomassa celular para as fermentações em diferentes temperaturas com <i>S. stipitis</i> e <i>S. passalidarum</i> | 64 |
| 2.3.2 Desenvolvimento do modelo matemático | 68 |
| 2.3.3 Estimação paramétrica e validação do modelo cinético | 73 |
| 2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 81 |

| | |
|--|-----|
| 3. CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ADAPTAÇÃO FISIOLÓGICA DA LEVEDURA <i>S. passalidarum</i> SUBMETIDA AO PROCESSO MELLE-BOINOT PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO..... | 82 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 83 |
| 3.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 86 |
| 3.2.1 Microrganismo, pré-inóculo, inóculo e propagação celular | 86 |
| 3.2.2 Fermentações em modo batelada alimentada com reciclo de células em diferentes estratégias de variação de temperatura | 86 |
| 3.2.3 Metodologia analítica | 87 |
| 3.2.4 Cálculo dos parâmetros de fermentação | 88 |
| 3.2.5 Análise estatística | 88 |
| 3.2.6 Modelagem matemática..... | 88 |
| 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 90 |
| 3.3.1 Comparação entre as fermentações a partir de parâmetros fermentativos | 90 |
| 3.3.2 Desenvolvimento do modelo matemático e estimação paramétrica | 98 |
| 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 105 |
| 4. CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA DE ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA <i>S. stipitis</i> FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR | 106 |
| 4.1 INTRODUÇÃO | 107 |
| 4.2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 109 |
| 4.2.1 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com ácido diluído..... | 109 |
| 4.2.2 Microrganismo, pré-inóculo, inóculo e propagação celular | 109 |
| 4.2.3 Adaptação da linhagem de <i>S. stipitis</i> através de fermentações com concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico | 110 |
| 4.2.4 Metodologia analítica | 112 |
| 4.2.5 Cálculo dos parâmetros de fermentação | 113 |
| 4.2.6 Análise estatística | 114 |
| 4.2.7 Modelagem matemática..... | 114 |
| 4.2.8 Análise de proteômica | 118 |
| 4.2.9 Avaliação do aumento da tolerância da linhagem adaptada de <i>S. stipitis</i> | 120 |
| 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 120 |
| 4.3.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e composição do substrato | 120 |
| 4.3.2 Fermentações em batelada com reciclo de células (CRBF) com aumento da porcentagem de hidrolisado hemicelulósico no substrato (33 e 67 %) | 121 |
| 4.3.3 Fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado hemicelulósico | 134 |
| 4.3.4 Avaliação da tolerância da linhagem adaptada de <i>S. stipitis</i> frente ao ácido acético | 142 |
| 4.3.5 Proteômica..... | 143 |
| 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 147 |

| | |
|---|-----|
| CONCLUSÕES, SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS E PUBLICAÇÕES .. | 148 |
| CONCLUSÕES | 148 |
| SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS | 149 |
| PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS | 150 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 153 |
| ANEXO I | 171 |
| ANEXO II | 172 |

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, tem-se dado muito destaque ao uso de fontes renováveis de energia, tendo em vista as incertezas e volatilidades no preço do petróleo e os fatores de restrição nas emissões de dióxido de carbono. Nesse cenário, o bioetanol é considerado uma boa opção. Mais precisamente, a produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas – denominado etanol de segunda geração – vem sendo apontada como uma opção viável para aumentar a produção sem expansão da área cultivada.

O bagaço de cana-de-açúcar é a principal biomassa lignocelulósica gerada no Brasil, uma vez que, para cada tonelada de cana produzida, obtém-se cerca de 250 kg desse resíduo em base úmida (Vasconcelos *et al.*, 2013). Como as hemiceluloses compreendem cerca de 30 % da massa seca do bagaço, o conteúdo de açúcares gerados após a hidrólise deste material compreende uma substancial porção para a produção de bioetanol de segunda geração. Levando-se em consideração que cerca de 620 milhões de toneladas de cana foram colhidas na safra 2018/2019 no Brasil, gerando cerca de 87 milhões de toneladas de bagaço, isto corresponderia à produção de 26 milhões de toneladas de hemiceluloses por ano. Considerando a estequiometria de conversão de hemiceluloses em xilose e arabinose, de 1,13 kg/kg, aproximadamente 29 milhões de toneladas de xilose seriam obtidas. Com a conversão da xilose em etanol, baseado no fator estequiométrico de 0,51 kg/kg, seria possível produzir aproximadamente 15 milhões de ton de etanol/ano (com base na densidade do etanol de 789 kg/m³, isto corresponderia a 19 bilhões de litros de etanol/ano). Embora rendimentos estequiométricos não sejam obtidos na prática, o potencial de produção de etanol a partir de pentoses é muito alto e precisa ser aproveitado quando se considera o processo de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* ainda é o microrganismo mais utilizado para produção de bioetanol, seja a partir do melaço de cana-de-açúcar, de amido de milho ou de biomassa lignocelulósica. Entretanto, a hidrólise da celulose e das hemiceluloses resulta em uma mistura de glicose, xilose, arabinose e outros monossacarídeos (Su *et al.*, 2015). Embora *S. cerevisiae* se apresente como um

excelente microrganismo para uma ampla aplicação industrial, desde a produção de químicos e *commodities* até a síntese de biocombustíveis usando hexoses como fonte de carbono (Apel *et al.*, 2016), não é capaz de metabolizar pentoses (xilose), a não ser que seja geneticamente transformada para expressar as rotas de assimilação de xilose (Fujii *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2013; Kuyper *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2012; Sanchez *et al.*, 2010). Sendo assim, a transformação de pentoses em bioetanol se torna um dos desafios mais importantes a resolver no âmbito científico e tecnológico em se tratando da produção de bioetanol proveniente de biomassa lignocelulósica (Jardine *et al.*, 2009; Kuhad *et al.*, 2011).

Nesse contexto, leveduras naturalmente capazes de fermentar pentoses ganham destaque, como *Scheffersomyces stipitis*, tanto na forma nativa quanto na geneticamente transformada (Hughes *et al.*, 2012; Jeffries & Jin, 2004; Li *et al.*, 2012). *S. stipitis* é uma levedura promissora para produção de bioetanol a partir de hidrolisados ricos em pentoses devido ao seu metabolismo de conversão de xilose a bioetanol (Liu *et al.*, 2012; Scordia *et al.*, 2012; Shindo & Nishida, 2012; Silva *et al.*, 2012; Bari *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2013; Ra *et al.*, 2013). A utilização desta levedura para a produção de bioetanol foi explorada na década de 80 e, em seguida, muitos pesquisadores optaram pelo estudo de *S. cerevisiae* geneticamente modificada (expressando genes de *S. stipitis*) para o consumo de pentoses. Nos últimos anos, porém, muitos grupos de pesquisas retomaram o estudo de *S. stipitis* para a produção de etanol de pentoses, visto o potencial de consumo de xilose e arabinose apresentados por esta levedura (Farias *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2015, Silva *et al.*, 2012; Nakanishi *et al.*, 2017, Bonan *et al.*, 2019) e tendo em vista que a fermentação industrial com cepas nativas é sempre mais simples e mais barata do que a fermentação com cepas modificadas.

Mais recentemente isolada, *Spathaspora passalidarum* é outra levedura com capacidade de fermentar pentoses. Esta levedura é capaz de metabolizar xilose mais rápido que glicose e pode co-utilizar glicose, xilose e celobiose como fontes de carbono (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2006). *S. passalidarum* e *S. stipitis* são próximas no que diz respeito a perspectivas taxonômicas e ambientais, sendo que ambas são encontradas no intestino de besouros (larvas e adultos) (Wohlbach *et al.*, 2011). Suas evoluções associadas a besouros vivendo no interior de madeira podre são, provavelmente, responsáveis por suas capacidades de metabolizarem uma ampla faixa de açúcares presentes em biomassas

lignocelulósicas e de crescerem em ambientes com pouca concentração de oxigênio (Garcia-Ochoa e Gomez, 2009; Nguyen *et al.*, 2006).

Além da escolha correta do microrganismo para conversão da biomassa lignocelulósica em bioetanol, uma estratégia eficaz para melhorar a produção é o reciclo de células por bateladas sucessivas (CRBF - *cell recycle batch fermentation*, em inglês), uma vez que este processo reduz significativamente o tempo de fermentação e os custos associados à preparação do inóculo (Andrade *et al.*, 2013; Landaeta *et al.*, 2013; Matano *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2016). Quando altas concentrações de células são aplicadas em sistemas de reciclo, há maior chance de sobrevivência das linhagens frente ao ambiente tóxico formado por compostos inibitórios provenientes do hidrolisado rico em pentoses (hidrolisado hemicelulósico) (Taherzadeh e Karimi, 2011). Embora esta prática seja comum na produção de bioetanol de primeira geração (Basso *et al.*, 2011) e venha sendo utilizada como uma alternativa para obtenção de elevado desempenho do processo de produção de bioetanol, existem poucos trabalhos na literatura que apliquem altas concentrações celulares e/ou reciclo de células em processos de produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica. Um trabalho anterior do grupo de pesquisa já mostrou que o reciclo de células na produção de etanol a partir da porção celulósica de bagaço de cana levou a excelente desempenho (Andrade *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015). No caso de fermentação de xilose, outro trabalho do grupo de pesquisa mostrou que sucessivos reciclos aumentaram a produtividade e o rendimento em etanol, assim como provocou um aumento da atividade de várias enzimas envolvidas no processo (Santos *et al.*, 2016; Nakanishi *et al.*, 2017).

Um dos problemas associados à fermentação alcoólica é a falta de robustez do processo na presença de flutuações das condições operacionais, o que leva a mudanças no comportamento cinético, com impacto no rendimento, na produtividade e na conversão (Andrade, 2007). Essas variações são muito comuns em plantas de fermentação alcoólica e ocorrem não só pela mudança na qualidade da matéria-prima, mas também por variações na levedura dominante no processo. Além disso, o processo de fermentação alcoólica é exotérmico e pequenos desvios na temperatura podem deslocar a reação das condições operacionais ótimas.

Nesse contexto, a temperatura exerce uma importante influência na reação, pois é comum a dificuldade de mantê-la constante durante um processo fermentativo em larga escala, afetando, também, a viabilidade do microrganismo. Além disso,

termos de influência da temperatura na cinética de fermentação podem ser úteis para estratégias de melhoramento do processo. Muitos trabalhos na literatura com *S. stipitis* realizam a fermentação a 30 °C (Silva *et al.*, 2012; Slininger *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016; Bonan *et al.*, 2019). No entanto, afirmam que 30 °C é a temperatura ótima de fermentação de glicose, enquanto a temperatura ótima de fermentação de xilose seria de 25-26 °C (Jeffries, 2008). Um trabalho do grupo de pesquisa (Santos *et al.*, 2016) mostrou que a fermentação de xilose a 25 °C tem pior desempenho do que a 30 °C para a levedura *S. stipitis*, mas que um esquema de cinco bateladas sucessivas com reciclo diminuindo a temperatura de 30 até 26 °C mostrou desempenho bastante superior ao obtido em bateladas sucessivas nas mesmas condições com temperatura fixa de 30 °C (Santos *et al.*, 2016). Assim, um estudo da cinética do processo fermentativo em função da temperatura usando mistura de glicose e xilose como substrato é essencial para definir as temperaturas ótimas de produção de etanol e consumo dos diferentes substratos, o que torna possível a proposta de formas de otimizar o processo. O uso de glicose e xilose em grau analítico (ao invés do licor de pré-tratamento de biomassa lignocelulósica) nesta etapa é imprescindível para evitar a influência da presença dos vários inibidores presentes no hidrolisado para o estudo da cinética em função da temperatura.

Desta forma, considerando o potencial desta tecnologia, isto é, produção de bioetanol a partir de biomassa lignocelulósica, e seu impacto no aumento da produção de bioetanol, conhecer a cinética da reação torna-se essencial para que o processo seja melhorado. Através da elaboração de modelos matemáticos que descrevem o consumo de substratos (xilose e glicose), o crescimento da biomassa celular e a formação de produto (etanol), é possível realizar a estimação dos parâmetros dependentes da temperatura, o que é essencial para o entendimento da cinética, tornando possível a determinação das melhores condições de operação.

Na literatura, são encontrados alguns estudos de modelagem matemática do processo de fermentação a partir de pentoses. Dentre eles, podem-se destacar os trabalhos de Farias *et al.* (2014) e Slininger *et al.* (2014), onde são feitas avaliações dos parâmetros cinéticos de fermentação utilizando *S. stipitis* como microrganismo e xilose como única fonte de carbono. Em ambos os trabalhos, as temperaturas foram mantidas constantes em todas as fermentações realizadas. Não há na literatura, portanto, trabalhos de modelagem matemática envolvendo a produção de etanol a partir de substrato misto de xilose e glicose em diferentes temperaturas de operação.

A utilização de substrato misto é importante, pois, conforme relatado na literatura (Hou, 2012; Santos *et al.*, 2015; Bonan *et al.*, 2019), *S. stipitis* apresenta um consumo sequencial dos açúcares, sendo que o consumo de xilose se inicia a partir de uma certa concentração de glicose no meio (efeito conhecido como repressão catabólica).

Por outro lado, por ter sido isolada recentemente, há poucos estudos do processo fermentativo envolvendo a levedura *S. passalidarum*, sendo que não é possível encontrar trabalhos de modelagem matemática de processos usando esta levedura. Considerando seu potencial de conversão de xilose em bioetanol, um estudo mais detalhado envolvendo esta levedura se faz necessário, permitindo uma comparação com *S. stipitis*.

OBJETIVOS DO TRABALHO

Tendo em vista as considerações feitas, o objetivo geral deste trabalho foi estudar os efeitos da temperatura sobre o processo de produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, bem como avaliar alternativas para melhorar o desempenho fermentativo dos microrganismos para possível aplicação em escala industrial. Em todas as etapas, os efeitos das diferentes estratégias aplicadas foram avaliados através da estimação de parâmetros cinéticos a partir do desenvolvimento e aplicação de modelos matemáticos.

Dentro desse contexto, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Avaliar o comportamento das leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis* quando submetidas a fermentações em batelada de um meio sintético composto por xilose e glicose (aproximadamente 63 e 27 g/L, respectivamente) em diferentes temperaturas de operação (26, 27, 28, 30 e 32 °C), sob alta densidade celular, visando a produção de etanol;
- A partir das fermentações realizadas, identificar a levedura com o melhor desempenho nas condições de fermentação empregadas;
- Desenvolver um modelo cinético em função da temperatura para a levedura selecionada para descrever crescimento celular, produção de etanol e consumos de xilose e glicose;
- Identificar e estimar os parâmetros em função da temperatura através da otimização e validação do modelo proposto;

- A partir do modelo desenvolvido, identificar a melhor faixa de temperatura visando a produção de etanol a partir de um substrato composto por xilose e glicose para a levedura selecionada;
- Por meio do desenvolvimento de um modelo matemático para fermentações em batelada alimentada, compreender a influência da aplicação de ciclos celulares nos parâmetros cinéticos para a levedura *S. passalidarum*;
- Avaliar um processo de adaptação para a levedura *S. stipitis*, através de fermentações em batelada com ciclo de células com concentrações crescentes de um hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar obtido por pré-tratamento ácido, com posterior fermentação em modo batelada alimentada, visando a adaptação do microrganismo frente a altas concentrações de inibidores;
- Compreender o efeito das fermentações com concentrações crescentes de hidrolisado no metabolismo da levedura *S. stipitis*, através da re-estimação de parâmetros cinéticos e análise de proteômica. Nesta etapa, os modelos previamente desenvolvidos para fermentações com meios sintéticos foram modificados para representar as fermentações com hidrolisado, tanto para batelada quanto para batelada alimentada, possibilitando uma investigação detalhada da evolução dos parâmetros cinéticos frente à adaptação do microrganismo.

ESTRUTURA DO TRABALHO

Tendo em vista os objetivos específicos previamente expostos, o presente trabalho está dividido entre os Capítulos 1 e 4, conforme detalhado a seguir.

CAPÍTULO 1: Revisão da literatura. Este capítulo traz uma abordagem conceitual dos temas relacionados ao presente trabalho, para uma completa contextualização dos estudos realizados. Além disso, são apresentados os principais resultados em termos de fermentação de pentoses para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, os dois microrganismos utilizados neste trabalho, bem como para *S. cerevisiae*, o principal microrganismo utilizado industrialmente na produção de etanol. Este capítulo está dividido entre as seguintes seções: A estrutura da biomassa

lignocelulósica; Potenciais microrganismos para conversão de pentoses em bioprodutos; Estratégias para melhoramento do processo fermentativo; e Cinética e modelagem matemática de processos fermentativos.

CAPÍTULO 2: *Desenvolvimento de modelo matemático em função da temperatura para produção de etanol a partir de substrato misto de xilose e glicose sob alta densidade celular para as leveduras S. stipitis e S. passalidarum.* Neste capítulo, são apresentados os resultados obtidos a partir de fermentações em batelada realizadas em diferentes temperaturas para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, bem como uma comparação entre elas. A partir de observações experimentais, foi proposto um conjunto de equações para descrever o consumo de xilose e de glicose, a produção de etanol e o crescimento celular nas condições empregadas. O modelo cinético desenvolvido foi ajustado em função da temperatura para a levedura *S. passalidarum*, com estimação dos parâmetros cinéticos do modelo e validação na faixa de temperatura investigada.

CAPÍTULO 3: *Avaliação do efeito da temperatura na adaptação fisiológica da levedura S. passalidarum submetida ao processo Melle-Boinot para produção de etanol de segunda geração.* Este capítulo contempla os resultados obtidos quando a levedura *S. passalidarum* é submetida a fermentações em batelada alimentada com reciclo de células, uma representação do processo *Melle-Boinot* amplamente utilizado nas usinas de produção de etanol de primeira geração. Além do estudo dos benefícios alcançados através da adoção desse processo, é feita uma investigação dos efeitos causados por diferentes estratégias de variação de temperatura ao longo dos ciclos de fermentação. Através da aplicação de um modelo matemático desenvolvido para as fermentações em batelada alimentada em questão, foi possível compreender o efeito dos ciclos celulares na evolução dos parâmetros cinéticos do modelo.

CAPÍTULO 4: *Avaliação de uma estratégia de adaptação da levedura S. stipitis frente a concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.* Neste capítulo, uma linhagem de *S. stipitis* obtida em um trabalho anterior do grupo de pesquisa (Santos *et al.*, 2016) foi submetida a fermentações em batelada com reciclo de células com concentrações crescentes de um hidrolisado hemicelulósico, com o objetivo de promover uma adaptação do microrganismo frente ao ambiente tóxico promovido pelo hidrolisado, com altas concentrações de inibidores.

Em seguida, o microrganismo foi submetido a uma fermentação em batelada alimentada, com a alimentação de um substrato composto por 100% de hidrolisado. O desempenho fermentativo alcançado pela levedura ao longo das fermentações foi avaliado pela estimação de parâmetros cinéticos, através da aplicação dos modelos matemáticos desenvolvidos nos Capítulos 2 e 3, modificados para as fermentações com hidrolisado hemicelulósico. Além disso, foram coletadas amostras para análise de proteômica para compreender os mecanismos de adaptação celular da levedura *S. stipitis* promovidos pela exposição aos inibidores hemicelulósicos.

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1.1 A ESTRUTURA DA BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Os principais componentes das biomassas lignocelulósicas são celulose, hemiceluloses e lignina, sendo que a composição muda de acordo com a origem da biomassa (Tye *et al.*, 2016). A celulose é formada por uma cadeia linear de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -(1-4). Já as hemiceluloses compreendem um polímero heterogêneo ramificado formado por açúcares C5 (β -D xilose, α -L arabinose), açúcares C6 (β -D manose, β -D glicose, α -D galactose) (Pu *et al.*, 2013) e grupos acetil. A lignina, por sua vez, é uma macromolécula polifenólica amorfa e irregular, sem uma estrutura química distinta (Pu *et al.*, 2013). Açúcares de celulose e hemiceluloses podem ser fermentados a etanol e outros bioprodutos de interesse por microrganismos específicos (Mupondwa *et al.*, 2017). A Figura 1.1 ilustra uma representação da estrutura da biomassa lignocelulósica.

Figura 1.1 Composição da parede celular de biomassas lignocelulósicas (amarelo: hemiceluloses; verde: celulose; marrom: lignina).



FONTE: SCISTYLE (2018)

Nesse contexto, os resíduos da produção agrícola representam uma quantidade substancial de matéria-prima que pode ser aproveitada e reprocessada (Fatma *et al.*, 2018), especialmente em países agrícolas (resíduos do processamento

de milho, cana-de-açúcar, arroz, oleaginosas, trigo, algodão, entre outros). A composição química dos resíduos agrícolas varia de acordo com a cultura, mas a concentração de celulose, hemiceluloses e lignina é de, aproximadamente, 37 a 50 %, 25 a 50 % e 5 a 15 %, respectivamente (Fatma *et al.*, 2018). Devido à alta concentração de celulose e hemiceluloses, resíduos agrícolas têm sido estudados como uma alternativa para produzir produtos de interesse (Tye *et al.*, 2016). A alta disponibilidade de diferentes biomassas representa um cenário favorável para a produção de diferentes bioprodutos. A Tabela 1.1 fornece a composição química dos resíduos agrícolas mais comuns.

Tabela 1.1 Composição química da biomassa de diferentes resíduos agrícolas.

| Resíduo agrícola | Celulose (%) | Hemiceluloses (%) | Lignina (%) | Referência |
|------------------|--------------|-------------------|-------------|----------------------------------|
| Casca de café | 43,0 ± 8,0 | 7,0 ± 3,0 | 9,0 ± 1,6 | Murthy <i>et al.</i> , 2012 |
| Polpa de café | 63,0 ± 2,5 | 2,3 ± 1,0 | 17,5 ± 2,2 | |
| Espiga de milho | 32,3 – 45,6 | 39,8% | 6,7 – 13,9 | Velmurugan <i>et al.</i> , 2011 |
| | 33 | 34 | 17 | |
| Fibra de milho | 14 | 39 | 5,7 | Van Eylen <i>et al.</i> , 2011 |
| Palha de milho | 30 | 26 | 29 | |
| | 35,0 – 42,6 | 17,0 – 35,0 | 7,0 – 21 | Tye <i>et al.</i> , 2016 |
| Casca de nozes | 33,3 | 32,1 | 32,4 | Kim <i>et al.</i> , 2014 |
| Palha de aveia | 35,0 ± 0,3 | 28,2 ± 0,9 | 4,1 ± 0,1 | Gomez-Tovar <i>et al.</i> , 2012 |
| Casca de arroz | 33 | 26 | 7 | Johar <i>et al.</i> , 2012 |
| Palha de arroz | 34 – 47 | 19 – 27 | 5 – 24 | Binod <i>et al.</i> , 2010 |
| | 32 – 47 | 18 – 28 | 5,5 – 24 | Tye <i>et al.</i> , 2016 |
| Bagaço de cana | 45 | 28,7 | 23,4 | Tye <i>et al.</i> , 2016 |
| | 42,6 ± 0,1 | 26,2 ± 0,5 | 22,5 ± 0,3 | Nakanishi <i>et al.</i> , 2017 |
| Bagaço de sorgo | 45,3 ± 0,3 | 26,3 ± 0,1 | 15,2 ± 0,2 | Zhang <i>et al.</i> , 2011 |
| | 30 – 50 | 30 – 45 | - | Liu <i>et al.</i> , 2012 |
| Palha de trigo | 33 – 45 | 20 – 32 | 5,5 – 24 | Tye <i>et al.</i> , 2016 |

Em relação ao Brasil, cuja economia é fortemente dependente da agricultura, as principais culturas são soja, milho, cana-de-açúcar, café, trigo e arroz (Faria *et al.*, 2018), o que leva à alta disponibilidade de biomassa lignocelulósica que pode ser utilizada para produzir produtos de valor agregado. No caso da cana-de-açúcar, 620 milhões de toneladas foram produzidas na safra 2018/2019 (CONAB, 2018), resultando em, aproximadamente, 166,27 milhões de toneladas de bagaço

(Lachos-Perez *et al.*, 2016), com composição média de 42 a 48 %, 19 a 25 % e 20 a 42 % de celulose, hemiceluloses e lignina, respectivamente (Zabed *et al.*, 2016).

Atualmente, parte do bagaço e da palha da cana-de-açúcar gerados são queimados em caldeiras para produção de vapor e eletricidade, com o objetivo de suprir a demanda energética do processo de produção de açúcar e bioetanol (Dias *et al.*, 2009). Parte da palha é deixada no campo para controle de doenças e reciclagem de nutrientes e parte é queimada no solo para facilitar as operações de colheita (Alonso Pippo *et al.*, 2011), o que causa problemas ambientais. Sendo assim, ações de entidades ambientais originaram a Lei da Queima da Cana (Lei nº 11.241/2002), a qual trata da queima controlada da cana-de-açúcar para despalha e de sua gradual eliminação. Segundo a legislação, para áreas mecanizáveis (maiores que 150 hectares e declividade menor ou igual a 12 %), 100 % da área cortada deve ter a queima eliminada até o ano de 2021. Já para áreas não-mecanizáveis, o prazo é 2031.

1.1.1 Hemiceluloses como potencial matéria-prima

Os açúcares hemicelulósicos mais importantes são xilanos e glucomananos. Os xilanos são os principais componentes das hemiceluloses que compõem as paredes celulares secundárias de madeiras duras e plantas herbáceas, compreendendo cerca de 20 a 30 % da biomassa total destas plantas. Os xilanos geralmente estão disponíveis em grandes quantidades como subprodutos da floresta, agricultura, agroindústrias e indústrias de madeira, papel e celulose. Açúcares do tipo manano, como glucomananos e galactoglucomananos, são os principais componentes hemicelulósicos da parede secundária de madeiras macias, enquanto que, nas madeiras duras, ocorrem em pequenas quantidades (Holtzappple *et al.*, 2003).

A desconstrução da fração hemicelulósica em açúcares monoméricos simples (como xilose, arabinose, glicose e galactose) é essencial para a conversão de materiais lignocelulósicos em produtos de maior valor agregado (Ho *et al.*, 2011). Para facilitar a liberação desses açúcares, o primeiro passo no processamento da biomassa é o pré-tratamento, cujo objetivo principal é romper a matriz lignocelulósica e afrouxar sua estrutura para permitir o acesso de produtos químicos e enzimas necessários para decompor os polímeros de carboidratos em açúcares fermentescíveis (Ho *et al.*, 2011), conforme discutido na próxima seção.

1.1.2 Pré-tratamentos de biomassa lignocelulósica: obtenção de hidrolisados hemicelulósicos ricos em pentoses

O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é um processo que pode remover a lignina e as hemiceluloses, aumentando a porosidade do material e facilitando o acesso de enzimas à celulose. De acordo com Jacquet *et al.* (2015), a fração hemicelulósica é facilmente hidrolisada e, dependendo do tipo e das condições do pré-tratamento, as hemiceluloses são hidrolisadas a oligo ou monossacarídeos. As tecnologias podem ser divididas em métodos físicos, químicos e biológicos, embora haja uma interdependência robusta entre esses processos. A Figura 1.2 mostra uma representação da desestruturação da matéria-prima lignocelulósica após a etapa de pré-tratamento, onde é possível observar o aumento da área superficial da fibra e a remoção das hemiceluloses.

Figura 1.2 Desconstrução da biomassa lignocelulósica causada pelo pré-tratamento (amarelo: hemicelulose; verde: celulose; marrom: lignina).



FONTE: SCISTYLE (2018).

O pré-tratamento de explosão a vapor catalisado por ácido sulfúrico diluído tem se mostrado uma boa alternativa para utilização em escala industrial, tendo em vista os custos de operação relativamente baixos. Além disso, é um método rápido e simples, alcançando elevadas eficiências de conversão de hemiceluloses em monossacarídeos (de 80 a 100%) e, conseqüentemente, uma elevada produção de xilose (Sánchez & Cardona, 2008; Rabelo, 2010; Santos *et al.*, 2012). A Tabela 1.2 descreve a composição de alguns hidrolisados hemicelulósicos obtidos pela etapa de

pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico diluído. É possível observar uma proporção de açúcares média de 70-85 % xilose e 15-30 % de glicose.

Tabela 1.2 Composição de diferentes hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar a partir de tratamento com ácido sulfúrico.

| Condições do prétratamento/ Composição do hidrolisado | Rocha <i>et al.</i> (2011) | | Zhang <i>et al.</i> (2012) |
|--|----------------------------|------|----------------------------|
| Ácido Sulfúrico (%) | 1 | 1 | - |
| Ácido Acético (%) | 1 | 1 | - |
| Ácido Clorídrico (%) | - | - | 1,2 |
| Temperatura (°C) | 190 | 190 | 130 |
| Tempo (min) | 10 | 10 | 30 |
| Proporções Biomassa (sólido-líquido) | 1,5:10 | 1:10 | 1:10 |
| Glicose (g/L) | 3,67 | 3,09 | 1,00 |
| Xilose (g/L) | 9,04 | 9,33 | 5,00 |
| Ácido Acético (g/L) | 2,21 | 2,89 | 4,60 |
| Furfural (g/L) | 0,05 | 0,10 | 5,60 |
| HMF (g/L) | 0,01 | 0,02 | 0,30 |

Não existe um método perfeito de pré-tratamento, sendo que os gargalos atuais incluem a alta carga de sólidos, alta demanda de energia, separação não eficiente de açúcares solúveis de resíduos sólidos e altos custos associados aos materiais e equipamentos (Kim, 2018). Além disso, conforme relatado por Palmqvist & Hahn-Haagerdal (2000), durante o pré-tratamento, além dos açúcares fermentescíveis, outros compostos são liberados, podendo ser divididos em vários grupos de acordo com a sua origem. Dentre estes grupos, incluem-se o ácido acético (gerado quando a estrutura das hemiceluloses é hidrolisada) e os extrativos, que compreendem terpenos, alcoóis e compostos aromáticos, tais como taninos. Os compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural (HMF) originam-se das moléculas de pentoses e hexoses, respectivamente, quando expostas a altas temperaturas e pressão (Fengel & Wegener, 1989). Os ácidos fórmico e levulínico são formados pela degradação do 5-hidroximetilfurfural. Já os compostos fenólicos são oriundos da degradação da lignina.

Os compostos citados são classificados como compostos inibitórios, uma vez que são prejudiciais para os mecanismos de consumo de substrato, crescimento de biomassa e formação de produto (Tahezardh & Karimi, 2011). Dentre esse grupo de substâncias, o ácido acético é o mais prejudicial ao metabolismo das leveduras, seguido do furfural. Concentrações desse ácido acima de 2,5 g/L podem afetar fortemente o metabolismo da maioria das leveduras (du Preez, 1994). Conforme o trabalho apresentado por Soares (2018), uma concentração de ácido acético de 1,5 g/L inibiu em 40 % o consumo do substrato e a produção de etanol caiu 20 % em relação ao controle (sem ácido acético) para fermentações com a levedura *S. passalidarum* NRRL Y-27907. Segundo estes autores, para que as fermentações com essa levedura tenham um desempenho satisfatório, os valores máximos de inibidores devem ser de até 0,5 g/L de ácido acético, 1,0 g/L de furfural e 3,0 g/L de HMF. Em outro trabalho, Morales *et al.* (2017) observou uma queda de quase 90 % na produtividade volumétrica de etanol por *S. passalidarum* quando adicionada uma concentração de 4,5 g/L de ácido acético, tendo glicose como fonte de carbono.

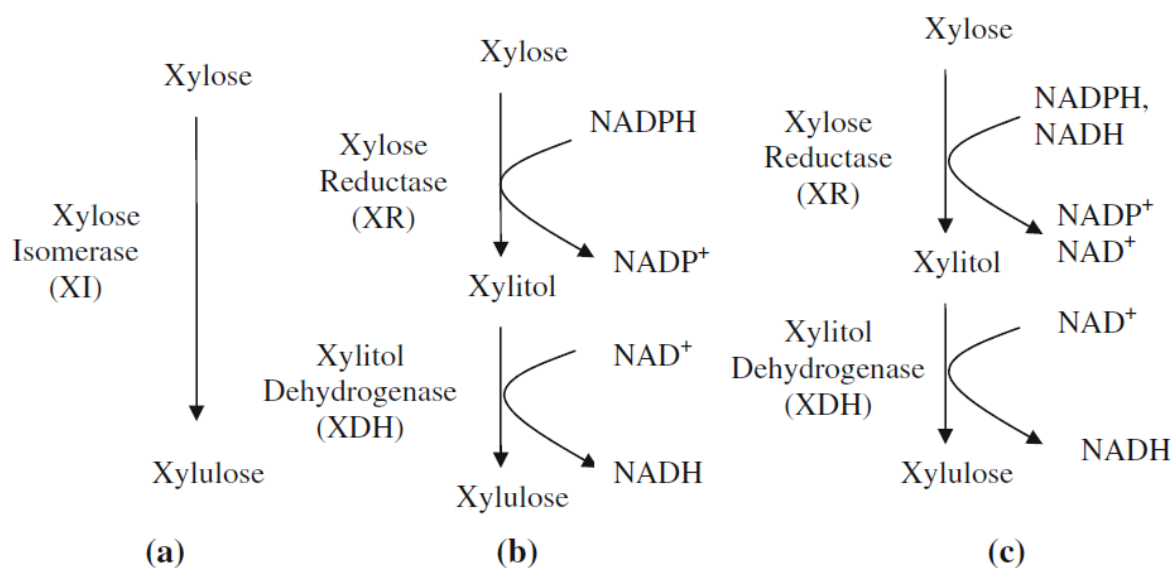
1.2 POTENCIAIS MICRORGANISMOS PARA CONVERSÃO DE PENTOSSES EM BIOPRODUTOS

Como afirmado anteriormente, a presença de compostos inibitórios e pentoses nos hidrolisados hemicelulósicos pode dificultar a obtenção da concentração desejável de produtos (como etanol ou outros blocos químicos) e prolongar o tempo de fermentação. Assim, a busca e o desenvolvimento de novos microrganismos fermentadores de pentoses que são resistentes a altas concentrações de inibidores se torna um interessante campo de estudo, uma vez que adicionar uma etapa de detoxificação (remoção dos compostos inibitórios) do hidrolisado traz algumas desvantagens, como a redução na quantidade de açúcar obtida (Matos *et al.*, 2016), além de custos adicionais e maior consumo de água, aumentando os impactos ambientais (García-Aparicio *et al.*, 2006).

Atualmente, existem duas principais vias de metabolização da xilose encontradas em microrganismos (Figura 1.3). Na primeira, principalmente encontrada em bactérias, xilose é diretamente convertida em xilulose pela ação da enzima xilose-isomerase (XI) (Figura 1.3a). Já em leveduras e na maioria dos fungos, ocorre uma reação em duas etapas, em que a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose-reductase (XR), que pode ser exclusivamente dependente da coenzima NADPH

(Figura 1.3b) ou das coenzimas NADPH e NADH (Figura 1.3c); xilitol então é oxidado a 5-xilulose através da enzima xilitol-desidrogenase (XDH), dependente de NAD^+ (Agbogbo & Coward-Kelly, 2008). Nos dois mecanismos, a xilulose é fosforilada a xilulose-5P pela enzima xiluloquinase (XK), entrando na via das pentoses-fosfato (PPP). O mecanismo XI é encontrado principalmente em procariontes, mas existem alguns fungos consumidores de xilose que utilizam essa enzima, como *Candida utilis*, *Candida boidinii* e *Piromyces sp. E2* (Banerjee *et al.*, 1994; Harhangi *et al.*, 2003; Kuyper *et al.*, 2003; Poudel *et al.*, 2017; Vongsuvanlert & Tani, 2011).

Figura 1.3 Vias simplificadas de conversão de xilose em etanol encontradas em procariontes e eucariontes. (a) Conversão por xilose isomerase (XI); (b) Conversão por xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR/XDH), com especificidade da XR por NADPH; (c) Conversão por xilose redutase e xilitol desidrogenase (XR/XDH), com especificidade da XR por NADPH e NADH.



FONTE: Agbogbo & Coward-Kelly (2008).

A escassez de microrganismos selecionados que são naturalmente capazes de metabolizar eficientemente os açúcares C5 e C6 é outro gargalo no desenvolvimento industrial de biorrefinarias lignocelulósicas (Kuhad *et al.*, 2011; Lennartsson *et al.*, 2014; Zaldivar *et al.*, 2001). A solução pode residir em: 1) seleção de novos microrganismos com boa tolerância a inibidores e que sejam capazes de fermentar os dois açúcares; 2) melhoramento do processo aplicado à fermentação com microrganismos industrialmente bem estabelecidos; 3) aplicação de adaptação

evolutiva e engenharia metabólica reversa nessas cepas e/ou na levedura *S. cerevisiae* comumente utilizada. As características de cada microrganismo para produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica são apresentadas a seguir, bem como os principais resultados obtidos.

1.2.1 Bactérias

A maioria das bactérias pode converter açúcares C5 em uma variedade de produtos em condições anaeróbicas, o que é desejável em um processo industrial (Kuhad *et al.*, 2011). O mais promissor para esta aplicação é o grupo termofílico (*Thermoanaerobacter mathranii*, *Geobacillus thermoglucosidasius*, entre outras), uma vez que podem fermentar hexoses e pentoses em temperaturas entre 50 a 80 °C e em uma ampla faixa de pH. Trata-se de um aspecto vantajoso, uma vez que reduz o nível de contaminantes, além do fato de que o controle de temperaturas e pH em valores mais baixos nos biorreatores pode ser industrialmente caro (Tuffin *et al.*, 2009). Outro grupo são as bactérias acetogênicas (*Clostridium autoethanogenum*, *Clostridium carboxidivorani*, entre outras), que convertem carbono lignocelulósico gasoso em biocombustíveis através da conversão de CO/H₂ em etanol e butanol (Munasinghe & Khanal, 2010).

Considerando a produção de bioetanol, as desvantagens quanto ao uso de bactérias na conversão da xilose é a produção de subprodutos indesejáveis, como polióis e cetonas, caracterizando uma heterofermentação (Olson *et al.*, 2015). Esse fator diminui o rendimento em etanol e dificulta seu processo de recuperação e purificação. As bactérias também mostram baixa resistência aos compostos inibitórios descritos anteriormente e ao etanol, não sendo adequadas para processos em larga escala (Kuhad *et al.*, 2011).

1.2.2 Fungos filamentosos

Essa classe de microrganismos pode degradar e metabolizar inúmeras fontes de biomassas lignocelulósicas e carboidratos e produzir uma enorme variedade de compostos, mas principalmente enzimas (Culleton *et al.*, 2013; Van Den Brink & De Vries, 2011). A produção de etanol por fungos filamentosos tem várias desvantagens, como longos tempos de fermentação, alta viscosidade do meio de fermentação, altos requisitos de concentração de oxigênio e baixos títulos de etanol

causados pela produção de subprodutos, como celobionato, xilitol, lipídios e ácidos (Dashtban *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2017; Liu & Qu, 2018; Roche *et al.*, 2014; Xu *et al.*, 2015).

1.2.3 Leveduras

1.2.3.1 *S. cerevisiae* geneticamente modificada

A via bioquímica de assimilação da xilose (via das pentoses-fosfato) pode ser encontrada em quase todos os organismos celulares com a necessidade de D-ribose, D-eritrose-4-fosfato e NADPH para ácido nucleico, aminoácidos aromáticos e reações de biossíntese anabólicas, respectivamente (Jeffries, 2006). Nesse contexto, *S. cerevisiae* carece apenas de enzimas para converter a xilose em xilulose, mas, devido à sua alta tolerância a etanol e inibidores e à capacidade de fermentar sob condições estritamente anaeróbicas, ainda é o microrganismo escolhido para a produção de etanol em muitas indústrias (Gírio *et al.*, 2010; Hahn-Hägerdal, 2007; Palmqvist & Hahn-Hägerdal, 2000).

Muitos estudos foram realizados para integrar a assimilação da xilose à PPP na produção de etanol por *S. cerevisiae*, principalmente de duas maneiras: inserção de genes codificadores da enzima de isomerização dependente de íons metálicos XI (*xylA*) ou genes codificadores do par de enzimas XR (*XYL1*, *Xyl1p*) e XDH (*XYL2*, *Xyl2p*) (Kwan & Jin, 2017).

A principal desvantagem em relação à inserção de genes que expressam XR/XDH em linhagens de *S. cerevisiae* reside no fato de que essas duas enzimas têm afinidade por diferentes cofatores: enquanto XR prefere NADPH, XDH usa preferencialmente NAD⁺, causando um desequilíbrio de cofator que resulta na acumulação de xilitol (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). Diferentes alternativas têm sido buscadas para superar esse problema, desde a adição de receptores de elétrons externos até alterações na especificidade das enzimas XR e XDH (Moysés *et al.*, 2016). A solução desses problemas está na procura e no estudo de novos genes que expressam XR com mais afinidade por NADH em novos microrganismos, como *S. passalidarum* (Hou, 2012). No caso da rota XI, o principal problema reside em sua baixa eficiência catalítica, fazendo com que linhagens de *S. cerevisiae* geneticamente modificadas cresçam e fermentem xilose de forma lenta (Moysés *et al.*, 2016).

Portanto, além da inserção dos genes codificadores de XI ou XR/XDH, são necessárias modificações genéticas adicionais, como modificação/inserção de transportadores de xilose específicos e mais eficientes, alterações nas vias competitivas da xilose ou nas vias de regeneração do NADPH, alterações nas afinidades dos cofatores e nocaute/superexpressão de genes codificadores de enzimas da via das pentoses-fosfato (Du *et al.*, 2010; Jin *et al.*, 2005; Krahulec *et al.*, 2010; Lu & Jeffries, 2007).

Nesse contexto, no trabalho de Zhou *et al.* (2012), foram feitas superexpressões de xilose-isomerase (XI) de *Pyromyces* e xiluloquinase (XK) de *S. stipitis*, em conjunto com modificações na via das pentoses-fostato, sendo que a linhagem obtida (H131 A3 AL^{CS}) teve um aumento significativo na velocidade específica máxima de crescimento anaeróbico ($0,203 \pm 0,006 \text{ h}^{-1}$) e nas velocidades específicas de consumo de xilose (σ_{xyl}) e de produção de etanol (π) (1,866 g/g.h e 0,765 g/g.h, respectivamente), com um fator de conversão de xilose em etanol de 0,41 g/g (Tabela 1.3).

Ainda nesse cenário, no trabalho de Cadete *et al.* (2016), os autores realizaram uma troca da XR dependente de NADPH proveniente de *S. stipitis* pela XR de *S. passalidarum* com preferência por NADH (linhagens TMB 3422 e TMB 3504, respectivamente), a fim de diminuir o desequilíbrio de cofatores, conforme previamente discutido. Dessa forma, foi possível obter um aumento no rendimento em etanol, bem como na produtividade, conforme destacado na Tabela 1.3.

Já no trabalho de Li *et al.* (2016), foi feita uma comparação entre duas das melhores linhagens modificadas de *S. cerevisiae* em domínio público, uma utilizando a rota XR/XDH (*S. stipitis*) e a outra a via XI (*Pyromyces*), em fermentações anaeróbicas de xilose. Os autores observaram que, independentemente das condições, a cepa que utilizava as enzimas XR/XDH obteve produtividades significativamente superiores em comparação com a outra. Em contrapartida, os rendimentos foram melhores para a linhagem que utilizou a enzima XI, como mostrado na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 Resultados de velocidade específica de consumo de xilose (σ_{Xyl}), velocidade específica de produção de etanol (π) e fator de conversão de xilose em etanol ($Y_{P/Xyl}$) obtidos por diferentes estudos com linhagens modificadas de *S. cerevisiae*.

| Linhagem | Enzima | Condições | $Y_{P/Xyl}$ g/g | σ_{Xyl} | π | Referência |
|--------------------------|--|----------------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| H131 A3 AL ^{CS} | XI (XYLA – <i>Piromyces</i>) | Batelada anaeróbica 4% xilose | 0,410 | 1,866 (g/g.h) | 0,765 (g/g.h) | Zhou <i>et al.</i> (2012) |
| TMB 3422 | XR/XDH (mutante SsXYL1, SsXYL2) | Batelada anaeróbica 5% xilose | 0,340 | 0,580 (g/g.h) | 0,180 (g/g.h) | Cadete <i>et al.</i> (2016) |
| TMB 3504 | XR/XDH (SpXYL1, SpXYL2) | Batelada anaeróbica 5% xilose | 0,400 | 0,760 (g/g.h) | 0,330 (g/g.h) | Cadete <i>et al.</i> (2016) |
| SXA-R2P-E | XI (XYLA – <i>Piromyces</i> mutante) | Batelada anaeróbica 4% xilose | 0,453 | 0,077 (g/DO.h) | 0,033 (g/DO.h) | Li <i>et al.</i> (2016) |
| SR8 | XR/XDH (SsXYL1, SsXYL2) | Batelada anaeróbica 4% xilose | 0,378 | 0,129 (g/DO.h) | 0,046 (g/DO.h) | Li <i>et al.</i> (2016) |

DO – densidade ótica.

1.2.3.2 *Scheffersomyces stipitis*

Conforme já mencionado, a utilização de linhagens de *S. stipitis* (anteriormente denominada *Pichia stipitis*) para a produção de bioetanol a partir de pentoses tem sido reportada na literatura desde a década de 80, sendo que muitos desses trabalhos fazem uma investigação da capacidade fermentativa desta levedura frente a diferentes condições de oxigênio. Nesse contexto, Dellweg *et al.* (1989), dentre as condições de oxigenação testadas, obteve a maior velocidade específica de produção de etanol (0,12 g/g.h) a uma velocidade de consumo de oxigênio (OUR – *oxygen uptake rate*, em inglês) de 3,75 mmol_{o2}/L.h, com um fator de conversão de xilose em etanol de 0,39 g/g. Em condições aeróbicas, os autores também observaram que a velocidade específica de crescimento celular é menor em xilose que em glicose. Da mesma forma, utilizando um meio composto apenas por xilose, Guebel *et al.* (1991) observaram que a produtividade volumétrica de etanol foi máxima (0,5-0,6 g/L.h) em uma faixa estreita de velocidades de consumo de oxigênio (3-5 mmol_{o2}/L.h).

Em trabalho similar, Delgenes *et al.* (1989) também realizaram fermentações com diferentes velocidades de transferência de oxigênio (OTR – *oxygen transfer rate*, em inglês), porém em um meio composto por xilose, glicose e arabinose. Os autores concluíram que um suprimento de oxigênio em excesso favoreceu a produtividade de etanol e diminuiu a formação de xilitol. Nessas condições, porém, a cadeia respiratória estava ativa, desviando o metabolismo para o crescimento celular, afetando o rendimento em etanol. Sendo assim, as condições de aeração que favoreceram o rendimento de etanol eram diferentes daquelas que otimizaram a produtividade de etanol. Considerando esses dois parâmetros, a fermentação a uma OTR de 0,7 mmol_{o₂}/L.h mostrou-se mais eficiente do que o processo em anaerobiose, uma vez que as velocidades específicas de produção de etanol foram 4,5 vezes maiores nessa condição, sem diminuição significativa do rendimento em etanol. Em relação ao consumo das diferentes fontes de carbono, *S. stipitis* consumiu glicose antes da assimilação de xilose. A levedura começou a utilizar arabinose apenas quando todos os outros açúcares estavam esgotados.

Mais recentemente, Silva *et al.* (2012) realizaram ensaios de fermentação em biorreatores sob diferentes condições de k_{La} (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio), em meio composto por xilose e glicose. A região mais promissora foi entre os valores de k_{La} de 2,3 a 4,9 h⁻¹, uma vez que promoveu os maiores resultados em termos de produção de etanol, com praticamente completa exaustão da xilose do meio.

Nesse sentido, Bonan *et al.* (2019) executaram fermentações em biorreatores sob a estratégia de alta densidade celular, comparando o k_{La} de 4,9 h⁻¹ com a condição de completa anaerobiose, em um meio composto por xilose e glicose. Além disso, os autores realizaram uma investigação detalhada do potencial de oxirredução (ORP – *oxido-reduction potential*, em inglês). Concluíram que a condição de microaerofilia mostrou-se adequada quando comparada à anaerobiose, fornecendo um rendimento em etanol e uma produtividade de 64,3 % e 0,45 g/L.h, respectivamente; o título máximo de etanol obtido foi 21,50 g/L. Além disso, observaram que valores de ORP entre -270 e -330 mV resultaram em alta produção de etanol a partir da xilose.

Já no trabalho de Veras *et al.* (2017), foram realizadas fermentações nas condições de limitação de oxigênio e de completa aerobiose, utilizando xilose como única fonte de carbono. Os maiores fatores de conversão de açúcar em etanol foram

registrados na condição de oxigênio limitante (0,45 g/g), fornecendo uma concentração máxima de etanol de 16,48 g/L. Em aerobiose, o título de etanol obtido foi de 8,05 g/L, correspondendo a um fator de conversão de 0,24 g/g. Nesse caso, o fator de conversão de substrato em células foi maior (0,16 g/g) em comparação com a condição de microaerofilia (0,09 g/g).

A Tabela 1.4 mostra alguns dos principais resultados obtidos nos estudos destacados para a levedura *S. stipitis* NRRL Y-7124, a mesma linhagem do presente trabalho.

Tabela 1.4 Resultados obtidos por diferentes estudos com a levedura *S. stipitis* NRRL Y-7124.

| Sistema de fermentação | Fonte de carbono | Q_P g/L.h | $Y_{P/S}$ g/g | Etanol g/L | Referência |
|------------------------|-----------------------------|----------------|------------------|---------------|-------------------------------|
| Frascos | Xilose | ~0,41 | 0,39 | ~16 | Dellweg <i>et al.</i> (1989) |
| Frascos | Xilose, glicose e arabinose | ~0,15 | ~0,4 | 7,4 | Delgenes <i>et al.</i> (1989) |
| Frascos | Xilose | 0,5 | 0,28 | NI | Guebel <i>et al.</i> (1991) |
| Frascos | Xilose | ~0,37 | 0,43 | ~21,5 | Laplace <i>et al.</i> (1991) |
| Frascos | Xilose e glicose | ~0,3 | ~0,29 | ~27 | Silva <i>et al.</i> (2012) |
| Biorreatores | Xilose | ~0,33 | 0,45 | 16,48 | Veras <i>et al.</i> (2017) |
| Biorreatores | Xilose e glicose | 0,45 | 0,33 | 21,50 | Bonan <i>et al.</i> (2019) |

NI: Não informado.

1.2.3.3 *Spathaspora passalidarum*

Muitos pesquisadores vêm realizando fermentações para avaliar o consumo de xilose por *S. passalidarum*. Cadete *et al.* (2012) destacaram que diferentes linhagens de *S. passalidarum* (UFMG HDM 1.1, 1.3, 2.1, 10.2, 14.1 e 16.2) apresentaram resultados promissores considerando a formação de etanol a partir de um meio composto apenas por xilose (50 g/L). As cepas estudadas apresentaram produtividades entre 0,62 e 0,75 g/L.h, com rendimentos em etanol entre 61 e 71,6 %.

No estudo de Long *et al.* (2012), foram realizadas fermentações em um meio sintético composto por glicose, xilose e celobiose. Os autores observaram que celobiose e xilose foram co-fermentados a taxas muito semelhantes na presença ou ausência de 20 g/L de glicose. Na presença de glicose, a assimiliação simultânea de celobiose e xilose, nas concentrações de 40 g/L cada, foi reprimida pela presença de glicose. A velocidade máxima de produção de etanol a partir de uma mistura de xilose e celobiose foi de 1,07 g/L.h, enquanto que, na presença de glicose, esse valor caiu para 0,73 g/L.h, com fatores de conversão de açúcar em etanol de 0,43 e 0,42 g/g, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para a produtividade volumétrica, sendo que o valor obtido em 72 h de fermentação para o meio composto por xilose e celobiose foi de 0,58 g/L.h; já na presença de glicose, esse valor foi de 0,53 g/L.h.

Já no trabalho de Hou (2012), foram realizadas fermentações em condições aeróbicas e anaeróbicas, em meios compostos por glicose (30 g/L) ou xilose (32 g/L) e pela mistura dos dois açúcares (15 g/L cada). A principal observação feita pelo autor foi o fato de *S. passalidarum* ter sido capaz de crescer e fermentar tendo xilose como única fonte de carbono em condições completamente anaeróbicas. As velocidades específicas máximas de crescimento para as três condições de substrato foram de $0,67 \pm 0,04$, $0,58 \pm 0,04$ e $0,63 \pm 0,05 \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Sendo assim, o crescimento foi mais lento em xilose do que em glicose. Comparando-se as condições anaeróbica e aeróbica, a completa exaustão de açúcar se deu em um tempo maior para a ausência de oxigênio (90 e 20 h, respectivamente), ou seja, a presença de oxigênio elevou as velocidades de consumo das fontes de carbono. Cabe ressaltar que os experimentos foram realizados em frascos *Erlenmeyer*, ou seja, não houve completa remoção do oxigênio no meio através do borbulhamento de gás nitrogênio para atingir uma completa condição de anaerobiose e não houve transferência de O_2 constante durante o tempo da reação para o processo em aerobiose.

O autor também observou que, no meio composto pelas duas fontes de carbono, xilose passou a ser assimilada após o consumo parcial de glicose no meio, confirmando o efeito de repressão por glicose. Ainda foi demonstrado que, para *S. passalidarum*, a conversão da xilose ocorre por meio de uma XR com preferência por NADH. Portanto, a capacidade desse microrganismo de utilizar xilose em condições anaeróbicas se dá, possivelmente, pelo maior equilíbrio de cofatores, uma vez que a enzima XDH tem preferência por NAD^+ .

Em outro trabalho recente, Veras *et al.* (2017), utilizando apenas xilose como fonte de carbono, obteve um fator de conversão de xilose em células 2,5 vezes maior para a condição de aerobiose do que para a condição de limitação de oxigênio, resultando em uma queda de 60 % no rendimento em etanol. Isso pode ser explicado, pois, segundo du Preez (1994), a disponibilidade de oxigênio determina a divisão do fluxo de carbono entre crescimento e formação de produto, interferindo no rendimento fermentativo, uma vez que *S. passalidarum* é uma levedura *Crabtree* negativa, assim como *S. stipitis*. Na condição de microaerofilia, o rendimento em etanol foi de 0,44 g/g, resultando em concentrações de $16,36 \pm 1,40$ g/L.

Já no estudo de Su *et al.* (2014), diferentes condições de limitação de oxigênio foram empregadas para avaliar o desempenho fermentativo da levedura em meios compostos por glicose (150 g/L) ou xilose (150 g/L) e pela mistura dos açúcares (120 g/L de glicose e 30 g/L de xilose). A velocidade específica máxima de produção de etanol foi de 0,153 g/g.h, com um fator de conversão de açúcar em etanol de 0,448 g/g para o meio composto apenas por xilose, a uma velocidade de transferência de oxigênio (OTR) de 2,47 mmol_{o2}/L.h. Aumentando a OTR para 4,27 mmol_{o2}/L.h, o fator de conversão caiu para 0,42 g/g de xilose, enquanto a produtividade volumétrica de etanol subiu de 0,52 para 0,80 g/L.h. Na presença de glicose, houve um aumento no rendimento em célula, resultando em uma diminuição do rendimento em etanol, conforme já reportado por outros trabalhos.

Os resultados acima descritos foram obtidos a partir de substrato sintéticos, em condições ideais de fermentação, sem a presença de inibidores oriundos das etapas de pré-tratamento. No trabalho de Long *et al.* (2012), também foram realizadas fermentações utilizando um hidrolisado hemicelulósico de bordo. Os autores observaram que a fermentação em hidrolisado foi mais lenta que em meio sintético. Em hidrolisado, a concentração máxima de etanol (38 g/L) foi atingida após 59 h de fermentação, enquanto que, no meio sintético, o valor máximo (40 g/L) foi atingido cerca de 38 h após o início da fermentação. Outra diferença encontrada foi em relação ao rendimento em células e etanol: com o hidrolisado, os valores foram inferiores (0,19 e 0,34 g/g, respectivamente) do que aqueles obtidos em meio sintético (0,25 e 0,37 g/g, respectivamente).

A Tabela 1.5 mostra alguns dos principais resultados obtidos a partir de fermentações de substratos compostos por xilose e outros açúcares para a levedura *S. passalidarum* NRRL Y-27907, a mesma linhagem do presente estudo.

Tabela 1.5 Resultados obtidos por diferentes estudos com a levedura *S. passalidarum* NRRL Y-27907.

| Sistema de fermentação | Fonte de carbono | Q_P g/L.h | $Y_{P/S}$ g/g | Etanol g/L | Referência |
|------------------------|-------------------------------------|----------------|------------------|---------------|----------------------------|
| Frascos | Xilose | ~0,72 | ~0,43 | 27-40 | Su <i>et al.</i> (2015) |
| Frascos | Glicose e xilose | 1,04 | 0,41 | 25 | Hou (2015) |
| Frascos | Glicose, xilose e celobiose | 0,53 | 0,42 | ~38 | Long <i>et al.</i> (2012) |
| Biorreatores | Xilose | ~0,30 | 0,44 | 16,36 | Veras <i>et al.</i> (2017) |
| Frascos | Hidrolisado hemicelulósico de bordo | 0,6 | 0,34 | 38 | Long <i>et al.</i> (2012) |

1.3 ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO FERMENTATIVO – ALTA DENSIDADE CELULAR, RECICLO DE CÉLULAS E BATELADA ALIMENTADA

Em vários casos, o aumento da concentração celular tem sido demonstrado como uma estratégia adequada para aumentar a produtividade volumétrica de etanol (Brethauer & Wyman, 2010). Segundo Olsson & Hahn-Hagerdal (1996), há dois modos gerais de operação em elevada concentração celular: o reciclo ou a imobilização das células. O reciclo de células é amplamente utilizado na produção de etanol de primeira geração (Basso *et al.*, 2011) e permite a adaptação e o condicionamento dos microrganismos em condições deletérias intrínsecas do sistema de fermentação (Slininger *et al.*, 2011). Através deste procedimento, é possível alcançar velocidades específicas de produção de etanol elevadas.

Conforme relatado por Andrade *et al.* (2013) em um estudo cinético da produção de bioetanol a partir da fração de hexoses do hidrolisado enzimático de bagaço de cana-de-açúcar misturado com melaço, foi possível observar um maior acúmulo celular e de etanol durante o reciclo de células por bateladas sucessivas. Além disso, segundo Matano *et al.* (2013), o reciclo celular para a obtenção de bioetanol proveniente de biomassa lignocelulósica hidrolisada reduz significativamente os custos associados à preparação do inóculo. Por meio de técnicas de DNA recombinante em linhagens de *S. cerevisiae*, seguida de reciclo de células por bateladas alimentadas sucessivas (cinco ciclos), os autores obtiveram 86,3 % do rendimento teórico de etanol.

Em se tratando do microrganismo *S. stipitis*, Slininger *et al.* (2011) buscaram compreender o crescimento lag diáuxico desta levedura, com o intuito de avaliar a produção de etanol por meio da reinoculação de linhagens capazes de metabolizar xilose na presença de glicose. Este fenômeno é exibido por microrganismos na presença de uma mistura de dois substratos, onde há uma fase lag inicial, seguida pelo consumo do substrato mais facilmente assimilável e, em seguida, ocorre uma segunda fase lag de adaptação ao segundo substrato acompanhada pelo consumo do mesmo. Segundo os autores, através do reciclo de células, observou-se um aumento nas velocidades de fermentação a partir de xilose e glicose, além de eliminar o lag diáuxico para a mistura das duas fontes de carbono. Além disso, foi possível obter um acúmulo de etanol de 70 g/L.

Ashoor *et al.* (2015) avaliaram a produção de etanol por uma cultura mista de *S. cerevisiae* e *S. stipitis*, com e sem a presença de reciclo de células. Os autores também utilizaram substrato composto por xilose e glicose. Através do reciclo de células, foi possível obter uma produção de etanol máxima de 9,73 g/L e um rendimento de 0,42 g/g, exibindo um aumento de 10 vezes na produtividade de etanol (2,1 g/L.h) em relação ao processo sem reciclo.

Em outro estudo, Santos *et al.* (2015) avaliaram a produção de etanol por *S. stipitis* na presença de dois substratos (xilose e glicose) através de batelada com reciclo de células, nas temperaturas de 25 e 30°C. Segundo os autores, a concentração final máxima de etanol foi de 17,2 e 34,5 g/L a 25 e 30 °C, respectivamente. Glicose foi o substrato preferencial, sendo que o consumo de xilose era iniciado após ser atingida certa concentração de glicose no meio, o que é característico do efeito de repressão por glicose, já reportado por outros autores. Além disso, o tratamento com ácido sulfúrico (conhecido como *refreshment*) realizado antes de cada reciclo resultou em uma maior viabilidade celular. Após os cinco ciclos, foi possível obter um rendimento de 0,43 g/g, sendo que a capacidade de fermentação e tolerância da *S. stipitis* foi maior a 30 °C, atingindo 83,4 % do rendimento teórico, com uma produtividade de 2,16 g/L.h, muito superior ao valor de 0,57 g/L.h obtido no primeiro ciclo. Em trabalho mais recente do mesmo grupo de pesquisa, Santos *et al.* (2016) avaliaram o desempenho fermentativo da mesma levedura ao longo das fermentações em batelada com ciclos celulares em duas estratégias diferentes de temperatura: temperatura constante de 30 °C em todos os ciclos ou decaimento da temperatura a cada reciclo, de 30 a 26 °C. Foi possível observar que o decaimento da

temperatura foi benéfico para o processo fermentativo, uma vez que, no último reciclo a 26 °C, 81 % da xilose foi consumida em 20 h e, em temperatura fixa, apenas 27 % da xilose foi metabolizada no último reciclo.

Nakanishi *et al.* (2017), além de aplicar a estratégia de reciclo de células, realizaram as fermentações no modo batelada alimentada com diminuição da temperatura a cada reciclo, de 30 a 27 °C, utilizando hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato, com concentrações de glicose e xilose de, aproximadamente, 42,9 e 14,9 g/L, respectivamente, para o microrganismo *S. passalidarum* NRRL Y-27907. Essa estratégia se mostrou eficaz, aumentando a produtividade e o consumo de xilose do primeiro para o quarto ciclo de fermentação (0,38 a 0,81 g/L.h e 88,5 a 93,5 %, respectivamente), além de diminuir o tempo de fermentação de 40 para 24 h. Os autores também relataram que as células de *S. passalidarum* são resistentes ao tratamento ácido realizado entre os ciclos, conforme descrito por Santos *et al.* (2016), mantendo uma porcentagem de células viáveis de 96, 92, 96 e 93 % no final de cada ciclo.

Já no trabalho de Landaeta *et al.* (2013), foi avaliada uma estratégia de adaptação de uma linhagem floculante de *S. cerevisiae* (NRRL Y-265) a diferentes inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, como ácido acético, furfural, HMF, vanilina, siringaldeído e ácido hidroxibenzoico. Nesse sentido, foram realizadas fermentações em batelada com reciclo de células em um período de 39 dias, com concentrações crescentes dos inibidores. A estratégia adotada resultou em um aumento na produtividade volumétrica de etanol e na velocidade de crescimento (10 % e 70 %, respectivamente) em relação à linhagem parental, possibilitando melhores resultados na produção de etanol a partir de hidrolisado obtido pelo pré-tratamento de eucalipto.

Sendo assim, a adoção das estratégias acima mencionadas se destaca como alternativas promissoras visando o melhoramento do desempenho fermentativo de leveduras nativas.

1.4 CINÉTICA E MODELAGEM MATEMÁTICA DE PROCESSOS FERMENTATIVOS

1.4.1 Abordagem conceitual para modelos cinéticos

Segundo Nielsen (2003), o estabelecimento de expressões cinéticas refere-se, normalmente, à modelagem cinética, e este processo envolve definir

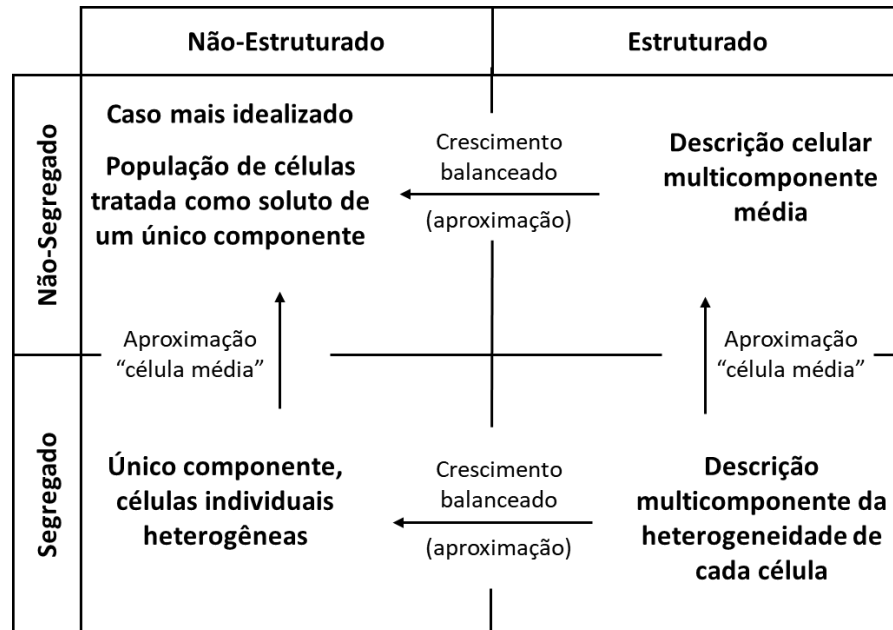
correlações entre velocidades e concentrações de reagentes/produtos que, inseridas nos balanços de massa, permitem a predição dos graus de conversão dos substratos e o rendimento individual de produtos em diferentes condições de operação. Sendo assim, se a velocidade de reação for corretamente estabelecida, é possível expressar o andamento de um experimento de fermentação baseado nos valores iniciais para os componentes, por exemplo, concentração dos substratos.

Segundo Bonomi & Schmidell (2001), através da modelagem matemática dos processos fermentativos, é possível: organizar informações desconexas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente; pensar e calcular logicamente quais componentes e interações são importantes num sistema complexo; descobrir novas estratégias para explicar o comportamento das células submetidas a determinados ambientes; corrigir falhas eventualmente existentes no entendimento convencional de determinados fenômenos e entender as características qualitativamente essenciais de determinados processos. Isso leva a simulações que, finalmente, podem resultar em projetos ótimos do equipamento ou do modo de operação para um dado sistema. A definição de uma descrição quantitativa do processo de fermentação geralmente envolve um processo iterativo onde o modelo é continuamente revisado quando uma nova informação é obtida.

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser divididos em quatro grupos, dependendo do nível de detalhes e complexidade. Conforme descrito por Bailey (1998), o termo “segregado” indica a presença de indivíduos heterogêneos na população de células. Já o termo “estruturado” é usado para designar uma formulação em que o material celular é composto por múltiplos componentes químicos. As quatro diferentes combinações de segregação e estrutura (ou suas ausências), conforme mostrado na Figura 1.4, dividem os tipos mais comuns de descrições matemáticas e experimentos em quatro categorias.

De acordo com a Figura 1.4, conclui-se que um elemento importante da modelagem matemática de processos fermentativos é a definição da complexidade do modelo. Na seção a seguir, são apresentados os principais modelos desenvolvidos para descrever processos fermentativos, tanto para substratos simples quanto para substratos com múltiplas fontes de carbono.

Figura 1.4 Diferentes tipos de classificações para representações matemáticas de populações de células.



FONTE: Bailey (1998) (adaptado).

1.4.2 Modelos matemáticos não-estruturados

Para que a cinética de um processo de fermentação seja determinada, é necessário, inicialmente, estudar a evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de reação. Considerando um processo operado em modo batelada, as equações de balanço de massa são dadas pelas Equações 1.1-1.4.

- Células viáveis: $\frac{dX}{dt} = r_X - r_d$ (1.1)

- Células mortas: $\frac{dX_d}{dt} = r_d$ (1.2)

- Substrato: $\frac{dS}{dt} = -r_S$ (1.3)

- Produto: $\frac{dP}{dt} = r_P$ (1.4)

Onde X , X_d , S e P representam as concentrações de células viáveis, células mortas, substrato e produto, respectivamente; r_X , r_d , r_S e r_P representam as velocidades de crescimento celular, de morte celular, de consumo de substrato e de

formação de produto, respectivamente; e t representa o tempo. A relação entre as velocidades de consumo e formação e as respectivas velocidades específicas é dada pelas Equações 1.5 a 1.8.

- Velocidade específica de crescimento celular: $\mu = \frac{1}{X} \cdot r_X$ (1.5)

- Velocidade específica de morte celular: $\mu_d = \frac{1}{X} \cdot r_d$ (1.6)

- Velocidade específica de consumo de substrato: $\sigma = \frac{1}{X} \cdot r_S$ (1.7)

- Velocidade específica de formação de produto: $\pi = \frac{1}{X} \cdot r_P$ (1.8)

Onde μ , μ_d , σ e π representam as velocidades específicas de crescimento celular, de morte celular, de consumo de substrato e de formação de produto, respectivamente. Na literatura, existem vários modelos para descrição das taxas cinéticas. Para o crescimento microbiano, o de Monod (1942) é o mais comumente utilizado, o qual estabelece uma relação entre velocidade específica de crescimento do microrganismo e a concentração de substrato (Equação 1.9)

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{(K_S + S)} \quad (1.9)$$

Onde μ_{max} representa a velocidade específica máxima de crescimento celular e K_S a concentração de substrato em que a velocidade específica de crescimento celular é metade da máxima. Analogamente, esse modelo pode ser descrito para descrever a formação de produto (Equação 1.10)

$$\pi = \pi_{max} \frac{S}{(K_S' + S)} \quad (1.10)$$

Onde π_{max} representa a velocidade específica máxima de formação de produto e K_S' a concentração de substrato em que a velocidade específica de formação de produto é metade da máxima. Esses modelos não levam em consideração o efeito da inibição do crescimento celular ou da formação de produto por substrato, mas apenas o mesmo como limitante. Além disso, outros efeitos

também podem ocorrer, como inibição pelo próprio produto, pela concentração celular e por compostos inibitórios.

Dentre os trabalhos encontrados na literatura envolvendo a determinação de parâmetros cinéticos de fermentação alcoólica pela aplicação de modelos matemáticos, o trabalho de Andrade *et al.* (2007) propôs um modelo para simular os efeitos da temperatura no crescimento e na produção de etanol por *S. cerevisiae*, no contexto de produção de etanol de primeira geração (1G). Nesse trabalho, os experimentos foram realizados em uma ampla faixa de temperatura (30 a 38 °C), com o objetivo de se estimar os parâmetros dependentes dessa variável. As equações utilizadas no modelo para descrever o crescimento celular, a formação de produto e o consumo de substrato são apresentadas na Tabela 1.6. Como pode ser observado, o modelo proposto para descrever o crescimento celular incluiu os termos de inibição por produto, substrato e biomassa. Já para a formação de produto, foi utilizada a equação de Luedeking–Piret (Luedeking & Piret, 1959), onde o termo $Y_{P/X} \mu$ corresponde à produção de etanol associada ao crescimento e o parâmetro m_p à produção não-associada ao crescimento. Dentre os 11 parâmetros do modelo, foi identificado que μ_{max} , X_{max} , P_{max} , $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ eram dependentes da temperatura, os quais foram ajustados em função da temperatura por uma equação dupla de Arrhenius, com um coeficiente de determinação (r^2) superior a 0,997. Vale ressaltar que X_{max} e P_{max} (g/L) correspondem às concentrações de biomassa celular e de produto em que o crescimento celular é interrompido, respectivamente, e $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ (g/L) correspondem aos fatores de conversão de substrato em célula e em produto, respectivamente. Ao final, o modelo representou satisfatoriamente o sistema de fermentação investigado, com desvio padrão residual (RSD – *residual standard deviation*, em inglês) médio de 11 % para a condição de validação do modelo, na temperatura de 34 °C.

Phisalaphong *et al.* (2006) também desenvolveram um modelo matemático para descrever os efeitos da temperatura nos parâmetros cinéticos para a levedura floculante *S. cerevisiae* M30, utilizando melaço de cana-de-açúcar como substrato. As equações também são apresentadas na Tabela 1.6. Assim como no trabalho de Andrade *et al.* (2007), os autores incluíram os termos de inibição por substrato e produto, tanto na expressão para o crescimento celular quanto para a produção de

etanol. Dos parâmetros do modelo, μ_{max} , π_{max} e μ_d foram ajustados em função da temperatura por uma equação simples de Arrhenius.

Já dentre os trabalhos no contexto de fermentação de pentoses, o trabalho de Farias *et al.* (2014) focou na determinação da cinética de produção de etanol em substrato composto apenas por xilose para a levedura não-convencional *S. stipitis*. Nesse caso, os experimentos foram realizados em sistemas de batelada e contínuo, à temperatura de 28 °C, com concentrações iniciais de xilose variando de 7,2 a 145 g/L, em que os autores puderam verificar a presença de efeitos inibitórios causados por altas concentrações de substrato no crescimento celular, no consumo de substrato e na produção de etanol, conforme mostrado nas equações apresentadas na Tabela 1.6. Além disso, em fermentações em modo contínuo com variação da velocidade específica de alimentação (D), foi possível avaliar o efeito de inibição causado por altas concentrações de etanol. Assim como no trabalho de Andrade *et al.* (2014), a equação de Luedeking–Piret foi utilizada para descrever a produção de etanol. Ao final, os autores verificaram que o modelo proposto descreveu satisfatoriamente a produção de etanol a partir de um substrato rico em xilose para a levedura *S. stipitis*, com um RSD médio de 11,85 % para as condições de validação do modelo.

Entretanto, os modelos citados foram propostos para a presença de uma única fonte de carbono no meio. Sendo assim, considerando a presença de duas fontes de carbono no meio de cultura, o trabalho de Krishnan *et al.* (1999) estudou os parâmetros cinéticos relativos à produção de etanol a partir de substrato composto por glicose e xilose, utilizando uma linhagem modificada de *S. cerevisiae*. Foi possível estabelecer expressões cinéticas para crescimento celular e produção de etanol para cada uma das fontes de carbono, bem como para a mistura das mesmas (Tabela 1.6). Como pode ser observado, no caso do crescimento celular, as concentrações individuais de cada açúcar no meio influenciam na velocidade final de crescimento, ou seja, quanto maior a proporção de um dos açúcares no meio, maior o termo referente ao crescimento causado pelo consumo desse açúcar. Além disso, o modelo também incorporou os efeitos da inibição por substrato e inibição por produto.

Em outro trabalho utilizando substrato misto, Kwon & Engler (2005) realizaram experimentos para obter dados cinéticos da produção de etanol a partir de uma mistura de glicose, xilose e celobiose, utilizando o microrganismo *Candida lusitanaeae*. Quanto ao crescimento celular, os autores puderam observar o efeito de

repressão por glicose tanto no consumo de xilose quanto no de celobiose. Entretanto, xilose e celobiose foram consumidas simultaneamente após exaustão da glicose, conforme também observado por Long *et al.* (2012). Sendo assim, termos de repressão por glicose foram incluídos nas expressões para o crescimento celular causado pelo consumo de xilose ou celobiose. Nesse caso, os termos R_{xil} , R_{cel} e n representam o efeito de repressão por glicose nos consumos de xilose e celobiose, respectivamente.

Considerando o consumo de substratos (σ) diferentes expressões foram propostas, as quais levam em consideração o consumo de substrato para formação de produto ($\pi/Y_{P/S}$), para crescimento celular ($\mu/Y_{X/S}$) e a velocidade específica de consumo de substrato para manutenção celular (m_X), conforme apresentado na Tabela 1.6.

Tabela 1.6 Modelos cinéticos não-estruturados para fermentações com substratos simples e substratos mistos.

| Microrganismo | Células | Produto | Substrato | Referência |
|--|--|---|--|-----------------------------------|
| Substrato | | | | |
| <i>S. cerevisiae</i> Melaço de cana | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} \exp(-K_I S) \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^\alpha \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right)^\beta$ | $\pi = Y_{P/X} \mu + m_P$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_X$ | Andrade <i>et al.</i> (2007) |
| <i>S. cerevisiae</i> Melaço de cana | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$ | $\pi = \pi_{max} \frac{S}{S + K_s' + \left(\frac{S^2}{K_I'}\right)} \left(1 - \frac{P}{P'_{max}}\right)$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}} + m_X$ | Phisalaphong <i>et al.</i> (2006) |
| <i>S. stipitis</i> Xilose | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^\alpha$ | $\pi = Y_{P/X} \mu + m_P$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_X$ | Farias <i>et al.</i> (2014) |
| <i>S. cerevisiae</i> Glicose e xilose | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I}\right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)^\alpha$ $\mu_{Mix} = \left(\frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + S_{Xyl}} \mu_{Glu} + \frac{S_{Xyl}}{S_{Glu} + S_{Xyl}} \mu_{Xyl} \right)$ | $\pi = \pi_{max} \frac{S}{S + K_s' + \left(\frac{S^2}{K_I'}\right)} \left(1 - \frac{P}{P'_{max}}\right)^{\alpha'}$ $\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Xyl}$ | $\sigma = \frac{\pi}{Y_{P/S}} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_X$ | Krishnan <i>et al.</i> (1999) |
| <i>C. lusitanaeae</i> Glicose, celobiose e xilose | $\mu_{Glu} = \mu_{Glu,max} \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K_{S,Glu}}$ $\mu_{Cel} = \left[\mu_{Cel,max} \frac{S_{Cel}}{S_{Cel} + K_{S,Cel}} \right] \left[\frac{1}{1 + R_{Cel} S_{Glu}^n} \right]$ $\mu_{Xyl} = \left[\mu_{Xyl,max} \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K_{S,Xyl}} \right] \left[\frac{1}{1 + R_{Xyl} S_{Glu}^n} \right]$ $\mu_{Mix} = \mu_{Glu} + \mu_{Cel} + \mu_{Xyl}$ | $\pi_{Glu} = Y_{P/X} \mu_{Glu}$ $\pi_{Cel} = Y_{P/X} \mu_{Cel}$ $\pi_{Xyl} = Y_{P/X} \mu_{Xyl}$ $\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Cel} + \pi_{Xyl}$ | $\sigma_{Glu} = \frac{\mu_{Glu}}{Y_{X/Glu}}$ $\sigma_{Cel} = \frac{\mu_{Cel}}{Y_{X/Cel}}$ $\sigma_{Xyl} = \frac{\mu_{Xyl}}{Y_{X/Xyl}}$ | Kwon & Engler (2005) |

CAPÍTULO 2: DESENVOLVIMENTO DE MODELO MATEMÁTICO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SUBSTRATO MISTO DE XILOSE E GLICOSE SOB ALTA DENSIDADE CELULAR PARA AS LEVEDURAS *S. stipitis* E *S. passalidarum*

Neste capítulo, são discutidos os resultados de fermentações em diferentes temperaturas para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, com uma comparação do desempenho fermentativo alcançado pelos dois microrganismos. A partir de experimentos em batelada sob a estratégia de alta densidade celular, utilizando um meio sintético composto por xilose e glicose, foi proposto um modelo cinético em função da temperatura para descrever crescimento celular, produção de etanol e consumos de xilose e glicose nas condições empregadas. Considerando a levedura *S. passalidarum*, o modelo foi otimizado e validado na faixa de temperatura estudada, sendo possível a estimação dos parâmetros cinéticos que compõem as equações propostas, bem como a determinação da melhor temperatura para otimizar a produção de etanol. Parte dos resultados descritos foi submetida em forma de artigo para a revista *Biochemical Engineering Journal*, sob o título “*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 NRRL Y-27907*”. Vale ressaltar que toda a parte experimental, assim como a proposição do modelo matemático e a estimação inicial dos parâmetros, foi realizada dentro deste trabalho de tese, enquanto a estimação dos parâmetros pelo método de evolução diferencial foi realizado em parceria com o aluno de doutorado Fernán David Martínez-Jimenez.

2.1 INTRODUÇÃO

A baixa robustez nos processos de fermentação devido a flutuações nas condições operacionais, seja devido a mudanças na qualidade da matéria-prima, diferentes microrganismos, desvios de temperatura, contaminação, entre outros, pode deslocar o processo das condições operacionais ideais. Sendo assim, podem ocorrer mudanças no comportamento cinético, o que, por consequência, impactam em viabilidade celular, rendimento, produtividade e conversão de substrato (Andrade *et al.*, 2007). Equilibrar todos os fatores que influenciam o processo não é intuitivo e pode resultar em baixa produtividade. É neste cenário que a modelagem matemática ganha importância, reduzindo os custos de produção e eliminando trabalho experimental desnecessário.

Diferentes abordagens matemáticas podem descrever o processo de fermentação, as quais são escritas através do balanço de massa e de equações cinéticas, resultando em um sistema determinístico não-linear de equações diferenciais ordinárias (ODE – *ordinary differential equations*, em inglês), o qual descreve o processo de forma quantitativa e prevê a resposta frente a diferentes *inputs* (Costa *et al.*, 2015). No entanto, a complexidade da solução da abordagem escolhida dependerá da configuração do sistema, do modelo cinético e do número de parâmetros do modelo. Esses parâmetros podem ser determinados simultaneamente de maneira indutiva, usando as informações implícitas a partir de medições experimentais das fermentações (como concentrações de células, substratos e produtos) e através de métodos de estimativa de parâmetros (Almquist *et al.*, 2014).

Em se tratando de processos fermentativos, a temperatura é uma variável de suma importância, pois é um parâmetro difícil de ser controlado em processos industriais em larga escala devido ao tamanho dos tanques de fermentação e à dinâmica do processo. A fermentação é um processo exotérmico e a reação pode ser alterada das condições ideais por desvios na temperatura (Andrade *et al.*, 2007).

Considerando leveduras consumidoras de pentose, o trabalho de Farias *et al.* (2014) e Slininger *et al.* (2014) propuseram avaliações de parâmetros cinéticos usando *S. stipitis* e xilose como única fonte de carbono para a produção de etanol. Nos dois trabalhos, porém, a temperatura foi mantida constante em todas as fermentações. Em outro estudo, Santos *et al.* (2015) avaliaram a produção de etanol por *S. stipitis* em presença de dois substratos (xilose e glicose) aplicando

fermentações em batelada com reciclo de células, a 25 e 30 °C. Segundo os autores, as maiores concentrações de etanol, rendimento e produtividade foram obtidas a 30 °C. No entanto, não foi realizado um trabalho de modelagem matemática para relacionar a melhoria no desempenho fermentativo por meio da avaliação de parâmetros cinéticos frente a alterações na temperatura.

Quanto à levedura *S. passalidarum*, até o momento não existem trabalhos publicados sobre modelagem matemática para produção de etanol. Considerando o potencial desse microrganismo para a produção de etanol a partir de açúcares lignocelulósicos já comprovados em trabalhos anteriores (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012; Nakanishi *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2015), o desenvolvimento de um modelo cinético torna-se importante para suportar o planejamento e a otimização de futuras aplicações no âmbito da produção de etanol de segunda geração.

Portanto, neste trabalho, um modelo matemático não-estruturado e não-segregado em função da temperatura foi desenvolvido para fermentações em batelada de uma mistura de glicose e xilose para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, com o objetivo compreender a cinética de consumo dos açúcares, do crescimento celular e da produção de etanol em função da temperatura. As fermentações foram realizadas sob a estratégia de alta densidade celular. Além disso, foi empregada uma condição de limitação de oxigênio, pois, assim como reportado em trabalhos anteriores da literatura, a produção de etanol para ambas as leveduras é favorecida em condições microaerofílicas (Bonan *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2015; Hou, 2012).

O modelo foi otimizado e validado na faixa de temperatura de 26 a 32 °C para *S. passalidarum*, tendo em visto o melhor desempenho desta levedura quando comparada a *S. stipitis* nas condições empregadas no presente estudo. Vale destacar que, nessa etapa do projeto, as fermentações foram realizadas utilizando um substrato sintético, para evitar a influência de outros compostos presentes em hidrolisados lignocelulósicos que pudessem afetar a estimação dos parâmetros cinéticos do processo fermentativo investigado.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Microrganismos, pré-inóculo e inóculo

As leveduras utilizadas nesse trabalho foram as linhagens nativas *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907, mantidas em estoque a -80 °C e transferidas para frascos *Erlenmeyer* de 250 mL contendo 100 mL de meio YPDX (Santos *et al.*, 2015). Os frascos foram incubados em *shaker* (New Brunswick™ Innova® 44) por 24 h, a 30 °C e 200 rpm. Depois desse período, 10 % (v/v) do pré-inóculo foi transferido para o meio de inoculação composto por (g/L): xilose (12,0), glicose (1,32), ureia (2,3), extrato de levedura (3,0) e MgSO₄.7H₂O (1,0) (adaptado de Silva *et al.* (2012)). Os frascos de inoculação tiveram volume total de 1000 mL, com 250 mL de volume de trabalho, e foram mantidos a 30 °C e 200 rpm, por um período de 24 h em *shaker* (New Brunswick™ Innova® 44).

2.2.2 Propagação celular

Após o tempo de inóculo, todo volume foi centrifugado a 11970 ×g, a 4 °C por 20 min, e as células foram ressuspendidas em água de torneira estéril, sendo que o volume total representou 10 % do volume inicial do biorreator para a propagação. As células foram transferidas para um biorreator de bancada de 7 L (New Brunswick™ BioFlo® 115), com 4 L de volume de trabalho, contendo um meio composto por (g/L): xarope de cana-de-açúcar (45,0), ureia (5,0) e KH₂PO₄ (2,0) (baseado em Santos *et al.* (2016)).

A propagação celular foi dividida em dois estágios, conforme metodologia descrita por Santos *et al.* (2016): inicialmente, uma fermentação em modo batelada com duração de 8 h foi conduzida para promover o crescimento exponencial do microrganismo, seguida por um crescimento linear com limitação da fonte de carbono em modo batelada alimentada, totalizando 24 h de propagação. No início da propagação, a concentração celular era de 2 g/L e as condições de aeração e agitação eram, respectivamente, 0,1 vvm e 200 rpm. Ao longo da etapa de propagação, os valores de agitação e aeração foram automaticamente controlados para manter o oxigênio dissolvido em 50 % de saturação em relação ao ar atmosférico, uma vez que, para as leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis*, o crescimento é favorecido por condições completamente aeróbicas. A temperatura foi mantida em 30 °C.

Durante a fase de crescimento linear, uma alimentação constante de xarope de cana-de-açúcar foi estabelecida a uma velocidade de 3,0 g_{AR}/L.h (Santos *et al.*, 2016). Entre as fases de crescimento exponencial e linear, foi realizado um pulso de ureia e KH₂PO₄ nas concentrações de 3,0 e 1,0 g/L, respectivamente (Santos *et al.*, 2015). No final da propagação, o cultivo foi submetido a centrifugação em condições estéreis a 11970 xg, por 20 min a 4 °C, e as células ressuspendidas em água destilada estéril. O creme de levedura foi então estocado a 4 °C para ser usado nas fermentações subsequentes. Esse procedimento foi realizado para ambas as leveduras.

2.2.3 Fermentações em batelada em diferentes temperaturas

Inicialmente, foram realizadas cinco fermentações em modo batelada em duplicata em diferentes temperaturas (26, 27, 28, 30 e 32 °C) para investigar a produção de etanol por *S. stipitis* e *S. passalidarum*. Os experimentos foram realizados em reatores BioFlo® 115 1,4 L (New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, NJ), com o controle de temperatura realizado pelo controlador interno do biorreator, sendo que não houve variação superior a $\pm 0,1$ °C. Esse conjunto de temperaturas foi selecionado a partir de um trabalho anterior do grupo de pesquisa (Santos *et al.*, 2016). Nesse trabalho, cinco fermentações sucessivas em batelada com reciclo de células foram executadas sob duas estratégias de temperatura: uma estratégia consistiu em manter a temperatura fixa em 30 °C em todos os ciclos, enquanto que a outra consistiu em diminuir a temperatura em 1 °C a cada ciclo, iniciando em 30 °C e finalizando em 26 °C. Os autores observaram que o decréscimo de temperatura resultou em um melhor desempenho da levedura utilizada no estudo (*S. stipitis*).

As fermentações foram conduzidas com 900 mL de volume de operação, contendo o inóculo obtido através do protocolo de propagação (seção 2.2.2). Os meios utilizados para ambas as leveduras estão mostrados na Tabela 2.1, com a faixa de concentração inicial para cada uma das fontes de carbono.

Tabela 2.1 Composição dos meios de fermentação para produção de etanol a partir de xilose e glicose por *S. stipitis* e *S. passalidarum* (baseado em Santos *et al.*, 2015).

| Componentes | Concentração (g/L) | |
|--------------------------------------|------------------------|--------------------|
| | <i>S. passalidarum</i> | <i>S. stipitis</i> |
| Glicose | 25,66 – 28,73 | 22,46 – 29,83 |
| Xilose | 63,30 – 73,04 | 54,55 – 66,81 |
| Extrato de Levedura | 3,0 | 3,0 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,0 | 1,0 |
| Ureia | 2,3 | 2,3 |

O meio estéril foi transferido para o biorreator estéril (xilose e glicose foram esterilizadas a 111 °C, 15 min e demais nutrientes a 121 °C, 20 min), o qual foi inoculado com uma concentração em torno de 20 g/L de levedura. A estratégia de alta densidade celular é amplamente utilizada nas usinas de etanol de primeira geração, promovendo maiores produtividades e velocidades específicas de consumo e produção (Brethauer & Wyman, 2010).

Durante as fermentações, a agitação foi mantida em 200 rpm e a aeração em 0,1 vvm, correspondendo a um k_{La} de, aproximadamente, 8 h^{-1} , determinado conforme protocolo descrito em Silva *et al.* (2012). Diferentemente do protocolo de propagação celular, o qual exigia uma condição de completa aerobiose para promover o crescimento celular, as fermentações com foco na produção de etanol foram realizadas em condições de limitação de oxigênio, baseado em trabalhos anteriores da literatura e em resultados prévios do grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2015). As fermentações foram monitoradas por 48 h, com amostragens a cada 4h.

2.2.4 Metodologia analítica

Concentrações de levedura foram medidas por análises gravimétricas em triplicata, onde 1,5 mL de cada amostra foram submetidos a centrifugação (15871 xg por 5 minutos), sendo ressuspensas duas vezes em água destilada e encaminhadas a estufa a 80 °C. A viabilidade celular foi determinada através de microscopia óptica com lente objetiva de 40X, considerando células viáveis e não-viáveis. A contagem foi

efetuada por câmara de Neubauer e azul de metileno foi usado para diferenciar células vivas das mortas.

Análises de glicose, xilose e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, USA). Amostras foram filtradas através de um filtro de PVDF Millex 22 μm e o filtrado foi injetado no sistema HPLC. Compostos foram separados com Aminex HPX 87H (300 \times 7,8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA) a 35 $^{\circ}\text{C}$ usando H_2SO_4 5 mM como fase móvel a uma taxa de 0,6 mL/min.

2.2.5 Cálculo de parâmetros de fermentação

Os parâmetros de fermentação foram calculados para avaliar o desempenho das leveduras *S. stipitis* e *S. passalidarum* na produção de etanol. O rendimento (η , %) de cada fermentação é dado pela Equação 2.1. A produtividade volumétrica do etanol (Q_P , g/L.h) foi calculada de acordo com a Equação 2.2. Fatores de conversão (observáveis) de açúcares redutores em etanol ($Y_{P/S}$, g/g) e em biomassa celular ($Y_{X/S}$, g/g) foram calculados de acordo com as Equações 2.3 e 2.4, respectivamente.

$$\eta = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \cdot \frac{100}{0,511} \quad (2.1)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (2.2)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad (2.3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S_f} \quad (2.4)$$

Onde o valor 0,511 g/g representa o rendimento estequiométrico das fontes de carbono (glicose e xilose) em etanol.

2.2.6 Análise estatística

Os parâmetros cinéticos descritos acima foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o *software* Statistica.

2.2.7 Modelagem matemática e estimação dos parâmetros

O modelo cinético dependente da temperatura para descrever a formação de etanol a partir de xilose e glicose foi desenvolvido com base nas observações experimentais das fermentações em batelada descritas anteriormente. Os processos de otimização do modelo foram realizados usando Python 3.6, em colaboração com o aluno Fernan David Martínez-Jimenez. No caso da levedura *S. passalidarum*, para a calibração do modelo, foram utilizadas as temperaturas de 26, 27, 30 e 32 °C, deixando a temperatura de 28 °C para executar a validação do modelo. O modelo cinético desenvolvido neste estudo é apresentado na seção 2.3.2.

Para fermentações operando em modo batelada, o balanço de massa para biomassa celular, substratos (nesse caso, glicose e xilose) e etanol podem ser escritos conforme mostrado nas Equações 2.5-2.8, respectivamente.

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (2.5)$$

$$\frac{dS_{Glu}}{dt} = -r_{Glu} \quad (2.6)$$

$$\frac{dS_{Xyl}}{dt} = -r_{Xyl} \quad (2.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (2.8)$$

Onde r_X , r_{Glu} , r_{Xyl} e r_P (g/L.h) representam as velocidades de crescimento celular, consumo de glicose, consumo de xilose e produção de etanol, respectivamente.

A equação do tipo Arrhenius (Equação 2.9) foi usada para descrever a influência da temperatura nos parâmetros cinéticos. Diferentes estudos mostraram que as equações do tipo Arrhenius descrevem a relação entre parâmetros cinéticos e a temperatura para leveduras utilizadas na produção de etanol (Andrade *et al.*, 2009, 2007; Rivera *et al.*, 2007; Phisalaphong *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2017; Szeifert *et al.*, 1995; Unrean, 2016).

$$\text{Parâmetro}(T) = A \cdot e^{\frac{-B}{T}} \quad (2.9)$$

O algoritmo de evolução diferencial (NumFocus, 2019), proposto por Storn & Price (1997), foi utilizado para determinar o melhor conjunto de parâmetros cinéticos que descrevem o processo de fermentação. Este tipo de algoritmo é eficiente para resolver problemas de determinação paramétrica, pois usam métodos estocásticos, são capazes de analisar espaços descontínuos e podem migrar de mínimos locais para globais (Dragoi & Curteanu, 2016). Esta etapa foi realizada como parte da tese de doutorado do aluno Fernan David Martínez-Jimenez.

A Equação 2.10 descreve a função objetivo utilizada. Funções deste tipo já foram aplicadas em outras pesquisas (Andrade *et al.*, 2007; Rivera *et al.*, 2017, 2006). A função usada nesta pesquisa calcula a diferença adimensional entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais. Além disso, já leva em consideração a influência da temperatura entre os experimentos através da inclusão e determinação das constantes da equação de Arrhenius (Equação 2.9) para cada parâmetro cinético dependente da temperatura.

$$F_{objective}(\phi) = \sum_{j=T_0}^{j=T_f} \left(\sum_{k=k_0}^{k=k_f} \sum_{i=t_0}^{i=t_f} \left(\frac{y_k(t_i) - \bar{y}_k(t_i)}{y_{max}} \right)^2 \right)_j \quad (2.10)$$

Onde y e \bar{y} são os valores experimentais e preditos, respectivamente; i é o vetor do tempo; k é o vetor de variáveis analisadas ($k = [\text{Célula}, \text{Glicose}, \text{Xilose}, \text{Etanol}]$); e j é o vetor de temperatura. Esta etapa foi realizada como parte da tese de doutorado do aluno Fernan David Martínez-Jimenez.

Para avaliar a previsão do modelo, o coeficiente de correlação de Pearson (r^2) e a raiz do erro quadrático médio (RMSE - *root-mean-squared error*, em inglês) (Equação 2.11) foram calculados.

$$RMSE = \sqrt{\left(\sum_{i=t_0}^{i=t_f} (y(t_i) - \bar{y}(t_i))^2 \right) \left(\frac{1}{n_p} \right)} \quad (2.11)$$

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Perfis de concentrações de glicose, xilose, etanol e biomassa celular para as fermentações em diferentes temperaturas com *S. stipitis* e *S. passalidarum*

A Figura 2.1 mostra os perfis das concentrações de xilose, glicose, células e etanol para as fermentações com a levedura *S. passalidarum* (26, 27, 28, 30 e 32 °C) e com *S. stipitis* (27, 28, 30 e 32 °C), sob uma condição de limitação de oxigênio ($k_{La} = 8,0 \text{ h}^{-1}$). Para a levedura *S. stipitis*, a fermentação a 26 °C apresentou problemas, impossibilitando a comparação com as outras temperaturas, sendo, então, excluída da análise.

Os perfis são semelhantes para todas as temperaturas consideradas. Para ambas as leveduras, houve um consumo preferencial de glicose, que foi completamente esgotado nas primeiras 12 h de fermentação para todos os casos. A assimilação da xilose foi afetada pela presença de glicose, uma vez que esse açúcar começou a ser consumido de forma significativa após ter sido atingida uma baixa concentração de glicose no meio (entre 8 e 12 h de processo). Esse consumo sequencial é característico da repressão por glicose e já foi relatada como característica de *S. passalidarum* em outros trabalhos (Hou, 2012; Su *et al.*, 2015), bem como para *S. stipitis* (Bonan *et al.*, 2019; Nakanishi *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2015). No caso de *S. passalidarum*, a xilose foi esgotada em menos de 48 h em todas as fermentações. Já para *S. stipitis*, esse tempo não foi suficiente para completa exaustão do substrato. Em todos os casos, apenas um ligeiro crescimento celular foi observado, mais pronunciado durante a fase de consumo de glicose.

A tabela 2.2 mostra os parâmetros de fermentação (calculados a partir das Equações 2.1 a 2.4) para cada temperatura, para ambos os microrganismos. Devido ao consumo sequencial de açúcares previamente destacado, os fatores de conversão foram calculados separadamente para glicose e xilose. Sob a condição de limitação de oxigênio aplicada, o metabolismo das leveduras favoreceu a produção de etanol, atingindo concentrações de $33,40 \pm 0,15$ a $37,07 \pm 0,09$ g/L para *S. passalidarum* e de $23,74 \pm 0,17$ a $34,50 \pm 0,05$ g/L para *S. stipitis*. Como pode ser observado através dos valores de fatores de conversão em etanol ($Y_{P/S}$) e células ($Y_{X/S}$), o açúcar consumido foi praticamente todo direcionado para a rota fermentativa em detrimento da via oxidativa, com valores de $Y_{P/S}$ muito superiores a $Y_{X/S}$. Observa-se que, no caso da xilose, o crescimento celular chegou a ser nulo em algumas condições.

Figura 2.1 Concentrações de biomassa celular, glicose, xilose e etanol observadas experimentalmente nas temperaturas estudadas para *S. passalidarum* (a) 26; (b) 27; (c) 28; (d) 30; (e) 32 °C; e para *S. stipitis* (f) 27; (g) 28; (h) 30; (i) 32 °C.

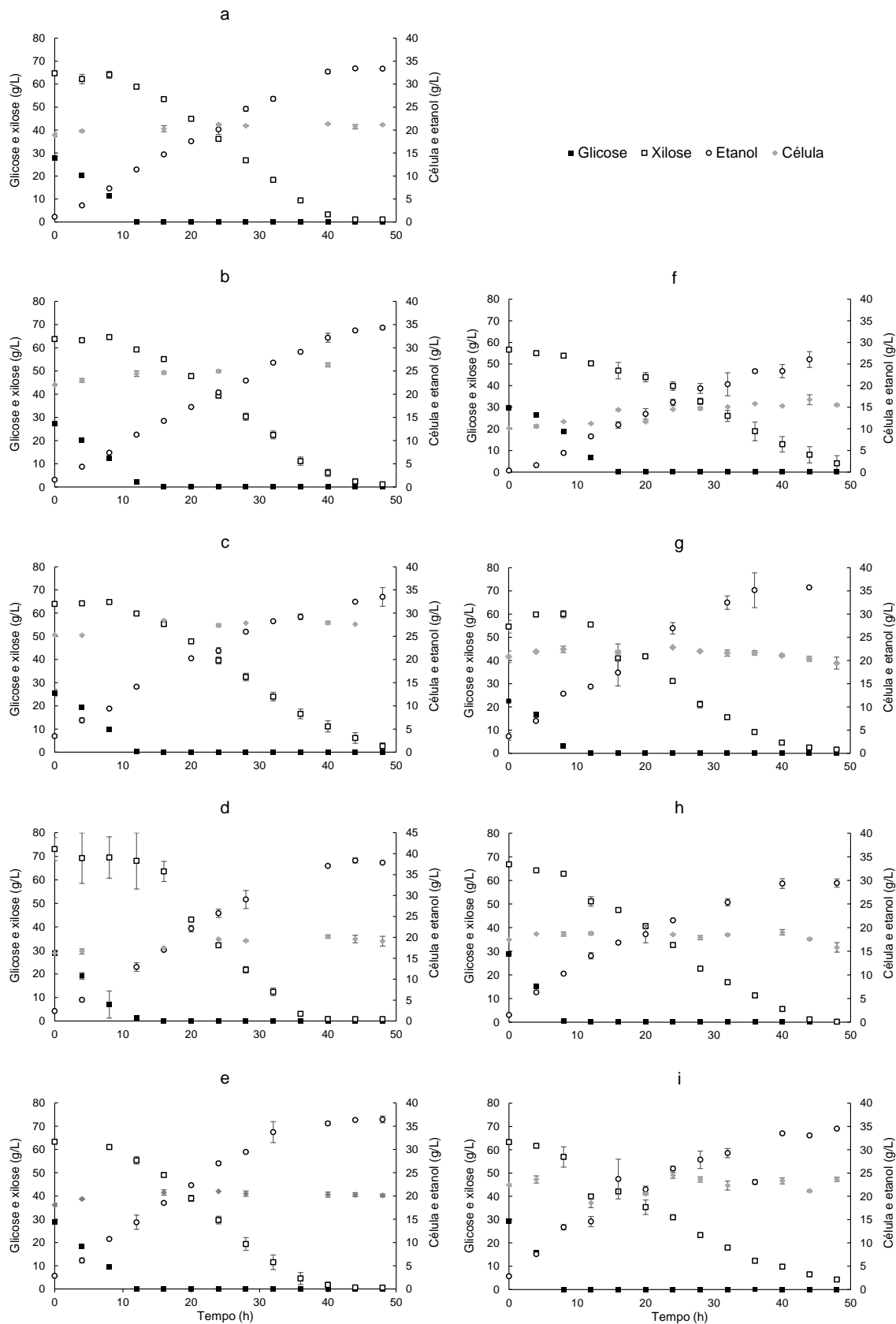


Tabela 2.2 Parâmetros obtidos experimentalmente para as fermentações com *S. passalidarum* e *S. stipitis* nas diferentes temperaturas estudadas.

| | Temperatura °C | Tempo h | Etanol g/L | Rendimento % | Produtividade g/L.h | $Y_{X/Glu}$ g/g | $Y_{X/Xyl}$ g/g | $Y_{P/Glu}$ g/g | $Y_{P/Xyl}$ g/g |
|------------------------|-------------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| <i>S. passalidarum</i> | 26 | 44 | 33,40 ± 0,15 | 69,05 ± 0,05 | 0,73 ± 0,00 | 0,05 ± 0,04 | 0,01 ± 0,01 | 0,37 ± 0,01 | 0,41 ± 0,01 |
| | 27 | 48 | 34,33 ± 0,34 | 71,27 ± 0,89 | 0,68 ± 0,01 | 0,10 ± 0,00 | 0,03 ± 0,00 | 0,39 ± 0,00 | 0,42 ± 0,01 |
| | 28 | 48 | 33,51 ± 2,03 | 67,44 ± 2,84 | 0,63 ± 0,04 | 0,12 ± 0,02 | 0,00 ± 0,00 | 0,42 ± 0,04 | 0,39 ± 0,02 |
| | 30 | 40 | 37,07 ± 0,09 | 67,41 ± 3,19 | 0,87 ± 0,00 | 0,04 ± 0,00 | 0,04 ± 0,01 | 0,39 ± 0,04 | 0,37 ± 0,08 |
| | 32 | 44 | 36,34 ± 0,03 | 72,04 ± 0,41 | 0,76 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,00 ± 0,00 | 0,40 ± 0,04 | 0,42 ± 0,01 |
| <i>S. stipitis</i> | 27 | 48 ⁺ | 23,74 ± 0,17 | 55,65 ± 1,98 | 0,49 ± 0,00 | 0,14 ± 0,01 | 0,09 ± 0,01 | 0,35 ± 0,03 | 0,34 ± 0,03 |
| | 28 | 48 | 32,04 ± 1,30 | 73,77 ± 4,71 | 0,59 ± 0,02 | 0,08 ± 0,03 | 0,00 ± 0,00 | 0,48 ± 0,04 | 0,33 ± 0,00 |
| | 30 | 48 | 29,43 ± 0,88 | 57,13 ± 1,65 | 0,58 ± 0,02 | 0,04 ± 0,02 | 0,00 ± 0,00 | 0,31 ± 0,01 | 0,31 ± 0,02 |
| | 32 | 48 ⁺ | 34,50 ± 0,05 | 70,33 ± 0,04 | 0,66 ± 0,00 | 0,04 ± 0,04 | 0,00 ± 0,00 | 0,36 ± 0,02 | 0,40 ± 0,02 |

⁺48+ significa que 48 h não foram suficientes para completa exaustão das fontes de carbono.

Para o caso da levedura *S. passalidarum*, o rendimento total permaneceu entre $67,41 \pm 3,19$ e $72,04 \pm 0,41$ %. O teste de Tukey concluiu que, a um nível de confiança de 95 %, não houve diferença em termos de rendimento de etanol para todas as temperaturas avaliadas. Os valores de produtividade volumétrica (Q_p) variaram de $0,63 \pm 0,04$ a $0,87 \pm 0,00$ g/L.h. O teste de Tukey mostrou que, no nível de confiança de 95 %, as fermentações a 30 e 32 °C apresentaram valores estatisticamente similares de Q_p , correspondendo aos maiores valores obtidos experimentalmente.

Já para a levedura *S. stipitis*, o rendimento total permaneceu entre $55,65 \pm 1,98$ e $73,77 \pm 4,71$ % e os valores de produtividade volumétrica (Q_p) variaram de $0,49 \pm 0,01$ g/L.h a $0,66 \pm 0,00$ g/L.h. Como pode ser observado, os maiores valores de produtividade foram obtidos com a levedura *S. passalidarum*, reflexo do menor tempo requerido por esse microrganismo para completa exaustão das fontes de carbono e das maiores concentrações de etanol obtidas ao final do processo. Sendo assim, *S. passalidarum* foi selecionada para dar continuidade ao desenvolvimento do modelo matemático e estimação dos parâmetros cinéticos em função da temperatura, como discutido nas próximas seções.

2.3.2 Desenvolvimento do modelo matemático

A partir dos perfis de concentração obtidos para cada temperatura, um modelo não-estruturado e não-segregado foi desenvolvido para a fermentação em batelada da mistura de glicose e xilose. Algumas considerações foram feitas na definição do conjunto de equações cinéticas, tanto a partir de observações experimentais como a partir da avaliação de diferentes termos nas equações propostas, como termos referentes à inibição. Sendo assim, as considerações foram:

- Consumo preferencial de glicose, caracterizando a repressão por glicose;
- Não houve a necessidade da inclusão de um termo para representar morte celular, uma vez que a viabilidade celular foi próxima a 100 % em todas as fermentações (dados não apresentados);

- Diferentes termos de inibição foram avaliados (inibição por célula, por produto e por substrato), resultando em pior ajuste do modelo aos dados experimentais. Sendo assim, não houve inclusão de termos de inibição;
- Consumo de açúcar principalmente direcionado para a produção de etanol, com baixo ou nulo crescimento celular, especialmente durante o consumo de xilose, tendo em vista as condições empregadas nos experimentos (limitação de oxigênio e alta densidade celular).

Devido à presença de dois substratos no meio, o crescimento celular foi dividido entre o crescimento celular causado por glicose ou por xilose. Para glicose, uma equação de Monod simples foi suficiente para ajustar os dados experimentais (Mulchandani e Luong, 1989). Já para a assimilação da xilose, com base nas observações experimentais destacadas anteriormente, um termo que considera a repressão causada pela glicose foi incluído, conforme já reportado em outros trabalhos em que foi utilizado um meio de cultura com múltiplas fontes de carbono (Kwon & Engler, 2005). Sendo assim, as Equações 2.11 e 2.12 descrevem as velocidades específicas de crescimento celular para cada fonte de carbono e a Equação 2.13 corresponde à velocidade considerando a mistura dos dois açúcares, baseado em trabalhos anteriores da literatura (Krishnan *et al.*, 1999; Kwon & Engler, 2005).

$$\mu_{Glu} = \mu_{Glu,max} \cdot \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K_{S,Glu}} \quad (2.11)$$

$$\mu_{Xyl} = \mu_{Xyl,max} \cdot \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K_{S,Xyl}} \cdot \frac{1}{1 + R \cdot S_{Glu}^n} \quad (2.12)$$

$$\mu_{Mix} = \mu_{Glu} + \mu_{Xyl} \quad (2.13)$$

Onde $\mu_{Glu,max}$ e $\mu_{Xyl,max}$ são as velocidades específicas máximas de crescimento celular em glicose e xilose, respectivamente; $K_{S,Glu}$ e $K_{S,Xyl}$ as concentrações de glicose e xilose onde as velocidades específicas de crescimento são a metade da máxima, respectivamente; e R e n são parâmetros referentes à repressão por glicose no crescimento celular.

Analogamente, as velocidades específicas de produção de etanol considerando o consumo de glicose ou xilose e a mistura das duas fontes de carbono estão detalhadas nas Equações 2.14 a 2.16. As equações foram desenvolvidas com base nas mesmas observações feitas para o perfil de crescimento celular, com a inclusão do termo de repressão por glicose na produção de etanol a partir de xilose.

$$\pi_{Glu} = \pi_{Glu,max} \cdot \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K'_{S,Glu}} \quad (2.14)$$

$$\pi_{Xyl} = \pi_{Xyl,max} \cdot \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K'_{S,Xyl}} \cdot \frac{1}{1 + R' \cdot S_{Glu}^{n'}} \quad (2.15)$$

$$\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Xyl} \quad (2.16)$$

Onde $\pi_{Glu,max}$ e $\pi_{Xyl,max}$ são as velocidades específicas máximas de produção de etanol em glicose e xilose, respectivamente; $K'_{S,Glu}$ e $K'_{S,Xyl}$ as concentrações de glicose e xilose onde as velocidades específicas de produção são a metade da máxima, respectivamente; e R' e n' são parâmetros referentes à repressão por glicose na produção de etanol.

Como discutido anteriormente, o consumo de açúcar foi direcionado principalmente para a formação de etanol, com baixo crescimento celular nas condições empregadas nos experimentos (limitação de oxigênio e alta densidade celular). Conforme proposto por Krishnan *et al.* (1999), as expressões para as velocidades específicas de consumo de glicose e xilose podem ser descritas pelas Equações 2.17 e 2.18, respectivamente, destacando o termo de repressão por glicose na equação de assimilação da xilose.

$$\sigma_{Glu} = \frac{1}{Y_{P/Glu}} \cdot \pi_{Glu} \quad (2.17)$$

$$\sigma_{Xyl} = \frac{1}{Y_{P/Xyl}} \cdot \pi_{Xyl} \cdot \left(\frac{1}{1 + R'' \cdot S_{Glu}^{n''}} \right) \quad (2.18)$$

Onde R'' e n'' são termos referentes à repressão por glicose no consumo da xilose. A Tabela 2.3 apresenta uma comparação entre o modelo cinético desenvolvido no presente trabalho e outros modelos da literatura para a produção de etanol. Nos trabalhos de Andrade *et al.* (2007) e Phisaphalong *et al.* (2006), um modelo cinético dependente da temperatura foi proposto, porém para produção de etanol de primeira geração a partir de melaço de cana-de-açúcar, utilizando *S. cerevisiae* como microrganismo. Sendo assim, em ambos os trabalhos, uma única fonte de carbono foi considerada. Quanto às equações para velocidade específica de crescimento celular, os autores modificaram a equação de Monod, com a inclusão de termos referentes às inibições por substrato, etanol e células, diferentemente do que foi observado no presente trabalho nas faixas de concentrações atingidas nas fermentações. Para a produção de etanol, a expressão de Luedeking-Piret (Luedeking & Piret, 1959) foi utilizada por Andrade *et al.* (2007), enquanto Phisaphalong *et al.* (2006) propuseram uma equação de Monod modificada, novamente com a inclusão dos termos de inibição por substrato e por etanol.

Já no contexto da produção de etanol de segunda geração, Farias *et al.* (2014), Krishnan *et al.* (1999) e Kwon & Engler (2005) propuseram modelos considerando a fermentação de substratos ricos em xilose, tanto como única fonte de carbono ou em misturas com outros açúcares, como glicose e celobiose. Nesses trabalhos, porém, a temperatura foi mantida constante, ou seja, não houve um estudo da influência da temperatura no desempenho fermentativo dos microrganismos. Novamente, a equação de Monod foi modificada com os termos de inibição para descrever crescimento celular (Farias *et al.*, 2014; Krishnan *et al.*, 1999) e formação de produto (Krishnan *et al.*, 1999). A expressão de Luedeking-Piret também foi utilizada para descrever a formação de produto no trabalho de Kwon & Engler (2005).

No contexto de múltiplas fontes de carbono compondo o substrato, os autores representam o efeito de repressão por glicose de formas diferentes. No trabalho de Kwon & Engler (2005), o termo de relativo à repressão por glicose é incluído no crescimento por xilose ou celobiose, de forma similar ao proposto no presente trabalho. Entretanto, no trabalho de Krishnan *et al.* (1999), as expressões para crescimento por glicose ou xilose são as mesmas, sendo que a influência da concentração de cada açúcar é levada em consideração na velocidade específica de crescimento na mistura.

Tabela 2.3 Comparação do modelo desenvolvido no presente estudo com modelos da literatura.

| Microrganismo Substrato | Células | Produto | Substrato | Referência |
|--|---|---|---|-----------------------------------|
| <i>S. passalidarum</i> Glicose e xilose (Em função da temperatura) | $\mu_{Glu} = \mu_{Glu,max} \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K_{S,Glu}}$ $\mu_{Xyl} = \left[\mu_{Xyl,max} \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K_{S,Xyl}} \right] \left[\frac{1}{1 + R S_{Glu}^n} \right]$ $\mu_{Mix} = \mu_{Glu} + \mu_{Xyl}$ | $\pi_{Glu} = \pi_{Glu,max} \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K'_{S,Glu}}$ $\pi_{Xyl} = \left[\pi_{Xyl,max} \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K'_{S,Xyl}} \right] \left[\frac{1}{1 + R' S_{Glu}^{n'}} \right]$ $\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Xyl}$ | $\sigma_{Glu} = \frac{\pi_{Glu}}{Y_{P/Glu}}$ $\sigma_{Xyl} = \left[\frac{\pi_{Xyl}}{Y_{P/Xyl}} \right] \left[\frac{1}{1 + R'' S_{Glu}^{n''}} \right]$ | Presente estudo |
| <i>S. cerevisiae</i> Melaço de cana (Em função da temperatura) | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s} \exp(-K_I S) \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^\alpha \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right)^\beta$ | $\pi = Y_{P/X} \mu + m_p$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_x$ | Andrade <i>et al.</i> (2007) |
| <i>S. cerevisiae</i> Melaço de cana (Em função da temperatura) | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I} \right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^\alpha$ | $\pi = \pi_{max} \frac{S}{S + K_s' + \left(\frac{S^2}{K_I'} \right)} \left(1 - \frac{P}{P'_{max}} \right)^\alpha$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + \frac{\pi}{Y_{P/S}} + m_x$ | Phisalaphong <i>et al.</i> (2006) |
| <i>S. stipitis</i> Xilose | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I} \right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^\alpha$ | $\pi = Y_{P/X} \mu + m_p$ | $\sigma = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_x$ | Farias <i>et al.</i> (2014) |
| <i>S. cerevisiae</i> Glicose e xilose | $\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_s + \left(\frac{S^2}{K_I} \right)} \left(1 - \frac{P}{P_{max}} \right)^\alpha$ $\mu_{Mix} = \left(\frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + S_{Xyl}} \mu_{Glu} + \frac{S_{Xyl}}{S_{Glu} + S_{Xyl}} \mu_{Xyl} \right)$ | $\pi = \pi_{max} \frac{S}{S + K_s' + \left(\frac{S^2}{K_I'} \right)} \left(1 - \frac{P}{P'_{max}} \right)^\alpha$ $\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Xyl}$ | $\sigma = \frac{\pi}{Y_{P/S}} = \frac{\mu}{Y_{X/S}} + m_x$ | Krishnan <i>et al.</i> (1999) |
| <i>C. lusitanae</i> Glicose, celobiose e xilose | $\mu_{Glu} = \mu_{Glu,max} \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K_{S,Glu}}$ $\mu_{Cel} = \left[\mu_{Cel,max} \frac{S_{Cel}}{S_{Cel} + K_{S,Cel}} \right] \left[\frac{1}{1 + R_{Cel} S_{Glu}^n} \right]$ $\mu_{Xyl} = \left[\mu_{Xyl,max} \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K_{S,Xyl}} \right] \left[\frac{1}{1 + R_{Xyl} S_{Glu}^n} \right]$ $\mu_{Mix} = \mu_{Glu} + \mu_{Cel} + \mu_{Xyl}$ | $\pi_{Glu} = Y_{P/X} \mu_{Glu}$ $\pi_{Cel} = Y_{P/X} \mu_{Cel}$ $\pi_{Xyl} = Y_{P/X} \mu_{Xyl}$ $\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Cel} + \pi_{Xyl}$ | $\sigma_{Glu} = \frac{\mu_{Glu}}{Y_{X/Glu}}$ $\sigma_{Cel} = \frac{\mu_{Cel}}{Y_{X/Cel}}$ $\sigma_{Xyl} = \frac{\mu_{Xyl}}{Y_{X/Xyl}}$ | Kwon & Engler (2005) |

As velocidades específicas de consumo de substrato são escritas em função das velocidades específicas de formação e dos respectivos fatores de conversão de substrato em produto, seja considerando a formação de etanol (π e $Y_{P/S}$) ou a formação de células (μ e $Y_{X/S}$), de forma similar ao presente trabalho. Sendo assim, apesar de algumas similaridades, cada conjunto de equação é específico para cada microrganismo, substrato e sistema de fermentação investigado, resultando em particularidades para cada caso, reforçando a importância do modelo cinético desenvolvido no presente trabalho.

2.3.3 Estimação paramétrica e validação do modelo cinético

Conforme relatado por Andrade *et al.* (2007), Pinheiro *et al.* (2017) e Phisalaphong *et al.* (2006) em relação aos parâmetros que compõem o modelo cinético (Equações 2.11-2.18), as velocidades específicas máximas de produção de etanol ($\pi_{Glu,max}$ e $\pi_{Xyl,max}$) e de crescimento celular ($\mu_{Glu,max}$ e $\mu_{Xyl,max}$) são os parâmetros cinéticos que variam em função da temperatura, sendo que os outros parâmetros podem ser mantidos fixos na faixa de temperatura estudada. Portanto, a influência da temperatura nesses quatro parâmetros pode ser descrita pela equação do tipo Arrhenius (Equação 2.9). Sendo assim, o modelo proposto é uma combinação de 13 equações (Equações 2.5-2.9 e 2.11-2.18), 16 parâmetros cinéticos ($\mu_{Glu,max}$, $\mu_{Xyl,max}$, $\pi_{Glu,max}$, $\pi_{Xyl,max}$, $K_{S,Glu}$, $K'_{S,Glu}$, $K_{S,Xyl}$, $K'_{S,Xyl}$, n , n' , n'' , R , R' , R'' , $Y_{P/Glu}$ e $Y_{P/Xyl}$), além de oito constantes das equações de Arrhenius para os quatro parâmetros dependentes da temperatura ($\pi_{Glu,max}$, $\pi_{Xyl,max}$, $\mu_{Glu,max}$ e $\mu_{Xyl,max}$).

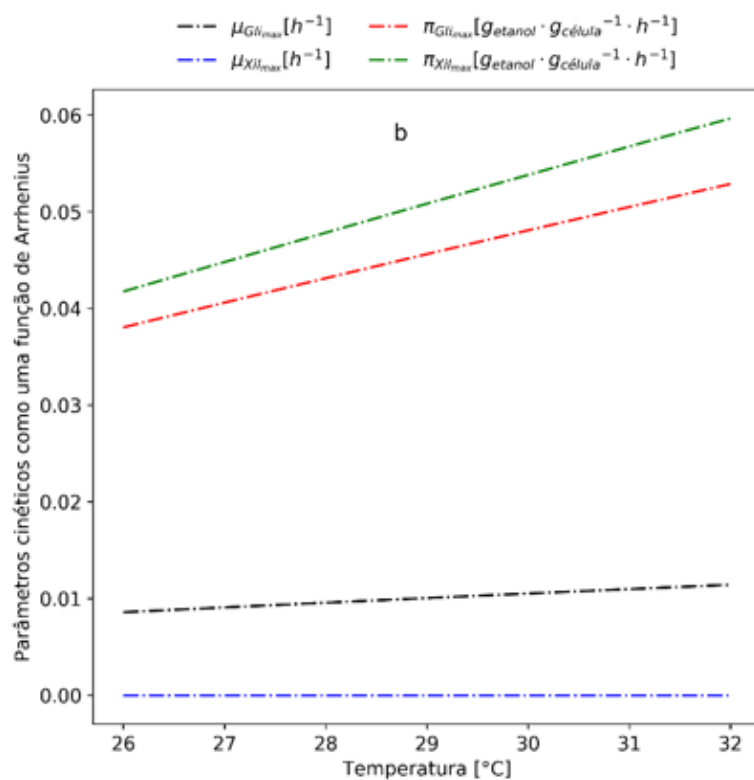
Considerando a levedura *S. passalidarum*, selecionada para realização do processo de otimização paramétrica, os valores dos parâmetros cinéticos que foram mantidos constantes no modelo ($K_{S,Glu}$, $K'_{S,Glu}$, $K_{S,Xyl}$, $K'_{S,Xyl}$, n , n' , n'' , R , R' , R'' , $Y_{P/Glu}$ e $Y_{P/Xyl}$) e as constantes de Arrhenius para os parâmetros dependentes da temperatura são apresentados na Tabela 2.4. Esses valores foram obtidos após a função objetivo (Equação 2.10) ter diminuído mais de 98 % em relação ao seu valor inicial.

Tabela 2.4 Valores obtidos para os parâmetros não-dependentes da temperatura e para as constantes da equação de Arrhenius para os parâmetros dependentes da temperatura para a levedura *S. passalidarum*.

| Parâmetros cinéticos não-dependentes da temperatura | | | | Parâmetros cinéticos como funções de Arrhenius | | |
|---|------|---|-----------------------|--|-------------------------------------|------------------------|
| | | | | Parâmetro | Constantes de Arrhenius | |
| | | | | | <i>A</i> [<i>h</i> ⁻¹] | <i>B</i> [°C] |
| $K_{S,Glu}$ [<i>g</i> _{glicose} / <i>L</i>] | 0.20 | <i>R</i> [<i>L/g</i> _{glicose}] | 67.53 | $\mu_{Glu,max}$ | 0.0394 | -39.6161 |
| $K'_{S,glu}$ [<i>g</i> _{glicose} / <i>L</i>] | 2.00 | <i>R'</i> [<i>L/g</i> _{glicose}] | 0.57 | $\mu_{Xyl,max}$ | 786.59×10 ³ | -64.91×10 ³ |
| $K_{S,xyl}$ [<i>g</i> _{xilose} / <i>L</i>] | 1.98 | <i>R''</i> [<i>L/g</i> _{glicose}] | 6.53×10 ⁻⁷ | $\pi_{Glu,max}$ | 0.2200 | -45.6330 |
| $K'_{S,Xyl}$ [<i>g</i> _{xilose} / <i>L</i>] | 7.00 | <i>n</i> [-] | 1.00 | $\pi_{Xyl,max}$ | 0.2798 | -49.4592 |
| $Y_{P/Glu}$ [<i>g</i> _{etanol} / <i>g</i> _{glicose}] | 0.34 | <i>n'</i> [-] | 1.00 | | | |
| $Y_{P/Xyl}$ [<i>g</i> _{etanol} / <i>g</i> _{xilose}] | 0.36 | <i>n''</i> [-] | 1.00 | | | |

A Figura 2.2 mostra os perfis de $\pi_{Glu,max}$, $\pi_{Xyl,max}$, $\mu_{Glu,max}$ e $\mu_{Xyl,max}$ em função da temperatura, como funções de Arrhenius. A velocidade específica máxima de crescimento celular por xilose foi próxima a zero para as temperaturas avaliadas, o que é consistente com as observações experimentais detalhadas a partir da Figura 2.1, conforme discutido na seção 2.3.1. Considerando a velocidade específica máxima de crescimento por glicose, observa-se um aumento com a temperatura, como já foi reportado por Rivera *et al.* (2017) e Andrade *et al.* (2007) na mesma faixa de temperatura para a levedura *S. cerevisiae*. Os valores obtidos para as velocidades específicas máximas de crescimento corroboram o que foi observado experimentalmente, uma vez que um baixo crescimento celular foi registrado em todas as temperaturas avaliadas, o qual ocorreu, principalmente, na fase de assimilação da glicose. Em relação à formação de etanol, pode-se observar que as velocidades específicas máximas de produção a partir de xilose são levemente maiores que a partir de glicose, indicando que a levedura produziu etanol mais rapidamente a partir da xilose nas condições empregadas neste trabalho. Para ambas as fontes de carbono nota-se um aumento com a temperatura.

Figura 2.2 Velocidades específicas máximas de crescimento celular e de produção de etanol como função da equação de Arrhenius para xilose e glicose.



A Tabela 2.5 apresenta uma comparação entre os valores obtidos para os parâmetros no presente trabalho e outros trabalhos da literatura, apresentados na Tabela 2.3. Cabe ressaltar que, na tabela apresentada, foram incluídos para comparação apenas os parâmetros cinéticos que compõem o modelo apresentado no presente trabalho.

Tabela 2.5 Comparação entre os valores de parâmetros obtidos no presente trabalho com trabalhos da literatura.

| Parâmetro | Presente estudo | Andrade <i>et al.</i> (2007) | Phisaphalong <i>et al.</i> (2006) | Farias <i>et al.</i> (2014) | Krishnan <i>et al.</i> (1999) | Kwon & Engler (2005) |
|--|---|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|---|
| $K_S [g_{RS} \cdot L^{-1}]$ | 0,20 (Glicose) 1,98 (Xilose) | 4,1 | 50-500 | 1,67 | 0,57 (Glicose) 3,40 (Xilose) | 0,30 (Glicose) 0,20 (Celobiose) 0,70 (Xilose) |
| $K'_S [g_{RS} \cdot L^{-1}]$ | 2,00 (Glicose) 7,00 (Xilose) | -* | 50-90 | - | 1,34 (Glicose) 3,40 (Xilose) | - |
| $R [-]$ | 67,53 (Xilose) | - | - | - | - | 50 (Celobiose) 50 (Xilose) |
| $R' [-]$ | 0,57 (Xilose) | - | - | - | - | - |
| $R'' [-]$ | $6,53 \times 10^{-7}$ (Xilose) | - | - | - | - | - |
| $n [-]$ | 1 | - | - | - | - | 1 |
| $n' [-]$ | 1 | - | - | - | - | - |
| $n'' [-]$ | 1 | - | - | - | - | - |
| $Y_{P/S} [g_{eth} \cdot g_{AR}^{-1}]$ | 0,34 (Glicose) 0,37 (Xilose) | - | 0,30-0,55 | - | - | 0,47 (Glicose) 0,49 (Celobiose) 0,08 (Xilose) |
| $\mu_{max} [h^{-1}]$ | 0,009-0,011 (Glicose) 0,000-0,000 (Xilose) | 0,2-0,43 | 0,10-0,78 | 0,232 | 0,66 (Glicose) 0,20 (Xilose) | 0,38 (Glicose) 0,10 (Celobiose) 0,01 (Xilose) |
| $\pi_{max} [g_{eth} \cdot g_{cell}^{-1} \cdot h^{-1}]$ | 0,038-0,052 (Glicose) 0,042-0,060 (Xilose) | - | 3,3-5,5 | - | 2,00 (Glicose) 0,25 (Xilose) | - |

*- Significa que o parâmetro em questão não compõe o referente modelo.

Os valores para os parâmetros n , n' e n'' foram mantidos em 1,0, assim como no trabalho de Kwon & Engler (2005). Os valores das constantes de saturação ($K_{S,glu}$, $K'_{S,glu}$, $K_{S,xyl}$ and $K'_{S,xyl}$) estão dentro dos limites para que o sistema seja fisicamente consistente, considerando a concentração das fontes de carbono no meio de cultura. Considerando a repressão por glicose, o valor encontrado para R se aproxima dos valores relatados por Kwon & Engler (2005), porém para a levedura *Candida lusitanae*. Esse valor sugere que o crescimento celular a partir de xilose é altamente reprimido pela glicose, evidenciado nas primeiras 10 h de fermentação em todas as temperaturas avaliadas. Cabe ressaltar que, sendo este o primeiro trabalho que apresenta um modelo cinético para a levedura *S. passalidarum* com xilose e glicose como fontes de carbono, os valores para R , R' e R'' não foram relatados anteriormente na literatura, impossibilitando uma comparação.

Como é possível observar na Tabela 2.5, as velocidades específicas máximas de crescimento celular estimadas no presente estudo, tanto para glicose quanto para xilose, são muito inferiores aos valores obtidos nos outros trabalhos apresentados, tendo em vista o baixo crescimento celular registrado devido às condições empregadas nas fermentações, como previamente discutido.

Sendo assim, as comparações entre os dados experimentais e os valores obtidos a partir do modelo para as concentrações de células, glicose, xilose e etanol são apresentadas na Figura 2.3. Pode-se observar que o modelo descreve satisfatoriamente as fermentações nas temperaturas usadas para calibrar o modelo, isto é, 26, 27, 30 e 32 °C. A Tabela 2.6 mostra detalhadamente os valores de r^2 para cada componente descrito pelo modelo. Os resultados confirmam que o modelo pode prever o comportamento do sistema fermentativo investigado neste estudo. A Figura 2.3c corresponde à validação do modelo, realizada com a fermentação a 28 °C. Em relação à validação, foi obtido um valor global para r^2 superior a 0,95, o que indica que o modelo foi capaz de prever a tendência das concentrações para o teste de validação. Em geral, conclui-se que o modelo representa satisfatoriamente os perfis para biomassa celular, glicose, xilose e etanol ao longo do tempo de fermentação. Além disso, o modelo previu as concentrações finais de etanol e célula, bem como o tempo de depleção de glicose e o início do consumo de xilose, levando em consideração o efeito da repressão por glicose.

Figura 2.3 Observações experimentais e valores previstos pelo modelo para as concentrações de biomassa celular, glicose, xilose e etanol nas temperaturas estudadas para *S. passalidarum* (a) 26 °C; (b) 27 °C; (c) 28 °C (validação); (d) 30 °C; e (e) 32 °C.

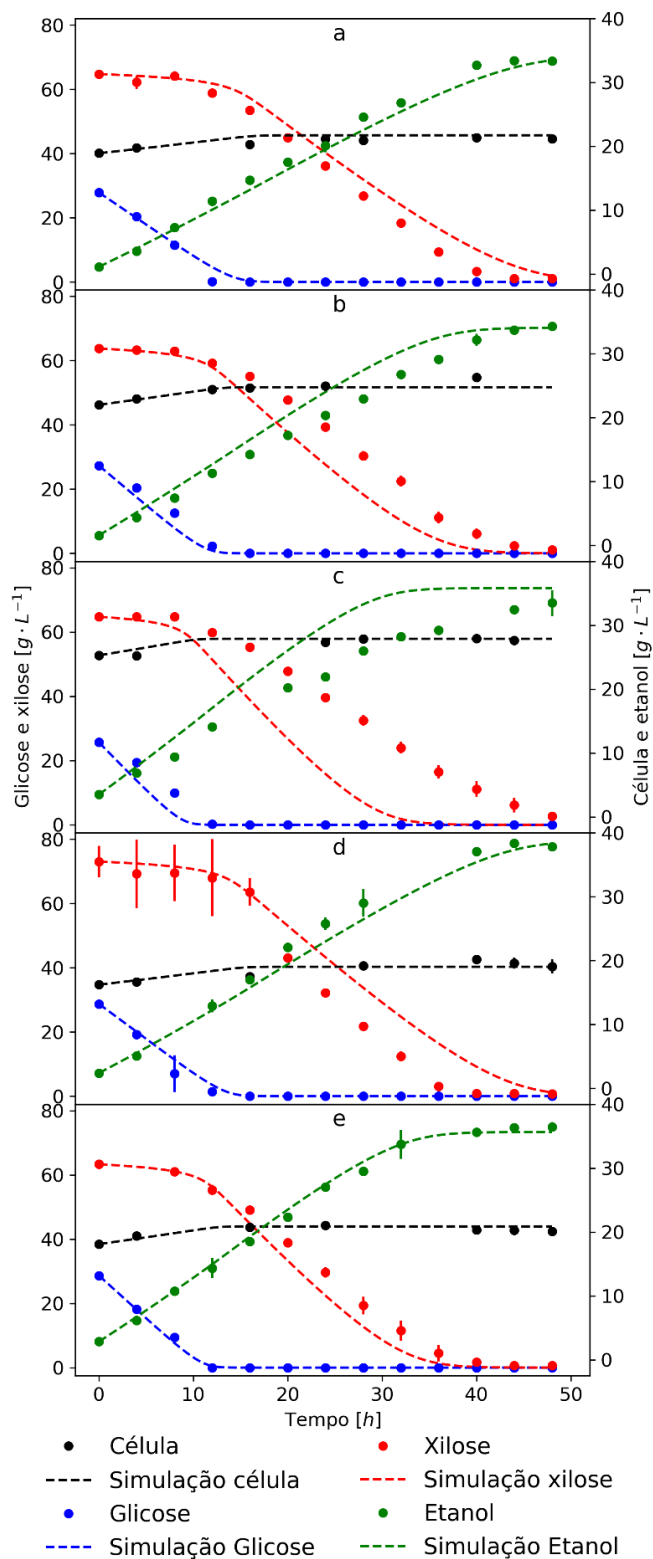
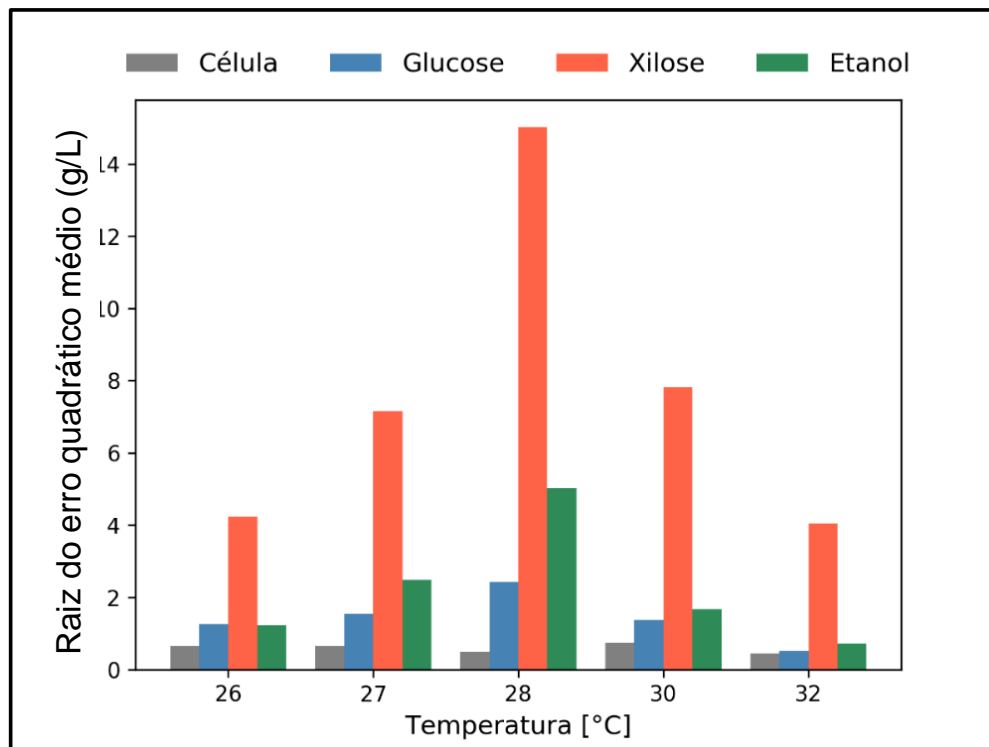


Tabela 2.6 Coeficiente de correlação de Pearson (r^2) para as temperaturas usadas na calibração e validação do modelo para *S. passalidarum*.

| Temperatura (°C) | r^2 | | | |
|-----------------------|--------|---------|--------|--------|
| | Célula | Glicose | Xilose | Etanol |
| 26 | 0,935 | 0,991 | 0,997 | 0,998 |
| 27 | 0,918 | 0,989 | 0,984 | 0,991 |
| 28 (Validação) | 0,945 | 0,966 | 0,942 | 0,983 |
| 30 | 0,856 | 0,991 | 0,987 | 0,996 |
| 32 | 0,931 | 0,998 | 0,994 | 0,999 |

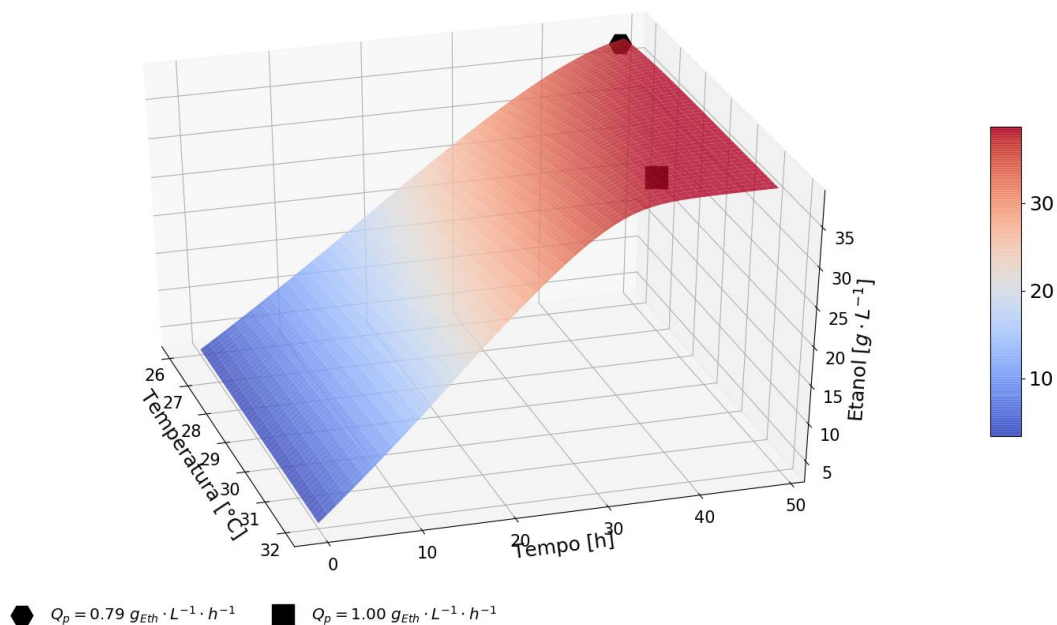
A Figura 2.4 mostra a comparação dos valores de RMSE obtidos para as temperaturas investigadas (calibração e validação) para as concentrações de célula, glicose, xilose e etanol, para *S. passalidarum*. Os resultados indicam que o conjunto de equações que compõem o modelo cinético pode ser usado para descrever a dinâmica da fermentação em batelada nas condições empregadas neste estudo, ou seja, produção de etanol a partir de uma mistura de xilose e glicose sob alta densidade celular em função da temperatura, na faixa compreendida entre 26 e 32 °C para *S. passalidarum*. O modelo descreve satisfatoriamente o comportamento de biomassa celular, etanol e glicose, destacando que valores de RMSE obtidos nesta análise foram inferiores aos os relatados por Pinheiro *et al.* (2017). Em relação às concentrações de xilose, os valores de RMSE são mais altos, sendo que, nesse caso, o modelo é melhor ajustado nos extremos do processo (tempo inicial e final de fermentação), conforme observado na Figura 2.3.

Figura 2.4 RMSE para as temperaturas usadas na calibração e validação do modelo para *S. passalidarum*.



Ao realizar uma projeção em 3D para simular a produção de etanol em função do tempo e da temperatura usando o modelo desenvolvido (Figura 2.5), melhores resultados de produtividade volumétrica foram obtidos em temperaturas entre 30 e 32 °C, uma vez que, nessa faixa de temperatura, menos tempo é necessário para que a levedura consuma todo o açúcar e atinja o máximo título de etanol, o que está de acordo com a influência da temperatura nas velocidades específicas máximas de produção de etanol (Figura 2.2). Como pode ser observado na Figura 2.5, para uma condição inicial fixa de simulação para todas as temperaturas (xilose, 70 g/L; glicose, 30 g/L; célula, 20 g/L), *S. passalidarum* pode esgotar toda a fonte de carbono em 38 h a 30 °C, atingindo valores de Q_p próximos a 1,00 g/L.h. Por outro lado, quando a temperatura diminui para 26 °C, a produtividade é afetada negativamente, sendo necessário um maior tempo para o consumo completo dos açúcares. Estes resultados estão de acordo com as observações experimentais (Tabela 2.3), em que as maiores produtividades foram atingidas para as temperaturas de 30 e 32 °C, sem diferença significativa entre elas.

Figura 2.5 Projeção 3D obtida através da simulação do modelo proposto, mostrando a formação de etanol em função do tempo e da temperatura. As condições iniciais foram: glicose, 30 g/L; xilose, 70 g/L; e célula, 20 g/L.



2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições de fermentação empregadas, a levedura *S. passalidarum* apresentou um desempenho superior a *S. stipitis* em termos de produção de etanol, com menores tempos necessários para completa exaustão dos açúcares, maiores títulos de etanol obtidos e, conseqüentemente, maiores produtividades volumétricas registradas. Em relação ao modelo cinético desenvolvido, as equações propostas descreveram de forma satisfatória o processo de fermentação em batelada sob alta densidade para a levedura *S. passalidarum*, na faixa de temperatura de 26 a 32 °C, a partir de um substrato misto (xilose e glicose). Através da simulação do modelo, foi possível concluir que maiores produtividades volumétricas de etanol podem ser atingidas em temperaturas entre 30 e 32 °C.

CAPÍTULO 3: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TEMPERATURA NA ADAPTAÇÃO FISIOLÓGICA DA LEVEDURA *S. passalidarum* SUBMETIDA AO PROCESSO MELLE-BOINOT PARA PRODUÇÃO DE ETANOL DE SEGUNDA GERAÇÃO

Neste capítulo, são apresentados os resultados de diferentes estratégias de variação de temperatura aplicadas a um sistema de fermentações em batelada alimentada com reciclo de células para a levedura *S. passalidarum*. Nesse sentido, foram realizadas fermentações sequenciais com a temperatura mantida constante ao longo dos ciclos (30 °C), bem como fermentações com decréscimo de temperatura ao longo dos ciclos (de 30 a 26 °C), baseado em resultados anteriores obtidos pelo grupo de pesquisa para as leveduras *S. stipitis* (Santos *et al.*, 2016) e *S. passalidarum* (Nakanishi *et al.*, 2017). O desempenho fermentativo do microrganismo foi avaliado frente aos diferentes esquemas de temperatura, bem como ao sistema de reciclo de células empregado. Através do desenvolvimento e aplicação de um modelo matemático para descrever as fermentações em questão, foi possível investigar os efeitos do reciclo celular na evolução dos parâmetros cinéticos. Parte dos resultados obtidos foi submetida em forma de artigo para a revista *Renewable Energy*, sob o título “*Temperature impact evaluation on physiological adaptation of Spathaspora passalidarum throughout the Melle-Boinot process for second-generation ethanol production*”, desenvolvido em colaboração com o aluno de doutorado Thiago Neitzel.

3.1 INTRODUÇÃO

A configuração de fermentação denominada *Melle-Boinot* é usada em cerca de 75 % das usinas de etanol de primeira geração no Brasil, caracterizando um processo bem estabelecido (Basso *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2012). No entanto, há poucos estudos na literatura quando se trata da aplicação dessa estratégia na produção de etanol de segunda geração a partir de biomassa lignocelulósica. Em suma, o processo *Melle-Boinot* consiste em uma etapa de propagação da levedura para obtenção de alta concentração de biomassa celular, inoculação de 1/3 do volume da dorna de fermentação com o creme de levedura obtido e execução da fermentação anterior, inicialmente em modo batelada alimentada, seguida de fermentação em batelada para exaustão dos açúcares. Ao término da fermentação, o creme de levedura é separado do vinho fermentado por centrifugação, sendo submetido a um tratamento com ácido sulfúrico diluído para reutilização na etapa de fermentação subsequente (Lopes *et al.*, 2016), como mostrado na Figura 3.1. A configuração *Melle-Boinot* representa uma boa alternativa para otimização do processo, uma vez que reduz significativamente o tempo de fermentação e os custos associados à preparação do inóculo (Basso *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2016; Nakanishi *et al.*, 2017).

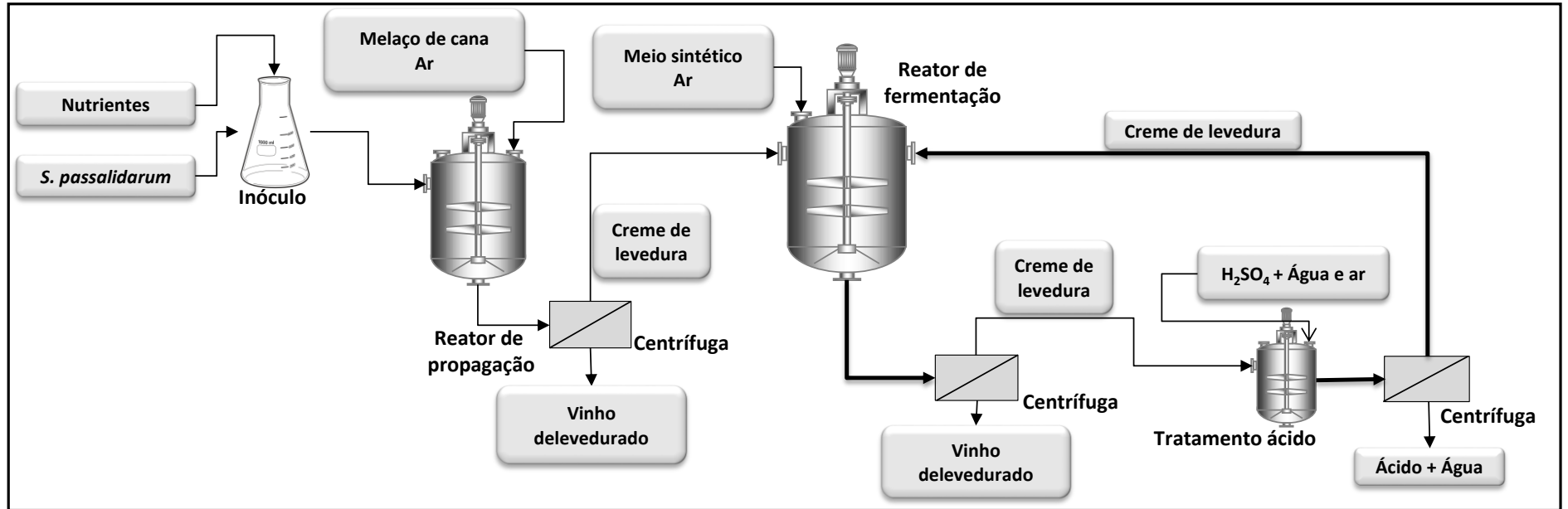
Outra estratégia para aumentar a produção de etanol é a queda de temperatura ao longo dos ciclos de fermentação, também criada para ser aplicada na produção de etanol de primeira geração (Dias *et al.*, 2007). No entanto, um estudo recente demonstrou que essa estratégia também pode ter efeitos positivos quando utilizada para obtenção de etanol de segunda geração por leveduras não-convencionais, como *S. stipitis* (Santos *et al.*, 2016) e *S. passalidarum* (Nakanishi *et al.*, 2017). No trabalho de Santos *et al.* (2016), foram realizadas cinco fermentações sequenciais em batelada de um meio sintético composto por xilose e glicose, todas a 30 °C, em comparação a cinco ciclos com decréscimo de temperatura de 1 °C a cada ciclo, de 30 a 26 °C. Como resultado, os autores observaram que, através do decaimento de temperatura, houve um aumento no percentual de xilose consumida em comparação à temperatura fixa (81,13 e 27,1% de xilose consumida no último ciclo, respectivamente), além de incrementos na produtividade volumétrica (1,53 e 0,81 g/L.h no último ciclo, respectivamente).

Baseado nesses resultados, no trabalho de Nakanishi *et al.* (2017), as fermentações em batelada alimentada com reciclo de células foram realizadas apenas

sob a estratégia de decaimento de temperatura (30 a 27 °C), sem comparação com uma temperatura constante ao longo dos ciclos, ou seja, não foi possível concluir se a melhora do desempenho se deu pelo decréscimo da temperatura ou pelo próprio efeito do reciclo celular para a levedura *S. passalidarum*. Além disso, os autores utilizaram um hidrolisado celulósico rico em glicose nas fermentações, diferentemente do foco do presente trabalho, que é a fermentação de substratos ricos em pentoses. Vale ressaltar que, através dos resultados obtidos no Capítulo 2 do presente trabalho, para uma única fermentação em batelada de substrato misto de xilose e glicose utilizando a levedura *S. passalidarum* sob alta densidade celular, temperaturas de trabalho próximas a 30 °C resultaram em melhores desempenhos, com maiores produtividades volumétricas em etanol.

Sendo assim, o principal objetivo do presente trabalho foi investigar os benefícios da utilização do processo de fermentação *Melle-Boinot* na produção de etanol de segunda geração por *S. passalidarum*, utilizando como substrato um meio majoritariamente composto por xilose, porém com concentrações de glicose. Para elucidar o efeito da estratégia de decaimento da temperatura e a adaptação do microrganismo ao longo dos reciclos celulares, foram realizadas fermentações em duas condições: temperatura de 30 °C mantida fixa em todos os ciclos; e decaimento da temperatura de 1 °C a cada ciclo, com o primeiro ciclo a 30 °C e o último a 26 °C. Além disso, para compreender a evolução da cinética de fermentação promovida pela aplicação de reciclo, foi aplicado um modelo matemático para fermentações em modo batelada alimentada, permitindo a estimação e comparação dos parâmetros cinéticos a cada ciclo. Assim como no Capítulo 2, os experimentos foram realizados utilizando um substrato sintético, para evitar a influência de outros compostos presentes em hidrolisados hemicelulósicos no desenvolvimento do modelo matemático e na elucidação da cinética.

Figura 3.1 Configuração da fermentação *Melle-Boinot* aplicada no presente estudo.



3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Microrganismo, pré-inóculo, inóculo e propagação celular

A levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 foi submetida às etapas de pré-inóculo, inóculo e propagação celular para obtenção de creme de levedura de alta densidade conforme previamente detalhado nas seções 2.2.1 e 2.2.2. O creme de levedura obtido foi então submetido às fermentações subsequentes.

3.2.2 Fermentações em modo batelada alimentada com reciclo de células em diferentes estratégias de variação de temperatura

As fermentações em batelada alimentada foram realizadas conforme o protocolo de Nakanishi *et al.* (2017). Após a propagação celular, o creme de levedura foi transferido para biorreatores de 1,4 L (New Brunswick, Bioflo® 115), correspondendo a 1/3 (v/v) (300 mL) do volume de trabalho final (900 mL). A concentração celular no início do processo foi de 90 g/L e de, aproximadamente, 30 g/L ao final das fermentações.

Em seguida, o meio de cultura foi alimentado por 20 h a uma vazão de 30 mL/h por bomba peristáltica (modelo peristáltico Watson-Marlow® 114DV). Sendo assim, após 20 h, 600 mL de substrato foram introduzidos no reator. Após esse tempo, a fermentação foi estendida por 4 h em modo batelada, totalizando 24 h de fermentação. A composição média do meio de cultivo alimentado entre todos os ciclos de fermentação realizados é mostrada na Tabela 3.1. Durante a fermentação, um fluxo de ar de 0,1 vvm e uma agitação de 200 rpm foram mantidos fixos.

Tabela 3.1 Composição média do meio de fermentação para produção de etanol a partir de xilose e glicose por *S. passalidarum* em batelada alimentada.

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------|--------------------|
| Glicose | 43 |
| Xilose | 97 |
| Extrato de Levedura | 3 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1 |
| Ureia | 2,3 |

Conforme previamente mencionado, foram estudadas duas condições de temperatura, todas realizadas em triplicata: A) cinco fermentações sequenciais em batelada alimentada com reciclo de células a 30 °C em todos os ciclos; e B) cinco fermentações sequenciais em batelada alimentada com reciclo de células com diminuição da temperatura em 1 °C a cada ciclo, iniciando em 30 °C e terminando em 26 °C.

Como mostrado na Figura 3.1, ao final de cada ciclo de fermentação, o vinho fermentado foi drenado do biorreator por uma bomba peristáltica (modelo peristáltico Watson-Marlow® 114DV) e centrifugado a 11970 $\times g$ por 20 min a 4 °C. Em seguida, o creme de levedura foi transferido de volta ao biorreator para a realização de um tratamento ácido, o qual foi realizado conforme protocolo descrito em Santos *et al.* (2016), com a ressuspensão do creme de levedura em água e H₂SO₄ (2,0 M), reduzindo seu pH para 2,5. Durante esta etapa, a temperatura foi mantida em 30 °C, com 200 rpm de agitação e 0,5 vvm de aeração, por 30 min. Após esse tempo, foram realizadas duas centrifugações a 11970 $\times g$ por 20 min a 4 °C: uma para remoção do ácido, seguida da ressuspensão das células em água estéril para eliminação do ácido residual, com uma segunda centrifugação para remoção da água ácida residual. Após uma nova ressuspensão em água estéril, o creme de levedura foi reintroduzido no biorreator para iniciar um novo ciclo de fermentação.

3.2.3 Metodologia analítica

Concentrações de levedura foram medidas por análises gravimétricas em triplicata, onde 1,5 mL de cada amostra foram submetidos a centrifugação (15871 $\times g$ por 5 min), ressuspendidas duas vezes em água destilada e encaminhadas a um forno secador de biomassa a 80 °C. A viabilidade celular foi determinada através de microscopia óptica com lente objetiva de 40X, considerando células viáveis e não-viáveis. A contagem foi efetuada por câmara de Neubauer e azul de metileno foi usado para diferenciar células vivas das mortas.

Análises de glicose, xilose, xilitol e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, USA). Amostras foram filtradas através de um filtro de PVDF Millex 22 μm , e o filtrado foi injetado no sistema HPLC. Compostos foram separados com Aminex HPX 87H (300 7,8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA) a 35 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma taxa de 0,6 mL/min.

3.2.4 Cálculo dos parâmetros de fermentação

Para avaliar o desempenho fermentativo da levedura *S. passalidarum*, a produtividade volumétrica de etanol (Q_P , g/L.h), o fator de conversão (observável) de substrato em etanol ($Y_{P/S}$, g/g), o rendimento em etanol considerando o substrato consumido (η , %) e o rendimento em etanol considerando o total de substrato alimentado (η' , %) foram calculados de acordo com as Equações 3.1-3.4, respectivamente, para todos os ciclos de fermentação.

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (3.1)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad (3.2)$$

$$\eta = \frac{P_f - P_0}{S_0 - S_f} \cdot \frac{100}{0.511} \quad (3.3)$$

$$\eta' = \frac{P_f - P_0}{S_0} \cdot \frac{100}{0.511} \quad (3.4)$$

3.2.5 Análise estatística

Os valores de concentrações e parâmetros cinéticos descritos acima foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o *software* Origin Pro 8.1.

3.2.6 Modelagem matemática

Para uma fermentação realizada em modo batelada alimentada, o balanço de massa para biomassa celular, substrato e produto (etanol) é descrito pelas Equações 3.5-3.7, respectivamente.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad (3.5)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_m - S) - \sigma \cdot X \quad (3.6)$$

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - D \cdot P \quad (3.7)$$

Onde μ , σ e π representam as velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol, respectivamente, S_m a concentração de substrato na corrente de alimentação e D (h^{-1}) a velocidade específica de alimentação do sistema, calculado através da Equação 3.8.

$$D = \frac{F}{V} \quad (3.8)$$

Onde F (L/h) é a vazão da corrente de alimentação (nesse caso, 0,03 L/h) e V (L) é o volume do meio de fermentação no reator a cada instante.

Para a elaboração do modelo matemático descrevendo o sistema de fermentação investigado, foram propostas equações a partir das observações experimentais para célula, substrato e etanol, cujo detalhamento é apresentado na seção 3.3.2. Os trabalhos de modelagem matemática e determinação paramétrica foram realizados através do *software* Microsoft Excel 2013, cujo detalhamento é apresentado na seção 3.3.2.

Para avaliar o ajuste do modelo, a raiz do erro quadrático médio (RMSE - *root-mean-squared error*, em inglês) (Equação 3.9) foi utilizada.

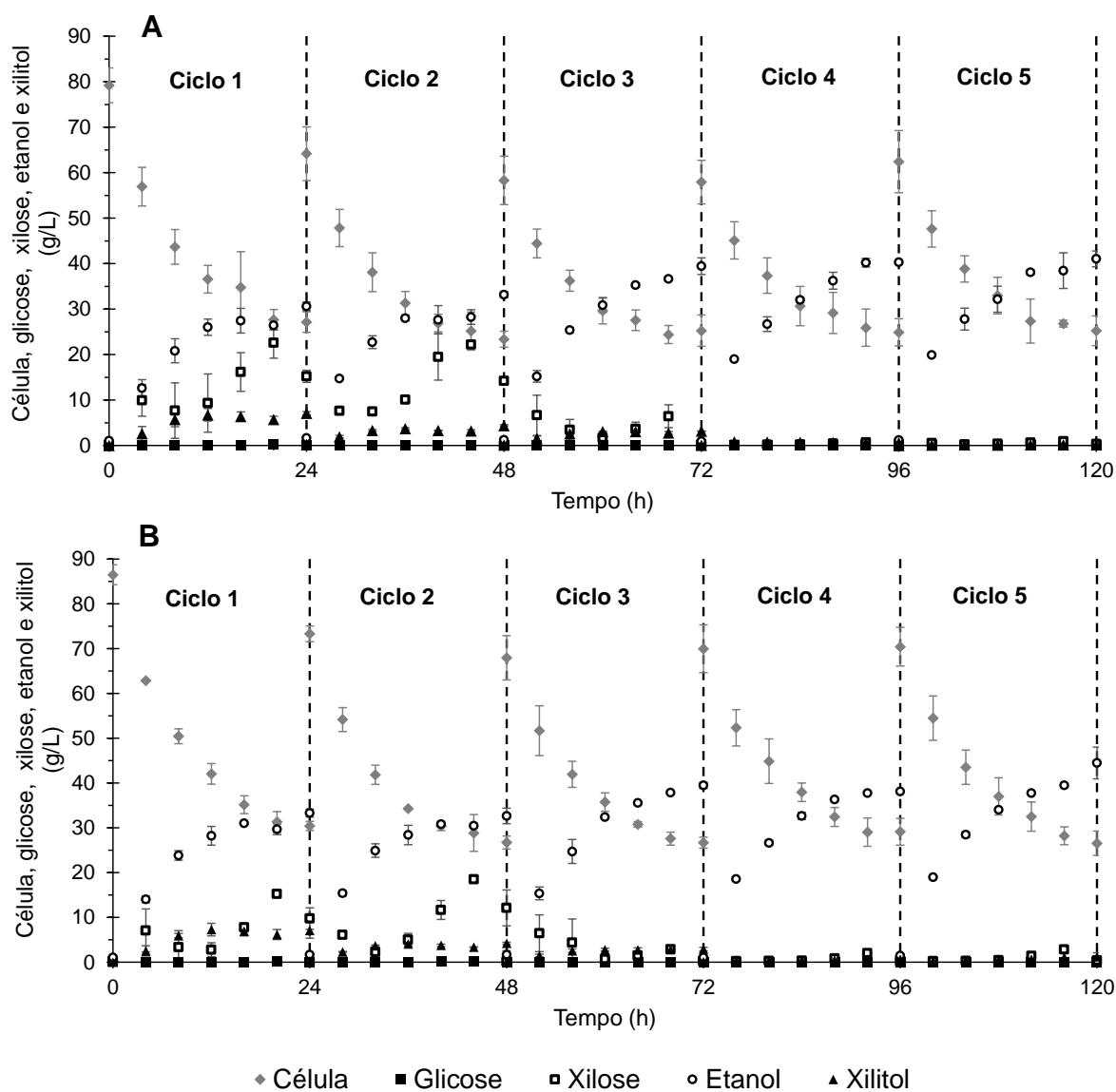
$$RMSE = \sqrt{\left(\sum_{i=t_0}^{i=t_f} (y(t_i) - \bar{y}(t_i))^2 \right) \left(\frac{1}{n_p} \right)} \quad (3.9)$$

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Comparação entre as fermentações a partir de parâmetros fermentativos

A Figura 3.2 mostra as concentrações de xilose, glicose, etanol, xilitol e biomassa celular para as duas estratégias de temperatura estudadas ao longo dos cinco ciclos de fermentação.

Figura 3.2 Concentrações de glicose, xilose, etanol, xilitol e células ao longo do tempo para as fermentações em batelada alimentada com reciclo de células para: (A) Temperatura fixa de 30 °C; (B) Decréscimo de temperatura de 30 a 26 °C.



Como pode ser observado, os perfis de concentrações obtidos são semelhantes para os dois esquemas de temperatura investigados. No caso da glicose, este açúcar é prontamente consumido em todos os ciclos de fermentação, resultando em uma concentração nula em todos os pontos amostrados, consequência do consumo preferencial deste açúcar pela levedura *S. passalidarum*. Já no caso da xilose, há um aumento contínuo na porcentagem de consumo ao longo dos ciclos, conforme mostrado na Tabela 3.2.

No primeiro ciclo, parte da xilose consumida foi convertida em xilitol, produzindo uma concentração média de 7,08 g/L desse subproduto entre as duas condições (30 °C e decréscimo de 30 até 26 °C). No entanto, a produção de xilitol diminuiu ciclo a ciclo, sendo praticamente nula nos ciclos 4 e 5 para ambos os processos. Na via de assimilação da xilose reportada para a levedura *S. passalidarum*, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose-redutase (XR), que é então oxidada a D-xilulose pela enzima xilitol-desidrogenase (XDH). Embora a XDH tenha uma dependência exclusiva da coenzima NAD⁺, é reportado na literatura que *S. passalidarum* possui dois genes ativos diferentes para expressar a enzima XR (genes XYL1.1 e XYL1.2), sendo o primeiro estritamente dependente de NADPH e o segundo, embora use as duas coenzimas, com preferência por NADH (Wohlbach *et al.*, 2011; Ferreira *et al.*, 2011). O uso de NADPH reflete em insuficiente regeneração de NAD⁺, causando desequilíbrio redox e, conseqüentemente, interrupção da via de fermentação da xilose, com acúmulo de xilitol em detrimento da produção de etanol (Jin *et al.*, 2004). Assim, com a diminuição do acúmulo de xilitol observado ao longo dos ciclos, uma possível explicação é que, ao longo dos ciclos, houve um aumento da atividade enzimática da XR com preferência pelo cofator NADH, diminuindo o desequilíbrio redox.

Tabela 3.2 Valores de rendimentos, produtividade volumétrica, consumo de glicose, consumo de xilose, título em etanol e concentrações de xilitol ao final de cada ciclo de fermentação.

| Ciclo | Rendimento % | Rendimento* % | Produtividade g/L.h | Consumo de glicose % | Consumo de xilose % | Título de etanol g/L | Xilitol g/L |
|--|---------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Condição A – Temperatura fixa de 30 °C | | | | | | | |
| 1 | 77,20 ± 1,74 ^a | 68,87 ± 3,17 ^a | 1,34 ± 0,01 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 84,02 ± 3,05 ^a | 33,29 ± 0,88 ^a | 7,07 ± 1,73 ^a |
| 2 | 77,84 ± 0,62 ^a | 66,98 ± 2,96 ^a | 1,29 ± 0,07 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 80,40 ± 6,80 ^a | 32,64 ± 1,75 ^a | 4,20 ± 0,03 ^a |
| 3 | 81,95 ± 3,63 ^a | 81,53 ± 3,65 ^a | 1,58 ± 0,07 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,40 ± 0,13 ^a | 39,47 ± 0,70 ^a | 2,88 ± 0,42 ^a |
| 4 | 79,25 ± 1,56 ^a | 79,05 ± 1,58 ^a | 1,55 ± 0,00 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,31 ± 0,14 ^a | 38,16 ± 0,20 ^a | 0,64 ± 0,04 ^a |
| 5 | 91,16 ± 7,03 ^a | 90,75 ± 6,95 ^a | 1,79 ± 0,13 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,52 ± 0,25 ^a | 44,46 ± 3,56 ^a | 1,19 ± 0,87 ^a |
| Condição B – Decréscimo de temperatura (30, 29, 28, 27 e 26 °C) | | | | | | | |
| 1 | 75,91 ± 0,15 ^a | 62,94 ± 0,96 ^a | 1,23 ± 0,04 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 74,89 ± 2,18 ^b | 30,60 ± 0,97 ^a | 7,09 ± 0,36 ^a |
| 2 | 81,51 ± 0,46 ^b | 68,39 ± 0,57 ^a | 1,31 ± 0,04 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 76,68 ± 0,41 ^a | 33,16 ± 0,64 ^a | 4,39 ± 0,16 ^a |
| 3 | 81,85 ± 2,70 ^a | 81,42 ± 2,62 ^a | 1,59 ± 0,17 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,51 ± 0,17 ^a | 39,45 ± 1,84 ^a | 3,14 ± 0,15 ^a |
| 4 | 84,04 ± 1,51 ^a | 83,72 ± 1,46 ^a | 1,61 ± 0,05 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,45 ± 0,06 ^a | 40,31 ± 0,51 ^b | 0,58 ± 0,14 ^a |
| 5 | 82,92 ± 4,35 ^a | 82,61 ± 4,31 ^a | 1,66 ± 0,08 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 99,46 ± 0,04 ^a | 41,04 ± 1,74 ^a | 0,17 ± 0,01 ^a |

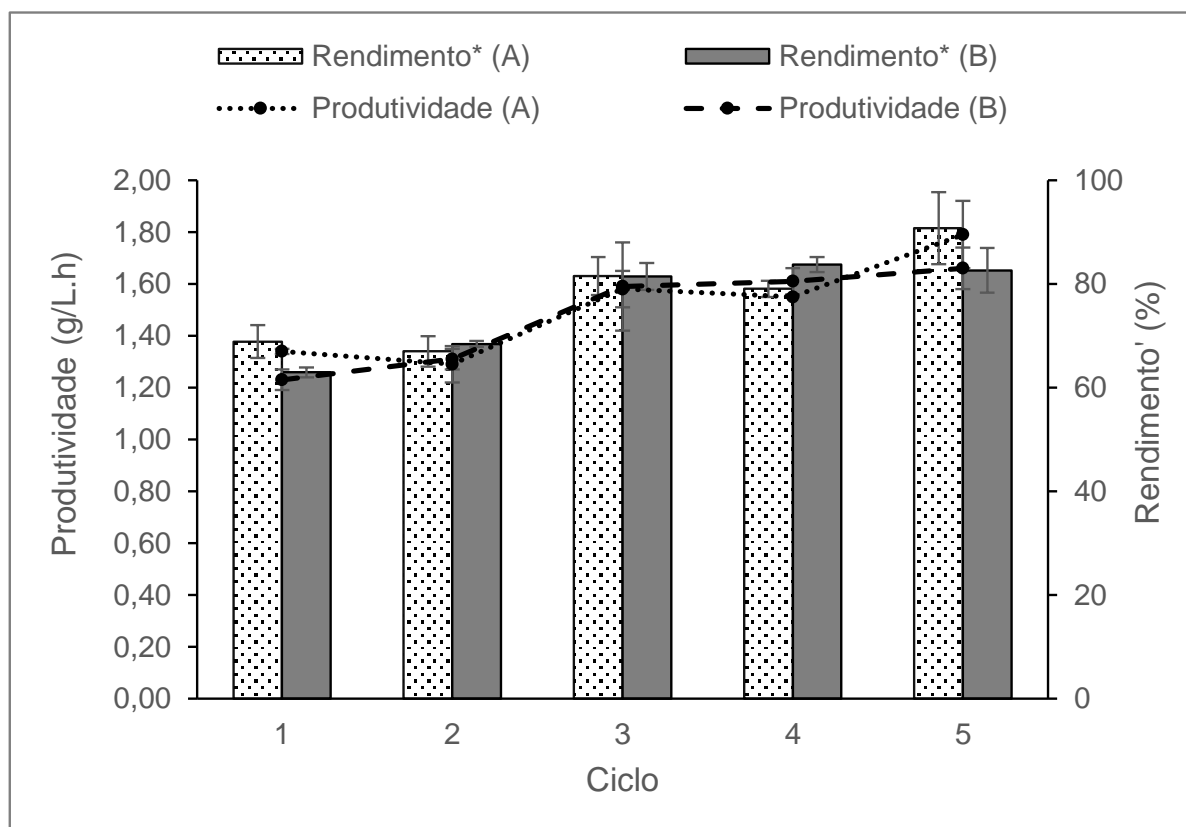
Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), pelo *software* Origin Pro 8.1.

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de parâmetros no mesmo ciclo de fermentação para as diferentes condições em estudo.

*Para o cálculo desse rendimento, foi considerado todo o substrato alimentado no reator.

Conforme mostrado na Tabela 3.2, o aumento na porcentagem de consumo de xilose e a redução no acúmulo de xilitol resultou em uma maior produção de etanol ao longo dos ciclos. Conseqüentemente, houve um aumento no rendimento e na produtividade em etanol, conforme destacado na Figura 3.3. O mesmo comportamento pôde ser observado em um estudo de Wang *et al.* (2017) durante cinco ciclos de fermentação realizados com *S. cerevisiae* apenas em glicose. Conforme reportado pelos autores, a adoção do reciclo de células resultou em aumentos na produtividade volumétrica na velocidade específica de produção de etanol de 43,1 e 42,7 %, respectivamente. Conforme demonstrado pela análise estatística apresentada na Tabela 3.2, as duas estratégias de temperatura apresentaram rendimento e produtividade estatisticamente iguais comparados ciclo a ciclo a 95% de confiança, resultado evidenciado pelo gráfico apresentado na Figura 3.3.

Figura 3.3 Valores de rendimento e produtividade volumétrica de etanol para todos os ciclos nas duas condições de temperatura investigadas - (A) Temperatura fixa de 30 °C; (B) Decréscimo de temperatura de 30 a 26 °C.



*Para o cálculo desse rendimento, foi considerado todo o substrato alimentado no reator.

Dessa forma, através dos resultados obtidos, pode-se concluir que a melhora no desempenho fermentativo da levedura *S. passalidarum* ocorreu pela adaptação do microrganismo devido ao reciclo celular, e não pelo efeito da temperatura em si. Independentemente do esquema de variação de temperatura adotado, a fermentação em batelada alimentada com reciclo de células se mostrou uma estratégia promissora para o aumento da produção de etanol a partir de um substrato rico em xilose, com uma melhora significativa nos parâmetros de processo do primeiro ao último ciclo, atingindo até $90,75 \pm 6,95$ % de rendimento, $1,79 \pm 0,13$ g/L.h de produtividade volumétrica de etanol, com um título máximo de etanol de $44,46 \pm 3,56$ g/L. Se observarmos apenas a condição A, esses números correspondem a um aumento de, aproximadamente, 32, 34 e 34 %, respectivamente, quando comparados ao primeiro ciclo. Além disso, em comparação às fermentações em batelada apresentadas no Capítulo 2, esses resultados também representam um importante avanço, uma vez que, conforme discutido no capítulo indicado, os maiores rendimentos e produtividades obtidos foram de $72,04 \pm 0,41$ % e $0,8674 \pm 0,0027$ g/L.h, respectivamente.

Até onde sabemos, o único estudo que obteve maiores títulos de etanol em meio sintético por *S. passalidarum* foi realizado por Su *et al.* (2015), atingindo concentrações finais de etanol entre 48 e 58 g/L. Entretanto, o tempo de fermentação foi de 120 h, muito superior a cada ciclo realizado no presente estudo (24 h). Sendo assim, apesar da maior quantidade de etanol obtida, a produtividade volumétrica de etanol obtida pelos autores foi inferior (0,84 g/L.h) aos valores obtidos no último ciclo de cada condição do presente estudo, conforme mostrado na Tabela 3.2, enfatizando os importantes resultados obtidos através da aplicação do processo *Melle-Boinot* na levedura *S. passalidarum*.

Portanto, em comparação a outros trabalhos da literatura com foco na produção de etanol a partir de pentoses por *S. passalidarum*, os resultados aqui apresentados representam uma melhora substancial no processo de fermentação. Cabe ressaltar que o uso de leveduras não-convencionais no processo industrial pode ser benéfico quando comparado a organismos geneticamente modificados. O uso de organismos geneticamente modificados pode se tornar inviável devido à necessidade de meios de cultura mais complexos, aumentando os custos do processo (Silva *et al.*, 2007; Schmidell, 2001; Li *et al.*, 2015). Além disso, algumas modificações genéticas requerem um sistema de contenção para evitar vazamento do microrganismo ao meio

ambiente, elevando os riscos e, conseqüentemente, os custos de instalação e operação (BRASIL, 2018; BRASIL, 2006).

Apesar da grande similaridade entre as condições A (temperatura fixa de 30 °C) e B (decréscimo de temperatura), conforme previamente discutido, a condição A se mostra mais interessante do ponto de vista econômico, considerando que a fermentação alcoólica é um processo exotérmico e, segundo Abdel-banat e Hoshida (2013), um aumento de 5 °C na temperatura de fermentação pode diminuir drasticamente o custo de energia, uma vez que o controle do processo em temperaturas mais baixas é mais custoso.

Nesse sentido, a Tabela A.1 apresenta uma comparação entre o desempenho fermentativo obtido pela levedura *S. passalidarum* após ser submetida ao processo *Melle-Boinot* e alguns resultados da literatura para linhagens de *S. cerevisiae* recombinante, também após serem submetidas a diferentes estratégias de adaptação celular para incrementos na produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose. Como já mencionado, no último ciclo de fermentação com *S. passalidarum* do presente trabalho a 30 °C, foi possível obter uma concentração final de etanol de 44,46 g/L em um tempo de 24 h, resultando em uma produtividade volumétrica de 1,79 g/L.h. Nesse caso, o fator de conversão de substrato em etanol de 0,47 g/g.

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, a estratégia de fermentações com reciclo de células também resultou em incrementos nos parâmetros de fermentação, tanto para a levedura *S. passalidarum* (Nakanishi *et al.*, 2017) quanto para *S. stipitis* (Santos *et al.*, 2016). No primeiro trabalho, as fermentações foram realizadas em batelada alimentada utilizando um hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, resultando em uma produtividade de 0,81 g/L.h no último ciclo. Já no segundo, foi utilizado substrato sintético e fermentações em batelada, atingindo uma produtividade de 2,16 g/L.h no último ciclo.

Tabela 3.3 Comparação entre resultados obtidos no presente trabalho e trabalhos da literatura para produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose.

| Microrganismo | Sistema de fermentação | Modo de operação | Substrato (g/L) | Etanol (g/L) | $Y_{P/S}$ (g/g) | Tempo (h) | Q_P (g/L.h) | Referência |
|---|------------------------|--|---|--------------|-----------------|-----------|---------------|----------------------------------|
| <i>S. passalidarum</i> NRRL Y-27907 | Biorreator | Batelada alimentada com reciclo de células (5 ciclos) | 65 (xilose) 29 (glicose) | 44,46 | 0,47 | 24 | 1,79 | Presente estudo** |
| <i>S. passalidarum</i> NRRL Y-27907 | Biorreator | Batelada alimentada com reciclo de células (4 ciclos) | Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar | 23,3 | 0,46 | 24 | 0,81 | Nakanishi <i>et al.</i> (2017)** |
| <i>S. stipitis</i> NRRL Y-7124 | Biorreator | Batelada com reciclo de células (5 ciclos) | 83 (xilose) 37 (glicose) | 34,54 | 0,43 | 15 | 2,16 | Santos <i>et al.</i> (2016)** |
| <i>S. cerevisiae</i> BSPX021 (XR, XDH ARS, XK, <i>gre3::PPP</i> , <i>cox4Δ</i> , AE*) | Frasco | Batelada (após 1000 h de incubação em xilose) | 20 (xilose) 20 (glicose) | 13,95 | 0,38 | 72 | 0,19 | Peng <i>et al.</i> (2012) |
| <i>S. cerevisiae</i> BSPX013 (<i>Pi-XI</i> , XK, <i>gre3::PPP</i> , <i>cox4Δ</i> , AE) | Frasco | Batelada (após 1000 h de incubação em xilose) | 20 (xilose) 20 (glicose) | 15,8 | 0,43 | 75 | 0,21 | Shen <i>et al.</i> (2012) |
| <i>S. cerevisiae</i> KE6-12 | Biorreator | SSCF (após adaptação em hidrolisado de palha de trigo) | Hidrolisado de palha de trigo | 37,8 | - | 120 | 0,32 | Nielsen <i>et al.</i> (2015) |
| <i>S. cerevisiae</i> F106KR | Frasco | Batelada | 102,6 (xilose) 106,7 (glicose) | 89 | 0,42 | 72 | 1,24 | Xiong <i>et al.</i> (2011) |

*A abreviação AE foi utilizada para indicar a linhagem após a evolução adaptativa.

**O último ciclo das fermentações foi considerado.

Já no trabalho de Peng *et al.* (2012), foi obtida uma linhagem de *S. cerevisiae* geneticamente modificada capaz de fermentar xilose de forma efetiva. Inicialmente, a cepa BSPC092 foi construída com inserção dos genes para expressar as enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH) e xiluloquinase (XK), além de modificações na via das pentoses-fosfato (PPP), conforme detalhado pelos autores. Em seguida, essa cepa foi submetida a uma estratégia de evolução adaptativa, sendo obtida a linhagem BSPX021 após 1000 h de incubação em xilose. A cepa foi então avaliada através de uma fermentação em batelada de um substrato misto de xilose e glicose (20 g/L cada), por 72 h, resultando em produtividade volumétrica de 0,19 g/L.h e um rendimento de açúcar em etanol de 0,38 g/L. Cabe ressaltar que outras linhagens também foram obtidas, sendo que a BSPX021 foi a que apresentou o melhor desempenho na produção de etanol a partir de xilose.

Dentro do mesmo grupo de pesquisa, porém em outro trabalho (Shen *et al.*, 2012), um estudo similar foi realizado. Inicialmente, a cepa BSPC095 foi obtida, sendo que todas as modificações genéticas realizadas para obtenção dessa cepa estão detalhadas no referente artigo, destacando a inserção do gene de *Pyromyces* sp. para expressão da enzima xilose isomerase (*Pi-XI*). Novamente, após incubação por mais de 1000 h em xilose como estratégia de evolução adaptativa, a cepa BSPX013 foi obtida, correspondendo ao melhor desempenho fermentativo dentre todas as linhagens avaliadas pelos autores. Nesse caso, após ser submetida a uma fermentação em batelada de um meio composto por xilose e glicose (20 g/L cada), por 75 h, uma concentração de 15,8 g/L de etanol foi obtida, resultando em um rendimento de açúcar em etanol de 0,43 g/L e em uma produtividade de 0,21 g/L.

Em trabalho mais recente (Nielsen *et al.*, 2015), os autores avaliaram a influência de uma adaptação a curto prazo no desempenho fermentativo de uma levedura *S. cerevisiae* consumidora de xilose (KE6-12, Taurus Energy AB), submetida a um processo de sacarificação e co-fermentação simultâneas (SSFC – *simultaneous saccharification and co-fermentation*, em inglês) de hidrolisado de palha de trigo. Para promover a adaptação, o microrganismo foi gradativamente exposto a concentrações do hidrolisado. Os autores concluíram que, como resultado da adaptação imposta, houve um aumento da tolerância a inibidores lignocelulósicos e uma melhora no rendimento em etanol a partir de xilose. No caso da linhagem KE6-12, após 120 h de processo em modo SSCF, uma concentração de 37,8 g/L de etanol foi obtida,

resultando em uma produtividade de 0,32 g/L.h, na condição correspondente a 5 % de sólidos insolúveis em água, conforme detalhado no trabalho.

Por fim, no trabalho de Xiong *et al.* (2011), a linhagem recombinante de *S. cerevisiae* F106KR, cuja construção é detalhada no referente trabalho, foi submetida a uma fermentação de substrato sintético com altas concentrações de xilose. Na condição de maiores concentrações iniciais (102,6 g/L de xilose e 106,7 g/L de glicose), o microrganismo foi capaz de produzir 89 g/L de etanol em 72 h, com uma produtividade de 1,24 g/L.h e um rendimento de açúcar em etanol de 0,43 g/L.

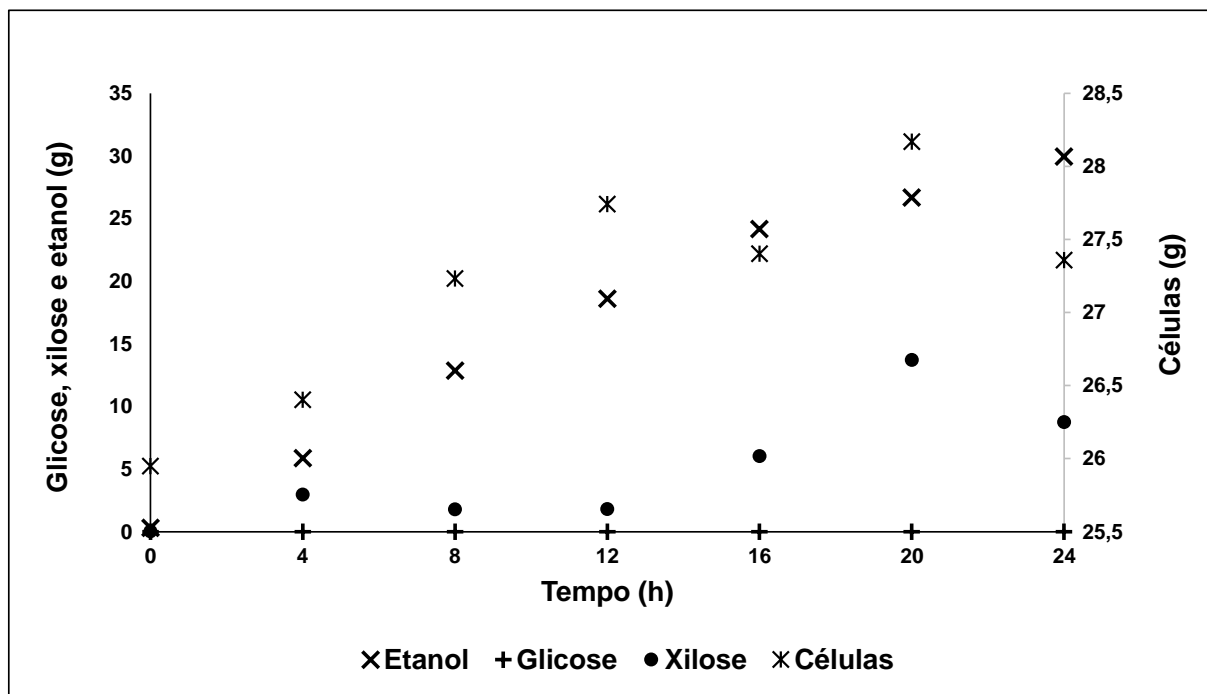
Sendo assim, os resultados obtidos através do sistema de fermentação *Melle-Boinot* apresentados neste capítulo confirmam o potencial da levedura *S. passalidarum* na produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose, tendo em vista os altos valores de produtividade volumétrica obtidos e a capacidade de adaptação desse microrganismo. Como já mencionado, o uso de leveduras nativas no processo industrial pode ser benéfico quando comparado a organismos geneticamente modificados. O uso de organismos geneticamente modificados pode se tornar inviável devido à necessidade de meios de cultura mais complexos, aumentando os custos do processo (Silva *et al.*, 2007; Schmidell, 2001; Li *et al.*, 2015).

3.3.2 Desenvolvimento do modelo matemático e estimação paramétrica

Tendo em vista a similaridade entre as duas estratégias de temperatura aplicadas no presente estudado, conforme previamente discutido, a etapa de modelagem matemática foi realizada considerando os resultados obtidos para as fermentações com a temperatura mantida fixa em 30 °C (condição A), tendo em vista as vantagens econômicas destacadas. As equações para descrever as concentrações de biomassa celular, substrato e etanol foram propostas a partir das observações experimentais. Para tanto, os resultados obtidos para o primeiro ciclo de fermentação foram inicialmente utilizados.

Para eliminar o efeito da diluição do sistema de cultivo, consequência da operação em modo batelada alimentada, os valores de concentrações obtidos em [g/L] foram multiplicados pelo volume do meio de fermentação em cada ponto amostrado, obtendo valores em [g]. Sendo assim, para o primeiro ciclo a 30 °C (condição A), os perfis para célula, glicose, xilose e etanol em [g] é mostrado na Figura 3.4.

Figura 3.4 Perfis para biomassa celular, etanol, glicose residual e xilose residual em [g] para o primeiro ciclo de fermentação a 30 °C (condição A).



Através da Figura 3.4, observa-se que, entre 0 e 12 h de fermentação, há um leve crescimento celular, de 25,95 a 27,74 g de células. Entretanto, após esse período, o crescimento celular é menos proeminente. Nesse estágio da fermentação (entre 12 e 24 h), houve um acúmulo de xilose no meio, conforme pode ser observado no gráfico. Sendo assim, uma possível causa da interrupção no crescimento celular após 12 h foi a inibição por substrato, tendo em vista a alta concentração dessa fonte de carbono no meio de alimentação. Para validar essa hipótese, foi proposta uma equação para descrever o crescimento celular a partir da Equação de Monod (Equação 1.9), porém com a adição de um termo representando a inibição por substrato. Dentre os diferentes tipos de inibição reportados na literatura, foi verificado que o modelo de Andrews melhor descreveu o sistema investigado, assim como apresentado por Farias *et al.* (2014) para a levedura *S. stipitis*. Sendo assim, a Equação 3.10 representa a velocidade específica de crescimento celular para o presente estudo.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (3.10)$$

Onde K_I (g/L) representa o termo de inibição por substrato, ou seja, a concentração de substrato que inibe o crescimento. No Capítulo 2, o crescimento celular nas fermentações em modo batelada foi dividido entre o crescimento causado por glicose e xilose separadamente, com inclusão dos termos de repressão por glicose, conforme detalhado no capítulo mencionado. Já nas fermentações em batelada alimentada apresentadas neste capítulo, a concentração de glicose ao longo de todo o tempo de fermentação é nula, pois a glicose alimentada é imediatamente consumida pela levedura, impossibilitando a inclusão dos termos de repressão por glicose e, conseqüentemente, a avaliação do crescimento celular e da formação de produto de forma individual para cada uma das fontes de carbono. Portanto, nesse caso, foi considerada a concentração de açúcares redutores (glicose e xilose de forma conjunta) para o desenvolvimento das equações.

Sendo assim, considerando a formação de produto, conforme já apresentado por outros autores (Andrade *et al.*, 2007; Farias *et al.*, 2014), a velocidade específica de produção pode ser descrita a partir da Equação 3.11.

$$\pi = Y_{P/X} \cdot \mu + m_P \quad (3.11)$$

Onde $Y_{P/X}$ (g/g) representa o termo de produção de etanol associada ao crescimento celular e m_P (g_{etanol}/g_{célula}·h⁻¹) a produção de etanol não-associada ao crescimento. Já para o consumo de substrato, foi considerada a mesma equação proposta no Capítulo 2. Sendo assim, o consumo de substrato pode ser descrito pela Equação 3.12.

$$\sigma = \frac{\pi}{Y_{P/S}} \quad (3.12)$$

Onde $Y_{P/S}$ (g/g) representa o consumo de substrato utilizado na formação de produto.

Portanto, o modelo proposto é composto por sete equações (3.5-3.8 e 3.10-3.12) e seis parâmetros cinéticos a serem estimados para cada um dos ciclos de fermentação (μ_{max} , K_S , K_I , $Y_{P/X}$, m_P e $Y_{P/S}$). Para o primeiro ciclo, os valores de μ_{max} , K_S e $Y_{P/S}$ foram fixados a partir dos resultados obtidos na determinação paramétrica apresentada no Capítulo 2 (Tabela 2.3 e Figura 2.2), considerando valores intermediários entre os resultados obtidos para glicose e xilose separadamente, uma que vez, nesta seção, estas fontes de carbono são analisadas de forma conjunta, conforme já explicado.

Já para a estimação inicial dos valores de $Y_{P/X}$ e m_P , para cada um dos ciclos, foram feitos gráficos de π em função de μ , em que o coeficiente angular da reta representa $Y_{P/X}$ e o coeficiente linear corresponde ao valor de m_P (ver gráficos no Anexo I).

Sendo assim, a estimação dos parâmetros do modelo foi realizada de forma a representar a fermentação investigada no presente estudo, tendo em vista as melhorias observadas no desempenho fermentativo do primeiro ao último ciclo. Como descrito por Andrade *et al.* (2009), a dificuldade na modelagem de processos biotecnológicos reside na descrição precisa da cinética. Embora muitos modelos matemáticos tenham sido propostos para descrever o processo de fermentação alcoólica, são válidos apenas nas condições usadas para o seu desenvolvimento. Sendo assim, uma modelagem robusta só pode ser alcançada através da atualização dos parâmetros quando há mudanças nas condições operacionais. Entretanto, a frequente re-estimação paramétrica é complexa e demanda tempo. Portanto, a seleção dos parâmetros mais significantes simplifica o processo de re-estimação, diminuindo o número de parâmetros a serem re-estimados.

Nesse sentido, no presente estudo, tentou-se fixar o maior número de parâmetros ao longo dos ciclos, re-estimando apenas aqueles que representassem a melhora do desempenho fermentativo obtida com a aplicação da estratégia de reciclo celular. A otimização dos parâmetros é uma etapa crítica, pois o melhor conjunto de valores pode não ter significado físico coerente, principalmente quando os diferentes ciclos são analisados de forma conjunta. Os valores devem ser estimados de forma a representar as observações experimentais, dando um sentido físico aos parâmetros obtidos.

Tendo em vista essas considerações, a Tabela 3.4 mostra os valores obtidos para todos os parâmetros do modelo para cada ciclo de fermentação a 30 °C, além dos valores de S_m para cada condição, isto é, a concentração de açúcares redutores (glicose e xilose) no meio de alimentação para cada ciclo.

Tabela 3.4 Valores dos parâmetros do modelo obtidos para os cinco ciclos de fermentação a 30 °C, além dos valores de S_m utilizados.

| Parâmetro | Ciclo 1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 | Ciclo 4 | Ciclo 5 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| S_m (g/L) | 140,51 | 139,91 | 137,34 | 139,91 | 139,91 |
| μ_{max} (h^{-1}) | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 | 0,006 |
| K_S (g/L) | 0,2 | 0,2 | 0,15 | 0,001 | 0,001 |
| K_I (g/L) | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| $Y_{P/X}$ (g/g) | 6,40 | 8,87 | 11,80 | 11,80 | 12,00 |
| m_P (h^{-1}) | 0,025 | 0,025 | 0,015 | 0,01 | 0,01 |
| $Y_{P/S}$ (g/g) | 0,355 | 0,355 | 0,355 | 0,42 | 0,425 |

Analisando os parâmetros que compõem a equação para o crescimento celular, o valor de μ_{max} foi mantido fixo em todos os ciclos, sendo um valor intermediário entre os obtidos para glicose e xilose de forma individual no Capítulo 2, como previamente discutido. No caso de K_S , o valor no primeiro ciclo foi fixado em 0,2 g/L, também a partir dos resultados obtidos no Capítulo 2. Este valor pôde ser mantido constante até o ciclo 2, com uma leve queda no ciclo 3. Entretanto, nos ciclos 4 e 5, o melhor ajuste do modelo aos dados experimentais só foi possível com uma diminuição significativa do valor de K_S . Esta diminuição indica que, ao longo dos ciclos, houve um aumento da afinidade do microrganismo pelas fontes de carbono, o que está de acordo com o aumento do percentual de açúcar consumido ao longo dos ciclos, conforme mostrado na Tabela 3.2. No caso do termo correspondente à inibição por substrato (nesse caso, xilose), o valor de K_I foi estimado em 7 g/L, mantido fixo em todos os ciclos, confirmando a hipótese de inibição por substrato no crescimento celular discutida na seção 3.3.1.

Já para os termos relacionados à formação de produto, após a estimativa inicial dos parâmetros $Y_{P/X}$ e m_P através do método gráfico (π vs μ), como anteriormente explicado, os valores foram re-estimados para melhor ajuste do modelo aos dados experimentais. No caso de $Y_{P/X}$, observa-se um aumento ao longo dos

ciclos, resultado da maior formação de produto obtida. Já para m_p , o valor diminuiu, indicando que a formação de produto fica cada vez mais associada ao crescimento celular, em detrimento da produção não-associada ao crescimento, explicando também o aumento nos valores de $Y_{p/X}$.

No caso do parâmetro relacionado ao consumo de substrato para a formação de produto ($Y_{p/S}$), o valor foi mantido em 0,355 g/g no primeiro ciclo, como um valor intermediário entre os obtidos para glicose e xilose de forma individual no Capítulo 2. Entretanto, a partir do ciclo 4, houve um aumento no valor deste parâmetro, também como consequência da maior produção de etanol observada.

Sendo assim, a partir da determinação paramétrica realizada, a comparação entre os perfis de concentração para biomassa celular, substrato e etanol obtidos a partir do modelo desenvolvido e os valores obtidos experimentalmente é apresentada na Figura 3.5, para todos os ciclos a 30 °C.

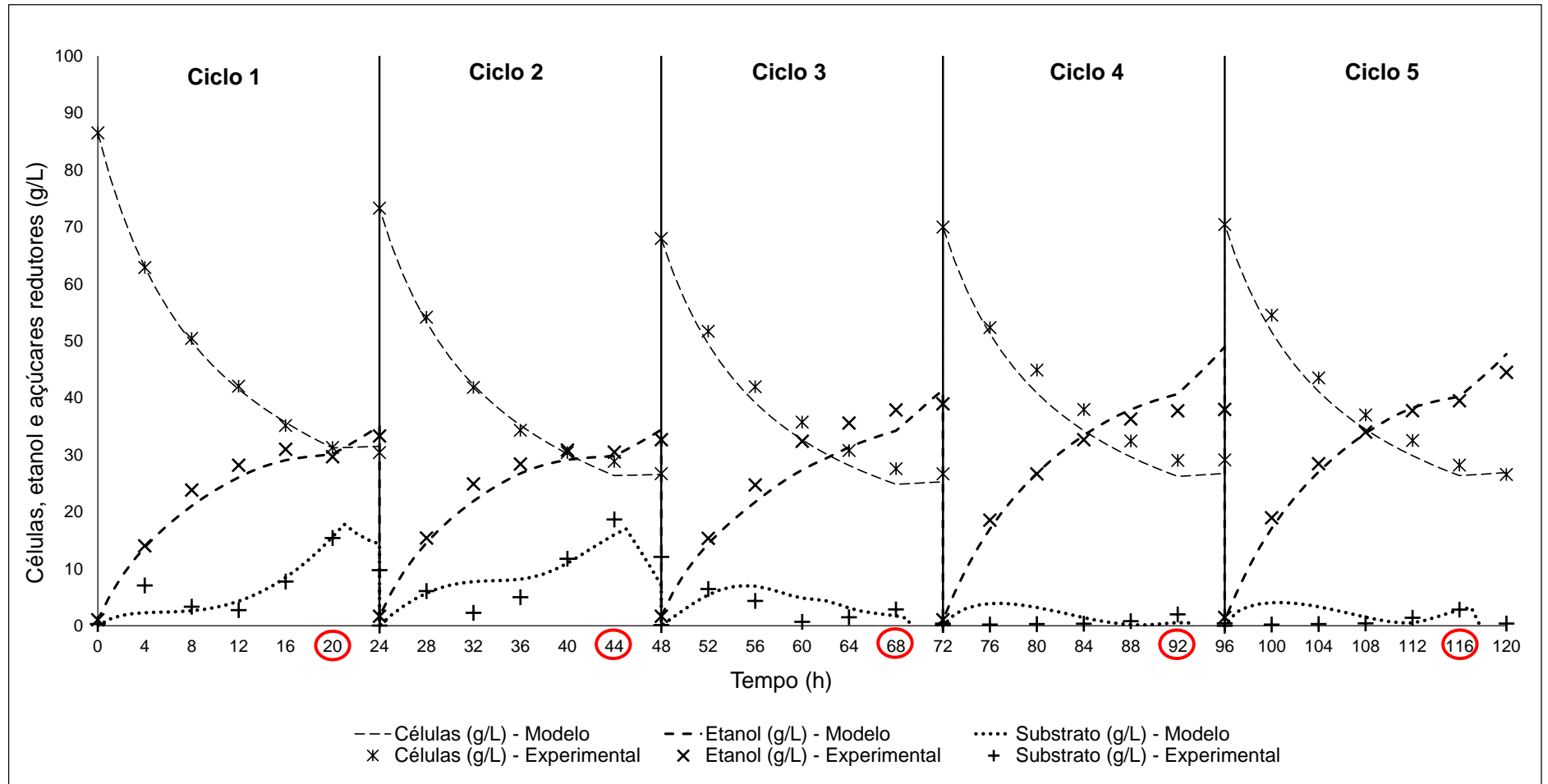
A Tabela 3.5 mostra os valores de RMSE (raiz do erro quadrático médio) para célula, substrato e etanol em todos os ciclos, calculados a partir da Equação 3.9.

Tabela 3.5 Valores de RMSE para célula, substrato e etanol para todos os ciclos a 30 °C.

| Variável | RMSE (g/L) | | | | |
|------------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| | Ciclo 1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 | Ciclo 4 | Ciclo 5 |
| Célula | 0,56 | 1,06 | 2,33 | 2,73 | 2,11 |
| Substrato | 2,56 | 3,06 | 2,11 | 1,93 | 1,94 |
| Etanol | 1,66 | 1,65 | 3,20 | 4,40 | 1,55 |

Como pode ser observado, tanto pela Figura 3.5 quanto pelos valores de RMSE apresentados na Tabela 3.5, o modelo proposto, juntamente com a estimação paramétrica realizada, representou bem o sistema de fermentação em batelada alimentada com reciclo de células investigado no presente estudo. Conforme previamente discutido, houve uma melhora do desempenho fermentativo da levedura ao longo dos ciclos e, através da re-estimação de alguns dos parâmetros chave, foi possível descrever essa melhora no desempenho, indicado pela maior formação de produto e pelo menor acúmulo de substrato, como mostrado na Figura 3.5.

Figura 3.5 Perfis de concentração de células, etanol e substrato (açúcares redutores – glicose + xilose) obtidos a partir do modelo em comparação aos dados experimentais. O círculo vermelho indica o tempo em que a alimentação foi interrompida.



3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos resultados obtidos, destacam-se os benefícios do processo *Melle-Boinot* no desempenho de leveduras nativas, considerando os aumentos de, aproximadamente, 32 % no rendimento em etanol e 18 % no consumo de xilose do primeiro ao quinto ciclo de fermentação em uma temperatura adequada para aplicação na indústria (30 °C). Nessa temperatura, no último ciclo de fermentação, o rendimento chegou a 91 %, com uma produtividade volumétrica de 1,79 g/L.h e 100 % do substrato consumido, com uma produção de xilitol praticamente nula. Para uma investigação mais detalhada da diminuição da produção de xilitol registrada e, conseqüentemente, melhora do desempenho na produção de etanol, outras análises são fundamentais, como transcriptômicas, metabolômicas, proteômicas ou medições de atividades enzimáticas. Um trabalho em andamento do grupo de pesquisa investiga os efeitos da adaptação proporcionada pelo processo *Melle-Boinot* através de análises de transcriptoma e metabolômica. De forma geral, a levedura *S. passalidarum* confirma-se como uma alternativa promissora para utilização em escala industrial, tendo em vista os resultados obtidos neste estudo.

Quanto ao modelo matemático proposto, o conjunto de parâmetros e equações representou satisfatoriamente as fermentações em batelada alimentada realizadas. Apesar da re-estimação paramétrica ser uma etapa que demanda tempo, ela se mostra necessária quando há mudanças no desempenho fermentativo do microrganismo, causadas, nesse caso, pelos efeitos do reciclo celular adotado.

CAPÍTULO 4: AVALIAÇÃO DE UMA ESTRATÉGIA DE ADAPTAÇÃO DA LEVEDURA *S. stipitis* FRENTE A CONCENTRAÇÕES CRESCENTES DE HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Este capítulo descreve os resultados obtidos para uma linhagem de *S. stipitis* submetida a uma estratégia de adaptação por meio de fermentações consecutivas com concentrações crescentes de um hidrolisado hemicelulósico e, conseqüentemente, de inibidores presentes neste hidrolisado. Para obtenção do hidrolisado, bagaço de cana-de-açúcar foi submetido a um pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, realizado pela equipe coordenada pela Profa. Dr^a. Sarita Rabelo, seguindo protocolo previamente estabelecido (Santoro *et al.*, 2015). Os efeitos da adaptação da levedura no sistema fermentativo foram avaliados através da estimação e comparação de parâmetros cinéticos ao longo das fermentações realizadas, determinados a partir da aplicação dos modelos matemáticos desenvolvidos nos Capítulos 2 e 3. Ao final, o desempenho fermentativo da levedura adaptada foi comparado com o da levedura que não foi submetida a tal processo. Além disso, foram realizadas análises de proteômica em diferentes momentos das fermentações realizadas, com o intuito de compreender os mecanismos de adaptação do microrganismo promovidos pela exposição ao hidrolisado hemicelulósico. Cabe ressaltar que os resultados experimentais apresentados neste capítulo foram obtidos dentro do projeto de pós-doutorado da Dra. Samantha Christine Santos.

4.1 INTRODUÇÃO

Nos capítulos anteriores do presente trabalho, o estudo da cinética fermentativa das leveduras *S. passalidarum* e *S. stipitis* foi realizado através de fermentações de substratos sintéticos ricos em xilose, possibilitando a compreensão do metabolismo de produção de etanol de segunda geração para ambas as leveduras sem a influência de compostos inibitórios oriundos do pré-tratamento da biomassa lignocelulósica. Nesse sentido, modelos matemáticos para descrever as fermentações realizadas foram propostos, tanto para a operação em modo batelada, quanto para batelada alimentada, na presença de dois açúcares (xilose e glicose).

Entretanto, visando a aplicação em um processo industrial, a compreensão do metabolismo de fermentação quando os microrganismos são submetidos a hidrolisados hemicelulósicos é de fundamental importância. Nesse contexto, Biswas *et al.* (2013) realizaram fermentações com *S. stipitis* utilizando hidrolisados de bagaço com diferentes concentrações de inibidores encontrados em hidrolisados (ácido acético, furfural e HMF). Na condição com maior concentração de ácido acético (6,8 g/L), foi observada uma fase lag de 12 h para o crescimento celular, o que não ocorreu nas condições mais amenas, corroborando o efeito prejudicial dos compostos inibitórios no metabolismo de xilose do microrganismo.

Cabe ressaltar que adicionar uma etapa de detoxificação (geralmente pela adição de compostos químicos e realização de processos físicos) do hidrolisado encarece o processo e aumenta os impactos ambientais devido ao maior uso de água (García-Aparicio *et al.*, 2006), além de reduzir a quantidade de açúcares obtida na hidrólise (Matos *et al.*, 2016), pois estes são perdidos no processo de detoxificação. Sendo assim, diferentes estratégias têm sido buscadas para aumentar a tolerância dos microrganismos frente aos compostos inibitórios presentes nos hidrolisados hemicelulósicos sem a necessidade de detoxificação do meio. Nesse cenário, no trabalho de Landaeta *et al.* (2013), foi avaliada uma estratégia de adaptação de uma linhagem floculante de *S. cerevisiae* (NRRL Y-265) a diferentes inibidores encontrados em hidrolisados lignocelulósicos, sendo que foram realizadas fermentações em batelada com reciclo de células durante 39 dias, com aumento gradual nas concentrações de inibidores, simulando um hidrolisado industrial. A estratégia adotada resultou em aumentos na produtividade volumétrica de etanol e na velocidade de crescimento (10 e 70 %, respectivamente) em relação à linhagem parental,

possibilitando melhores resultados na produção de etanol a partir de hidrolisado obtido pelo pré-tratamento de eucalipto.

No trabalho de Santos *et al.* (2016), foram realizadas fermentações em batelada com reciclo de células (CRBF) com a linhagem *S. stipitis* NRRL Y-7124, onde foi avaliada uma adaptação a curto prazo do microrganismo, a fim de se realizar uma adaptação a um meio com altas concentrações de xilose. Ao final de dez fermentações sequenciais, os autores observaram que a robustez da cepa foi aprimorada, corroborada por um aumento de 6 vezes na atividade da xilose-redutase (XR), isto é, houve um aumento de atividade na rota de assimilação da xilose. Após a conclusão do estudo, a cepa adaptada foi armazenada em glicerol a -80 °C para fermentações futuras. Vale ressaltar que esse estudo foi realizado através de fermentações de substrato sintético, sem concentração de inibidores e sem a complexidade advinda do uso de substratos reais.

No presente estudo, a linhagem de *S. stipitis* obtida após as dez fermentações sequenciais previamente descritas (Santos *et al.*, 2016) foi submetida a uma estratégia de evolução adaptativa, onde fermentações foram realizadas com concentrações crescentes de um hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Sendo assim, o principal objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi a obtenção de uma linhagem de *S. stipitis* com maior tolerância aos compostos inibitórios presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, a fim de eliminar a necessidade de detoxificação do meio e, conseqüentemente, os custos associados.

Nesse sentido, foram realizadas cinco fermentações em batelada com reciclo de células (CRBF) utilizando um substrato com 33 % das fontes de carbono proveniente de hidrolisado hemicelulósico, seguidas por cinco fermentações sequenciais em batelada aumentando essa proporção para 67 %. Então, a levedura foi submetida a uma fermentação em batelada alimentada com alimentação de um substrato composto por 100 % de hidrolisado. O sistema de batelada alimentada minimiza a inibição por substrato e, no caso da fermentação de hidrolisados, permite uma alimentação lenta dos inibidores, alguns dos quais podem ser consumidos pelo microrganismo em baixas concentrações (Nakanishi *et al.*, 2017).

Para compreender o efeito da estratégia de evolução empregada no metabolismo de fermentação do microrganismo, os modelos matemáticos desenvolvidos nos Capítulos 2 e 3 foram aplicados no presente estudo, permitindo um melhor entendimento dos impactos das fermentações nos parâmetros cinéticos. Além

disso, análises de proteômica foram realizadas para abordar genotipicamente os efeitos da adaptação celular. Ao final, para validar a estratégia de evolução proposta, a levedura adaptada foi avaliada frente a diferentes concentrações de ácido acético, em comparação com uma linhagem de *S. stipitis* não adaptada.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Pré-tratamento do bagaço da cana-de-açúcar com ácido diluído

O hidrolisado hemicelulósico utilizado nesse estudo foi obtido por meio do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido diluído, seguindo procedimento descrito por Santoro *et al.* (2015) e Roque *et al.* (2019). Sendo assim, o pré-tratamento ácido foi realizado em um reator de aço liga de 350 L (Pope Scientific Inc., Saukville, EUA), utilizando, aproximadamente, 15 kg de bagaço cru (50 % m/m de umidade) sem moagem ou lavagem prévia, com 9 % (m/m) de carga de sólidos. A reação foi realizada a 140 °C por percolação de fluido térmico através da camisa do reator, por 15 min a 150 rpm, e 0,5 % (v/v) de uma solução de H₂SO₄.

Após a reação, o reator foi esfriado com água, despressurizado e aberto. As frações de material pré-tratadas foram separadas por um filtro Nutsche com 140 L de capacidade (Pope Scientific Inc., Saukville, EUA). A fração sólida, composta principalmente por celulignina, foi armazenada em um contêiner refrigerado e sua composição caracterizada.

A fração líquida, compreendendo o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, foi concentrada três vezes em evaporador de filme seco (Pope Scientific Inc., Saukville, EUA) com capacidade de evaporação de água de até 50 kg/h. O hidrolisado foi então armazenado em um contêiner refrigerado para posterior aplicação nas fermentações. Esta etapa do trabalho foi realizada pela equipe de pré-tratamento da planta piloto do Laboratório Nacional de Biorrenováveis (LNBR), sob a supervisão da Profa. Dr^a. Sarita Rabelo.

4.2.2 Microrganismo, pré-inóculo, inóculo e propagação celular

A linhagem de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 obtida por Santos *et al.* (2016) foi utilizada neste estudo. Inicialmente, a cepa estava armazenada em glicerol a -80 °C. Conforme protocolo descrito nas seções 2.2.1 e 2.2.2, o microrganismo passou pelas etapas de pré-inóculo, inóculo e propagação celular para

obtenção da biomassa celular de alta densidade para realização de cada uma das etapas de fermentação. Esta etapa do processo foi realizada dentro do projeto de pós-doutorado da Dra. Samantha Christine Santos.

4.2.3 Adaptação da linhagem de *S. stipitis* através de fermentações com concentrações crescentes de hidrolisado hemicelulósico

4.2.3.1 Fermentações em batelada com reciclo de células com concentração crescente de hidrolisado hemicelulósico

A biomassa celular obtida na etapa de propagação foi direcionada para cinco fermentações sequenciais em batelada (CRBF), realizadas em um biorreator de 3 L totalmente equipado (New Brunswick BioFlo® 115), com 1,4 L como volume reacional (adaptado de Santos *et al.* (2016)). A concentração inicial de células no primeiro ciclo foi de 10 g/L, aproximadamente. O meio foi composto por uma mistura de hidrolisado hemicelulósico e substrato sintético, a fim de se obter uma concentração final de (g/L): xilose (63,0), glicose (27,0), extrato de levedura (3,0), MgSO₄.7H₂O (1,0) e ureia (2,3) (adaptado de Santos *et al.* (2015)). Nos cinco ciclos iniciais de fermentação, 33 % das fontes de carbono foram fornecidas pelo hidrolisado. Em seguida, foram realizados cinco ciclos com elevação dessa proporção para 67 %. Para todas as fermentações, foi aplicada uma agitação de 200 rpm e uma microaeração de 0,1 vvm. A temperatura do primeiro ciclo foi de 30 °C, sendo que foi aplicado um esquema de diminuição da temperatura em 1 °C entre os ciclos, com base nos resultados obtidos anteriormente por Santos *et al.* (2016). A estratégia de diminuição de temperatura já é executada em usinas de etanol de primeira geração, uma vez que a toxicidade causada por altas concentrações de etanol em leveduras aumenta com a temperatura (Russell *et al.*, 2012)

Os quatro primeiros ciclos foram conduzidos por, aproximadamente, 20 h cada; já o quinto ciclo durou 70 h, ou seja, um tempo total de fermentação de 150 h. Entre os ciclos, a fermentação foi interrompida e o meio fermentativo foi bombeado para fora do biorreator para um recipiente estéril usando uma bomba peristáltica (modelo peristáltico Watson-Marlow® 114DV), centrifugado a 11970 xg por 20 min, seguindo o procedimento descrito por Santos *et al.* (2016). Água estéril foi usada para ressuspender a biomassa precipitada, a qual foi bombeada de volta para o biorreator. Antes de iniciar o ciclo subsequente, foi realizado um tratamento ácido por 30 min, em

que o pH foi mantido em 2,5 por adição de H₂SO₄ 2M, a 30 °C. Durante esse período, a aeração foi mantida em 0,2 vvm. O pré-tratamento com ácido foi aplicado para evitar a aglomeração celular durante a fermentação e minimizar a fixação de biomassa nas superfícies, devido ao caráter floculante da levedura *S. stipitis* (Westeman *et al.*, 2012). O novo meio de fermentação foi então introduzido no biorreator para iniciar o novo ciclo de fermentação.

Após os cinco ciclos de fermentação com 33 % de hidrolisado hemicelulósico, o meio fermentativo foi bombeado para fora do biorreator para um recipiente estéril usando uma bomba peristáltica (modelo peristáltico Watson-Marlow® 114DV), centrifugado a 11970 xg por 20 min. A biomassa precipitada foi ressuspendida em água estéril e uma alíquota armazenada em glicerol a -80 °C. Em seguida, essa biomassa celular obtida foi submetida ao mesmo sistema CRBF descrito anteriormente, porém com uma maior concentração de hidrolisado no substrato (67 %). Para tal, o microrganismo passou pelas mesmas etapas de pré-inóculo, inóculo e propagação celular. Para as fermentações em CRBF com 67 % de hidrolisado, as operações foram realizadas conforme descrito anteriormente para 33 % de hidrolisado. No final do quinto ciclo, o meio fermentado foi bombeado para fora do biorreator para um recipiente estéril e centrifugado a 11970 xg por 20 min. A biomassa precipitada foi ressuspendida em água estéril e uma alíquota foi armazenada em glicerol a -80 °C para posterior utilização no sistema de fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado, conforme será descrito a seguir.

Para ambos os casos (33 e 67 % de hidrolisado), amostras foram coletadas regularmente durante os cinco ciclos para medições das concentrações de metabólitos extracelulares, peso seco e viabilidade celular. No tempo de 144 h de cada sistema de fermentação, amostras adicionais para análise de proteômica foram coletadas.

4.2.3.2 Fermentações em batelada alimentada com alimentação de 100% de hidrolisado

Para realização desta etapa de fermentação, células obtidas no sistema anterior, a qual estavam armazenadas a -80 °C, foram submetidas aos processos de pré-inóculo, inóculo e propagação celular conforme descrito anteriormente. Em seguida, as células foram transferidas para um sistema de fermentação em batelada

alimentada com alimentação de um substrato composto por 100 % de hidrolisado, seguindo o protocolo de fermentação adaptado de Nakanishi *et al.* (2017). Um biorreator de 1,4 L (New Brunswick BioFlo® 115) foi utilizado neste estudo, com um volume final de fermentação de 720 mL. Inicialmente, 250 mL do creme de levedura foram introduzidos no biorreator, correspondendo a, aproximadamente, 1/3 do volume final de operação. Durante a fase de batelada alimentada, uma alimentação de substrato a uma vazão de 13 mL/h foi aplicada para completar o volume total de reação de 720 mL em 36 h, através de uma bomba peristáltica (modelo peristáltico Watson-Marlow® 114DV). As concentrações de xilose e glicose no hidrolisado foram de 137,74 e 43,65 g/L, respectivamente, com uma concentração de substrato total de 181,39 g/L. Após 36 h, a alimentação foi interrompida e a reação foi estendida para um tempo final de 108 h, operando em modo batelada. Durante todo o tempo de fermentação, a agitação foi mantida em 200 rpm, a aeração em 0,1 vvm e a temperatura em 30 °C.

Para monitoramento da fermentação, foram colhidas amostras para determinação da concentração de metabólitos extracelulares, peso seco e viabilidade celular. Em relação à análise proteômica, amostras adicionais foram coletadas no tempo final de fermentação (108 h).

4.2.4 Metodologia analítica

Concentrações de levedura foram medidas por análises gravimétricas em triplicata, onde 1,5 mL de cada amostra foram submetidos a centrifugação (15871 \times g por 5 minutos), ressuspendidas duas vezes em água destilada e encaminhadas a um forno secador de biomassa a 80 °C. A viabilidade celular foi determinada através de microscopia óptica com lente objetiva de 40X, considerando células viáveis e não-viáveis. A contagem foi efetuada por câmara de Neubauer e azul de metileno foi usado para diferenciar células vivas das mortas.

Análises de glicose, xilose, ácido acético, xilitol, glicerol e etanol foram determinadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Agilent Infinity 1260, Santa Clara, CA, USA). Amostras foram filtradas através de um filtro de PVDF Millex 22 μ m, e o filtrado foi injetado no sistema HPLC. Compostos foram separados com Aminex HPX 87H (300 7,8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA) a 35 °C usando H₂SO₄ 5 mM como fase móvel a uma taxa de 0,6 mL/min.

Para análise de furfural e HMF, foi utilizado um sistema HPLC de fase reversa equipado com uma coluna Acclaim 120 C18 (150 mm × 4,6 mm, 3 μm) e um detector de um único comprimento de onda UV. A fase móvel foi água:acetonitrila 1:8 (v/v) com ácido acético a 1% (v/v) a uma vazão de 0,8 mL/min à temperatura ambiente.

O conteúdo total de compostos fenólicos da lignina no hidrolisado foi determinado por espectrofotometria UV no comprimento de onda de 280 nm. As amostras analisadas foram diluídas, quando necessário, e tiveram seu pH aumentado para 12,0 por uma solução concentrada de NaOH, conforme Sluiter *et al.* (2016).

4.2.5 Cálculo dos parâmetros de fermentação

Os parâmetros de fermentação foram calculados para avaliar o desempenho da levedura *S. stipitis* na produção de etanol. O rendimento (η' , %) de cada fermentação é dado pela Equação 4.1, calculado considerando todo o açúcar alimentado no sistema. Já a produtividade volumétrica do etanol (Q_P , g/L.h) foi calculada de acordo com a Equação 4.2. Fatores de conversão (observáveis) de açúcares redutores em etanol ($Y_{P/S}$, g/g) e em biomassa celular ($Y_{X/S}$, g/g) foram calculados de acordo com as Equações 4.3 e 4.4, respectivamente.

$$\eta' = \frac{P_f - P_0}{S_0} \cdot \frac{100}{0,511} \quad (4.1)$$

$$Q_P = \frac{P_f - P_0}{t_f} \quad (4.2)$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S_f} \quad (4.3)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S_f} \quad (4.4)$$

4.2.6 Análise estatística

Os valores de concentrações e parâmetros cinéticos descritos acima foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando o *software* Statistica.

4.2.7 Modelagem matemática

4.2.7.1 Modelagem matemática para as fermentações em batelada

Conforme previamente detalhado na seção 4.2.3.1, as fermentações em batelada foram realizadas com concentrações de xilose e glicose de 63 e 27 g/L, respectivamente, além de alta densidade celular, sob condição de limitação de oxigênio. Nesse sentido, as condições empregadas foram similares às fermentações em batelada descritas no Capítulo 2. Dessa forma, o modelo proposto para investigar as fermentações em batelada com reciclo de células para *S. stipitis*, tanto para 33 quanto para 67 % de hidrolisado, foi baseado no modelo desenvolvido e validado no Capítulo 2.

Sendo assim, para fermentações em batelada, o balanço de massa para célula, glicose, xilose e etanol podem ser descritos pelas Equações 4.5-4.8.

$$\frac{dX}{dt} = r_X \quad (4.5)$$

$$\frac{dS_{Glu}}{dt} = -r_{Glu} \quad (4.6)$$

$$\frac{dS_{Xyl}}{dt} = -r_{Xyl} \quad (4.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = r_P \quad (4.8)$$

Com base no modelo apresentado no Capítulo 2, o crescimento celular pode ser dividido entre o crescimento causado pelos consumos de glicose e xilose de forma separada (Equações 2.11 e 2.12). Entretanto, este modelo foi desenvolvido a partir de fermentações de um meio sintético, sem concentração de inibidores. Tendo

em vista que as fermentações no presente estudo foram realizadas com hidrolisado hemicelulósico, foi necessário incluir termos correspondentes à inibição por ácido acético, por se tratar de um composto que afeta o metabolismo de fermentação da xilose de forma significativa, como reportado por Soares (2018). Segundo os autores, no caso da levedura *S. stipitis*, uma concentração de ácido acético superior a 0,7 g/L foi suficiente para afetar a velocidade de consumo desse açúcar, sendo que, em concentrações acima de 2,6 g/L de ácido, o consumo de xilose foi inibido, praticamente, de forma completa. No caso da glicose, os efeitos são menos pronunciados, sendo que houve uma diminuição na velocidade de consumo dessa fonte de carbono acima da concentração de 2,6 g/L de ácido. Dessa forma, as Equações 4.9-4.11 descrevem as velocidades específicas de crescimento a partir de glicose, xilose e para a mistura dos açúcares.

$$\mu_{Glu} = \mu_{Glu,max} \cdot \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K_{S,Glu}} \left(1 - \frac{AC}{AC_{max}}\right)^{nn_{X,Glu}} \quad (4.9)$$

$$\mu_{Xyl} = \mu_{Xyl,max} \cdot \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K_{S,Xyl}} \cdot \frac{1}{1 + R \cdot S_{Glu}^n} \left(1 - \frac{AC}{AC_{max}}\right)^{nn_{X,Xyl}} \quad (4.10)$$

$$\mu_{Mix} = \mu_{Glu} + \mu_{Xyl} \quad (4.11)$$

Onde AC é a concentração de ácido acético no meio, AC_{max} é a máxima concentração de ácido acético em que o crescimento celular é interrompido e $nn_{X,Glu}$ e $nn_{X,Xyl}$ são termos correspondentes à inibição por ácido acético no crescimento causado pelo consumo de glicose e xilose, respectivamente.

Analogamente, as velocidades específicas de produção de etanol considerando o consumo de glicose ou xilose e a mistura das duas fontes de carbono estão detalhadas nas Equações 4.12 a 4.14, novamente com a inclusão dos termos referentes à inibição por ácido acético.

$$\pi_{Glu} = \pi_{Glu,max} \cdot \frac{S_{Glu}}{S_{Glu} + K'_{S,Glu}} \left(1 - \frac{AC}{AC_{max}}\right)^{nn_{P,Glu}} \quad (4.12)$$

$$\pi_{Xyl} = \pi_{Xyl,max} \cdot \frac{S_{Xyl}}{S_{Xyl} + K'_{S,Xyl}} \cdot \frac{1}{1 + R' \cdot S_{Glu}^{n'}} \left(1 - \frac{AC}{AC_{max}}\right)^{nn_{P,Xyl}} \quad (4.13)$$

$$\pi_{Mix} = \pi_{Glu} + \pi_{Xyl} \quad (4.14)$$

Onde $nn_{P,Glu}$ e $nn_{P,Xyl}$ são termos correspondentes à inibição por ácido acético na produção de etanol decorrente do consumo de glicose e xilose, respectivamente.

Assim como no Capítulo 2, as velocidades específicas de consumo de glicose e xilose são descritas a partir dos fatores de conversão de açúcar em etanol. Entretanto, para cada uma das fontes de carbono, foi necessário incluir os termos correspondentes ao consumo de açúcar destinado à manutenção celular, conforme mostrado nas Equações 4.15 e 4.16, o qual era nulo nas fermentações em bateladas simples com substrato sintético. No presente estudo, por se tratar de fermentações sucessivas com reciclo de células a partir de um hidrolisado hemicelulósico, esses termos se fazem presentes.

$$\sigma_{Glu} = \frac{1}{Y_{P/Glu}} \cdot \pi_{Glu} + m_{X,Glu} \quad (4.15)$$

$$\sigma_{Xyl} = \frac{1}{Y_{P/Xyl}} \cdot \pi_{Xyl} \cdot \left(\frac{1}{1 + R'' \cdot S_{Glu}^{n''}} \right) + m_{X,Xyl} \quad (4.16)$$

Onde $m_{X,Glu}$ e $m_{X,Xyl}$ representam as velocidades específicas de consumo de glicose e xilose para manutenção celular, respectivamente. Os trabalhos de modelagem matemática e determinação paramétrica foram realizados através do *software* Microsoft Excel 2013, cujo detalhamento é apresentado na seção 4.3.2.2.

4.2.7.2 Modelagem matemática para a fermentação em batelada alimentada

Assim como já apresentado no Capítulo 3, o balanço de massa para célula, substrato e etanol em um sistema operado em modo batelada alimentada é descrito pelas Equações 4.17-4.19.

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D)X \quad (4.17)$$

$$\frac{dS}{dt} = D(S_m - S) - \sigma \cdot X \quad (4.18)$$

$$\frac{dP}{dt} = \pi \cdot X - D \cdot P \quad (4.19)$$

Onde μ , σ e π representam as velocidades específicas de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol, respectivamente, S_m a concentração de substrato na corrente de alimentação (nesse caso, 181,39 g/L) e D (h^{-1}) a velocidade específica de alimentação do sistema, calculado através da Equação 4.20.

$$D = \frac{F}{V} \quad (4.20)$$

Onde F (L/h) é a vazão da corrente de alimentação (nesse caso, 0,013 L/h) e V (L) é o volume do meio de fermentação no reator a cada instante.

Analogamente, para a construção do modelo matemático representando a fermentação em questão, foram utilizadas as equações propostas no Capítulo 3 (Equações 3.9-3.11). Mais uma vez, foi necessário incluir o termo referente à inibição por ácido acético, uma vez que as fermentações do capítulo mencionado foram realizadas utilizando substrato sintético, sem concentração de inibidores, diferentemente do presente estudo. Além disso, o termo correspondente ao consumo de açúcar destinado à manutenção celular (m_x) também foi incluído. Sendo assim, as equações para velocidade específica de crescimento celular, produção de etanol e consumo de substrato são dadas pelas Equações 4.21-4.23, respectivamente.

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S + \frac{S^2}{K_I}} \left(1 - \frac{AC}{AC_{max}}\right)^{nn} \quad (4.21)$$

$$\pi = Y_{P/X} \cdot \mu + m_P \quad (4.22)$$

$$\sigma = \frac{\pi}{Y_{P/S}} + m_X \quad (4.23)$$

Como pode ser observado, o termo referente à inibição por ácido acético foi incluído apenas na equação para o crescimento celular (μ), uma vez que π é descrito em função de μ , e σ é escrito em função de π , ou seja, a inibição por ácido acético se faz presente em todas as equações. Os trabalhos de modelagem matemática e determinação paramétrica foram realizados através do *software* Microsoft Excel 2013, cujo detalhamento é apresentado na seção 4.3.3.2.

4.2.7.3 Análise estatística

Para avaliar o ajuste dos modelos propostos, tanto para as fermentações em batelada quanto em batelada alimentada, a raiz do erro quadrático médio (RMSE - *root-mean-squared error*, em inglês) (Equação 4.24) foi calculada.

$$RMSE = \sqrt{\left(\sum_{i=t_0}^{i=t_f} (y(t_i) - \bar{y}(t_i))^2 \right) \left(\frac{1}{n_p} \right)} \quad (4.24)$$

4.2.8 Análise de proteômica

4.2.8.1 Preparação das amostras para análise de proteômica

As amostras foram coletadas nos tempos de 144 h para as condições de 33 e 67 % de hidrolisado (último de ciclo de fermentação), e no tempo de 108 h para a fermentação com 100 % de hidrolisado. Um mililitro de sobrenadante foi concentrado usando um concentrador centrífugo de 10 kDa (MWCO Vivaspín, GE Healthcare). As proteínas foram quantificadas pelo teste de Bradford (Bradford 1976) usando a diluição de albumina sérica como padrão. A mesma quantificação foi feita para o *pellet* diluído. Após quantificação, 100 μ L de ácido tricloroacético 1M foram adicionados a 200 μ g de proteína de cada sobrenadante concentrado e um volume

final de 500 μ L foi completado com água estéril, seguido de incubação em gelo de um dia para o outro. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 min. Os precipitados foram lavados três vezes com 1 mL de acetona fria e ressuspensos em ureia 8M, seguido de redução de proteínas com ditioneitol (5 mM por 25 min a 56 °C) e alquilação com iodoacetamida (14 mM por 30 min a temperatura ambiente no escuro) (Kaupert Neto *et al.*, 2015).

Para digestão de proteínas, a ureia foi diluída até uma concentração final de 1,6 M e 1 mM de cloreto de cálcio foi adicionado às amostras para digestão com tripsina durante 16 horas a 37 °C (adaptado de Villén & Gygi, 2008). Os peptídeos derivados das amostras digeridas com tripsina foram purificados em StageTips C18, secos em um concentrador a vácuo e reconstituídos em ácido fórmico a 0,1 %.

4.2.8.2 *Análise por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)*

Uma alíquota de 4,5 μ L (aproximadamente 2 μ g de peptídeos) foi separada por RP-nanoUPLC C18 (100 μ m x 100 mm) (nanoAcquity, Waters) acoplado a um espectrômetro de massa Q-ToF Premier (Waters) com fonte de nanoeletropulverização a uma vazão de 0,6 μ L/min. O gradiente foi de 2-90 % de acetonitrila em ácido fórmico 0,1% durante 60 minutos para as proteínas digeridas. A voltagem do nanoeletropulverizador foi ajustada para 3,5 kV, com uma voltagem cônica de 30 V e uma temperatura da fonte de 80 °C. O instrumento foi operado no modo “três principais”, no qual um espectro de MS é adquirido seguido por MS/MS dos três picos mais intensos detectados. Após a fragmentação do MS/MS, o íon foi colocado na lista de exclusão por 60 s (Kaupert Neto *et al.*, 2015). Essas análises foram realizadas no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio).

4.2.8.3 *Análise dos dados*

Os espectros foram adquiridos usando o *software* MassLynx v.4.1 e os arquivos de dados brutos foram convertidos para um formato de lista de pico (mgf) pelo *software* Mascot Distiller v. 2.6.2.0, 2009 (Matrix Science Ltd.) e pesquisados no banco de dados *Scheffersomyces stipitis* (8.738 seqüências; 4.280.446 resíduos) usando o MASCOT v.2.3.2 2009 (Matrix Science Ltd.), com carbamidometilação como

modificação fixa, oxidação de metionina como modificação variável, uma tripsina perdida na clivagem e uma tolerância de 0,1 Da para íons precursores e fragmentos. Para identificação das proteínas, foi utilizado o software Scaffold (versão 4.9.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validação dos dados de espectrometria de massas dos peptídeos e das proteínas identificadas. Os peptídeos identificados foram aceitos se obedecessem a uma probabilidade acima de 95 % de acordo com o algoritmo de FDR (*False Discovery Rate*) proposto pelo software. A identificação das proteínas foi aceita caso obedecessem a uma probabilidade maior que 99,9 % além de conter ao mínimo 2 peptídeos identificados de sua sequência. As probabilidades das proteínas foram calculadas a partir do algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii *et al.*, 2003).

4.2.9 Avaliação do aumento da tolerância da linhagem adaptada de *S. stipitis*

Para validar a estratégia de adaptação descrita no presente estudo, a linhagem adaptada de *S. stipitis* foi submetida a uma comparação com uma linhagem não-adaptada, conforme apresentado no trabalho de Soares (2018). Nesse contexto, fermentações foram realizadas em frascos *Erlenmeyer* de 250 mL com 100 mL de meio composto por (g/L): xilose (63,0), glicose (27,0), ureia (2,3), extrato de levedura (3,0) e Mg.SO₄.7H₂O (1,0). Alíquotas de ácido acético foram adicionadas para que a concentração final de ácido no meio fosse de 0,2, 0,7, 1,1, 2,2, 2,6, 3,2 e 3,6 g/L. As células das linhagens adaptada e não-adaptada de *S. stipitis* foram inoculadas, separadamente, a uma concentração inicial de 5 g/L. Os frascos foram mantidos em *shaker* por 72 h, a 30 °C e 200 rpm. Amostras foram recolhidas para medidas das concentrações de célula, etanol e açúcares, conforme protocolo descrito no seção 4.2.4.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização do hidrolisado hemicelulósico e composição do substrato

A Tabela 4.1 mostra a composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana obtido após a etapa de pré-tratamento e evaporação. Os valores foram relatados como a média analítica dos ensaios, realizados em triplicata.

Após o pré-tratamento, a maior parte da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar foi hidrolisada ($89,5 \pm 1,1$ %), da qual $82,0 \pm 1,2$ % foram

recuperados como açúcares monoméricos (xilose e arabinose). Assim, foi possível observar uma alta concentração de xilose presente no hidrolisado após a etapa de pré-tratamento ($25,14 \pm 0,45$ g/L) em comparação com os demais açúcares.

O hidrolisado foi concentrado em aproximadamente 500 %, sendo que parte dos inibidores, gerados e liberados durante a etapa de pré-tratamento, foram removidos juntamente com a fração condensada no processo de concentração do hidrolisado hemicelulósico. Apesar dessa extração parcial, a concentração desses compostos inibitórios no meio concentrado ainda foi significativa, principalmente em relação à fração fenólica ($25,61 \pm 0,12$ g/L) e ao ácido acético ($6,03 \pm 0,09$ g/L).

Tabela 4.1 Composição química do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar após pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído e etapa de concentração (evaporação).

| Analito | Hidrolisado (g/L) | Hidrolisado concentrado (g/L) |
|-------------------------|-------------------|-------------------------------|
| Arabinose | $2,37 \pm 0,18$ | $19,77 \pm 0,38$ |
| Glicose | $3,60 \pm 0,60$ | $17,07 \pm 0,051$ |
| Xilose | $25,14 \pm 0,45$ | $178,56 \pm 0,32$ |
| Celobiose | $1,07 \pm 0,01$ | $5,05 \pm 0,026$ |
| Ácido fórmico | $0,23 \pm 0,05$ | $0,30 \pm 0,011$ |
| Ácido acético | $3,94 \pm 0,16$ | $6,03 \pm 0,089$ |
| HMF | $0,05 \pm 0,01$ | $0,23 \pm 0,021$ |
| Furfural | $0,45 \pm 0,18$ | $0,05 \pm 0,00$ |
| Fenólicos totais | $4,65 \pm 0,22$ | $25,61 \pm 0,12$ |
| Ácido ferúlico | $0,11 \pm 0,00$ | $0,79 \pm 0,01$ |
| Ácido cumárico | $0,15 \pm 0,00$ | $1,64 \pm 0,00$ |
| Ácido 4-hidroxibenzoico | ALD | ALD |
| Ácido vanílico | ALD | $0,064 \pm 0,00$ |
| Ácido siríngico | $0,003 \pm 0,00$ | $0,053 \pm 0,00$ |
| Vanilina | $0,025 \pm 0,00$ | $0,16 \pm 0,00$ |

ALD: Abaixo do limite de detecção.

4.3.2 Fermentações em batelada com reciclo de células (CRBF) com aumento da porcentagem de hidrolisado hemicelulósico no substrato (33 e 67 %)

4.3.2.1 Observações experimentais

A Figura 4.1 mostra as concentrações de açúcares, etanol e células ao longo do tempo para os cinco ciclos de fermentação em batelada, para as condições de 33 e 67 % de hidrolisado na composição do substrato. Nos dois casos,

considerando os quatro primeiros ciclos, 20 h de fermentação não foram suficientes para o consumo completo de açúcar. Ao final de cada um desses ciclos, apenas aproximadamente 30 g/L das fontes de carbono foram consumidas, correspondendo, principalmente, à concentração de glicose do substrato inicial, conforme indicado pela porcentagem de consumo de glicose e xilose na Tabela 4.2. Os perfis de consumo de açúcar foram semelhantes para 33 e 67 % de hidrolisado nos quatro primeiros ciclos, sem diferença significativa a 95 % de confiança quando os mesmos ciclos foram comparados, conforme indicado pela análise estatística apresentada na Tabela 4.2.

No entanto, o quinto ciclo revela uma diferença entre as duas condições, a qual foi observada devido ao maior tempo de fermentação (70 h). Na condição de 33 % de hidrolisado, a xilose foi significativamente consumida após a exaustão da glicose, com uma concentração residual de, aproximadamente, 13 % em relação à concentração inicial. Em 67 % de hidrolisado, porém, o consumo de xilose foi menos pronunciado, resultando em uma xilose residual de 80 % em relação à concentração inicial. Uma possível explicação para essa diferença no consumo de xilose é a maior concentração de compostos inibitórios devido ao aumento da porcentagem de hidrolisado no substrato, conforme mostrado na Tabela 4.3.

Figura 4.1 Concentrações de açúcares redutores, etanol e biomassa celular ao longo do tempo para fermentações em CRBF com: (A) 33 % e (B) 67 % de hidrolisado no substrato.

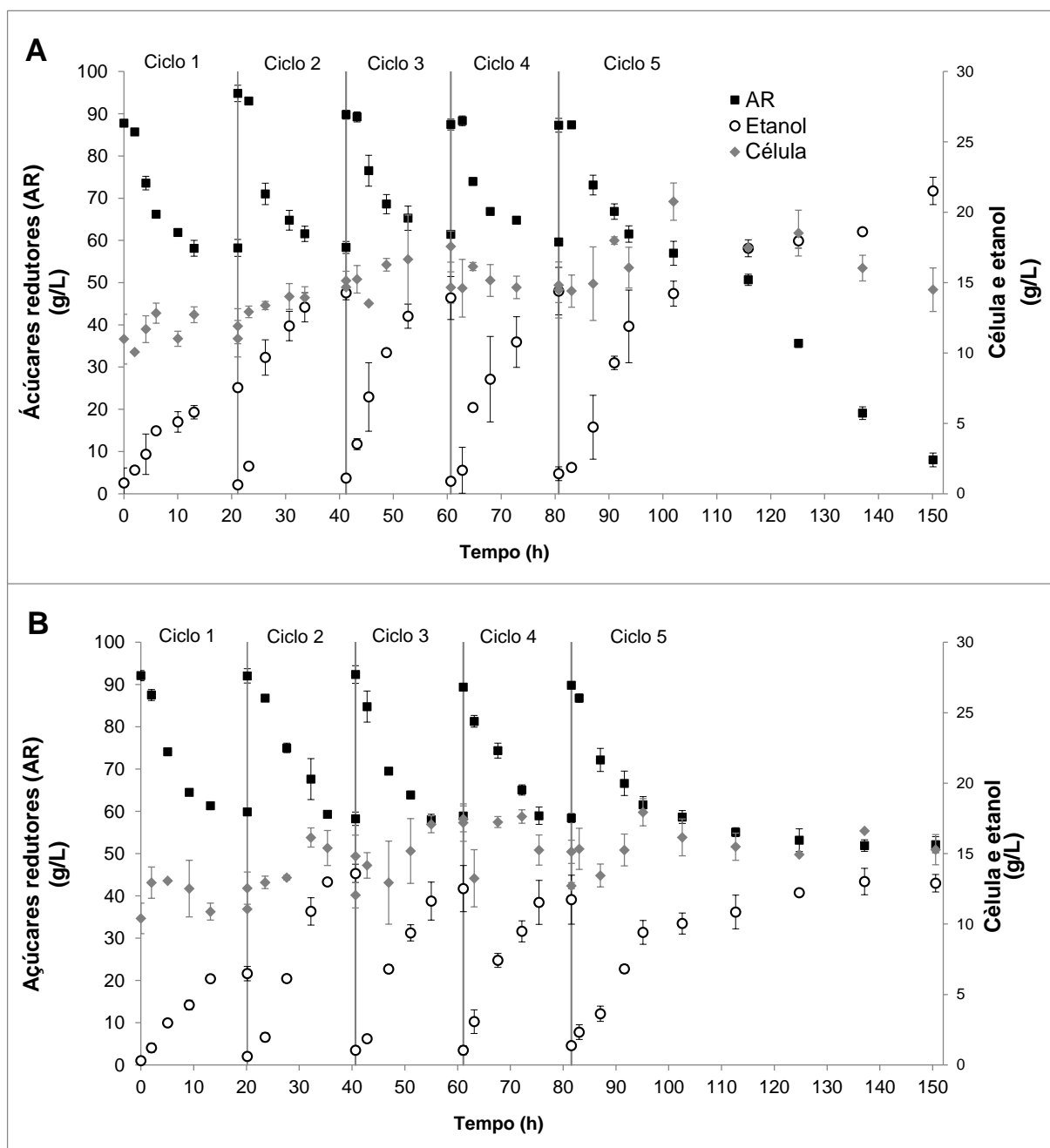


Tabela 4.2 Valores de rendimento, produtividade volumétrica, consumo de glicose, consumo de xilose e título de etanol no tempo final de cada ciclo de fermentação para fermentações em batelada com reciclo de células a 33 e 67% de hidrolisado.

| Ciclo | Tempo* h | Rendimento** % | Produtividade g/L.h | Consumo de glicose % | Consumo de xilose % | Título de etanol g/L |
|----------------------------|-------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 33 % de hidrolisado | | | | | | |
| 1 | 21,12 | 15,09 ± 1,72 ^a | 0,32 ± 0,04 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 2,78 ± 3,93 ^a | 7,53 ± 0,27 ^a |
| 2 | 20,10 | 28,17 ± 0,15 ^a | 0,68 ± 0,02 ^a | 98,09 ± 1,89 ^a | 7,37 ± 4,03 ^a | 14,28 ± 0,49 ^a |
| 3 | 19,43 | 27,89 ± 3,35 ^a | 0,66 ± 0,09 ^a | 99,06 ± 0,44 ^a | 4,30 ± 1,99 ^a | 13,91 ± 1,53 ^a |
| 4 | 20,02 | 30,20 ± 3,51 ^a | 0,67 ± 0,09 ^a | 97,95 ± 1,19 ^a | 5,18 ± 1,19 ^a | 14,39 ± 1,69 ^a |
| 5 | 69,44 | 45,02 ± 2,45 ^a | 0,29 ± 0,02 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 87,13 ± 3,02 ^a | 21,52 ± 0,97 ^a |
| 67 % de hidrolisado | | | | | | |
| 1 | 20,15 | 13,13 ± 0,93 ^a | 0,31 ± 0,03 ^a | 100,00 ± 0,00 ^a | 3,17 ± 0,28 ^a | 6,48 ± 0,50 ^a |
| 2 | 20,50 | 27,63 ± 2,14 ^a | 0,63 ± 0,04 ^a | 99,38 ± 0,87 ^a | 6,39 ± 2,74 ^a | 13,59 ± 0,66 ^a |
| 3 | 20,44 | 24,34 ± 3,70 ^a | 0,56 ± 0,07 ^a | 99,74 ± 0,00 ^a | 5,68 ± 3,01 ^a | 12,61 ± 1,64 ^a |
| 4 | 20,47 | 23,39 ± 3,39 ^a | 0,52 ± 0,07 ^a | 99,86 ± 0,19 ^a | 4,87 ± 3,19 ^a | 11,73 ± 1,74 ^a |
| 5 | 69,00 | 25,09 ± 0,85 ^b | 0,17 ± 0,01 ^b | 99,85 ± 0,22 ^a | 19,13 ± 3,83 ^b | 12,90 ± 0,62 ^b |

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), pelo *software* Statistica.

Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos de parâmetros no mesmo ciclo de fermentação para as diferentes condições em estudo.

*Tempo de cada ciclo de fermentação, não-cumulativo.

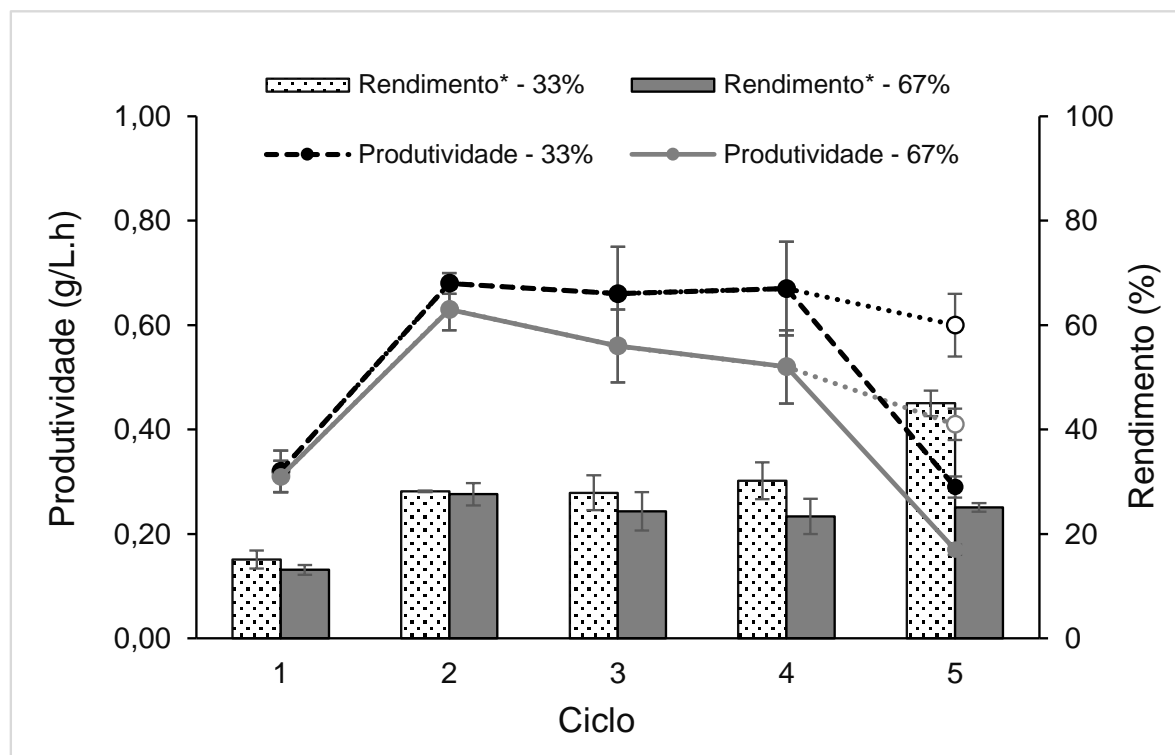
**Para o cálculo desse rendimento, foi considerado todo o substrato alimentado no reator.

Tabela 4.3 Concentrações máximas de ácido acético, furfural e HMF registradas em cada ciclo de fermentação para fermentações em batelada com reciclo de células a 33 e 67% de hidrolisado.

| Ciclo | Ácido acético g/L | | Furfural g/L | | HMF g/L | |
|-------|----------------------|------|-----------------|------|------------|------|
| | 33 % | 67 % | 33 % | 67 % | 33 % | 67 % |
| 1 | 0,67 | 1,14 | 0,90 | 1,91 | 0,04 | 0,51 |
| 2 | 0,61 | 1,48 | 0,93 | 1,93 | 0,05 | 0,48 |
| 3 | 0,76 | 1,63 | 1,00 | 2,00 | 0,06 | 0,94 |
| 4 | 0,64 | 1,63 | 1,00 | 2,23 | 0,05 | 0,91 |
| 5 | 0,43 | 1,57 | 1,00 | 1,88 | 0,07 | 0,90 |

Em relação à produção de etanol, a Figura 4.2 mostra a produtividade volumétrica (Q_p) e o rendimento (η') obtidos para todos os ciclos de fermentação em ambas as condições. Em 33 % do hidrolisado, houve um aumento no valor de Q_p de 112 % do primeiro para o segundo ciclo ($0,32 \pm 0,04$ para $0,68 \pm 0,02$ g/L.h), o qual não variou significativamente até o quarto ciclo. No quinto ciclo, o tempo de fermentação foi maior (70 h), refletindo em uma menor produtividade. Devido a essa diferença nos tempos de fermentação, o valor de Q_p no último ciclo também foi calculado considerando as primeiras 20 h de fermentação (mesmo tempo dos ciclos anteriores), valor indicado pelo símbolo (○) na Figura 4.2, correspondendo a $0,60 \pm 0,06$ g/L.h. Como pode ser observado, não houve diferença significativa entre valores de Q_p entre os ciclos 2 e 5, considerando 20 h de fermentação, para 33 % de hidrolisado.

Figura 4.2 Produtividade volumétrica de etanol e rendimento em etanol para os cinco ciclos de fermentação em batelada a 33 e 67 % de hidrolisado.



*Para o cálculo desse rendimento, foi considerado todo o substrato alimentado no reator.

Para as fermentações com 67 % de hidrolisado, embora também tenha ocorrido um aumento em Q_p do primeiro para o segundo ciclo ($0,31 \pm 0,03$ para $0,63 \pm 0,04$ g/L.h), houve uma diminuição nos ciclos subsequentes, chegando a $0,52 \pm 0,07$ g/L.h no quarto ciclo. No entanto, embora os valores de Q_p tenham sido mais baixos para a condição de 67 %, não houve diferença significativa a 95 % de confiança quando comparado ciclo a ciclo com a condição de 33 % (do primeiro ao quarto ciclo), conforme indicado pela análise estatística na Tabela 4.2. No quinto ciclo, porém, Q_p foi significativamente menor na condição de 67 % de hidrolisado quando comparado ao quinto ciclo da fermentação com 33 % de hidrolisado, considerando as 70 h de fermentação. Entretanto, devido ao maior tempo de fermentação no quinto ciclo, também foi calculado o valor de Q_p considerando as primeiras 20 h de fermentação para a condição de 67 % de hidrolisado. Nesse caso, o valor encontrado foi de $0,41 \pm 0,03$ g/L.h, indicado pelo símbolo (O) na Figura 4.2. Dessa forma, confirma-se a tendência de queda na produtividade volumétrica ao longo dos ciclos 2 a 5 para 67 % de hidrolisado, o que não foi observado para 33 % de hidrolisado.

Em relação ao rendimento em etanol, calculado considerando a quantidade total de açúcar inicial no sistema, também houve aumento do primeiro para o segundo ciclo, para ambas as condições, o qual permaneceu praticamente constante do segundo para o quarto ciclo, como podemos observar na Figura 4.2. Entretanto, para o experimento com 33% de hidrolisado, houve um incremento no rendimento no quinto ciclo, explicado pelo maior consumo de xilose e pela maior concentração de etanol obtidos neste ciclo. Esse aumento não foi observado em 67% de hidrolisado. No quinto ciclo, o rendimento em etanol obtido na concentração mais baixa de hidrolisado foi de $45,02 \pm 0,29$ %, em comparação com $25,09 \pm 0,17$ % em 67 % de hidrolisado. Ao realizar o teste de Tukey com 95 % de confiança, a diferença entre as condições em relação ao rendimento foi detectada apenas no último ciclo, assim como observado para os demais parâmetros (Q_p , consumo de xilose e concentração de etanol), conforme apresentado na Tabela 4.2.

Novamente, o menor desempenho fermentativo da levedura *S. stipitis* em 67 % de hidrolisado, com menor produtividade e rendimento ao final das fermentações (quinto ciclo) pode ser explicado pelas maiores concentrações de inibidores no substrato, o que, como discutido anteriormente, resultou em um menor consumo de xilose e, conseqüentemente, menor formação de produto. Nos quatro primeiros ciclos, como as fermentações foram realizadas por apenas 20 h, não houve tempo suficiente para permitir um consumo substancial de xilose, portanto, os efeitos desses compostos não puderam ser vistos de forma clara.

4.3.2.2 Estimação paramétrica a partir do modelo matemático

Conforme discutido na seção 4.2.7.1, o modelo matemático para as fermentações em batelada com 33 e 67% de hidrolisado é formado por 12 equações (4.5-4.16) e 23 parâmetros cinéticos que devem ser estimados para os cinco ciclos de fermentação, para ambas as concentrações de hidrolisado hemicelulósico. Nesse caso, os parâmetros são $\mu_{Glu,max}$, $\mu_{Xyl,max}$, $\pi_{Glu,max}$, $\pi_{Xyl,max}$, $K_{S,Glu}$, $K_{S,Xyl}$, $K'_{S,Glu}$, $K'_{S,Xyl}$, R , R' , R'' , n , n' , n'' , $Y_{P/Glu}$, $Y_{P/Xyl}$, $m_{X,Glu}$, $m_{X,Xyl}$, AC_{max} , $nn_{X,Glu}$, $nn_{X,Xyl}$, $nn_{P,Glu}$ e $nn_{P,Xyl}$.

Assim como mencionado no Capítulo 3, tendo em vista que a re-estimação paramétrica é uma etapa que demanda tempo, tentou-se fixar o maior número de

parâmetros ao longo das fermentações, re-estimando apenas aqueles que representassem as observações experimentais descritas anteriormente, pela aplicação do reciclo celular e pelo aumento na concentração de hidrolisado. Sendo assim, foram mantidos fixos ao longo dos ciclos os parâmetros: $\mu_{Glu,max}$, $\mu_{Xyl,max}$, $\pi_{Glu,max}$, $\pi_{Xyl,max}$, $K_{S,Glu}$, $K_{S,Xyl}$, $K'_{S,Glu}$, $K'_{S,Xyl}$, R , R' , R'' , n , n' , n'' , $Y_{P/Glu}$ e $Y_{P/Xyl}$, os quais foram fixados conforme os resultados apresentados para a fermentação a 30 °C no Capítulo 2 (Tabela 2.3 e Figura 2.2), além de AC_{max} , fixada no valor de 4 g/L para todos os ciclos, valor baseado em outros trabalhos (Andrade *et al.*, 2013) e em resultados anteriores do grupo de pesquisa (Soares, 2018). Portanto, restam apenas seis parâmetros que devem ser re-estimados a cada ciclo para representar de forma coerente o que foi observado experimentalmente. Esses parâmetros estão relacionados ao consumo de substrato para manutenção celular ($m_{X,Glu}$ e $m_{X,Xyl}$) e à inibição por ácido acético ($nn_{X,Glu}$, $nn_{X,Xyl}$, $nn_{P,Glu}$ e $nn_{P,Xyl}$). Mais uma vez, a otimização paramétrica é uma etapa crítica, uma vez que os valores devem otimizar o modelo para melhor ajuste aos dados experimentais, sem perder o sentido físico do sistema de fermentação representado.

Dessa forma, a Tabela 4.4 mostra os valores obtidos para os parâmetros para cada um dos ciclos para as duas concentrações de hidrolisado. Cabe ressaltar que, para a estimação paramétrica, o valor de AC utilizado para as condições de 33 e 67 % de hidrolisado foi de 0,6 e 1,5 g/L, respectivamente, baseado nos valores apresentados na Tabela 4.3. Através dos valores apresentados na Tabela 4.4, observa-se que o principal efeito das fermentações sucessivas com reciclo de células utilizando um hidrolisado hemicelulósico se dá nos parâmetros relacionados à inibição por ácido acético.

Tabela 4.4 Valores dos parâmetros do modelo para os ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado na composição do substrato.

| Parâmetro | 33 % de hidrolisado | | | | | 67 % de hidrolisado | | | | |
|---------------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|---------|---------------------|---------|---------|---------|---------|
| | Ciclo 1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 | Ciclo 4 | Ciclo 5 | Ciclo 1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 | Ciclo 4 | Ciclo 5 |
| Parâmetros mantidos constantes | | | | | | | | | | |
| $\mu_{Glu,max} [h^{-1}]$ | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| $\mu_{Xyl,max} [h^{-1}]$ | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |
| $\pi_{Glu,max} [h^{-1}]$ | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 | 0,11 |
| $\pi_{Xyl,max} [h^{-1}]$ | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 | 0,06 |
| $K_{S,Glu} [g/L]$ | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| $K_{S,Xyl} [g/L]$ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| $K'_{S,Glu} [g/L]$ | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| $K'_{S,Xyl} [g/L]$ | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 | 7 |
| $R [L/g]$ | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 | 67 |
| $R' [L/g]$ | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 | 0,57 |
| $R'' [L/g]$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| $n [-]$ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $n' [-]$ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $n'' [-]$ | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $Y_{P/Glu} [g/g]$ | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 |
| $Y_{P/Xyl} [g/g]$ | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 | 0,37 |
| $AC_{max} [h^{-1}]$ | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Parâmetros re-estimados | | | | | | | | | | |
| $m_{X,Glu} [h^{-1}]$ | 0,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,08 | 0 | 0 | 0,005 | 0,012 |
| $m_{X,Xyl} [h^{-1}]$ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,002 |
| $nn_{X,Glu} [-]$ | 5 | 0,7 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,8 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| $nn_{X,Xyl} [-]$ | 12 | 7 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |
| $nn_{P,Glu} [-]$ | 5 | 0,7 | 2,5 | 2,5 | 2,5 | 1,8 | 0,7 | 0,7 | 1,8 | 1,8 |
| $nn_{P,Xyl} [-]$ | 12 | 10 | 10 | 10 | 10 | 5 | 5 | 5 | 5 | 5 |

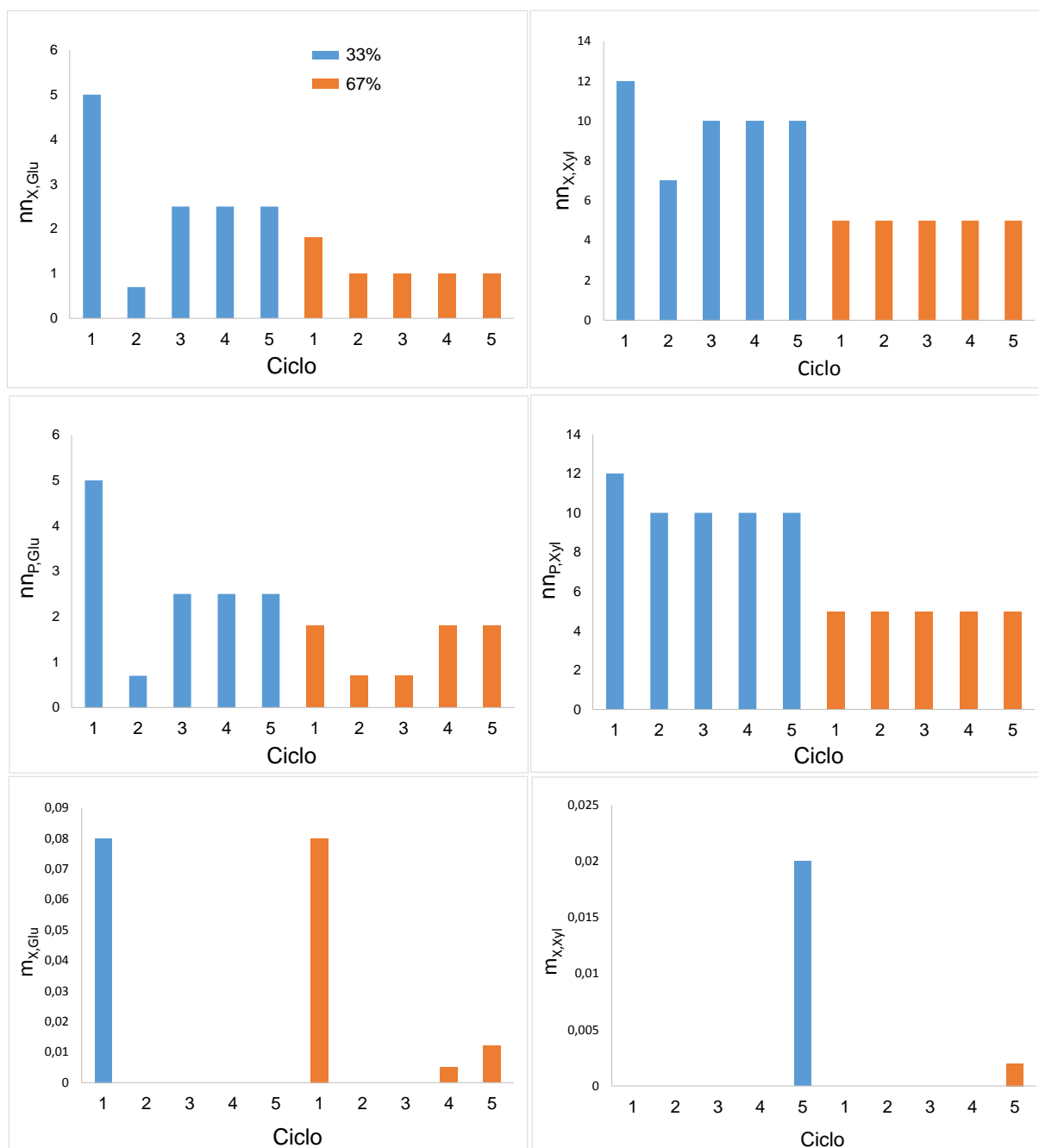
No primeiro ciclo com 33 % de hidrolisado, os valores de nn são elevados, indicando que a presença de ácido acético no meio é extremamente prejudicial ao metabolismo para crescimento celular e formação de produto. Cabe ressaltar que, conforme Soares (2018), os efeitos inibitórios de ácido acético são mais pronunciados no metabolismo de fermentação da xilose, em comparação ao da glicose,

observações que corroboram os maiores valores de mn encontrados para xilose. Entretanto, nota-se que, do primeiro para o segundo ciclo, houve uma queda nos valores desses parâmetros, provavelmente devido à adaptação celular frente ao hidrolisado, consequência do reciclo celular empregado. Esses valores permanecem constantes ou sofrem uma leve elevação até o quinto ciclo. Esse perfil está de acordo com o que foi observado para rendimento e produtividade (Figura 4.2), em que há uma melhora significativa do primeiro para o segundo ciclo, mas o mesmo não é observado no restante dos ciclos.

No primeiro ciclo com 67 % de hidrolisado, os valores dos parâmetros mn são inferiores, mais uma vez possivelmente devido à adaptação do microrganismo. Assim como observado para 33 % de hidrolisado, há uma diminuição nos valores do primeiro para o segundo ciclo, os quais permanecem constantes ou sofrem uma leve elevação até o quinto ciclo, confirmando o que foi observado experimentalmente (Figura 4.2).

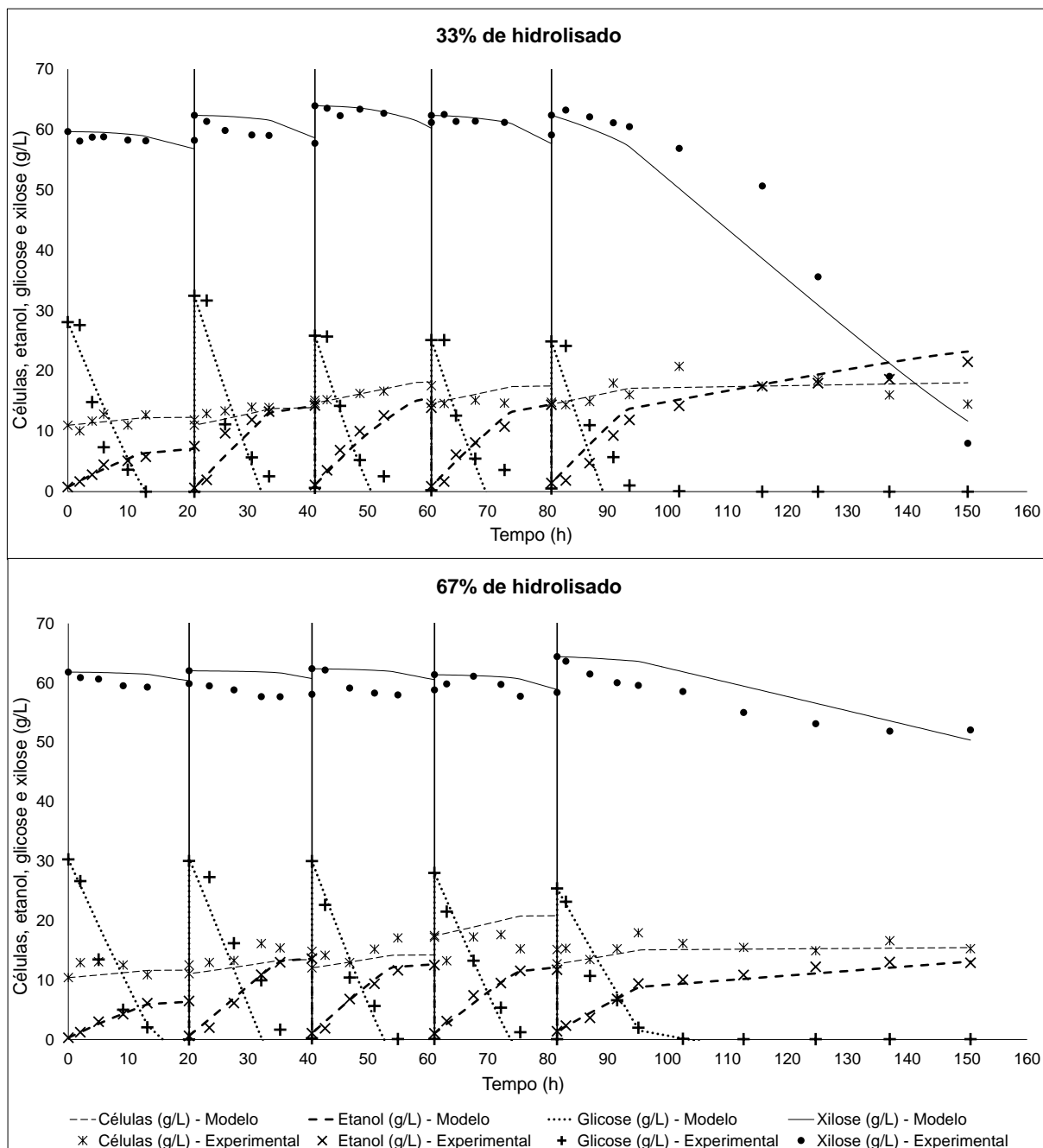
Quanto aos termos relacionados ao consumo de substrato para manutenção celular, observa-se que, no ciclo 1 das duas condições, parte da glicose é desviada para esse fim ($m_{X,Glu} = 0,08 h^{-1}$), possivelmente por ser o primeiro ciclo e, antes de iniciar cada uma das fermentações, a célula estar armazenada em ambiente refrigerado. Como a glicose é o açúcar preferencialmente consumido, o microrganismo pode ter utilizado esta fonte de carbono para retomada completa das funções vitais em um primeiro momento das fermentações. No caso das fermentações com 33% de hidrolisado, os termos relacionados à manutenção celular, tanto por glicose e xilose, seguem nulos até o quinto ciclo. Nesse momento, devido ao maior tempo de fermentação em comparação aos outros ciclos (70 h), foi detectado que parte da xilose consumida é desviada para esse fim. Esse perfil se repete para as fermentações com 67% de hidrolisado, porém, com o reaparecimento dos termos de manutenção celular por glicose nos ciclos 4 e 5. Sendo assim, pode-se inferir que a célula apresentou condições de estresse para a maior concentração de hidrolisado, utilizando uma maior fração das fontes de carbono, principalmente glicose, para manutenção das funções celulares nos últimos ciclos. A Figura 4.3 mostra a variação dos parâmetros re-estimados ao longo dos cinco ciclos para as duas concentrações de hidrolisado.

Figura 4.3 Evolução dos parâmetros $nn_{X,GLU}$, $nn_{X,Xyl}$, $nn_{P,GLU}$, $nn_{P,Xyl}$ (referentes ao estresse por ácido acético) e $m_{X,GLU}$, e $m_{X,Xyl}$ (referentes ao uso da fonte de carbono para manutenção celular), para os cinco ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado.



A partir da Figura 4.3, observa-se uma tendência de diminuição nos valores relacionados à inibição por ácido acético ao longo dos ciclos, conforme previamente discutido. Sendo assim, a partir dos valores estimados para os parâmetros que compõem o modelo para todos os ciclos de fermentação, a Figura 4.4 foi obtida, a qual apresenta uma comparação entre as concentrações experimentais e as obtidas através do modelo para biomassa celular, glicose, xilose e etanol.

Figura 4.4 Comparação entre os perfis de concentração de células, etanol, glicose e xilose obtidos através do modelo e os dados experimentais para os cinco ciclos de fermentação com 33 e 67 % de hidrolisado.



A Tabela 4.5 mostra os valores de RMSE para célula, glicose, xilose e etanol em todos os ciclos de fermentação, para 33 e 67 % de hidrolisado, calculados a partir da Equação 4.24.

Tabela 4.5 Valores de RMSE para biomassa celular, glicose, xilose e etanol para todos os ciclos a 33 e 67 % de hidrolisado.

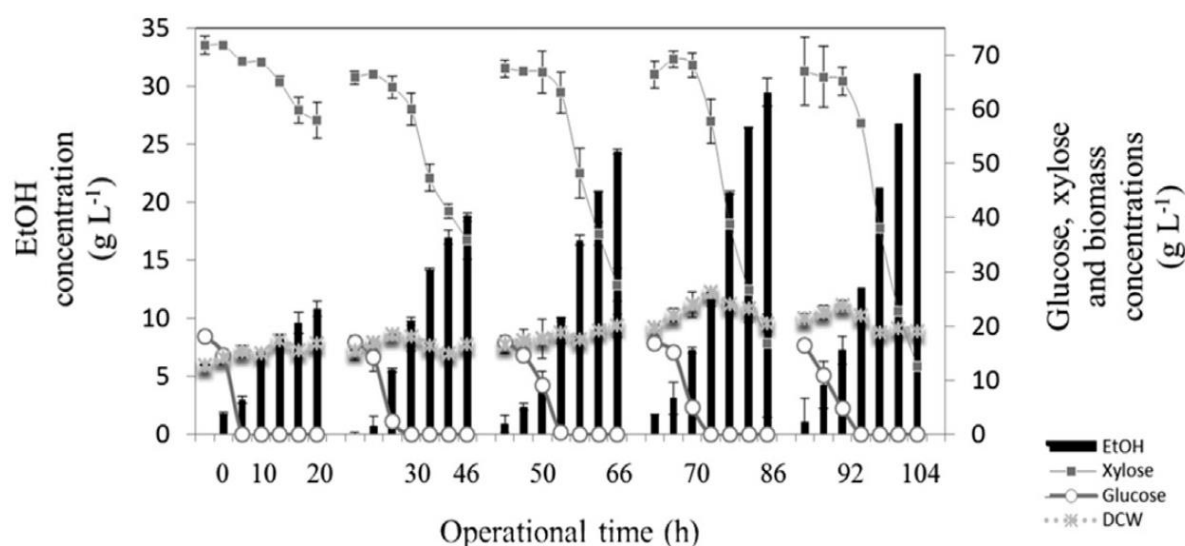
| Variável | RMSE (g/L) | | | | |
|----------------------------|------------|---------|---------|---------|---------|
| | Ciclo 1 | Ciclo 2 | Ciclo 3 | Ciclo 4 | Ciclo 5 |
| 33 % de hidrolisado | | | | | |
| Célula | 0,77 | 1,04 | 0,86 | 1,59 | 1,81 |
| Glicose | 4,50 | 3,45 | 2,68 | 3,27 | 3,10 |
| Xilose | 1,08 | 1,89 | 0,75 | 0,72 | 5,04 |
| Etanol | 0,41 | 1,71 | 1,17 | 0,99 | 1,91 |
| 67 % de hidrolisado | | | | | |
| Célula | 1,50 | 1,86 | 1,91 | 3,99 | 1,34 |
| Glicose | 3,43 | 4,88 | 1,66 | 0,99 | 1,59 |
| Xilose | 1,39 | 3,08 | 2,64 | 1,46 | 2,96 |
| Etanol | 0,19 | 0,73 | 0,61 | 0,60 | 0,64 |

Como pode ser observado, o modelo proposto, juntamente com os parâmetros estimados, representa satisfatoriamente o sistema de fermentação investigado, tanto para 33 quanto para 67 % de hidrolisado no meio de cultura. Assim como nas observações experimentais, glicose é preferencialmente assimilada, sendo totalmente consumida em torno de 12 h de fermentação em todos os ciclos. Já a xilose passa a ser consumida após a exaustão da glicose. Assim como nas discussões apresentadas no Capítulo 2 para as fermentações em batelada, o crescimento celular é baixo, o qual ocorre principalmente durante a fase de consumo da glicose.

Considerando a formação de etanol, o modelo representa bem os incrementos na produção observados do primeiro para o segundo ciclo, para as duas concentrações de hidrolisado, corroborando os resultados apresentados na Figura 4.2. Além disso, ao observarmos o quinto ciclo, o modelo proposto detecta as diferenças observadas entre as duas condições, sendo que há um maior consumo de xilose a 33 % de hidrolisado. Diferentemente do que foi apresentado no Capítulo 2, em que a produção de etanol ocorria de forma mais rápida a partir de xilose em substrato sintético, resultando em uma maior velocidade específica de formação de etanol a partir de xilose (π_{xyl}), no presente estudo a produção de etanol é mais evidente durante a fase de consumo de glicose, provavelmente devido ao maior efeito inibitório das concentrações de ácido acético nos termos referentes ao consumo de xilose.

Para mostrar os efeitos da utilização de um hidrolisado hemicelulósico real no desempenho fermentativo da levedura *S. stipitis*, a Figura 4.5 mostra os resultados obtidos no trabalho de Santos *et al.* (2016) a partir de cinco fermentações sequenciais com decréscimo de temperatura (de 30 a 26 °C) utilizando substrato sintético. Como é possível observar, o desempenho obtido pelos autores é superior ao apresentado no presente trabalho, sendo que, no último ciclo de fermentação, houve um consumo de 81,13 % de xilose em apenas 20 h de fermentação, resultando em uma produtividade de 1,53 g/L.h e um rendimento em etanol de 83%.

Figura 4.5 Fermentações consecutivas com decréscimo de temperatura utilizando substrato sintético para a levedura *S. stipitis*.



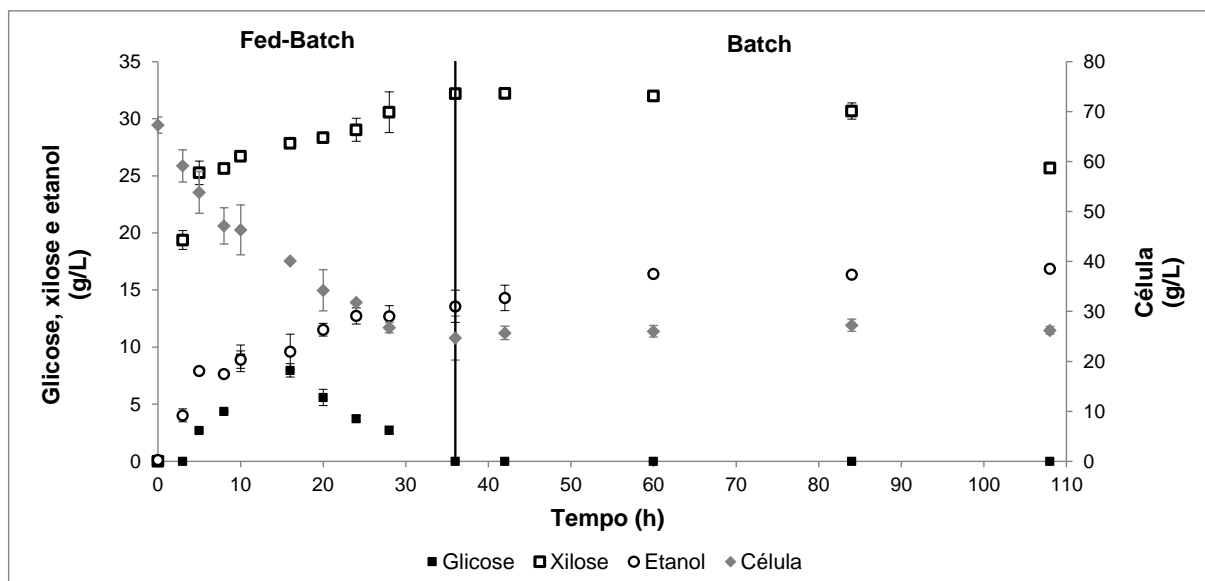
FONTE: Santos *et al.* (2016).

4.3.3 Fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado hemicelulósico

4.3.3.1 Observações experimentais

A Figura 4.6 mostra os perfis de concentração de xilose, glicose, etanol e biomassa celular obtidos para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado. Como mencionado anteriormente, essa fermentação teve duas fases distintas: a fase de alimentação, que durou 36 h, seguida de uma fermentação em batelada de 72 h, totalizando 108 h de operação.

Figura 4.6 Concentrações de glicose, xilose, etanol e biomassa celular ao longo do tempo para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.



Em relação à concentração celular, o sistema foi inoculado com, aproximadamente, 67 g/L de células. No final da fase de alimentação (36 h), a concentração foi de cerca de 25 g/L, como resultado da diluição causada pela adição do substrato. Durante a fase de batelada (36-108 h, Figura 4.6), a concentração celular permaneceu constante, sem crescimento celular registrado. Considerando todo o tempo de fermentação, o fator de conversão de açúcares em célula ($Y_{X/S}$) foi de 0,030 g/g (ver Tabela 4.6).

Considerando o consumo de substrato, há uma clara diferença entre os perfis de glicose e xilose. Enquanto a glicose é preferencialmente assimilada, com uma concentração nula no final da fase de alimentação, a concentração de xilose atinge 32 g/L às 36 h. Durante a fermentação em batelada, o consumo de xilose foi baixo, com uma concentração residual final de, aproximadamente, 26 g/L. Como já indicado na literatura, *S. stipitis* apresenta um consumo sequencial de açúcares, sendo a glicose preferencialmente consumida antes da xilose (Hou, 2012; Bonan *et al.*, 2019), o que explica a rápida assimilação da glicose e o acúmulo de xilose.

Tabela 4.6 Consumo de glicose, consumo de xilose, título de etanol, rendimento, produtividade volumétrica e $Y_{x/s}$ para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.

| Parâmetro | Valor |
|------------------------|--------|
| Consumo de glicose (%) | 100,00 |
| Consumo de xilose (%) | 71,38 |
| Título de etanol (g/L) | 16,87 |
| Rendimento (%) | 27,85* |
| Produtividade (g/L.h) | 0,1562 |
| $Y_{x/s}$ (g/g) | 0,030 |

*Para o cálculo desse rendimento, foi considerado todo o substrato alimentado no reator.

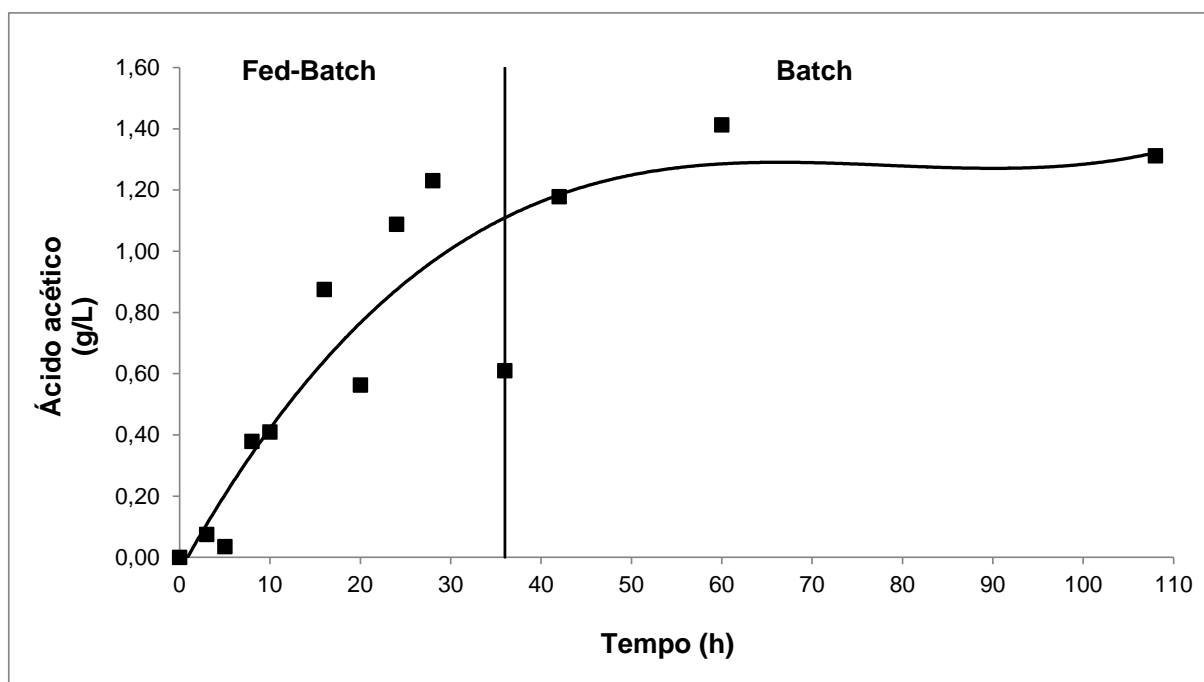
Entretanto, deve-se ressaltar que, se levarmos em consideração a porcentagem de açúcar consumida no tempo total de fermentação (Tabela 4.6), essa concentração residual de xilose (26 g/L) representa apenas 28,62 % da xilose total alimentada no sistema (71,38 % foi consumida). Também devemos enfatizar que a maior assimilação da xilose ocorreu durante a fase de batelada alimentada, na presença de concentrações de glicose. Durante a fermentação em batelada, o consumo de xilose foi menos pronunciado, como podemos ver na Figura 4.6.

Em relação à produção de etanol, o título final obtido pelo presente estudo foi de 16,87 g/L. Sendo assim, a produtividade volumétrica do etanol (Q_p) obtida para 108 h de fermentação foi de 0,1562 g/L.h. Como a maior parte do substrato foi consumida durante a fase de alimentação, a produção de etanol também foi mais proeminente nas primeiras 36 h, atingindo 13,57 g/L neste período, resultando em um Q_p de 0,3769 g/L.h (considerando 36 h de fermentação). Portanto, a fermentação em modo batelada alimentada (correspondente às primeiras 36 h de operação) se destaca como uma boa alternativa para promover o consumo de açúcar em comparação com a fermentação em modo batelada quando hidrolisados hemicelulósicos reais são utilizados, tendo a presença de compostos inibitórios.

A Figura 4.7 mostra a evolução das concentrações de ácido acético ao longo da fermentação, em que os pontos representam os dados experimentais e a linha contínua uma regressão feita para mostrar a tendência da evolução da concentração de ácido acético. Como pode ser observado, a concentração é crescente durante a fase de alimentação (primeiras 36 h) e permanece praticamente constante durante o restante da fermentação (36-108 h). Dessa forma, podemos

concluir que o ambiente enfrentado pelas células foi menos tóxico enquanto a fermentação estava ocorrendo em modo batelada alimentada, sendo uma das possíveis causas do melhor desempenho durante essa fase, confirmando os efeitos positivos da adoção dessa estratégia de operação.

Figura 4.7 Concentração de ácido acético ao longo do tempo para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.



Embora a levedura tenha consumido uma porção substancial de glicose e xilose, isso não refletiu em uma alta produção de etanol ou em crescimento celular, resultando em baixos valores de $Y_{X/S}$ e rendimento em etanol. Cabe ressaltar que a formação de subprodutos, como glicerol e xilitol, também foi baixa, com concentrações finais de 0,36 e 1,11 g/L, respectivamente. Assim, considerando que a fermentação foi realizada com um substrato composto por 100 % de hidrolisado hemicelulósico, promovendo um ambiente agressivo para o microrganismo, uma possível explicação para a baixa formação de produtos (etanol, biomassa celular ou subprodutos) é que uma grande fração do substrato tenha sido consumida para manutenção celular, ou até mesmo para um produto que não foi quantificado pelas análises realizadas. Um ponto a ser destacado é que objetivo das fermentações com altas cargas de hidrolisado era promover a adaptação do microrganismo, não necessariamente registrando um bom desempenho fermentativo da levedura nessas condições.

4.3.3.2 Estimação paramétrica a partir do modelo matemático

Conforme apresentado na seção 4.2.7.2, para descrever a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado, foi utilizado o modelo desenvolvido no Capítulo 3 para as fermentações em meio sintético. Da mesma forma, glicose e xilose foram avaliadas de forma conjunta como substrato, e não individualmente, devido à baixa concentração de glicose observada ao longo de todo o tempo de fermentação. Entretanto, assim como para as fermentações em batelada, foi necessário realizar a inclusão do termo de inibição por ácido acético no crescimento celular. Sendo assim, o modelo proposto é composto por sete equações (4.17-4.23) e nove parâmetros cinéticos a serem estimados (μ_{max} , K_S , K_I , $Y_{P/X}$, m_P , $Y_{P/S}$, m_X , AC_{max} e nn).

Assim como nas discussões anteriores, tentou-se variar o menor número de parâmetros possíveis, diminuindo a complexidade do trabalho de re-estimação paramétrica. Sendo assim, os parâmetros μ_{max} , K_S , $Y_{P/X}$ e AC_{max} foram fixados com base no primeiro ciclo da fermentação em batelada alimentada com substrato sintético apresentado no Capítulo 3 (Tabela 3.3). Dessa forma, apenas cinco parâmetros foram re-estimados - K_I , $Y_{P/X}$, m_P , m_X e nn . A Tabela 4.7 mostra os valores obtidos após o processo de estimação dos parâmetros para melhor ajuste das curvas obtidas pelo modelo aos dados experimentais.

Tabela 4.7 Parâmetros cinéticos estimados para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.

| Parâmetro | Batelada alimentada | Batelada |
|--|---------------------|----------|
| Parâmetros mantidos constantes | | |
| μ_{max} [h^{-1}] | 0,006 | 0,006 |
| K_S [g/L] | 0,2 | 0,2 |
| AC_{max} [g/L] | 4 | 4 |
| $Y_{P/S}$ [g/g] | 0,355 | 0,355 |
| Parâmetros re-estimados | | |
| K_I [g/L] | 1 | 1 |
| $Y_{P/X}$ [g/g] | 1,00 | 0,50 |
| m_P [$g_{etanol}/g_{célula} \cdot h$] | 0,015 | 0,0015 |
| m_X [$g_{substrato}/g_{célula} \cdot h$] | 0,05 | 0,001 |
| nn [-] | 1 | 1 |

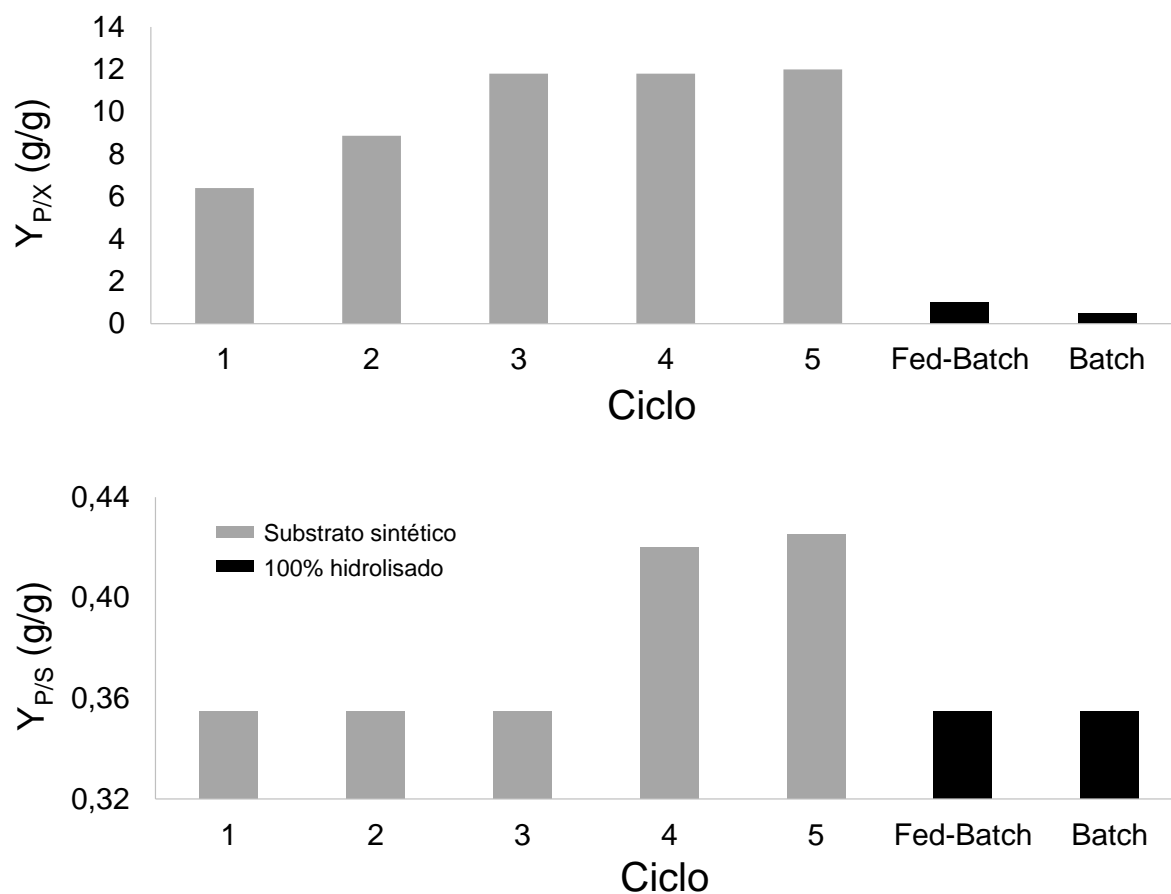
Como pode ser observado na Tabela 4.7, os valores de alguns dos parâmetros re-estimados são diferentes para a fase de alimentação (de 0 a 36 h) e para a fase de fermentação em modo batelada (de 36 a 108 h). Conforme discutido anteriormente, o desempenho da levedura nas primeiras 36 h foi superior ao restante da fermentação, tanto em termos de produção de etanol quanto de consumo de substrato, o que explica o maior valor de $Y_{P/X}$ e m_P , parâmetros que compõem a velocidade específica de formação de produto (π), como mostra a Equação 4.22. Além disso, quanto maior o valor de π e de m_X , maior a velocidade específica de consumo de substrato, segundo a Equação 4.23. Sendo assim, os valores estimados para os parâmetros do modelo corroboram as conclusões feita a partir das observações experimentais, em que a célula estava mais ativa durante a fase de alimentação (batelada alimentada).

A Figura 4.8 mostra uma comparação entre os parâmetros $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ obtidos para os cinco ciclos de fermentação em batelada alimentada com substrato sintético (Capítulo 3) e os valores obtidos com 100 % de hidrolisado (presente estudo), tanto para a fase de alimentação quanto para a fase batelada.

Como pode ser observado na Figura 4.8, os valores de $Y_{P/X}$ são superiores para as fermentações em meio sintético. Além disso, observa-se o aumento de $Y_{P/X}$ nos ciclos 4 e 5 para as fermentações com substrato sintético, como consequência da melhora no desempenho fermentativo do microrganismo, como previamente discutido no Capítulo 3.

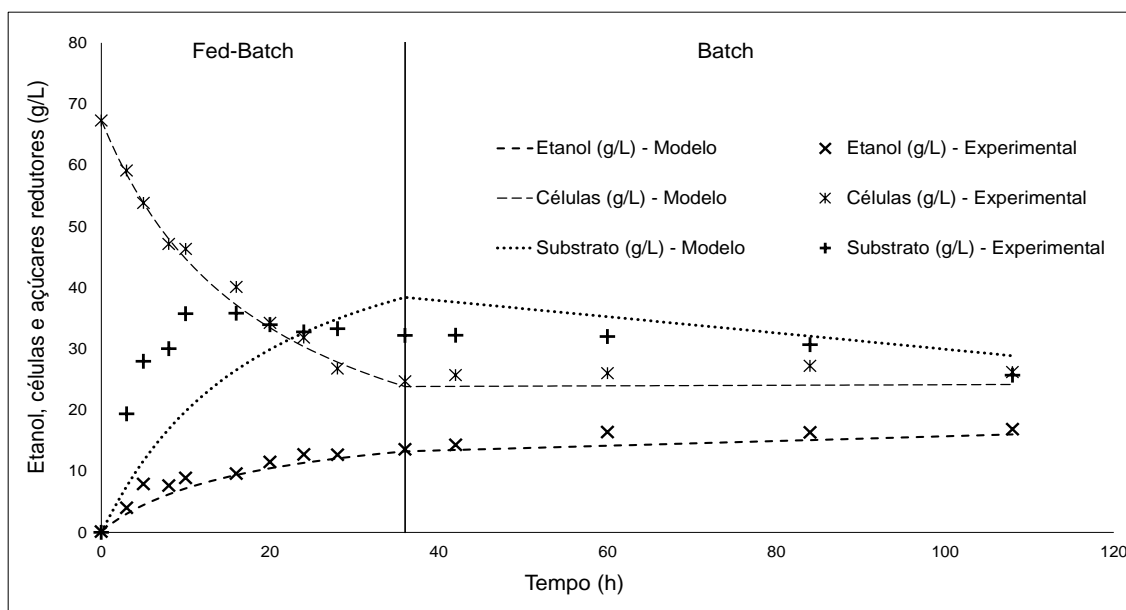
Quanto ao parâmetro correspondente à inibição por ácido acético, observa-se que o valor obtido ($nn = 1$) é inferior ao apresentado no último ciclo das fermentações em bateladas sucessivas com 67 % de hidrolisado (Tabela 4.4), o que indica uma contínua adaptação do microrganismo frente ao ambiente tóxico encontrado ao longo das fermentações no presente estudo.

Figura 4.8 Evolução dos parâmetros $Y_{P/X}$ e $Y_{P/S}$ para as fermentações realizadas em substrato sintético para levedura *S. passalidarum* (Capítulo 3) e a fermentação com 100 % de hidrolisado realizada no presente estudo com *S. stipitis* (para as fases de batelada alimentada e batelada).



Sendo assim, a Figura 4.9 mostra as concentrações de biomassa celular, substrato e etanol obtidos a partir do modelo em comparação aos dados experimentais.

Figura 4.9 Perfis de concentração de células, açúcares redutores e etanol obtidos a partir do modelo e os dados experimentais para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.



A Tabela 4.8 mostra os valores de RMSE para célula, substrato e etanol, calculados a partir da Equação 4.24.

Tabela 4.8 Valores de RMSE para célula, substrato e etanol para a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado.

| Variável | RMSE (g/L) |
|------------------|------------|
| Célula | 1,67 |
| Substrato | 8,56 |
| Etanol | 1,45 |

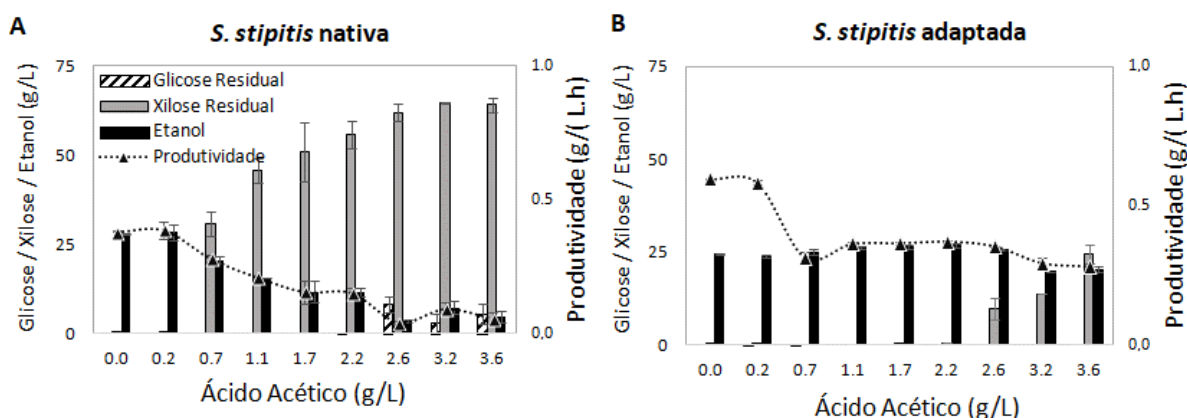
Como pode ser observado, o modelo proposto, em conjunto com os valores estimados para os parâmetros, representou satisfatoriamente a fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado, principalmente para as concentrações de etanol e biomassa celular. No caso do substrato, o modelo se afastou dos dados experimentais nas primeiras horas da fermentação. Uma possível explicação para isso é que, como não foi possível incluir o termo de repressão por glicose nas equações do modelo para a condição de batelada alimentada, conforme discutido nas seções de elaboração do modelo matemático para a fermentação em batelada alimentada

(seções 3.2.2 e 4.2.7.2), o acúmulo de xilose devido ao consumo preferencial de glicose nas horas iniciais não foi devidamente ajustado.

4.3.4 Avaliação da tolerância da linhagem adaptada de *S. stipitis* frente ao ácido acético

A Figura 4.10 mostra os resultados obtidos quando as linhagens adaptada e não-adaptada de *S. stipitis* foram submetidas a diferentes concentrações de ácido acético, resultado apresentado no trabalho de Soares (2018). Como pode ser observado, o desempenho da levedura *S. stipitis* foi superior ao da sua parental, resultado evidenciado pelas menores concentrações de açúcar residual e pelas maiores concentrações de etanol obtidas, mesmo nas concentrações mais altas de ácido acético investigadas neste estudo.

Figura 4.10 Concentrações finais de glicose, xilose e etanol e produtividade volumétrica para as linhagens não-adaptada (A) e adaptada (B) de *S. stipitis*.



FONTE: Soares (2018).

No caso da glicose, como pode ser observado na Figura 4.10, foi registrado um acúmulo deste açúcar a partir de 2,6 g/L de ácido para a linhagem não-adaptada. Para a linhagem adaptada, glicose foi completamente consumida mesmo na concentração mais alta. Já para xilose, conforme já mencionado, concentrações acima de 0,7 g/L de ácido acético foram suficientes para promover o acúmulo de xilose na linhagem não-adaptada; para a linhagem adaptada, um acúmulo de xilose é registrado apenas em concentrações superiores a 2,6 g/L. Sendo assim, se analisarmos de forma conjunta o acúmulo dos açúcares e a produtividade de etanol, conclui-se que, para a linhagem não-adaptada, o desempenho fermentativo é afetado

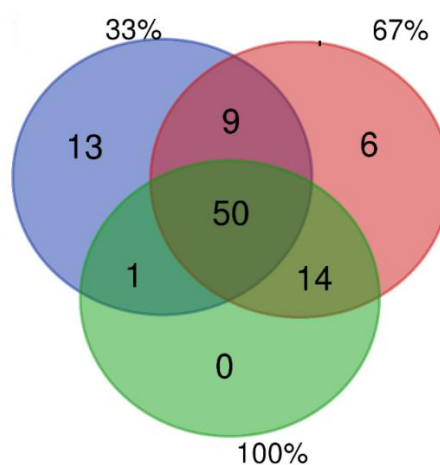
de forma significativa a partir de 0,7 g/L de ácido, enquanto que, para a linhagem adaptada, esse valor é 3,7 vezes maior (2,6 g/L). Vale ressaltar que a adaptação celular se manteve mesmo após armazenamento do microrganismo a -80 °C entre cada experimento realizado (33, 67 e 100 % de hidrolisado), além da reativação do microrganismo em meio sintético sem a pressão celular exercida pela exposição ao hidrolisado, conforme protocolo descrito na seção 4.2.3.

Dessa forma, conclui-se que a estratégia de adaptação empregada no presente estudo promoveu um aumento da tolerância da levedura *S. stipitis*. Os resultados aqui apresentados corroboram as conclusões feitas pela aplicação dos modelos matemáticos, isto é, a diminuição nos parâmetros cinéticos correspondentes aos termos de inibição por ácido acético ao longo das fermentações.

4.3.5 Proteômica

A Tabela A.1, apresentada no Anexo II, mostra todas as proteínas detectadas por meio da análise de proteômica para as três condições de fermentação investigadas (33, 67 e 100 % de hidrolisado). Como pode ser observado, foi encontrado um total de 93 proteínas. A partir dessa tabela, o Diagrama de Venn apresentado na Figura 4.11 foi construído, em que a quantidade de proteínas encontrada para condição é destacada.

Figura 4.11 Diagrama de Venn construído a partir da análise de proteômica apresentada no Anexo II.



Através do diagrama apresentado, observa-se que há nove proteínas em comum para as condições de 33 e 67 %, 14 proteínas em comum para 67 e 100 % e apenas uma proteína em comum para 33 e 100 % de hidrolisado. Além disso, há 50

proteínas em comum às três condições. Vale ressaltar que nenhuma proteína foi detectada de forma isolada na condição de 100% de hidrolisado.

Dentre as proteínas encontradas, algumas merecem destaque, estando vinculadas a mecanismos celulares quando o microrganismo é submetido a condições estressantes, tendo em vista o ambiente tóxico promovido pela utilização de um hidrolisado hemicelulósico não-detoxificado nas fermentações. Essas proteínas estão identificadas pela cor amarela na Tabela A.1, e correspondem a:

- Acetil-CoA-hidrolase (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado);
- Citocromo c oxidase (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado);
- Tiorredoxina e tiorredoxina redutase (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado);
- Cu/Zn-superóxido dismutase (encontrada nas condições de 33 e 67 % de hidrolisado);
- Mn-superóxido dismutase (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado)
- Malato desidrogenase (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado);
- Heat shock protein 70 (encontrada nas condições de 33, 67 e 100 % de hidrolisado).

No caso da proteína acetil-CoA hidrolase, estudos mostraram que essa enzima atua na mitocôndria da célula, com sua função relacionada ao controle dos níveis da acetil-coenzima A (acetil-CoA) nesse compartimento, a fim de evitar efeitos tóxicos (Buu *et al.*, 2003). Em outro estudo (Fleck & Brock, 2009), os autores sugeriram que a enzima acetil-CoA hidrolase promove conservação de energia através da detoxificação do acetato mitocondrial. Uma possível explicação para a atividade dessa enzima ter sido registrada são as concentrações de ácido acético presentes nas fermentações realizadas, conforme discutido ao longo do capítulo, o que pode ter elevado os níveis de acetato na célula.

Vale ressaltar a importância do composto acetil-CoA, que serve como precursor central no metabolismo de leveduras, a partir do qual muitos blocos químicos de interesse podem ser sintetizados, como polihidroxitirato, 1-butanol,

isoprenoides, esteróis, polifenóis, alcanos/alcenos e álcoois graxos (Nielsen, 2014). Sendo uma forma ativada de acetato, acetil-CoA atua como metabólito intermediário crucial na rede metabólica e está envolvido nos metabolismos citosolítico, mitocondrial, peroxissomal e, também, do núcleo celular. É o substrato do ciclo do ácido tricarbóxico (ciclo de Krebs) para geração de energia, além de precursor para aminoácidos e bases nucleotídicas (Krivoruchko *et al.*, 2015).

Explorar a toxicidade dos compostos inibitórios e seus mecanismos de atuação nas células é de fundamental importância para a obtenção de linhagens com tolerância aumentada aos inibidores. Entretanto, os mecanismos de toxicidade desses compostos em leveduras são complexos e altamente dependentes do microrganismo empregado (Chen & Dou, 2016). O ácido acético afeta o metabolismo celular e a estabilidade de proteínas pela diminuição do pH intracelular, causando um efeito negativo (Roe *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2005). Além disso, a difusão do ácido através da membrana plasmática resulta no acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Giannattasio *et al.*, 2013). Além do ácido acético, outros inibidores, como furfural e compostos fenólicos, também promovem a geração de ERO (Gao *et al.*, 2017). Essas espécies reagem com diferentes compostos celulares, como DNA, proteínas e lipídios, induzindo fragmentações e modificações oxidativas (Stadtman & Berlett, 1997; Storz *et al.*, 1987).

A cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria por si só também é considerada uma fonte de ERO, especialmente quando a reação de redução do oxigênio é incompleta (Herrero *et al.*, 2008). As principais espécies de ERO intracelulares são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (Herrero *et al.*, 2008), sendo que o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) é o composto mais abundante no interior das células (Nohl *et al.*, 2003).

A fim de prevenir a célula dos efeitos das ERO, os microrganismos possuem um sistema de defesa, o qual envolve alguns compostos e enzimas oxidorreduzases essenciais, como peroxirredoxinas, tiorredoxina e sua redutase, glutathiona e sua redutase e peroxidase, catalase e superóxido dismutases. Essas oxidorreduzases estão relacionadas ao aumento da tolerância a alguns inibidores específicos (Arellano-Plaza *et al.*, 2013; Miura *et al.*, 2002).

Sendo assim, para reduzir os níveis de ERO que são induzidos por compostos inibitórios lignocelulósicos, a superexpressão de oxidorreduzases se destaca como alternativa (Grant, 2001). Como reportado por Kumar *et al.* (2015), a

expressão do gene da enzima citocromo c oxidase mitocondrial resultou em uma melhora na tolerância a ácidos fracos, especialmente ácido acético, em *S. cerevisiae*. Em relação a essa enzima, sua atividade tem sido associada à morte celular programada (MCP) em leveduras sob stress oxidativo causado pelo acúmulo de ERO e também pela exposição ao ácido acético (Ludovico *et al.*, 2002; Giannattasio *et al.*, 2008; Côrte-Real *et al.*, 2013). Dentre os diferentes mecanismos de MCP, a apoptose é o mais comum, sendo descrita como um colapso orquestrado de células, desempenhando um papel fundamental na eliminação de células danificadas que possam vir a comprometer o funcionamento correto do conjunto de células (Carmona-Gutierrez *et al.*, 2010; Ludovico *et al.*, 2002).

Segundo Gao *et al.* (2017), a superexpressão de tiorredoxina e tiorredoxina redutase também promoveu o aumento da tolerância a múltiplos inibidores lignocelulósicos em uma linhagem de *Kluyveromyces marxianus*, resultando em considerável produção de etanol mesmo na presença desses inibidores. Conforme descrito pelos autores, o sistema tiorredoxina está amplamente presente na mitocôndria da maioria das leveduras e atua como um agente de defesa aos danos causados por ERO.

A enzima antioxidante Cu/Zn-superóxido dismutase (Cu-Zn/SOD) citosólica é necessária não somente como resposta ao estresse oxidativo, mas também por outros tipos de estresse durante a fermentação, como stress osmótico, por etanol e por calor (Burphan *et al.*, 2018). Já a Mn-superóxido dismutase (Mn-SOD2) mitocondrial tem um papel fundamental na proteção da mitocôndria contra o estresse oxidativo e é essencial para a sobrevivência de muitos organismos (Luk *et al.*, 2003). Para detoxificar $O_2^{\bullet-}$, as superóxido dismutases desproporcionam $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 , o qual é então convertido em água e O_2 por catalases (Herrero *et al.*, 2008). Cabe ressaltar que as duas espécies de SOD encontradas no presente estudo também estão presentes em *S. cerevisiae* (Culotta *et al.*, 2006).

A enzima mitocondrial malato desidrogenase está principalmente envolvida no ciclo de Krebs oxidativo, convertendo malato em oxaloacetato, embora a reação que forma oxaloacetato seja desfavorável sob condições termodinâmicas padrões (Takahashi-Iñiguez *et al.*, 2016). Por essa razão, foi sugerido que essa enzima possui outras funções na célula (Molenaar *et al.*, 1998), participando também do ciclo Krebs redutivo para promover proteção contra stress oxidativo, uma vez que o oxaloacetato tem a capacidade de se ligar a radicais livres (Oh *et al.*, 2002).

Por fim, proteínas de choque térmico são expressadas para promover funções biológicas, a fim de contornar diferentes tipos de estresse. No caso da Hsp-70 (heat shock protein 70) encontrada no presente estudo, sua expressão se dá em resposta ao estresse por pH (Tiwari *et al.*, 2015), provavelmente pelas alterações causadas devido à presença de ácido acético no meio fermentativo.

Conforme discutido na seção 4.3.4, a estratégia de adaptação adotada promoveu um aumento da tolerância do microrganismo, avaliado através de concentrações crescentes de ácido acético (Figura 4.10). A identificação dos genes responsáveis pelos mecanismos de defesa da levedura *S. stipitis* frente ao estresse oxidativo promovido pela presença de compostos inibitórios é de fundamental importância para compreensão do metabolismo celular. Esses genes podem ser utilizados para superexpressão no próprio microrganismo ou em microrganismos industrialmente solidificados (linhagens de *S. cerevisiae*, por exemplo) para promover o aumento da tolerância frente aos inibidores lignocelulósicos.

4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados, conclui-se que a estratégia de adaptação adotada atingiu o objetivo inicialmente proposto, o qual era aumentar a tolerância da levedura *S. stipitis* frente aos principais inibidores encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, visando uma aplicação industrial sem a necessidade de detoxificação do substrato. Um ponto importante a ser destacado é a manutenção da adaptação celular mesmo após armazenamento a -80 °C e reativação do microrganismo em substrato sintético antes de cada experimento com hidrolisado. A partir da aplicação de modelos matemáticos, foi possível compreender os efeitos dessa adaptação nos parâmetros cinéticos. A análise de proteômica permitiu a compreensão dos mecanismos de defesa do microrganismo que resultam no aumento da sua tolerância aos compostos inibitórios do hidrolisado hemicelulósico.

Tendo em vista o baixo desempenho fermentativo da levedura *S. stipitis* na fermentação em batelada alimentada com 100 % de hidrolisado, com acúmulo de açúcares (principalmente xilose), uma possível estratégia para amenizar os efeitos inibitórios da alta concentração de substrato seria realizar a alimentação de um hidrolisado com menores concentrações de açúcares, ou até mesmo diminuir a vazão de alimentação.

CONCLUSÕES, SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS E PUBLICAÇÕES

CONCLUSÕES

Conforme discutido ao longo deste trabalho, as leveduras não-convencionais *S. passalidarum* e *S. stipitis* se confirmam como potenciais microrganismos para aplicação industrial visando a produção de etanol a partir de substratos ricos em pentose, tendo em vista o desempenho fermentativo e a capacidade de adaptação desses microrganismos quando submetidos a fermentações sucessivas, seja a partir de substrato sintético ou de hidrolisado hemicelulósico. O trabalho de modelagem matemática se confirma como uma ferramenta útil para compreensão da cinética fermentativa dos microrganismos, a qual pode ser aplicada para otimização do processo, promovendo a redução de trabalhos experimentais e de custos operacionais.

A partir dos resultados discutidos e das considerações finais apresentadas ao final de cada capítulo, destacam-se as seguintes principais conclusões:

- Quando submetidas a fermentações em batelada de um substrato sintético composto por xilose e glicose (aproximadamente 63 e 27 g/L, respectivamente), nas condições experimentais empregadas, isto é, alta densidade celular e limitação de oxigênio ($k_{La} = 8 \text{ h}^{-1}$), a levedura *S. passalidarum* apresentou um desempenho superior a *S. stipitis*, com maiores concentrações de etanol e produtividades volumétricas;
- A partir do modelo matemático desenvolvido para as fermentações em batelada em função da temperatura, na faixa de 26 a 32 °C, maiores produtividades volumétricas podem ser alcançadas entre 30 e 32 °C para a levedura *S. passalidarum*, sendo que os parâmetros cinéticos dependentes da temperatura são as velocidades específicas máximas de crescimento celular e de produção de etanol, tanto a partir de xilose quanto de glicose;
- O sistema de fermentação *Melle-Boinot*, amplamente aplicado nas usinas de etanol de primeira geração, se destaca como uma estratégia promissora para ser aplicada na produção de etanol de segunda geração.

A partir de fermentações em batelada alimentada com reciclo de células (sistema *Melle-Boinot*), utilizando substrato sintético, houve uma melhora contínua no desempenho fermentativo da levedura *S. passalidarum* ao longo dos ciclos, com aumentos de, aproximadamente, 32, 34 e 34 % no rendimento em etanol, na produtividade volumétrica e na concentração máxima de etanol, respectivamente, do primeiro ao quinto ciclo, a uma temperatura constante de 30 °C;

- Aplicando o modelo matemático desenvolvido para as fermentações em batelada alimentada, foi possível compreender o efeito dos reciclos celulares na evolução dos parâmetros cinéticos, destacando a necessidade de re-estimação de parâmetros chave que representem a melhora no desempenho fermentativo do microrganismo ao longo dos ciclos;
- A estratégia de fermentações sequenciais com crescentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico se destaca como uma alternativa para promover o aumento da tolerância a compostos inibitórios presentes em hidrolisados utilizando leveduras não-convencionais, tendo em vista os resultados obtidos para *S. stipitis*;
- A fermentação em modo batelada alimentada se mostrou adequada para diminuir os efeitos negativos dos compostos inibitórios, em comparação à fermentação em batelada;
- Os modelos matemáticos desenvolvidos para as fermentações com substrato sintético puderam ser aplicados nas fermentações com hidrolisado, com a inclusão de termos relacionados à inibição por ácido acético e ao consumo das fontes de carbono para manutenção celular. A partir da aplicação dos modelos nas fermentações com concentrações crescentes de hidrolisado, observou-se que o principal efeito da adaptação celular se dá nos parâmetros cinéticos relacionados ao estresse por ácido acético.

SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados apresentadas nessa tese de doutorado, novos trabalhos podem ser realizados. Alguns dos possíveis trabalhos são:

- Desenvolvimento do modelo cinético em função da temperatura para uma maior faixa de temperatura;
- Aplicação do modelo desenvolvido para fermentações em batelada em diferentes condições iniciais de substrato (concentração inicial de açúcares redutores e proporção xilose:glucose);
- Aplicação do modelo desenvolvido para fermentações em batelada alimentada para se determinar a vazão ótima de alimentação, juntamente com a concentração ótima de açúcares no substrato alimentado, a fim de se evitar acúmulo de substrato (principalmente xilose), com validação dos resultados através de novas fermentações;
- Realização de um trabalho de genômica para melhor compreensão dos níveis de alteração celular ocorridos como consequência da estratégia de adaptação celular investigada.

PUBLICAÇÕES E PARTICIPAÇÕES EM EVENTOS

Durante o período de doutorado, houve participação como co-autor nos seguintes artigos publicados:

- “Fermentation strategy for second-generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*”, publicado na revista *Biotechnology and Bioengineering* (Nakanishi *et al.*, 2017);
- “Online monitoring of the redox potential in microaerobic and anaerobic *Scheffersomyces stipitis* fermentations”, publicado na revista *Biotechnology Letters* (Bonan *et al.*, 2019).

Além desses artigos já publicados, quatro outros artigos foram submetidos e estão em processo de revisão nas respectivas revistas. São eles:

- “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* NRRL Y-27907”, submetido na revista *Biochemical Engineering Journal*, no dia 18/09/2019, como autor principal;

- “Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitors strategies to overcome problems related to inhibitors for non-*Saccharomyces* species”, submetido na revista *Biomass and Bioenergy*, no dia 12/07/2019, como co-autor;
- “Redox potential as a key parameter for monitoring and optimization of xylose fermentation with yeast *Spathaspora passalidarum* under limited-oxygen conditions”, submetido na revista *Bioprocess and Biosystems Engineering*, no dia 15/08/2019, como co-autor.
- “Temperature impact evaluation on physiological adaptation of *Spathaspora passalidarum* throughout the melle-boinot process for second-generation ethanol production”, submetido na revista *Biorenewable Energy*, no dia 27/08/2019, como co-autor.

Quanto a participações em eventos, os seguintes trabalhos foram apresentados:

- “Fermentation of xylose and glucose mixture by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 in different temperatures”, apresentado em forma de poster, no XXI Simpósio Nacional de Bioprocessos (XXI SINAFERM), como autor principal;
- “Determination of a kinetic model for xylose and glucose mixture fermentation by yeast *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907”, apresentado em forma de poster, no 3º *Brazilian BioEnergy Science and Technology Conference* (BBest), como autor principal;
- “Non-stationary ¹³C-metabolic flux analysis to investigate *Spathaspora passalidarum* metabolism on glucose and xylose”, apresentado em forma de poster, no *41st Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals* (*41st SBFC*), como autor principal;
- “Minimizing the effect of acetic acid on fermentation performance of yeast *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 through pH control”, apresentado em forma de poster, no XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos (XXII SINAFERM), como autor principal;
- “Evaluation of enzymatic activity of yeast *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 for ethanol production from xylose under different oxygen

transfer conditions”, apresentado em forma de poster, no XIII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática (XIII ENZITEC), como co-autor;

- “*Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 fermentations under different microaerobic conditions”, apresentado em forma de poster, no XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos (XXII SINAFERM), como co-autor;
- “Temperature-dependent kinetic model for a xylose/glucose mixture fermentation by yeast *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907”, em apresentação oral, no XXII Simpósio Nacional de Bioprocessos (XXII SINAFERM), como co-autor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-BANAT, B.M.A.; HOSHIDA, H. High temperatures become superior to the traditional process using High-temperature fermentation : how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 85, n. 4, p. 861-767, 2013.
- AGBOGBO, F.K.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose-fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnol Lett**, v. 30, p. 1515-1524, 2008.
- ALFENORE S.; MOLINA-JOUVE, C.; GUILLOUET, S.E.; URIBELARREA, J.L.; GOMA, G.; BENBADIS, L. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 60, p. 67–7, 2003.
- ALMQUIST, J.; CVIJOVIC, M.; HATZIMANIKATIS, V.; NIELSEN, J.; JIRSTRAND, M. Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. **Metab Eng**, v. 24, p. 38–60, 2014.
- ALONSO PIPPO, W.; LUENGO, C.A.; ALONSOAMADOR, L.M.A.; GARZONE, P.; CORMACCHIA, G. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels.
- ANDRADE, R.R. **Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica**. Mestrado. Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP, 2007.
- ANDRADE, R.R.; RIVERA, E.C.; ATALA, D.I.P.; FILHO, R.M.; FILHO, F.M.; COSTA, A.C. Study of kinetic parameters in a mechanistic model for bioethanol production through a screening technique and optimization. **Bioprocess Biosyst Eng** v. 32, p. 673–680, 2009.
- ANDRADE, R.R.; RIVERA, E.C.; COSTA, A.C.; ATALA, D.I.P.; FILHO, F.M.; FILHO, R.M. Estimation of temperature dependent parameters of a batch alcoholic fermentation process. **Appl Biochem Biotechnol** v. 137, p. 753–763, 2007.
- ANDRADE, R.R.; FILHO, F.M.; FILHO, R.M.; COSTA, A.C. Kinetics of ethanol production from sugarcane bagasse enzymatic hydrolysate concentrated with molasses under cell recycle. **Bioresour Technol**, v. 130, p. 351-359, 2013.
- APEL, A.A.; OUELLET, M.; SZMIDT-MIDDLETON, H.; KEASLING, J.D.; MUKHOPADHYAY, A. Evolved hexose transporter enhances xylose uptake and

- glucose/xylose co-utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Sci Rep**, v.6, p. 1-10, 2016.
- ARELLANO-PLAZA, M.; GSCHAEDLER-MATHIS. A.; NORIEGA-CISNEROS, R.; CLEMENTE-GUERRERO, M.; MANZO-ÁVALOS. S.; GONZÁLEZ-HERNÁNDEZ, J.C.; ET AL. Respiratory capacity of the *Kluyveromyces marxianus* yeast isolated from the mezcal process during oxidative stress. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 29, p. 1279–1287, 2013.
- ASHOOR, S.; COMITINI, F.; CIANI, M. Cell-recycle batch process of *Scheffersomyces stipitis* and *Saccharomyces cerevisiae* co-culture for second generation bioethanol production. **Biotechnol Lett**, v. 37, p. 213-2218, 2015.
- AUESUKAREE, C. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. **J Biosci Bioeng**, v. 124, n. 2, p. 133–142, 2017.
- BAILEY, J.E. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. **Biotechnol Prog**, v. 14, p. 8-20, 1998.
- BAJWA, D. S.; PETERSON, T.; SHARMA, N.; SHOJAEIARANI, J.; & BAJWA, S. G. A review of densified solid biomass for energy production. **Renew Sust Energ Rev**, v. 96, p. 296–305, 2018.
- BANERJEE, S.; ARCHANA, A.; SATYANARAYANA, T. Xylose metabolism in a thermophilic mould *Malbranchea pulchella* var. *sulfurea* TMD-8. **Curr Microbiol**, v. 29, n.6, p. 349–352, 1994.
- BARI, I.; CANIO, P.; CUNA, D.; LIUZZI, F.; CAPECE, A.; ROMANO, P. Bioethanol production from mixed sugars by *Scheffersomyces stipitis* free and immobilized cells, and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. **New Biotechnol**, v. 302, p. 591-597, 2013.
- BASSO, L.C.; BASSO, T O.; ROCHA, S.N. Biofuel Production – Recent Developments and Prospects. Chapter - Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation, p. 85-100, 2011.
- BASSO, L.C.; BASSO, T O.; ROCHA, S.N. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. **Biofuel Production Dev. Prospect**. 1530, 2012.
- BASSO, L.C.; DE AMORIM, H.V.; DE OLIVEIRA, A.J.; LOPES, M.L. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil, **FEMS Yeast Res**, v. 8, n. 7, p. 1155-1163, 2008.

- BRASIL, CTNBio. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 2, DE 27 DE NOVEMBRO DE 2006. Dispõe sobre a classificação de riscos de Organismos Geneticamente Modificados (OGM) e os níveis de biossegurança a serem aplicados nas atividades e projetos com OGM e seus derivados em contenção. Disponível em: <https://agrobiobrasil.org.br/wp-content/uploads/2013/11/RESOLU%C3%87%C3%83O-NORMATIVA-N%C2%BA-2-DE-27-DE-NOVEMBRO-DE-2006.pdf>. Acesso em 19 de agosto de 2018.
- BRASIL, CTNBio. Resolução Normativa Nº 16, de 15 de janeiro de 2018. Estabelece os requisitos técnicos para apresentação de consulta à CTNBio sobre as Técnicas Inovadoras de Melhoria de Precisão. Disponível em: http://ctnbio.mcti.gov.br/inicio/-/asset_publisher/58KNi0CuF68J/content/resolucao-normativa-n%C2%BA-16-de-15-de-janeiro-de-2018. Acesso em 19 de agosto de 2018.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R.K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 13, p. 4767–4774, 2010.
- BISWAS R.; UELLEND AHL H.; AHRING B.K. Conversion of C6 and C5 sugars in undetoxified wet exploded bagasse hydrolysates using *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* CBS6054. **AMB Express**, v. 3, n. 42, p. 1-7, 2013
- BONAN, C.I.D.G. Avaliação da produção de bioetanol sob diferentes condições de transferência de oxigênio para a levedura *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (Dissertação de mestrado), 2019.
- BONAN, C.I.D.G.; BIAZI, L.E.; SANTOS, S.C.; SOARES, L.B.; DIONÍSIO, S.R.; HOFFMAM, Z.B.; COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Online monitoring of the redox potential in microaerobic and anaerobic *Scheffersomyces stipitis* fermentations. **Biotechnol Lett**, v. 41, p. 753–761, 2019.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: W. Schmidell, U. A. Lima, *et al.* **Biotecnologia Industrial** São Paulo, 2001. v. 2, p. 123-178.
- BRETHAUER, S.; WYMAN, C.E. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 4862-4874, 2010.
- BURPHAN, T.; TATIP, S.; LIMCHAROENSUK, T.; KANGBOONRUANG, K.; BOONCHIRD, C.; AUESUKAREE, C. Enhancement of ethanol production in very high gravity fermentation by reducing fermentation-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientific Reports**, 8:13069, 2018.

- BUU, L.M. ET AL. Functional characterization and localization of acetyl-CoA hydrolase, Ach1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 17203–17209, 2003.
- CADETE RM, DE LAS HERAS AM, SANDSTRÖM AG, FERREIRA C, GÍRIO F, GORWA-GRAUSLUND M-F, ET AL. Exploring xylose metabolism in *Spathaspora* species: XYL1.2 from *Spathaspora passalidarum* as the key for efficient anaerobic xylose fermentation in metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Biofuels**, 9:167, 2016.
- CADETE, R.M.; MELO, M. A.; DUSSÁN, K. J.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, S. S.; ZILLI, J.E.; VITAL, M.J.S.; GOMES, F.C.O.; LACHANCE, M.; ROSA, C.A. Diversity and Physiological Characterization of D-Xylose-Fermenting Yeasts Isolated from the Brazilian Amazonian Forest. **PLoS ONE**, n. 7, v. 8, e43135, 2012.
- CARMONA-GUTIERREZ, D.; EISENBERG, T.; BÜTTNER, S.; MEISINGER, C.; KROEMER, G.; MADEO, F. Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, p. 763-773, 2010.
- CHEN, R.; DOU, J. Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. **Biotechnol Lett**, 38:213–21, 2016.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Monitoramento Agrícola-Safra 2017, v. 5, n. 7, p. 1–98, 2018.
- CÔRTE-REAL, M.; MADEO, F. Yeast programmed cell death and aging. **Frontiers in Oncology**, v. 3, 2013.
- COSTA, R.S.; HARTMANN, A.; VINGA, S. Kinetic modeling of cell metabolism for microbial production. **J Biotechnol**, v. 219, p. 126–141, 2015.
- CULLETON, H.; MCKIE, V.; DE VRIES, R. P. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: What have we learned from *Aspergillus*? **Biotechnol J**, v. 8, n.8, p. 884–894, 2013.
- CULOTTA, V.C.; YANG, M; O'HALLORAN, T.V. Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1763, p. 747–758, 2006.
- DASHTBAN, M.; KEPKA, G.; SEIBOTH, B.; QIN, W. Xylitol production by genetically engineered *Trichoderma reesei* strains using barley straw as feedstock. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 169, n. 2, p. 554–569, 2013.
- DE CASTRO, L.N. Fundamentals of natural computing: an overview. **Phys Life Rev**, v. 4, p. 1–36, 2007.

- DELGENES, J.P.; MOLETTA, R. Fermentation of o-x ylose, 0-glucose, r-arabinose Mixture by *Pichia stipitis*: Effect of the Oxygen Transfer Rate on Fermentation Performance. **Biotechnol Bioeng**, v. 34, n. 3, p. 398-402, 1989.
- DELLWEG H, RIZZI M, KLEIN C. Contolled limited aeration and metabolic regulation during the prduction of ethanol from D-xylose by *Pichia stipitis*. **J Biotechnol** v. 12, n. 2, p. 111–122, 1989.
- DIAS, M.O.S.; ENSINAS, A.V.; NEBRA, S.A.; MACIEL FILHO, R.; ROSSEL. C.E.V.; MACIEL M.R.W. Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process. **Chem Eng Res Des**, v. 87, p.1206-1216, 2009.
- DIAS, M.O.S.; MACIEL FILHO, R.; ROSSELL, C.E.V. Efficient Cooling of Fermentation Vats in Ethanol Production – Part 1, **Proc Int Soc Sugar Cane Technol**, v. 26, p. 1210–1217, 2007.
- DRAGOI, E.N.; CURTEANU, S. The use of differential evolution algorithm for solving chemical engineering problems. **Rev Chem Eng**, v. 32, p. 149–180, 2016.
- DU, J.; LI, S.; ZHAO, H. Discovery and characterization of novel d-xylose-specific transporters from *Neurospora crassa* and *Pichia stipitis*. **Mol BioSyst**, v. 6, n. 11, p. 2150–2156, 2010.
- DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting D-Xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb Technol**, v. 16, p. 944-956, 1994.
- FARIAS, D.; ANDRADE, R.R.; MAUGERI-FILHO, F. Kinetic Modeling of Ethanol Production by *Scheffersomyces stipitis* from Xylose. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 172, p. 361-379, 2014.
- FARIA, J. M. B. A. DE; RODRIGUES, P. DE O.; MELO, S. W. C.; LIMA, T. A. R. Indicadores da Agropecuária. **Conab**, XXVI(03), p. 01-114, 2018.
- FATMA, S.; HAMEED, A.; NOMAN, M.; AHMED, T.; SHAHID, M.; TARIQ, M.; Sohail. I.; TABASSUM, R. Lignocellulosic Biomass: A Sustainable Bioenergy Source for the Future. *Protein Pept Lett*, v. 25, n.2, p.148-163,2018.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.
- FERREIRA, A.D.; MUSSATTO, S.I.; CADETE, R.M.; ROSA, C.A.; SILVA, S.S. Ethanol production by a new pentose-fermenting yeast strain, *Scheffersomyces stipitis* UFMG-IMH 43.2, isolated from the Brazilian forest, **Yeast**, v. 28, p. 547–554, 2011.

- FLECK, C.B.; BROCK, M. Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: Fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. **Fungal Genetics and Biology**, v. 46, p. 473, 485, 2009.
- FUJII, T.; YU, G.; MATSUSHIKA, A.; KURITA, A.; YANO, S.; MURAKAMI, K.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylo-oligosaccharides by xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* expressing beta-xylosidase. **Biosci Biotechnol Biochem**, v. 75, n. 6, p. 1140-1146, 2011.
- GAO, J.; YUAN, W.; LI, Y.; BAI, F.; JIANG, Y. Synergistic effect of thioredoxin and its reductase from *Kluyveromyces marxianus* on enhanced tolerance to multiple lignocellulose-derived inhibitors. **Microb Cell Fact**, 16:81, 2017.
- GARCÍA-APARICIO, M.P.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; OLIVA, J.M.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M.J. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 129, p. 278–228, 2006.
- GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnol Adv**, v. 27, n. 2, p. 153-176, 2009.
- GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ŽDRALEVIĆ, M.; MARRA, E. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Front Microbiol**, 4:33, 2013.
- GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 13, p. 4775-4800, 2010.
- GOMEZ-TOVAR, F.; CELIS, L. B.; RAZO-FLORES, E.; ALATRISTE-MONDRAGÓN, F. Chemical and enzymatic sequential pretreatment of oat straw for methane production. **Bioresour Technol**, v. 116, p. 372–378, 2012.
- GRANT, C.M. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. **Mol Microbiol**, v. 39, p. 533–541, 2001.
- GUEBEL, D.V.; CORDENONS, A.; NUDEL, B.C.; GIULIETTI, A.M. Influence of oxygen transfer rate and media composition on fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **J Ind Microb**, v. 7, p. 287-292, 1991.
- HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose fermenting yeast strains. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 74, n. 5, p. 937–953, 2007.
- HARHANGI, H. R.; AKHMANOVA, A. S.; EMMENS, R.; VAN DER DRIFT, C.; DE LAAT, W. T. A. M.; VAN DIJKEN, J. P.; JETTEN, M.S.M.; PRONK, J.T.; OP DEN

- CAMP, H. J. M. Xylose metabolism in the anaerobic fungus *Piromyces* sp. strain E2 follows the bacterial pathway. **Arch Microbiol**, v. 180, n. 2, p. 134–141, 2003.
- HERRERO, E.; ROS, J.; BELLI, G.; CABISCOL, E. Redox control and oxidative stress in yeast cells, **Biochem Biophys Acta**, v. 1780, p. 1217-1235 (2008).
- HO, N. W. Y.; LADISCH, M.; SEDLAK, M.; MOSIER, N.; CASEY, E. Biofuels from Cellulosic Feedstocks. In *Comprehensive Biotechnology*, v. 3, p. 51–62, 2011.
- HOLTZAPPLE, M.T. Hemicelluloses. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2^a ed. San Diego: Academic Press, p. 3060-3071, 2003.
- HOU, X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 94, n. 1, p. 205-214, 2012.
- HUGHES, S.R.; GIBBONS, W.R.; BANG, S.S.; PINKELMAN, R.; BISCHOFF, K.M.; SLININGER, P.J.; QURESHI, N.; KURTZMAN, C.P.; LIU, S.Q.; SAHA, B.C; AND OTHERS. Random UV-C mutagenesis of *Scheffersomyces* (formerly *Pichia*) *stipitis* NRRL Y-7124 to improve anaerobic growth on lignocellulosic sugars. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, n. 1, p. 163-173, 2012.
- JACQUET, N.; MANIET, G.; VANDERGHEM, C.; DELVIGNE, F.; RICHEL, A. Application of Steam Explosion as Pretreatment on Lignocellulosic Material: A Review. **Ind Eng Chem Res**, v.54, n. 10, p. 2593-2598, 2015.
- JARDINE, J.G.; DISPATO, I.; PERES, M.R. Considerações Sobre o Bioetanol Lignocelulósico para Subsidiar a Elaboração de Conteúdo da Árvore do Conhecimento Agroenergia. **Embrapa Informática Agropecuária Campinas**, SP, 32, 2009.
- JEFFRIES, T. W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Curr Opin Biotechnol**, v. 17, n. 3, p. 320–326, 2006.
- JEFFRIES, T. W. Engineering the *Pichia stipitis* genome for fermentation of hemicellulose hydrolysates. In: **Wall, J. et al. (Eds.), Bioenergy**. ASM Press, Washington, DC, p. 37–47, Chapter 3, 2008.
- JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 63, n. 5, p. 495-509, 2004.
- JIN, Y.S.; ALPER, H.; YANG, Y.T.; STEPHANOPOULOS, G. Improvement of xylose uptake and ethanol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* through an inverse metabolic engineering approach. *Appl Environ Microbiol*, v. 71, n.12, p. 8249–8256, 2005.

- JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Appl Environ Microbiol**, v. 70, n. 11, p. 6816–6825, 2004.
- JOHAR, N., AHMAD, I., DUFRESNE, A. Extraction, preparation and characterization of cellulose fibres and nanocrystals from rice husk. **Ind Crop Prod**, v. 37, n.1, p. 93–99, 2012.
- KAUPERT NETO, A.A.; BORIN, G.P.; GOLDMAN, G.H.; DAMÁSIO, A.R.L.; OLIVEIRA, J.V.C. Insights into the plant polysaccharide degradation potential of the xylanolytic yeast *Pseudozyma brasiliensis*. **FEMS Yeast Res**, v. 6, n. 2, 2015.
- KIM, D. Physico-Chemical Conversion of Lignocellulose: Inhibitor Effects and Detoxification Strategies: A Mini Review. **Molecules**, v. 23, p. 1-21, 2018.
- KIM, Y., KIM, S., HAN, T. U.; PARK, Y. WATANABE, C. Pyrolysis reaction characteristics of Korean pine (*Pinus Koraiensis*) nut shell. **J Anal Appl Pyrol**, v. 110, p. 435–441, 2014.
- KIM, S.R.; LEE, K.S.; KONG, I.I.; LESMANA, A.; LEE, W.H.; SEO, J.H.; KWEON, D.H.; JIN, Y.S. Construction of an efficient xylose-fermenting diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain through mating of two engineered haploid strains capable of xylose assimilation, **J Biotechnol**. v. 164, n. 1, p. 105-111, 2013.
- KRAHULEC, S., PETSCHACHER, B., WALLNER, M., LONGUS, K., KLIMACEK, M., NIDETZKY, B. Fermentation of mixed glucose-xylose substrates by engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the coenzyme specificity of xylose reductase, and effect of glucose on xylose utilization. **Microb Cell Fact**, v. 9, n. 16, p. 1–14, 2010.
- KRISHNAN, M.S.; HO, N.W.Y.; TSAO, G.T. Fermentation Kinetics of Ethanol Production from Glucose and Xylose by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* 1400 (Plnh33). **Appl Biochem Biotech**, v. 77-79, p. 373-388, 1999.
- KRIVORUCHKO, A.; ZHANG, Y.; SIEWERS, V.; CHEN, Y.; NIELSEN, J. Microbial acetyl-CoA metabolism and metabolic engineering. **Metab Eng**, v. 28, p. 28-42, 2015.
- KUHAD, R.C.; GUPTA, R.; KHASA, Y.P.; SINGH, A.; ZHANG, Y.H.P. Bioethanol production from pentose sugars: Current status and future prospects. **Renew and Sust Energ Rev**, v. 15, p. 4950-4962, 2011.
- KUMAR, V.; HART, A.J.; KEERTHIRAJU, E.R.; WALDRON, P.R.; TUCKER, G.A.; GREETHAM D. Expression of mitochondrial cytochrome C oxidase chaperone gene (COX20) improves tolerance to weak acid and oxidative stress during yeast fermentation. **PLoS ONE**, 10:e0139129, 2015.

- KUYPER, M., HARHANGI, H. R., STAVE, A. K., WINKLER, A. A., JETTEN, M. S., DE LAAT, W. T.; DEN RIDDER, J.J.; OP DEN CAMP, H.J.; DIJKEN, J.P.; PRONK, J. T. High-level functional expression of a fungal xylose isomerase: the key to efficient ethanolic fermentation of xylose by *Saccharomyces cerevisiae*? **FEMS Yeast Res**, v. 4, n. 1, p. 69–78, 2003.
- KUYPER, M.; TOIRKENS, M.J.; DIDERICH, J.A.; WINKLER, A.A.; VAN DIJKEN, J.P.; PRONK, J.T. Evolutionary engineering of mixed-sugar utilization by a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain. **FEMS Yeast Res**, v. 5, n. 10, p. 925-934, 2005.
- KWAK, S.; JIN, Y-S. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *Saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. **Microb Cell Fact**, 16:82, 2017.
- KWON, Y.J.; ENGLER, C.R. Kinetic Models for Growth and Product Formation on Multiple Substrates. **Biotechnol Bioproc Eng**, v. 10, p. 587-592, 2005.
- LACHOS-PEREZ, D., MARTINEZ-JIMENEZ, F., REZENDE, C. A., TOMPSETT, G., TIMKO, M., FORSTER-CARNEIRO, T. Subcritical water hydrolysis of sugarcane bagasse: An approach on solid residues characterization. **J Supercrit Fluids**, v. 108, p. 69–78, 2016.
- LANDAETA, R.; AROCA, G.; ACEVEDO, F.; TEIXEIRA, J.A.; MUSSATO, S.I. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Appl Energ**, v. 102, p. 124-130, 2013.
- LAPLACE, J.M.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Alcoholic fermentation of glucose and xylose by *Pichia shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: oxygen requirement as a key factor. *Appl Microbial Biotechnol*, v. 36, p. 158-162, 1991.
- LENNARTSSON, P. R.; ERLANDSSON, P.; TAHERZADEH, M. J. Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products. **Bioresour Technol**, v. 165, p. 3–8, 2014.
- LI, X.; PARK, A.; ESTRELA, R.; KIM, S.R.; JIN, Y.S.; CATE, J.H.D. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol Rep**, v. 9, p. 53-56, 2016.
- LI, Y.; PARK, J-Y.; SHIROMA, R.; IKE, M.; TOKUYASU, K. Improved ethanol and reduced xylitol production from glucose and xylose mixtures by the mutant strain of *Candida shehatae* ATCC 22984. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 166, n. 7, p. 1781-1790, 2012.

- LI, H., WU, M., XU, L., HOU, J., GUO, T., BAO X., SHEN, Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. **Microb Biotechnol**, v. 8, n. 2, p. 266- 274, 2015.
- LIANG, M.; KIM, M.H.; HE, Q.P.; WANG, J. Impact of pseudo-continuous fermentation on the ethanol tolerance of *Scheffersomyces stipitis*. **J Biosci Bioeng**, v. 116, p. 319-326, 2013.
- LIN, H., HILDEBRAND, A., KASUGA, T., FAN, Z. Engineering *Neurospora crassa* for cellobionate production directly from cellulose without any enzyme addition. **Enzyme Microb Technol**, v. 99, p. 25–31, 2017.
- LIU, G., QU, Y. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. **Biotechnol Advanc**, v. 37, n. 4. P. 519-529, (2018).
- LIU, Z.L.; WEBER, S.A.; COTTA, M.A.; LI, S.Z. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. **Bioresour Technol**, v. 104, p. 410-416, 2012.
- LONG, T.M.; SU, Y.K.; HEADMAN, J.; HIGBEE, A.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. **Appl Environ Microbiol**, v. 78, n. 16, p. 5492-5500, 2012.
- LOPES, M.L.; PAULILLO S.C.L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R.A.; LORENZI, M.S.; GIOMETTI, F.H.C.; BERNARDINO, C.D.; DE AMORIM NETO, H.B., DE AMORIM, H.V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry, **Brazilian J Microbiol**, v. 47, p. 64–76, 2016.
- LU, C., JEFFRIES, T. Shuffling of promoters for multiple genes to optimize xylose fermentation in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied Environ Microbiol*, v. 73, n. 19, p. 6072–6077, 2007.
- LUDOVICO, P.; RODRIQUES, F.; ALMEISA, A.; SILVA, M.T.; BARRIENTOS, A.; CORTE-REAL, M. Cytochrome c release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Biol Cell**, v. 13(8): p. 2598–2606, 2002.
- LUK, E.; CARROLL, M.; BAKER, M.; CULOTTA, V.C. Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. **PNAS**, v. 100, p. 10353-10357, 2003.

- MA, M.; LIU, Z.L.; MOON, J. Genetic engineering of inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* for improved xylose utilization in ethanol production. **Bioenergy Res**, v. 5, n. 2, p. 459-469, 2012.
- MATANO, Y.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Cell recycle batch fermentation of high-solid lignocellulose using a recombinant cellulase-displaying yeast strain for high yield ethanol production in consolidated bioprocessing. **Bioresour Technol**, v. 135, p. 403-409, 2013.
- MATOS, I.T.S.R.; DO CARMO, E.J.; DE ASSUNÇÃO, E.N.; DE ALMEIDA, R.A.; SOARES, V.M.; ASTOLFI FILHO, S. Xylitol production and furfural consumption by a wild type *Geotrichum* sp. **J Biotechnol**, v. 24, p. 21–25, 2016.
- MIURA, T.; ABE, F.; INOUE, A.; USAMI, R.; HORIKOSHI, K. Superoxide dismutase is involved in high tolerance to copper in the deep-sea yeast, *Cryptococcus* sp. N6. **Biotechnol Lett**, v. 24, p. 1069–1074, 2002.
- MOLENAAR, D.; VAN DER REST, M.E.; PETROVIĆ, S. Biochemical and genetic characterization of the membrane associated malate dehydrogenase (acceptor) from *Corynebacterium glutamicum*. **Eur J Biochem**, 254(2):395-403, 1998.
- MORALES, P.; GENTINA, J.C.; AROCA, G.; MUSSATTO, S.I. Development of an acetic acid tolerant *Spathaspora passalidarum* strain through evolutionary engineering with resistance to inhibitors compounds of autohydrolysate of Eucalyptus globulus. **Ind Crops Prod**, v. 106, p. 5-11, 2017.
- MOYSÉS, D.N.; REIS, V.C.B.; DE ALMEIDA, J.R.M.; DE MORAES, L.M.P.; TORRES, F.A.G. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Challenges and prospects. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 3, p. 1–18, 2016.
- MULCHANDANI, A.; LUONG, J.H.T. Microbial inhibition kinetics revisited. **Enzyme Microb Technol**, v. 11, p. 66–73, 1989.
- MUNASINGHE, P.C.; KHANAL, S.K. Biomass-derived syngas fermentation into biofuels: Opportunities and challenges. **Bioresour Technol**, v. 101, n. 13, p. 5013–5022, 2010.
- MUPONDWA, E.; LI, X.; TABIL, L.; SOKHANSANJ, S.; ADAPA, P. Status of Canada's lignocellulosic ethanol: Part II: Hydrolysis and fermentation technologies. **Renew Sust Energ Rev**, v. 79, p. 1535–1555, 2017.
- MURTHY, P. S.; NAIDU, M. M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition - A review. **Resour Conserv Recy**, v. 66, p. 45–58, 2012.

- NAKANISHI, S.C.; SOARES, L.B.; BIAZI, L.E.; NASCIMENTO, V.M.; IENCZAK, J.L.; ROCHA, G.J.M. Fermentation strategy for second generation ethanol production from sugarcane bagasse hydrolyzate by *Spathaspora passalidarum* and *Scheffersomyces stipitis*. **Biotechnol Bioeng**, v. 9999, p. 1-11, 2017.
- NESVIZHSKII, A.I.; KELLER, A.; KOLKER, E.; AEBERSOLD, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Anal Chem**, 75, 17, p. 4646-4658, 2003.
- NGUYEN, N.H.; SH, S.O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp nov and *Candida jeffriesii* sp nov. **Mycol Res**, v. 110, p. 1232-1241, 2006.
- NIELSEN, J. Synthetic biology for engineering acetyl coenzyme A metabolism in yeast. **mBio**, 5(6):e02153-14, 2014.
- NIELSEN, F.; TOMÁS-PEJÓ, E.; OLSSON, L.; WALLBERG, O. Short-term adaptation during propagation improves the performance of xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and co-fermentation. **Biotechnol Biofuels**, 8:219, 2015.
- NOHL, H.; KOZLOV, A. V.; GILLE, L.; STANIEK, K. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts, **Biochem Soc Trans**, v. 31, p. 1308-1311, 2003.
- NUMFOCUS, 2019. Scipy Optimize - Differential Evolution¶ [WWW Document]. URL https://docs.scipy.org/doc/scipy/reference/generated/scipy.optimize.differential_evolution.html
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme Microb Technol**, v. 18, p. 312-331, 1996.
- OLSON, D.G.; SPARLING, R.; LYND, L.R. Ethanol production by engineered thermophiles. **Curr Opin Biotechnol**, v. 33, p. 130–141, 2015.
- OH, T.J.; KIM, I.G.; PARK, S.Y.; ET AL. NAD-dependent malate dehydrogenase protects against oxidative damage in *Escherichia coli* K-12 through the action of oxaloacetate. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 11(1), p. 9-14, 2002.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresour Technol**, v. 74, p. 17-24, 2000.
- PENG, B.; SHEN, Y.; LI, X.; CHEN, X.; HOU, J.; BAO, X. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. **Metab Eng**, v. 14, p. 9–18, 2012.

- PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochem Eng J**, v. 28, p. 36-43, 2006.
- PINHEIRO, Á.D.T., DA SILVA PEREIRA, A., BARROS, E.M., ANTONINI, S.R.C., CARTAXO, S.J.M., ROCHA, M.V.P., GONÇALVES, L.R.B. Mathematical modeling of the ethanol fermentation of cashew apple juice by a flocculent yeast: the effect of initial substrate concentration and temperature. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 40, p. 1221–1235, 2017.
- POUDEL, S.; GIANNONE, R.J.; RODRIGUEZ, M.; RAMAN, B.; MARTIN, M. Z.; ENGLE, N. L.; MIELENZ, J.R.; NOOKAEW, I.; BROWN, S.D.; TSCHAPLINSKI, T.J.; USSERY, D.; HETTICH, R.L. Integrated omics analyses reveal the details of metabolic adaptation of *Clostridium thermocellum* to lignocellulose-derived growth inhibitors released during the deconstruction of switchgrass. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, n. 14, p.1–14, 2017.
- PU, Y.; HALLAC, B.; RAGAUSKAS, A.J. Plant Biomass Characterization: Application of Solution- and Solid-state NMR Spectroscopy. In *Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals*, 2013.
- RA, C.H.; JEONG, G.T.; SHIN, K.M.; KIM, S.K. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. **Bioresour Technol**, v. 140, p. 421-425, 2013.
- RABELO, S.C. Avaliação e Otimização de Pré-Tratamentos e Hidrólise Enzimática do Bagaço de Cana-de-Açúcar para Produção de Etanol de Segunda Geração, Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (tese de doutorado), 2010.
- RIVERA E.C.; COSTA A.C.; ANDRADE R.R.; ATALA D.I.P.; MAUGERI F.; MACIEL FILHO R. Development of adaptive modeling techniques to describe the temperature-dependent kinetics of biotechnological processes. **Biochem Eng J**, 36:157–66, 2007.
- RIVERA, E.C., COSTA, A.C., ATALA, D.I.P., MAUGERI, F., MACIEL, M.R.W., FILHO, R.M. Evaluation of optimization techniques for parameter estimation: Application to ethanol fermentation considering the effect of temperature. **Process Biochem**, v. 41, p. 1682–1687, 2006.
- RIVERA, E.C., YAMAKAWA, C.K., SAAD, M.B.W., ATALA, D.I.P., AMBROSIO, W.B., BONOMI, A., JUNIOR, J., ROSSELL, C.E.V. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochem Eng J** v. 119, p. 42–51, 2017.

- ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass Bioenerg**, v. 35, p. 663-670, 2011.
- ROCHE, C.M.; GLASS, N.L.; BLANCH, H.W.; CLARK, D.S. Engineering the filamentous fungus *Neurospora crassa* for lipid production from lignocellulosic biomass. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 6, p. 1097–1107, 2014.
- ROE, A.J.; MCLAGGAN, D.; DAVIDSON, I.; O'BYRNE, C.; BOOTH, I.R. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. **J Bacteriol**, v. 180, p. 767–72, 1998.
- ROQUE, L.R.; MORGADO, G.P.; NASCIMENTO, V.M.; IENCZAK, J.L.; RABELO, S.C. Liquid-liquid extraction: A promising alternative for inhibitors removing of pentoses fermentation. **Fuel**, v. 242, p. 775-787, 2019.
- ROSSELL, C.E.V.; JUNIOR, J.N.; YAMAKAWA, C.K. Processo e equipamento para fermentação contínua multiestágio com recuperação, reativação e reciclo de fermento para obtenção de vinhos com alto teor alcoólico. Patent WO2014078924A1.
- SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresour Technol**, v.99, p. 5270-5295, 2008.
- SANCHEZ, R.G.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; NOGUE, V.S.; ALMEIRA, J.R.M.; LARSSON, C.U.; BENGTSSON, O.; BETTIGA, M.; HAHN-HAGERDAL, B.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. **Biotechnol Biofuels**, v. 3, p. 11, 2010.
- SANTORO, D.C.J.; ASSIS, T.; DIONÍSIO, S.R.; IENCZAK, J.L.; RABELO, S.C. Scaling up dilute sulfuric acid pretreatment for sugarcane bagasse bioethanol production. In: 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2015, San Diego. 37th Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2015.
- SANTOS, S.C.; DIONÍSIO, S.R.; DE ANDRADE, A.L.D.; ROQUE, L.R.; DA COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Fermentation of xylose and glucose mixture in intensified reactors by *Scheffersomyces stipitis* to produce ethanol. **Int J Biol, Veterinary and Agricultural Engineering**, v. 9, no 5, p. 482-487, 2015.
- SANTOS, S.C.; SOUSA, A.S.; DIONÍSIO, S.R.; TRAMONTINA, R.; RULLER, R.; SQUINA, F.M.; ROSSELL, C.E.V.; DA COSTA, A.C.; IENCZAK, J.L. Bioethanol production by recycled *Scheffersomyces stipitis* in sequential batch fermentations with high cell density using xylose and glucose mixture. **Bioresour Technol**, v. 219, p. 319-329, 2016.

- SCISTYLE. Lignocellulose. Disponível em: <<http://portfolio.scistyle.com/Lignocellulose>>. Acesso em: 28 ago. 2018.
- SCORDIA, D.; COSENTINO, S.L.; LEE, J.W.; JEFFRIES, T.W. Bioconversion of giant reed (*Arundo donax* L.) hemicellulose hydrolysate to ethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS6054. **Biomass Bioenerg**, v. 39, p. 296-305, 2012.
- SHEN, Y.; CHEN, X.; PENG, B.; CHEN, L.; HOU, J.; BAO, X. An efficient xylose-fermenting recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained through adaptive evolution and its global transcription profile. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 96, p. 1079-1091, 2012.
- SHINDO, S.; NISHIDA, T. Production of bioethanol with novel fermentation system using high temperature tolerance *Schizosaccharomyces japonicus* and *Pichia stipitis* from cellulosic biomass. **New Biotechnol**, v. 29S, p. 545, 2012.
- SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**, São Paulo, v. 2, p. 123-178, 2001
- SILVA, J.P.A. Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz. 144 f. **Dissertação (mestrado em Biotecnologia Industrial)** – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2007.
- SILVA, J.P.A.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C.; TEIXEIRA, J.A. Fermentation medium and oxygen transfer conditions that maximize the xylose conversion to ethanol by *Pichia stipitis*. **Renew Energ**, v. 37, p. 259-265, 2012.
- SILVA, V.F.N.; NAKANISHI, S.C.; DIONÍSIO, S.R.; ROSSELL, C.E.V.; IENCZAK, J.L.; GONÇALVES, A.R.; ROCHA, G.J.M. Using cell recycling batch fermentations to validate a setup for cellulosic ethanol production. **J Chem Technol Biotechnol**, v. 91, n.6, 2015.
- SLININGER, P.J.; DIEN, B.S.; LOMONT, J.M.; BOTHAST, R.J.; LADISCH, M.R.; OKOS, M.R. Evaluation of a kinetic model for computer simulation of growth and fermentation by *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* fed D-xylose. **Biotechnol Bioeng**, v. 111, n. 8, p. 1532-1540, 2014.
- SLININGER, P.J.; THOMPSON, S.R.; WEBER, S.; LIU, Z. L.; MOON, J. Repression of xylose-specific enzymes by ethanol in *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* and utility of repitching xylose-grown populations to eliminate diauxic lag. **Biotechnol Bioeng**, v. 8, p. 1801-1815, 2011.
- SLUITER, J.B.; CHUM, H.; GOMES, A.C.; TAVARES, R.P.A.; AZEVEDO, V.; PIMENTA, M.T.B.; *ET AL.* Evaluation of brazilian sugarcane bagasse characterization: na interlaboratory comparison study. **J AOAC Int**2016.

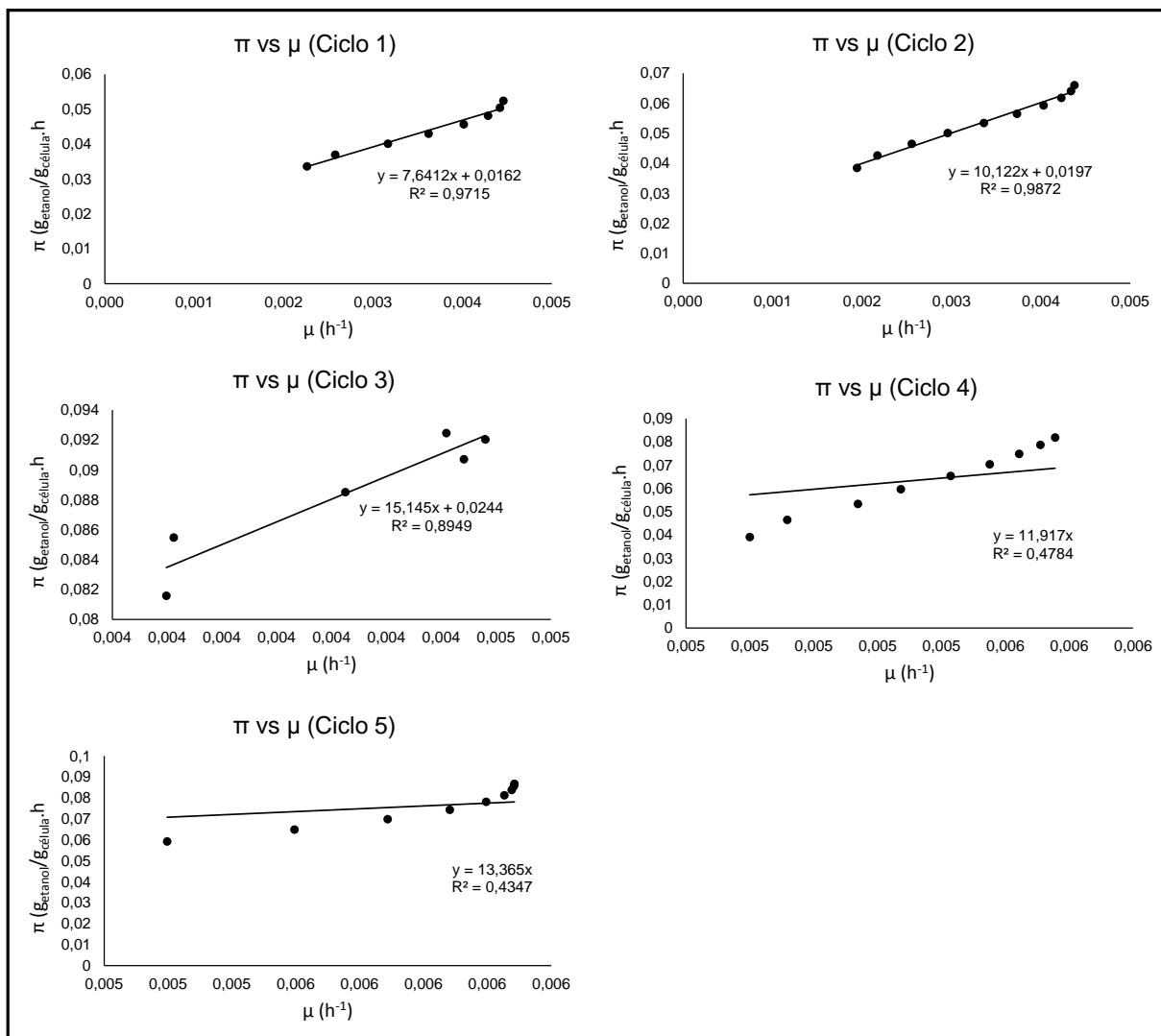
- SOARES, L.B. O efeito de inibidores do hidrolisado hemicelulósico e seu impacto no desempenho da fermentação etanólica de *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124 e *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907. Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP. Campinas-SP (Dissertação de mestrado), 2018.
- STADTMAN, E.R.; BERLETT, B.S. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. **Chem Res Toxicol**, v. 10(5), p. 485-494, 1997.
- STORN, R., PRICE, K. Differential Evolution - A Simple and Efficient Heuristic for Global Optimization over Continuous Spaces. **J Glob Optim**, v. 11, p. 341–359, 1997.
- STORZ, G.; CHRISTMAN, M.K.; SIES, H.; AMES, B.N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. **Proc Natl Acad Sci**, v. 84, p. 8917-8921, 1987.
- SU Y.K.; WILLIS, L.B.; JEFFRIES, T.W. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 e *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. **Biotechnol Bioeng**, v. 112, n. 3, p. 457-469, 2015.
- SZEIFERT, F.; CHOVAN, T.; NAGY, L. Process dynamics and temperature control of fed-batch reactors. **Comput. Chem Eng**, v. 19, p. 447–452, 1995.
- TAHERZADEH, M.J.; KARIMI, K. Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Process. Chapter 12 - Fermentation Inhibitors in Ethanol Process and Different Strategies to Reduce Their Effects, p. 287-311, 2011.
- TAKAHASHI-ÍÑIGUEZ, T.; ABURTO-RODRÍGUEZ, N.; VILCHIS-GONZÁLEZ, A.L.; FLORES, M.E. Function, kinetic properties, crystallization, and regulation of microbial malate dehydrogenase. **Biomed & Biotechnol**, v. 17(4), p. 247-261, 2016.
- TIWARI, S.; THAKUR, R.; SHANKAR, J. Role of Heat-Shock Proteins in Cellular Function and in the Biology of Fungi. **Biotechnol Res Int**, 2015, 2015:132635.
- TUFFIN, M.I.; BURTON, S.G.; ELEY, K.L.; COWAN, D.A.; MARTIN, S.; TAYLOR, M.P. Thermophilic ethanologeneses: future prospects for second-generation bioethanol production. **Trends Biotechnol**, v. 27, n. 7, p. 398–405, 2009.
- TYE, Y.Y., LEE, K.T., WAN ABDULLAH, W.N., LEH, C.P. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. **Renew Sust Energ Rev**, v. 60, p. 155-172, 2016.

- UNREAN, P. Bioprocess modelling for the design and optimization of lignocellulosic biomass fermentation. **Bioresour Bioprocess**, v. 3, n. 1. 2016.
- VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R.P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 91, n. 6, p. 1477–1492, 2011.
- VAN EYLEN, D.; VAN DONGEN, F.; KABEL, M.; DE BONT, J. Corn fiber, cobs and stover: Enzyme-aided saccharification and co-fermentation after dilute acid pretreatment. **Bioresour Technol**, v. 102, n.10, p. 5995–6004, 2011
- VASCONCELOS, S. M.; SANTOS, A. M. P.; ROCHA, G. J. M.; SOUTO-MAIOR, A. M. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based. **Bioresour Technol**, v.135, p. 46-52, 2013.
- VELMURUGAN, P.; HUR, H.; BALACHANDAR, V.; KAMALA-KANNAN, S.; LEE, K.J.; LEE, S.M.; CHAE, J.C.; SHEA, P.J.; OH, B. T. Monascus pigment production by solid-state fermentation with corn cob substrate. **J Biosci and Bioeng**, v. 112, n.6, p. 590–594, 2011.
- VERAS, H.C.T.; PARACHIN, N.S.; ALMEIDA, J.R.M. Comparative assessment of fermentative capacity of diferente xylose-consuming yeasts. **Microb Cell Factor**, v. 16, n. 01, 2017.
- VILLÉN J.; GYGI S.P.; The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. **Nat Protoc**, v. 3, n. 10, p. 1630-1638, 2008.
- VONGSUVANLERT, V., TANI, Y. Purification and characterization of xylose isomerase of a methanol yeast, *Candida boidinii*, which is involved in sorbitol production from glucose. **Agric Biol Chem**, v. 52, n. 7, p. 1817–1824, 2011.
- WANG J.; CHAE, M.; SAUVAGEAU, D.; BRESSLER, D.C. Improving ethanol productivity through self-cycling fermentation of yeast: a proof of concept. **Biotechnol Biofuels**, v. 10, p. 1–11, 2017.
- WESTEMAN, J.O.; TAHERZADEH, M.J.; FRANZÉN, C.J. Inhibitor tolerance and flocculation of a yeast strain suitable for second generation bioethanol production. *Electron J Biotechn*, v. 15, n. 3, p. 1-14, 2012.
- WOHLBACH, D.J.; KUO, A.; SATO, T.K.; POTTS, K.M.; SALAMOV, A.A.; LABUTTI, K.M.; SUN, H.; CLUM, A.; PANGINILAN, J.L.; LINDQUIST, E.A. AND OTHERS. Comparative genomics of xylose-fermenting fungi for enhanced biofuel production. **Proc Natl Acad Sci, USA.**, v. 108, n. 32, p. 13212-13217, 2011.

- XIONG, M.; CHEN, G.; BARFORD, J. Alteration of xylose reductase coenzyme preference to improve ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* from high xylose concentrations. **Bioresour Technol**, v. 102, p. 9206-9215, 2011.
- XU, J.; HU, F.L.; WANG, W.; WAN, X.C.; BAO, G.H. Investigation on biochemical compositional changes during the microbial fermentation process of Fu brick tea by LC-MS based metabolomics. **Food Chem**, v. 186, p. 176–184, 2015.
- ZABED, H.; SAHU, J. N.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. **Renew Sust Energ Rev**, v. 66, p. 751–774, 2016.
- ZALDIVAR, J., NIELSEN, J., OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 56, n. 1–2, p. 17–34, 2001.
- ZHANG, Z.; MA, X; YU, J. ZHANG, X.; TAN, T. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse. **Bioresour Technol**, v. 102, n. 6, p. 4585-4589, 2011.
- ZHANG, Z.; O`HARA, I. M.; DOHERTY, Q.O.S. Pretreatment of sugarcane bagasse by acid-catalysed process in aqueous ionic liquid solutions (Report) **Bioresour Technol**, v. 120 p. 149-156, 2012.
- ZHAO, J.; WANG, M.; YANG, Z.; GONG, Q.; LU, Y.; YANG, Z. Mediated electrochemical measurement of the inhibitory effects of furfural and acetic acid on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae*. **Biotechnol Lett**, v. 27, p. 207–11, 2005.
- ZHOU, H.; CHENG, J-S.; WANG, B.L.; FINK, G.R.; STEPHANOPOULOS, G. Xylose isomerase overexpression along with engineering of the pentose phosphate pathway and evolutionary engineering enable rapid xylose utilization and ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Metab Eng**, v. 14, p. 611–22, 2012.

ANEXO I

Figura A.1 Gráficos de π em função de μ para os cinco ciclos de fermentação em batelada alimentada com *S. passalidarum* (Capítulo 3).



ANEXO II

Tabela A.1 Comparação entre resultados obtidos no presente trabalho e trabalhos da literatura para produção de etanol a partir de substratos ricos em xilose.

| Accession number (NCBI) | Proteínas | Condições |
|-------------------------|--|-----------------|
| gb EAZ63947.2 | cell wall protein in family of putative glycosidases Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase, partial | 33% |
| gb ABN67333.2 | chitinase 2 precursor, partial | 33% |
| gb ABN64958.2 | family 18 glycosyl hydrolase, partial | 33% |
| gb ABN68448.1 | formate dehydrogenase-like protein | 33% |
| gb ABN67731.2 | Glucan 1,3-beta-glucosidase precursor (Exo-1,3-beta-glucanase) | 33% |
| gb ABN65806.2 | Glucoamylase 1 precursor (Glucan 1,4-alpha-glucosidase) (1,4-alpha-D-glucan glucohydrolase) | 33% |
| gb EAZ63533.1 | Glycoside hydrolase, family 17 | 33% |
| gb ABN68630.2 | predicted protein | 33% |
| gb EAZ62917.1 | protein involved in control of DNA replication | 33% |
| gb ABN67031.2 | putative beta-glucosidase Septation protein SUN4 precursor (Soluble cell wall protein 3) SIM1 (putative) | 33% |
| gb EAZ63470.1 | riboflavin aldehyde-forming enzyme, partial | 33% |
| gb ABN66802.1 | Thioredoxin reductase | 33% |
| emb CAX28338.1 | unnamed protein product | 33% |
| gb ABN68401.1 | 40S ribosomal protein | 67% |
| gb EAZ62870.1 | Malate synthase, glyoxysomal (MASY) | 67% |
| gb ABN66810.1 | nucleoside diphosphate kinase | 67% |
| gb ABN64423.1 | plasma membrane H ⁺ -ATPase | 67% |
| gb EAZ63042.1 | ribosomal protein L8B (L4B) (rp6) (YL5) | 67% |
| gb ABN66965.1 | ribosomal protein S18B | 67% |
| gb ABN68456.1 | protoplast secreted protein 2 precursor | 33 e 100% |
| gb ABN65890.1 | acyl-coA-binding protein | 33 e 67% |
| gb ABN64394.2 | Agglutinin-like protein 1 precursor, partial | 33 e 67% |
| gb ABN68733.1 | dehydrogenase | 33 e 67% |
| gb EAZ63577.1 | F1F0-ATPase complex, F1 alpha subunit | 33 e 67% |
| gb ABN64899.1 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 33 e 67% |
| gb ABN64681.2 | hypothetical protein PICST_42277 | 33 e 67% |
| gb ABN67049.1 | NAPDH dehydrogenase (old yellow enzyme) (EPB1) | 33 e 67% |
| gb ABN66075.1 | superoxide dismutase (Cu-Zn) | 33 e 67% |
| emb CAA01269.1 | xylitol dehydrogenase | 33 e 67% |
| gb ABN66675.1 | 3-phosphoglycerate kinase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63168.1 | 6-phosphogluconate dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66557.1 | acetyl-CoA acetyltransferase | 33, 67 e 100% |

| | | |
|----------------|--|------------------|
| gb ABN67097.2 | Acetyl-CoA hydrolase (Acetyl-CoA deacylase) (Acetyl-CoA acylase) | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68051.1 | Aconitase, mitochondrial | 33, 67 e 100% |
| gb ABN67976.2 | adjacent to HXT4 | 33, 67 e 100% |
| emb CAA73827.1 | alcohol dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68174.1 | aldo/keto reductase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63967.1 | aspartate aminotransferase | 33, 67 e 100% |
| gb AAB86817.3 | cytochrome c | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65770.2 | Cytochrome c oxidase polypeptide IV, mitochondrial precursor | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65755.1 | Cytochrome c oxidase polypeptide vib | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64825.1 | Elongation factor | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63326.2 | Endo-1,4-beta-glucanase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64663.1 | enolase I | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65951.1 | F1F0-ATPase complex, F1 beta subunit | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63480.1 | fructose-bisphosphate aldolase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68043.1 | Glucokinase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68020.2 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64626.1 | glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68431.1 | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63599.1 | heat shock protein 70 | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66123.1 | Inorganic pyrophosphatase (Pyrophosphate phospho- hydrolase) (PPase) | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66739.1 | methionine-synthesizing 5- methyltetrahydropteroyltriglutamate- -homocysteine methyltransferase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63916.2 | mitochondrial malate dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ62982.1 | NAD-dependent malate dehydrogenase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65443.2 | NADH:flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63097.1 | nascent-polypeptide-associated complex beta subunit | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68403.1 | Oxygen-repressed protein | 33, 67 e 100% |

| | | |
|----------------|---|------------------|
| gb ABN67881.1 | phosphoglucoisomerase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65289.1 | phosphoglucomutase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64290.1 | phosphoglycerate mutase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64489.1 | predicted protein | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68346.1 | predicted protein | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68327.1 | predicted protein | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68342.1 | predicted protein | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66599.1 | pyruvate kinase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN67567.1 | regulation of redox homeostasis | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66727.2 | secondary alcohol dehydrogenase (SADH2) | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64283.1 | subunit VI of cytochrome c oxidase | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63336.1 | succinate-CoA ligase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN64459.1 | succinate--CoA ligase (GDP-forming) beta chain (LSC2) | 33, 67 e 100% |
| gb EAZ63193.1 | thioredoxin | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68690.1 | transaldolase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN68356.1 | Triosephosphate isomerase (TIM) (Triose-phosphate isomerase) | 33, 67 e 100% |
| emb CAY37660.1 | unnamed protein product | 33, 67 e 100% |
| emb CBM36760.1 | unnamed protein product | 33, 67 e 100% |
| emb CBM39980.1 | unnamed protein product | 33, 67 e 100% |
| gb ABN66975.1 | WD repeat protein | 33, 67 e 100% |
| emb CAA01268.1 | xylose reductase | 33, 67 e 100% |
| gb ABN65375.1 | adenosine kinase | 67 e 100% |
| gb ABN68070.2 | aspartate aminotransferase | 67 e 100% |
| gb ABN68698.1 | citrate synthase (CISY) | 67 e 100% |
| gb ABN64658.1 | Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha) | 67 e 100% |
| gb ABN66698.1 | Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A) (eIF-4D) | 67 e 100% |
| gb ABN67791.1 | heat shock protein 70, Hsp70 family (SSA2) | 67 e 100% |
| gb ABN65656.1 | Isocitrate dehydrogenase [NADP] peroxisomal (Oxalosuccinate decarboxylase) (IDH) (PS-NADP-IDH) (CtIDP2) | 67 e 100% |
| gb ABN68734.1 | manganese-superoxide dismutase | 67 e 100% |

| | | |
|----------------|--|-----------|
| gb ABN66017.2 | NADH-cytochrome b-5 reductase | 67 e 100% |
| gb ABN66288.1 | ornithine aminotransferase | 67 e 100% |
| gb ABN65476.1 | phosphoenolpyruvate carboxykinase | 67 e 100% |
| gb EAZ63500.1 | ribosomal protein S6A (S10A) (rp9) (YS4) | 67 e 100% |
| gb EAZ63868.2 | thioredoxin | 67 e 100% |
| emb CBM39544.1 | unnamed protein product | 67 e 100% |